

Université de Sherbrooke

**RECOMBINAISON À HAUTE FRÉQUENCE INDUITE PAR
L'ANTIGÈNE GRAND T DES PAPOVAVIRUS**

par

LUC ST-ONGE

Département de microbiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Novembre 1992



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-81882-4

Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	i
LISTE DES FIGURES	iv
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
RÉSUMÉ	viii
INTRODUCTION	1
MATÉRIELS ET MÉTHODES	16
I. Plasmides recombinants	16
II. Lignées cellulaires	19
1. Transfection des lignées cellulaires Hy2 et Hy5	19
2. Cellules fibroblastiques d'embryon de rat	20
III. Identification des antigènes de virus du polyome dans des cellules transformées	21
1. Immunoprécipitation des antigènes T du virus du polyome	21
2. Détection de l'activité kinasique associée à l'antigène T moyen	23
IV. Caractérisation du patron d'intégration de l'ADN viral dans l'ADN génomique des cellules transformées	25
1. Extraction de l'ADN chromosomique des cellules transformées	25
2. Transfert de l'ADN chromosomique sur membrane de nylon (Southern blotting)	26
3. Préhybridation et hybridation de la membrane de nylon	26
4. Préparation d'une sonde radioactive	27

V.	Détermination <i>in vivo</i> de l'efficacité de réplication de l'ADN plasmidique	28
	1. Extraction de l'ADN épisomique des lignées Hy5, 3T6 et des cellules primaires de rat	28
	2. Mesure indirecte de l'efficacité de réplication de l'ADN recombinant	28
VI.	Analyse de l'expression du gène T moyen dans les cellules transformées	29
	1. Extraction de l'ARN cytoplasmique	29
	2. Préparation d'une ribosonde radioactive	30
	3. Essai de protection aux ribonucléases A et T ₁	31
VII.	Liaison de l'antigène grand T à l'ADN bicaténaire	33
	1. Préparation des extraits nucléaires et immunoprécipitation de l'antigène grand T	33
	2. Liaison à l'ADN	34
	RÉSULTATS	35
I.	Stratégie utilisée pour observer la recombinaison homologue dans les cellules de mammifère	35
II.	Étude de la recombinaison homologue dans la lignée Hy2	37
	1. Description de la lignée cellulaire Hy2	37
	2. Recombinaison spontanée	39
	3. Effet de l'antigène grand T du virus du polyome	40
	4. Effet de l'antigène grand T de SV40	49
III.	Étude de l'amplification des séquences virales de la lignée Hy2 par l'antigène grand T ts-a du virus du polyome	50
	1. Établissement de la lignée Hy2-ts5	50
	2. Analyse de l'expression des antigènes tumoraux dans les cellules Hy2-ts5	55
	3. Analyse de la structure des inserts viraux	55
	4. Taux de recombinaison induit par l'antigène grand T	60
	5. Mécanisme de recombinaison	61
IV.	Étude de la recombinaison homologue dans la lignée Hy5	64
	1. Description de la lignée cellulaire Hy5	64

2. Recombinaison spontanée	66
3. Effet de l'antigène grand T du virus du polyome	75
4. Effet de l'antigène grand T de SV40	79
V. Effet de la méthylation sur la recombinaison homologue	84
DISCUSSION	89
REMERCIEMENTS	106
BIBLIOGRAPHIE	107

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Structure génomique de la souche A2 du virus du polyome.	4
Figure 2.	Amplification et excision d'ADN selon le modèle de la pelure d'oignon.	11
Figure 3.	Recombinaison homologue intramoléculaire.	13
Figure 4.	Représentation des divers plasmides utilisés.	17
Figure 5.	Stratégie utilisée pour étudier la recombinaison homologue.	36
Figure 6.	Analyse par blot de Southern de l'ADN des transformants spontanés de la lignée Hy2.	38
Figure 7.	Analyse de la structure des séquences virales dans la lignée Hy2.	43 44
Figure 8.	Efficacité de réplication des antigènes grand T mutants.	46
Figure 9.	Analyse de la structure des séquences virales dans la lignée Hy2 transfectée avec des mutants de l'antigène grand T inactifs pour l'initiation de la réplication virale.	47
Figure 10.	Liaison des antigènes grand T mutants à l'origine de réplication virale.	48
Figure 11.	Analyse des cellules Hy2 transformées par l'antigène grand T de SV40.	51
Figure 12.	Activité de l'antigène grand T ts-a du virus du polyome dans la lignée Hy2.	54
Figure 13.	Détection des antigènes tumoraux du virus du polyome dans la lignée Hy2-ts5.	56
Figure 14.	Analyse des inserts viraux dans la lignée Hy2-ts5.	57
Figure 15.	Analyse des transformants de la lignée Hy2-ts5 par l'enzyme BglII.	59
Figure 16.	Analyse des produits de recombinaison de la lignée Hy2-ts5.	62

Figure 17.	Produits de recombinaison obtenus après un échange inégal entre chromatides-soeurs.	63
Figure 18.	Recombinaison homologue dans la lignée Hy5.	65
Figure 19.	Analyse de la lignée Hy5 subissant la recombinaison spontanée.	68
Figure 20.	Identification d'un événement de conversion génique dans la lignée Hy5.	69
Figure 21.	Analyse des transformants spontanés de la lignée Hy5 avec l'enzyme HindIII.	71
Figure 22.	Détection des antigènes tumoraux du virus du polyome dans la lignée Hy5.	73
Figure 23.	Niveau d'expression du gène <i>pmt-dl1</i> dans les transformants spontanés de la lignée Hy5.	74
Figure 24.	Analyse de la structure de l'insert <i>pmt</i> dans les cellules Hy5 transfectées avec l'antigène grand T du virus du polyome.	77
Figure 25.	Analyse des cellules Hy5 transformées par l'antigène grand T de SV40.	80
Figure 26.	Analyse des cellules Hy5 transformées avec les mutants C11A et C6-2 de l'antigène grand T de SV40.	83
Figure 27.	Analyse du degré de méthylation de l'insert <i>pmt</i> dans le sous-clone Hy5-13.	86
Figure 28.	Modèles de recombinaison homologue dans la lignée Hy2.	96
Figure 29.	Conversion génique au niveau de l'insert <i>pmt</i> de la lignée Hy5.	99
Figure 30.	Échange inégal entre chromatides-soeurs au niveau de l'insert <i>pmt</i> de la lignée Hy5.	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Activité des mutants de l'antigène grand T du virus du polyome dans la lignée Hy2.	42
Tableau 2.	Activité des mutants de l'antigène grand T de SV40 dans la lignée Hy2.	52
Tableau 3.	Activité des mutants de l'antigène grand T du virus du polyome dans la lignée Hy5.	76
Tableau 4.	Activité des mutants de l'antigène grand T de SV40 dans la lignée Hy2.	81
Tableau 5.	Activité des mutants de l'antigène grand T du virus du polyome dans différents sous-clones de la lignée Hy5.	86

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARN _t	Acide ribonucléique de transfert
BSA	Albumine bovine
°C	Degré celsius
cm	Centimètre
cpm	Coups par minute
DDT	Dithiothréitol
DMEM	Milieu Eagle modifié par Dulbecco
DMEM complet	DMEM + 10% sérum de veau foétal + 5% fongizone
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate
Hepes	Acide N-2-hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthanesulfonique
kb	Kilo paires de bases
kDd	KiloDalton
M	Molaire
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
mm	Millimètre
nm	Nanomètre
NP-40	Nonidet P-40
nt	Nucléotide
pb	Paire de bases
PIPES	Piperazine-N,N'-bis[acide 2-éthanesulfonique]
PMSF	Phénylméthylsulfonylfluoride
PVP	Polyvinylpyrrolidone
p/v	Poids/volume
rpm	Révolution par minute
SDS	Sodium dodécyl sulfate
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
Tris	Hydroxyméthyl-aminométhane
μCi	MicroCurie
μg	Microgramme
μl	Microlitre
v/v	Volume/volume

RÉSUMÉ

Afin de définir les mécanismes par lesquels les antigènes grand T des papovavirus induisent la recombinaison dans les cellules de mammifère, nous avons construit deux lignées cellulaires permettant d'étudier la recombinaison homologe entre un tandem tête-à-queue de gènes T moyen du virus du polyome inactifs pour la transformation néoplasique. Ces lignées ont été nommées Hy2 et Hy5. Une recombinaison homologe entre les séquences répétées de T moyen devrait restaurer un gène intact capable de transformer la cellule. La reconstitution d'un gène T moyen fonctionnel par recombinaison spontanée se produit avec un taux qui se situe entre 10^{-7} et 10^{-5} événement par génération cellulaire. Dans la lignée Hy2, la recombinaison reconstitue un gène T moyen entre les deux copies défectueuses du gène. Dans la lignée Hy5, la recombinaison spontanée se produit surtout entre les séquences plasmidiques de l'insert viral provoquant ainsi l'inversion d'un des gènes T moyen inactifs. Cette inversion augmente l'expression du gène défectueux et la surproduction d'antigène T moyen mutant transforme la cellule.

L'introduction de l'antigène grand T du virus du polyome augmente de 10 000 à 1 000 000 de fois le taux de recombinaison dans les lignées Hy2 et Hy5. L'antigène grand T de SV40 induit aussi une recombinaison à haute fréquence en dépit du fait qu'il ne puisse pas initier la synthèse de l'ADN à l'origine de réplication du virus du polyome. Des mutants de l'antigène grand T du virus du polyome inactifs pour l'initiation de la réplication virale provoquent également une recombinaison de l'insert viral dans les deux lignées. Mes résultats montrent que la recombinaison est indépendante des fonctions répliquatives de grand T et ne nécessite pas l'amplification des séquences virales. La restauration d'un gène T moyen n'est donc pas le résultat du modèle de la structure en pelure d'oignon.

Dans la lignée Hy2, nous proposons que la recombinaison reconstitue un gène T moyen intact entre les deux copies défectueuses par des mécanismes de "slipped-strand mispairing" et d'échange inégal au niveau de l'insert. Dans la lignée Hy5, la restauration d'un gène T moyen intact est plutôt le résultat d'échange inégal entre chromatides-soeurs, de conversion génique et d'événements de recombinaison complexes. Un de ces événements mène à la perte d'un fragment acentrique et la formation d'un chromosome dicentrique. Mes résultats permettent de mieux comprendre comment l'antigène grand T induit la formation d'aberrations chromosomiques dans des cellules transformées. Finalement, je discute d'une relation possible entre le degré de méthylation d'une région d'ADN et son influence sur l'efficacité de recombinaison homologue dans les cellules de mammifère.

INTRODUCTION

Le cancer est l'aboutissement d'un processus progressif impliquant de nombreux événements indépendants (Bishop, 1987, 1991; Hunter, 1991). Chaque événement est le résultat d'altérations génétiques qui modifient la structure et l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la division et de la différenciation cellulaire. On retrouve deux catégories de gènes impliqués dans la carcinogenèse: les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs . Les oncogènes sont des gènes cellulaires normaux (proto-oncogènes) qui subissent des mutations dominantes permettant l'acquisition de fonctions nécessaires à la transformation néoplasique et à la formation de tumeurs. L'activation illégitime d'un oncogène peut se produire par mutation ponctuelle, insertion rétrovirale, translocation chromosomique ou amplification du gène (Testa, 1990; Solomon *et al.*, 1991; Makela et Alitalo, 1986; Klein et Klein, 1984). Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes qui exercent un contrôle négatif sur la prolifération cellulaire (Klein, 1989; Marshall, 1991). Leur inactivation par des mutations ponctuelles ou leur perte par des délétions contribuent au développement et à la progression des tumeurs.

Un problème important dans l'étude de la carcinogenèse est de déterminer comment les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs contribuent à la transformation des cellules et comment leurs divers modes d'action sont reliés. À cet égard, les virus oncogènes à ADN constituent un modèle de choix pour l'étude de la carcinogenèse car un petit nombre de protéines virales est suffisant pour initier la transformation cellulaire et la formation de tumeurs chez les animaux (Tooze, 1981; Salzman, 1986; Villarreal, 1989). Ces virus ont permis d'identifier deux étapes de la carcinogenèse *in vitro*: l'immortalisation et la transformation. Généralement, l'immortalisation est assurée par des protéines nucléaires qui confèrent un potentiel de croissance

illimité aux cellules primaires, tandis que la transformation est assurée par des protéines cytoplasmiques qui permettent aux cellules d'acquérir des propriétés néoplasiques telles que des changements morphologiques, la perte d'inhibition de contact et l'indépendance d'ancrage (Bastin, 1992).

Dans plusieurs cellules cancéreuses, la recombinaison et l'amplification jouent un rôle important dans la modification de l'expression des proto-oncogènes (Solomon *et al.*, 1991; Schramayr *et al.*, 1990; Mäkelä et Alitalo, 1986; Yunis, 1987). Certains oncogènes dits immortalisants augmentent la fréquence de recombinaison et provoquent l'apparition de caryotypes anormaux dans les cellules (Cerni *et al.*, 1986; Caporossi et Baccetti, 1990). Dans ce travail, nous avons étudié la fonction et le mécanisme par lesquels un oncogène viral, l'antigène grand T du virus du polyome, induit la recombinaison homologue au niveau du génome des cellules de mammifère.

Le virus du polyome est un membre de la famille des *papovaviridae* (Tooze, 1981). Son hôte naturel est la souris. Dans des cellules de souris dites permissives, le virus du polyome adopte un cycle vital lytique où il y a réplication du génome viral et production de virions infectieux. Des cellules non-permissives telles que des cellules de singe sont incapables d'assumer la réplication du virus. Les cellules de rat et de hamster apparaissent comme intermédiaires. Elles sont dites semi-permissives car elles permettent un faible niveau de réplication. L'ADN du virus peut s'intégrer dans le génome cellulaire que les cellules soient permissives, semi-permissives ou non-permissives, et provoquer ainsi une transformation néoplasique des cellules. Toutefois, l'intégration est un phénomène rare qui ne se produit que dans un tout petit nombre de cellules. Dans les rats et les hamsters, une telle intégration du génome viral peut induire la formation de tumeurs (Tooze, 1981).

Le virus du polyome est formé d'une capsidie protéique icosaèdre contenant un ADN bicaténaire circulaire de 5292 nucléotides (figure 1a). Le génome viral est divisé en deux régions: une région précoce exprimée avant la réplication virale et une région tardive exprimée après la réplication virale. Les deux régions sont séparées par des séquences régulatrices qui contrôlent l'expression et la réplication du génome viral (Tyndall *et al.*, 1978; Luthman *et al.*, 1982). Ces séquences comprennent (figure 1b) un élément enhancer, une origine de réplication de même que les promoteurs tardif et précoce (Soeda *et al.*, 1980). Le promoteur précoce est composé d'une boîte CAAT et d'une boîte TATAA dirigeant l'initiation de la transcription des gènes précoces aux nucléotides 148 et 153 (Heiser et Eckhart, 1982; Kamen *et al.*, 1982; Cowie *et al.*, 1982). Le promoteur tardif ne possède pas de boîte TATAA de sorte que l'initiation de la transcription tardive se fait à 15 endroits différents entre les nucléotides 5075 et 5170 (Cowie *et al.*, 1981). L'élément enhancer est une séquence d'ADN qui stimule la transcription virale indépendamment de sa distance ou de son orientation vis-à-vis le promoteur (Khoury et Gruss, 1983). L'enhancer du virus du polyome est divisé en sous-unités α et β (Mueller *et al.*, 1988) La sous-unité α possède des séquences homologues à l'enhancer du gène E1a d'adénovirus tandis que, la sous-unité β possède des séquences homologues à l'enhancer de SV40 (Herbomel *et al.*, 1984). Seulement une des sous-unités est suffisante pour exercer une régulation positive sur la transcription précoce et tardive (Mueller *et al.*, 1984). L'origine de réplication est composée de trois éléments essentiels (figure 1b): une séquence riche en résidus adénine/thymidine (A/T), une séquence organisée en épingle à cheveux et des répétitions imparfaites (Prives *et al.*, 1987). Ces éléments forment le coeur de l'origine quoiqu'une réplication efficace du génome nécessite aussi une des sous-unités de l'enhancer (deVilliers *et al.*, 1982; Muller, *et al.*, 1988).

Les régions tardive et précoce du génome sont transcrites dans des directions opposées de part

et d'autres des séquences régulatrices. La région tardive encode les protéines structurales VP1, VP2 et VP3 (Fine *et al.*, 1968; Gibson, 1974). La région précoce génère, par épissage alternatif, trois protéines de taille différente: les antigènes petit T, T moyen et grand T. Chacune de ces protéines possède des propriétés et des fonctions distinctes dans la carcinogenèse à étapes multiples.

L'antigène petit T est une protéine de 22 kDa retrouvée à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules infectées par le virus du polyome (Zhu *et al.*, 1984). Il est nécessaire au cycle lytique du virus. Petit T exerce un effet stimulant sur la réplication du génome viral (Tüler et Salomon, 1985; Templeton *et al.*, 1986; Berger et Winterberger, 1986; Ogris *et al.*, 1992). Toutefois, dans des essais *in vitro*, petit T inhibe la réplication virale (Carbone *et al.*, 1992). Dans la carcinogenèse, petit T complète l'antigène T moyen dans la transformation des cellules primaires en culture et dans l'induction de tumeurs chez des rats nouveaux-nés (Asselin *et al.*, 1983). Les propriétés biochimiques de petit T sont peu connues. L'antigène petit T forme un complexe avec les unités catalytique et régulatrice de la protéine phosphatase 2A (Pallas *et al.*, 1988, 1990). La protéine phosphatase 2A est une sérine phosphatase qui joue un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire. Il est possible que l'association avec petit T inactive la protéine phosphatase 2A ou change la spécificité de son substrat (Scheidtmann *et al.*, 1991a,b; Shenolikar et Nairn, 1991). Finalement, petit T semble modifier la structure du cytosquelette des cellules en culture pour réduire leur adhésion au support de plastique (Zhu *et al.*, 1984, Cuzin, 1984).

L'antigène T moyen est une phosphoprotéine cytoplasmique de 56 kDa associée aux membranes cellulaires (Ito *et al.*, 1977; Ito, 1979; Dilworth *et al.*, 1986). Cet antigène joue un rôle important dans la transformation néoplasique *in vitro* et dans la tumorigénèse *in vivo*. L'expression de T moyen seul confère le phénotype transformé aux cellules déjà établies en culture (Treisman *et al.*, 1981;

Mes et Hassell, 1982; Gélinas et Bastin, 1985). Toutefois, T moyen ne peut transformer efficacement des cellules primaires (telles que des cellules fibroblastiques d'embryon de rat) sans être complémenté par un second oncogène (Rassoulzadegan *et al.*, 1982). Pareillement, T moyen seul ne provoque pas de tumeurs lorsque son gène est injecté dans des rats nouveaux-nés (Asselin *et al.*, 1983, 1984). Cependant dans des souris transgéniques, T moyen induit à lui seul des hémangiomes, des adénocarcinomes mammaires et des tumeurs de la glande pituitaire (Bautch *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1988, 1989; Guy *et al.*, 1992). Dans la cellule transformée, T moyen forme des complexes avec les protéines cellulaires pp60^{c-src}, pp62^{c-yes} et pp59^{c-fyn} (Courtneidge et Smith, 1983; 1984; Kornbluth *et al.*, 1986, 1990; Courtneidge, 1989; Kypta *et al.*, 1988). L'association de T moyen avec le produit des gènes *c-src* et *c-yes* stimule leur activité tyrosine kinase et semble être essentielle au maintien du phénotype transformé. L'antigène T moyen active la propriété kinasique de *c-src* en empêchant la phosphorylation du résidu tyrosine 527 de *c-src* (Cartwright *et al.*, 1986; Cheng *et al.*, 1989). En effet, plusieurs études ont montré que la phosphorylation de la tyrosine 527 inhibe l'activité kinasique et la capacité transformante de *c-src* (Cartwright *et al.*, 1987; Cooper et King, 1986; Kmiecik et Shalloway, 1987; Piwnica-Worms *et al.*, 1987). Le complexe T moyen/pp60^{c-src} interagit avec et active l'enzyme phosphatidylinositol 3-kinase (Ptdlns 3-kinase) des cellules transformées (Whitman *et al.*, 1985, 1987; Courtneidge et Heber, 1987). La Ptdlns 3-kinase activée convertit le phosphatidylinositol en phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3-P). Le PI3-P semble être un second messenger important dans l'oncog nese et la régulation de la prolifération cellulaire (Whitman *et al.*, 1988; Kaplan *et al.*, 1988). L'antigène T moyen forme également un complexe avec la protéine phosphatase 2A (Pallas *et al.*, 1990; Ruediger *et al.*, 1992).

L'antigène grand T est une phosphoprotéine multifonctionnelle localisée dans le noyau des cellules infectées (Schaffhausen *et al.*, 1978; Silver *et al.*, 1978; Dilworth *et al.*, 1986). Dans le noyau,

grand T est retrouvé sous forme dimérique, tétramérique, hexamérique ou complexé avec plusieurs protéines cellulaires. Au cours du cycle lytique du virus, l'antigène grand T est impliqué au niveau de la stimulation de la synthèse de l'ADN cellulaire, de l'initiation de la réplication du génome viral (Francke et Eckhart, 1973; Schlegel et Benjamin, 1978), de la transactivation du promoteur tardif (Cogen, 1978; Farmerie et Folk, 1984; Kern *et al.*, 1986; Pannuti *et al.*, 1987) et de la répression de l'expression des gènes précoces. L'antigène grand T est capable de se lier à l'ADN bicaténaire de façon non spécifique cependant, il forme une liaison spécifique avec la région régulatrice du virus du polyome (Gaudray *et al.*, 1981; Pomerantz *et al.*, 1983; Cowie et Kamen, 1984; Prives *et al.*, 1987). Grand T possède une forte affinité pour le pentanucléotide $G_G^A GGC$ (Pomerantz et Hassell, 1984). La région régulatrice du virus contient 15 séquences $G_G^A GGC$ organisées en six sites de fixation pour grand T (figure 1b). Son affinité pour les sites 1, 2 et 3 est environ dix fois moins élevée que pour les sites A, B, et C (Cowie et Kamen, 1984; Scheller et Prives, 1985). L'attachement de grand T aux sites 1 et 2 est requise pour l'initiation de la réplication (Prives *et al.*, 1987) tandis que la répression de l'expression des gènes précoces requiert la fixation de grand T aux sites A et B (Farmerie et Folk, 1984; Dailey et Basilico, 1985). L'activation de l'expression des gènes tardifs par grand T ne semble pas nécessiter d'interaction directe avec l'ADN (Pannuti *et al.*, 1987). Toutefois, la transactivation du promoteur tardif est dépendante de la réplication de l'ADN viral (Cahill *et al.*, 1990).

L'antigène grand T possède également des activités ATPase et ADN hélicase intrinsèques (Gaudray *et al.*, 1981; Stahl *et al.*, 1986; Scheffner *et al.*, 1989). Cette dernière activité permet l'ouverture de l'ADN double brin au niveau de l'origine virale pour ainsi initier la réplication du génome viral (Dean *et al.*, 1987; Dodson *et al.*, 1987; Wold *et al.*, 1987). Ce que l'on sait sur la réplication du génome viral des papovavirus provient d'études faites avec l'antigène grand T de

SV40 (Fanning et Knippers, 1992). En présence d'ATP, deux hexamères de l'antigène grand T se fixent sur le coeur de l'origine (Mastrangelo *et al.*, 1989; Wessel *et al.*, 1992). Les deux hexamères dénaturent les répétitions imparfaites et changent la conformation des séquences A/T (Dean *et al.*, 1987; Borowiec et Hurwitz, 1988; Parson *et al.*, 1990). L'ATP est ensuite hydrolysé et grand T provoque la séparation complète des deux brins grâce à son activité hélicase. La protéine cellulaire RF-A se fixe à l'ADN monocaténaire et l'ouverture des deux brins permet l'entrée du complexe ADN polymérase α -primase (Stillman, 1989; Kenny *et al.*, 1989). L'ADN polymérase α s'associe avec l'antigène grand T pour initier la synthèse de l'ADN viral (Smale et Tjian, 1986; Dornreiter *et al.*, 1990). La phosphorylation de l'antigène grand T contrôle le niveau de son activité lors de l'initiation de la réplication virale (Prives, 1990). La protéine phosphatase 2A (PP2A) stimule la réplication virale en déphosphorylant les résidus sérine 120 et 123 de l'antigène grand T (Virshup *et al.*, 1989; Scheidtmann *et al.*, 1991b). La phosphorylation de ces résidus semble empêcher certaines interactions entre les deux hexamères de grand T liés à l'origine de réplication (Virshup *et al.*, 1992). Ces interactions protéine-protéine seraient possiblement nécessaires pour la dénaturation de l'origine par grand T. Des études ont montré que l'antigène petit T s'associe et inactive la PP2A (Scheidtmann *et al.*, 1991a; Yang *et al.*, 1991). Il est probable que petit T inhibe la réplication de l'ADN viral *in vitro* parce qu'il empêche la déphosphorylation de grand T par la PP2A (Carbone *et al.*, 1992). Toutefois, *in vivo* petit T stimule la réplication virale (Berger et Winterberger, 1986; Ogris *et al.*, 1992). Cet effet opposé de petit T *in vivo* et *in vitro* n'a pas encore trouvé d'explication.

Dans le processus de la carcinogenèse, l'antigène grand T permet l'immortalisation cellulaire, c'est-à-dire l'établissement de cellules primaires en culture (Rassoulzadegan *et al.*, 1983; Asselin et Bastin, 1985). Il complète l'antigène T moyen dans la transformation des cellules primaires et

dans l'induction de tumeurs chez les rongeurs. L'antigène grand T active l'expression de plusieurs gènes cellulaires (Kingston *et al.*, 1986). Toutefois, cette propriété n'est pas suffisante pour induire l'immortalisation (Larose *et al.*, 1990). Des études récentes ont montré que l'antigène grand T forme un complexe avec le produit du gène de la susceptibilité au rétinoblastome *Rb* (Dyson *et al.*, 1990). Cette association semble être importante pour l'immortalisation cellulaire. En effet, des mutants de grand T incapables de fixer la protéine *Rb* n'immortalisent pas des cellules fibroblastiques d'embryon de rat (Larose *et al.*, 1991). Le gène *Rb* est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire. Son inactivation, par mutation ou délétion, a été observée non seulement dans des rétinoblastomes mais aussi dans différents carcinomes humains (Lee *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 1988; Weinberg, 1990). Le produit du gène *Rb* est une protéine de 110 kDa qui est phosphorylée durant certaines étapes spécifiques du cycle cellulaire (Buchkovich *et al.*, 1989; DeCaprio *et al.*, 1989). La phosphorylation de la protéine *Rb* ou sa fixation par grand T semble neutraliser sa propriété d'inhiber la croissance cellulaire. Plusieurs études suggèrent que *Rb* est un inhibiteur du facteur de transcription E2F (Chellappan *et al.*, 1991; Bagchi *et al.*, 1991; Bandara *et al.*, 1991). Ce facteur agit sur le promoteur de plusieurs gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (i.e. *fos*, *myc*) ou la régulation de la réplication de l'ADN (Chittenden *et al.*, 1991; Mudryj *et al.*, 1990, 1991). L'antigène grand T dissocierait le complexe *Rb*-E2F en fixant *Rb* et permettrait au facteur E2F d'activer les gènes responsables de la prolifération cellulaire (Nevins, 1992).

L'antigène grand T est également impliqué dans l'intégration, l'amplification et l'excision des séquences virales dans le génome cellulaire (Botchan *et al.*, 1979; Bourgaux *et al.*, 1982; Pellegrini *et al.*, 1984). L'intégration du génome viral est requise pour une transformation stable et complète des cellules. Grand T provoque aussi des aberrations chromosomiques et des modifications dans

le caryotype des cellules transformées (Léopold *et al.*, 1986; Ray *et al.*, 1990; Stewart et Baccetti 1990). Ces altérations dans la stabilité et l'intégrité du génome de la cellule peuvent produire des sous-populations mutantes qui acquièrent de nouvelles propriétés telles que l'immortalisation cellulaire et la tumorigénicité.

L'instabilité génomique, l'intégration et l'amplification du génome viral sont des phénomènes impliquant des événements de recombinaison génétique. Les mécanismes permettant la recombinaison sont peu connus. Selon un modèle proposé par Botchan et collaborateurs (1979), l'antigène grand T initie plusieurs cycles de réplication à l'origine virale pour créer des séquences amplifiées d'ADN. Ces séquences, organisées en structure de pelure d'oignon (figure 2), représentent un substrat favorable pour la recombinaison homologue. La résolution de la structure de pelure d'oignon permettrait l'amplification ou l'excision des séquences virales. D'autres auteurs ont proposé que grand T induit lui-même la recombinaison, indépendamment de la réplication des séquences virales (Sager *et al.*, 1981; Colantuoni *et al.*, 1982). Jasin et collaborateurs (1985) ont observé de la recombinaison homologue à haute fréquence entre le génome de SV40 et les séquences SV40 endogènes de la lignée COS. Piché et Bourgaux (1987) ont observé que la résolution de la molécule RmI dans les cellules permissives de souris était entièrement dépendante de la présence de l'antigène grand T du virus du polyome. RmI est un ADN épisomique isolé de la lignée cellulaire Cyp. Elle contient une copie du génome viral de polyome dont la région tardive est interrompue par une insertion d'ADN de souris. En présence de grand T, RmI génère par recombinaison de type site spécifique deux molécules correspondant au génome de polyome et à l'insertion cellulaire. Dans ce système, l'antigène grand T de polyome peut être remplacé par l'antigène grand T de SV40. Bouchard *et al.* (1987) ont observé que l'antigène grand T active l'expression de l'antigène T moyen dans une lignée cellulaire possédant plus de 30 copies inactives du gène. Ces travaux suggèrent que

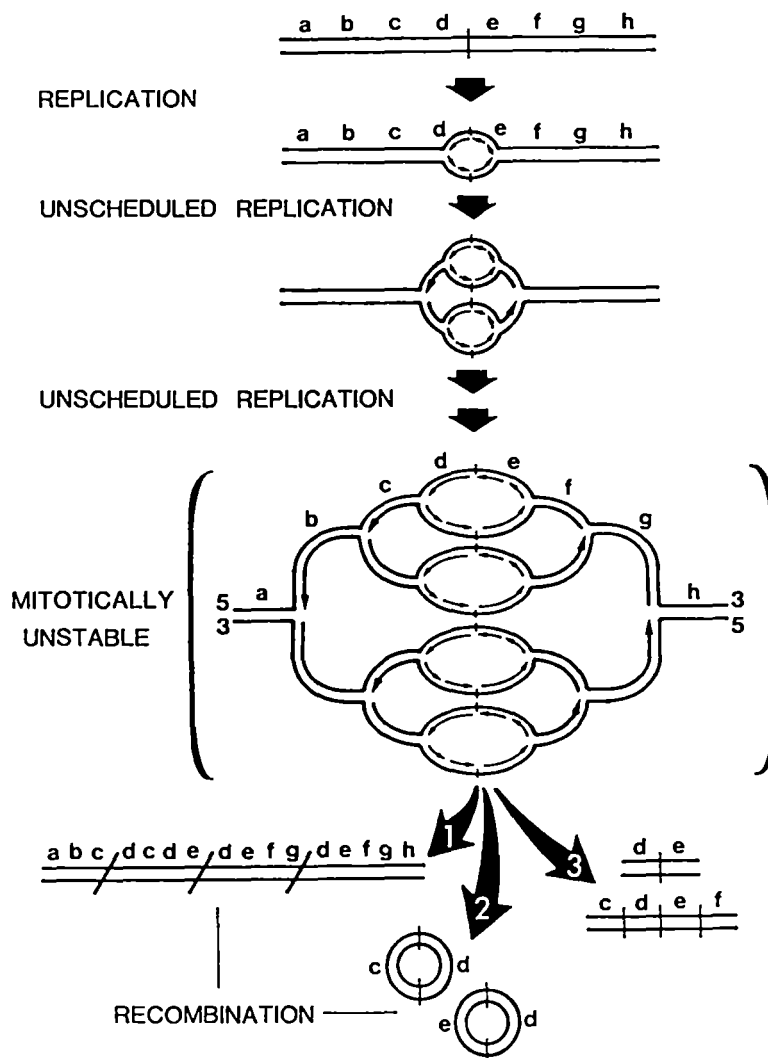


Figure 2. Amplification et excision d'ADN selon le modèle de la pelure d'oignon.

Plusieurs cycles de réplication imprévus à l'origine virale génèrent des séquences d'ADN amplifiées organisées en structure de pelure d'oignon. Des événements de recombinaison homologue au niveau de cette structure provoquent l'amplification ou l'excision de l'ADN (tiré de Stark et Walh, 1984).

grand T favorise une recombinaison homologue entre les différentes copies de T moyen par un mécanisme de "hit-and-run".

La recombinaison intrachromosomique entre deux séquences homologues peut être réciproque (crossing over) ou non réciproque (conversion génique). Ces deux modes d'échange peuvent se produire lorsque les séquences sont sur une même molécule ADN ou lorsqu'elles sont sur deux chromatides soeurs (Bollag *et al.*, 1989). Une recombinaison réciproque permet un échange mutuel de l'information génétique entre les deux séquences homologues tandis que la conversion génique provoque un transfert unidirectionnel de l'information génétique d'une séquence donneuse vers son homologue receveur (figure 3a). Un échange réciproque entre un tandem tête-à-queue provoque la délétion ou la duplication d'une des séquences. Lorsque les séquences sont dans des orientations inverses, une recombinaison réciproque induit l'inversion des séquences intercalaires (figure 3b). Malgré des progrès récents dans l'étude de la recombinaison chez la bactérie et la levure, l'analyse de la recombinaison homologue à l'échelle moléculaire dans les cellules de mammifère s'avère difficile pour plusieurs raisons: l'absence de méthodes faciles pour sélectionner les recombinants, le manque de marqueurs génétiques appropriés, la taille et la complexité du génome des mammifères et la fréquence peu élevée de recombinaison dans la cellule (Lin et Sternberg, 1984). En dépit de ces problèmes, plusieurs laboratoires ont développé des systèmes permettant d'étudier la recombinaison homologue (Lin et Sternberg, 1984; Smith et Berg, 1984; Stringer *et al.*, 1985). Rubnitz et Subramani (1986) ont étudié la recombinaison dans les cellules de souris en introduisant un gène *néo*, rendu non-fonctionnel par une mutation, et un fragment interne du gène. L'acquisition de la résistance au G418 résulte d'un réarrangement entre les séquences homologues qui reconstitue un gène *néo* fonctionnel. Ces travaux ont permis d'évaluer une fréquence de recombinaison intrachromosomique et extrachromosomique d'environ 10^{-6} événement par génération cellulaire. La

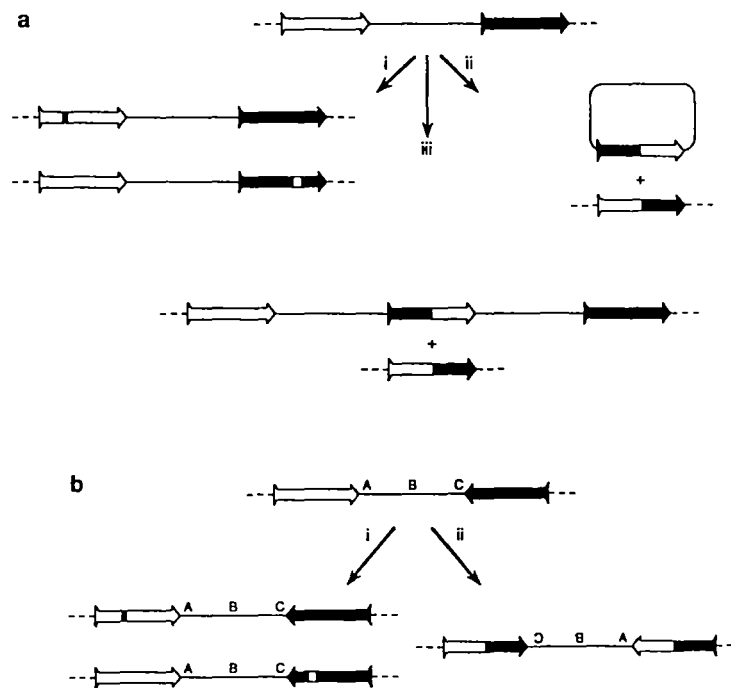


Figure 3. Recombinaison homologue intramoléculaire.

A. Recombinaison entre tandem tête-à-queue. (i) Conversion génique entre le gène blanc (□) et le gène noir (■). L'échange non réciproque de l'information génétique entre le gène donneur et le gène receveur modifie le gène receveur mais ne change pas l'intégrité du gène donneur. (ii) Échange réciproque entre les deux gènes provoquant l'excision et l'élimination des séquences intercalaires. (iii) Échange inégal entre chromatides-soeurs produisant une addition ou une délétion d'ADN. Les deux produits sont ségrégués dans deux cellules filles lors de la division cellulaire.

B. Recombinaison entre des répétitions inversées. (i) Conversion génique. (ii) Recombinaison réciproque provoquant l'inversion des séquences intercalaires (tiré de Bollag *et al.*, 1989).

recombinaison homologue a aussi été étudiée entre deux gènes *tk* inactifs, intégrés de façon stable dans le génome de la souris (Liskay et Stachelek, 1983; Bollag et Liskay, 1988; Stachelek et Liskay, 1988). Une recombinaison entre les deux gènes reconstitue un gène intact qui permet la croissance en milieu de sélection HAT. Dans ce système, 80% des événements de recombinaison observés sont dus à de la conversion génique tandis que 20% sont le résultat d'une recombinaison réciproque avec perte des séquences intercalaires.

Nous nous sommes intéressés au mécanisme permettant à l'antigène grand T d'induire la recombinaison homologue. Dans ce travail, nous avons construit un système de lignées cellulaires possédant un tandem tête-à-queue de gènes T moyen inactifs pour la transformation néoplasique. Ces gènes sont inactivés par des délétions à des endroits différents et sont intégrés de façon stable sur le même chromosome dans des cellules de rat. Une recombinaison homologue entre les deux copies défectueuses devrait reconstituer un gène T moyen intact, capable de convertir les cellules au phénotype transformé. L'avantage d'étudier la recombinaison entre deux gènes T moyen plutôt que deux gènes *néo* (Rubnitz et Subramani, 1985) ou deux gènes *tk* (Liskay et Stachelek, 1983) est que l'événement de recombinaison peut être sélectionné sans avoir recours à des agents cytotoxiques puisque l'événement de recombinaison est mis en évidence par un changement morphologique des cellules.

Nous avons étudié la recombinaison dans deux lignées de rat désignées Hy2 et Hy5. Nos résultats montrent que les antigènes grand T du virus du polyome et de SV40 induisent une recombinaison à haute fréquence au niveau des séquences virales. Dans la lignée Hy2, grand T induit également un amplification des séquences virales. Afin d'adresser le rôle les fonctions répliquatives de l'antigène grand T dans la recombinaison et l'amplification, nous avons étudié l'effet de mutants inactifs dans

l'initiation de la réplication virale. Nous montrons que l'antigène grand T provoque de la recombinaison indépendamment de la réplication virale. Nos résultats indiquent donc que la recombinaison dans les lignées Hy2 et Hy5 ne se produit pas selon le modèle de la pelure d'oignon. Dans la lignées Hy2, nous proposons que grand T induit une recombinaison selon un mécanisme de mauvais appariement entre les séquences homologues et l'amplification des séquences virales serait le résultats d'événements successifs de recombinaison. Dans la lignée Hy5, l'antigène grand T induit différents événements de recombinaison tels que l'inversion, la conversion génique et l'échange inégal entre chromatides soeurs. Certains des produits de recombinaison obtenus sont comparables avec les aberrations chromosomiques observées dans les cellules transformées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Plasmides recombinants

Le plasmide pSV₂neo porte le gène de l'aminoglycoside phosphotransférase de l'élément transposable Tn5 d'*Escherichia coli*. Ce gène est sous le contrôle du promoteur précoce de SV40 et il confère la résistance à l'antibiotique G418 (Southern et Berg, 1982).

Le plasmide pneoLT1ori- a été obtenu en introduisant au site BamHI de pSV₂neo, un génome modifié du virus du polyome qui ne permet que l'expression de l'antigène grand T (Asselin et Bastin, 1985; figure 4). De plus, une délétion de 23 pb (nt. 37-60) et l'introduction d'un adapteur XhoI inactivent l'origine de répllication du virus (Bautch *et al.*, 1987).

Le recombinant pneoLTtsa produit une protéine grand T thermosensible, dû à une mutation ponctuelle au nucléotide 2171 qui convertit le résidu alanine à la position 539 en résidu thréonine (Thomas *et al.*, 1981).

Les recombinants pneoLTdl23ori-, pneoLTdl45ori- et pneoLTdl97 produisent des antigènes grand T mutants. Ils ont été obtenus en échangeant les fragments de restriction contenant les mutations dl-23 (nt. 1138-1240), dl-45 (nt. 1078-1141) et dl-97 (nt. 1367-1397) avec la portion correspondante du plasmide pneoLT1ori- (Bending *et al.*, 1980; Griffin et Maddock, 1979; Asselin et Bastin, 1985).

Le plasmide pneoLTdl8ori- a été obtenu en introduisant la mutation dl-8 (nt. 990-1080) dans le

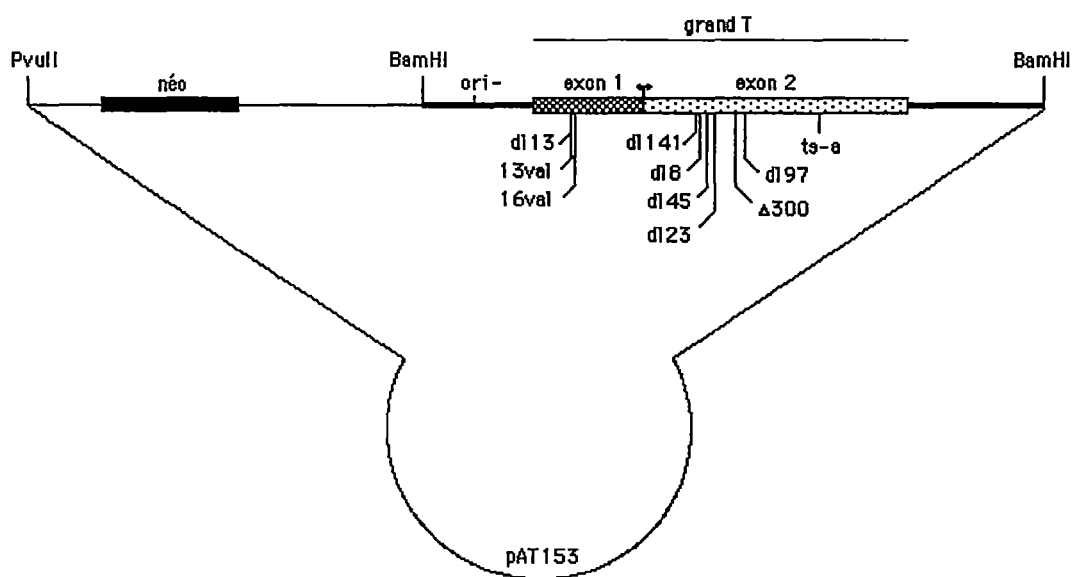


Figure 4. Représentation des divers plasmides utilisés.

Position des différentes mutations sur le gène grand T du virus du polyome. Les deux exons sont illustrés. Le plasmide pnéoLT1 contient à la fois le gène de sélection *néo* et le gène codant pour l'antigène grand T du virus du polyome. Les deux gènes sont insérés entre les sites BamHI (nt 375) et PvuII (nt 2067) du vecteur plasmidique pAT153.

plasmide pLT1 par recombinaison *in vivo* dans une souche RecA+ d'*E. coli* (Pinsonneault *et al.*, 1988).

pneoLTdl13 possède une délétion de 15 pb entre les nucléotides 210 et 224 inclusivement, tandis que les plasmides pneoLT13val et pneoLT16val contiennent des transversions C-G aux nucléotides 210 et 213 qui changent une leucine en valine aux positions 13 et 16 respectivement. Ces mutations inactivent la propriété d'immortalisation de grand T (Larose *et al.*, 1991).

Les recombinants pneoLTdl141ori- et pneoLTdl149 possèdent des délétions de 18 pb (nt.978-996) et de 84 pb (nt.996-1080) respectivement. Ils encodent des antigènes grand T qui sont inactifs pour l'immortalisation et qui sont incapables de fixer le produit du gène de la susceptibilité au rétinoblastome (Larose *et al.*, 1991).

Le plasmide pSP72-MT a été obtenu en insérant le fragment XhoI-PstI (nt. 60-484) de pdPx13B1a (Bautch *et al.*, 1987) dans le site de clonage multiple du vecteur d'expression pSP72 (Krieg et Melton. 1988). Ce site de clonage multiple est localisé entre les promoteurs des bactériophages SP6 et T7 de sorte que l'ARN polymérase Sp6 ou T7 peut être utilisée pour convertir le fragment T moyen inséré en sonde d'ARN simple brin.

Tous ces plasmides ont été amplifiés dans la souche HB101 d'*E. coli* (Boyer et Roulland-Dussoix, 1969) et purifiés par centrifugation à l'équilibre en gradient de chlorure de césium (Maniatis *et al.*, 1982).

II. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont cultivées dans un milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF), 5% de fongizone (amphotéricine B, 2.5 µg/ml) et 1% d'antibiotiques (Streptomycine 0.01%, pénicilline 100 unités/ml). Elles sont maintenues à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂.

1. Transfection des lignées cellulaires Hy2 et Hy5

Les lignées cellulaires Hy2 et Hy5 ont été transfectées selon la méthode de coprécipitation au phosphate de calcium avec choc au DMSO (Stow et Wilkie, 1976). Brièvement, 450 µl d'ADN entraîneur (10 µg/ml d'ADN de thymus de veau dans du tampon Hebs: 0.14 M NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na₂HPO₄, 5.5 mM glucose, 20 mM Hepes [pH 7.05]), 100 µl d'aprotinine 1% et 35 µl de CaCl₂ 2 M sont ajoutés à 2 µg d'ADN plasmidique dilué dans 25 µl de tampon TE (1 mM Tris-Cl [pH 8.0], 0.1 mM EDTA). Après une agitation vigoureuse, le contenu est laissé 10 minutes à la température de la pièce afin de permettre la formation d'un précipité de phosphate de calcium. Le précipité est ensuite resuspendu et immédiatement déposé dans une boîte de pétri de 60 mm contenant 500 000 cellules, préalablement vidée de son milieu nutritif. Après une incubation de 30 minutes à 37°C avec 5% CO₂, 5 ml de DMEM complet sans fongizone sont ajoutés à chacune des boîtes et l'incubation se poursuit pendant 6 heures. Cette incubation permet au précipité de phosphate de calcium de se déposer sur les cellules. Le milieu nutritif est enlevé des boîtes et les cellules sont lavées une fois avec du DMEM complet. Les cellules sont ensuite soumises à un choc au DMSO (1ml de DMEM complet contenant 20% [v/v] de DMSO) de 40 secondes permettant ainsi à l'ADN plasmidique accolé à la membrane cellulaire de pénétrer à l'intérieur de la cellule.

Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du DMEM complet afin d'éliminer le DMSO. Après avoir ajouté 5 ml de DMEM complet avec fongizone, les boîtes sont incubées 36 heures à 33°C avec 5% de CO₂. Par la suite, les cellules de chaque boîte sont redistribuées dans 5 nouvelles boîtes de 60 mm contenant 5 ml de DMEM complet et incubées une nuit à 37°C avec 5% de CO₂. Le lendemain, les cellules sont soumises à une sélection au G418 (400 µg/ml de DMEM complet). Le milieu de sélection au G418 est préparé à partir d'une solution mère contenant 8 mg de G418 (Gibco) par ml de tampon HEPES 100 mM (pH 7.0). Le milieu de sélection est changé tous les 5 jours et les colonies résistantes apparaissent 2 à 3 semaines après la transfection.

2. Cellules fibroblastiques d'embryon de rat.

i) Préparation des cellules.

Des embryons de rat Fischer de 13 à 14 jours sont prélevés stérilement et lavés 3 fois avec une solution Tris-salin (25 mM Tris-Cl [pH 7.4], 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 5 mM Dextrose, 0.0015% [v/v] rouge de phénol, 100 unités/ml pénicilline, 0.01% Streptomycine). Après avoir découpé les embryons avec des ciseaux, les morceaux sont traités avec de la trypsine 0.06% (75 ml Tris-salin + 25 ml de trypsine 0.25% [p/v]) pendant 20 minutes à 37°C avec agitation constante. Les cellules sont ensuite filtrées à travers une gaze et recueillies dans 50 ml de sérum de veau foetal pour inactiver la trypsine. Les cellules sont centrifugées à 1800 rpm (Sorvall RC-3) pendant 10 minutes à 4°C, resuspendues dans 20 ml de DMEM complet et comptées au bleu de trypan (dilution 1:3). Les cellules sontensemencées à raison de 5 x 10⁵ cellules par boîte de pétri de 100 mm et incubées pendant 18 heures à 37°C avec 5% CO₂.

ii) Transfection des lignées Hy5, 3T6 et des cellules primaires

Avec pour but de déterminer l'efficacité de recombinaison de l'ADN plasmidique, les lignées Hy5, 3T6 et les cellules primaires de rat sont transfectées selon la méthode au Polybrène-DMSO (Kawai et Nishizawa, 1984). Les boîtes sont préalablement rincées une fois avec 5 ml de milieu DMEM complet sans fongicide. Deux ml de DMEM contenant 10 µg d'ADN et 30 µg de Polybrène (Sigma #P-4515) sont ajoutés à chaque boîte. Les cellules sont incubées pendant 6 heures à 37°C puis soumises à un choc de 2 minutes au DMSO (4ml de DMEM seul contenant 25% [v/v] DMSO). Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec 5 ml de DMEM seul et incubées 72 heures à 37°C dans 10 ml de DMEM complet.

III. Identification des antigènes du virus du polyome dans les cellules transformées

1. Immunoprécipitation des antigènes T du virus du polyome

L'expression des antigènes T moyen et grand T dans les cellules qui ont subi la transformation néoplasique est analysée d'une part par immunoprécipitation des protéines marquées avec la [³⁵S]-méthionine (Schaffhausen et Benjamin, 1981a). Les cellules cultivées à 80% de confluence dans des boîtes de pétri de 100 mm sont lavées deux fois avec une solution PBS⁺ (0.17 M NaCl, 3.3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 7 mM CaCl₂, pH 6.8). Les cellules sont ensuite marquées dans 3 ml de milieu Hanks (Flow Laboratory) contenant 450 µCi de [³⁵S]-méthionine (Amersham). Après 60 minutes d'incubation à 37°C, 3 ml de DMEM complet est ajouté aux boîtes et l'incubation se poursuit pendant 30 minutes. Suite au marquage, le milieu radioactif est enlevé et les cellules sont lavées deux fois avec du PBS⁺ froid. A l'aide d'un policeman, les cellules sont

grattées dans 1 ml de PBS⁺ froid et récoltées dans un tube conique de 15 ml. Après avoir centrifugé l'extrait cellulaire deux minutes à 1800 rpm (Sorvall RC-3), le culot est resuspendu et vortexé dans 500 µl de tampon de solubilisation (0.4% [p/v] SDS, 50 mM Triéthanolamine-Cl [pH 7.4], 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoéthanol, 0.1 mM PMSF).

Les extraits sont chauffés 3 minutes à 100°C et transférés dans un tube de 1.5 ml contenant 125 µl de Triton-X100 10% (v/v) et 100 µl d'une solution d'iodoacétamide 100 mM. Les tubes sont alors centrifugés pendant 30 minutes à 4°C. Après avoir prélevé 90% du surnageant qui contient l'extrait protéique, 2 µl de sérum anti-T polyome sont ajoutés et les tubes sont incubés pendant 30 minutes à 4°C avec agitation constante. Le sérum contient des anticorps IgG et IgM qui forment un complexe spécifique avec les antigènes tumoraux du virus du polyome. Suite à l'incubation, 60 µl de protéine A-sépharose 50% (v/v; Pharmacia) préalablement hydratée et lavée 6 fois avec de l'eau bidistillée sont ajoutés aux extraits. Les extraits sont incubés 90 minutes ou plus à 4°C avec agitation lente et régulière de façon à maintenir la protéine A en suspension. La protéine A-sépharose fixe le fragment Fc du complexe anticorps-antigène. Afin d'éliminer les protéines liées de façon non-spécifique à l'anticorps, les extraits sont transférés dans des tubes coniques de 15 ml et lavés 2 fois avec 5 ml de tampon PBS⁺ froid, 2 fois avec 5 ml d'une solution de lavage au LiCl (0.1 M Tris-Cl [pH 7.0], 0.5M LiCl) et une fois avec de l'eau distillée. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation à 4°C jusqu'à ce que la vitesse atteigne 2000 rpm. Après l'avoir resuspendue dans 1 ml d'eau distillée, la protéine-A est transférée dans un tube de 1.5 ml et centrifugée quelques secondes.

Le culot peut être soumis à une seconde immunoprécipitation afin de réduire le matériel immunoprécipité de façon non-spécifique. Le culot final est resuspendu dans 40 µl de tampon de

dissociation (125 mM Tris-Cl [pH 6.8], 5% [p/v] SDS, 20% [v/v] glycérol, 0.0075% [p/v] bleu de bromophénol, 5% [v/v] 2-mercaptoéthanol) et chauffé 2 minutes à 100°C. Les échantillons sont immédiatement déposés sur un gel de SDS-polyacrylamide 12.5%. Le gel de migration (1.5 mm d'épaisseur) est fait à partir de 20.5 ml d'une solution de 30% polyacrylamide-0.24% N,N-méthylène-bis-acrylamide (Bio-Rad), 6.25 ml de Tris-Cl 3M (pH 8.9), 500 µl de SDS 10% (p/v), 19.93 ml d'eau, 15 µl de TEMED (Bio-Rad) et 225 µl d'une solution de persulfate d'ammonium 10% (p/v; Bio-Rad). Une mince couche d'eau est déposée sur le gel afin d'obtenir une surface uniforme. Lorsque le gel de migration est polymérisé, un gel de concentration y est superposé. Ce gel est constitué de 1.67 ml d'une solution de 30% polyacrylamide-0.8% N,N-méthylène-bis-acrylamide, 1.25 ml de Tris-Cl 3M (pH 8.9), 10 µl SDS 10% (p/v), 6.9 ml d'eau, 5 µl de TEMED et 100 µl d'une solution de persulfate d'ammonium 10% (p/v). L'électrophorèse se fait dans un tampon contenant 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 0.1% (p/v) SDS à 40 volt jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit à 1 cm du bas du gel. Après la migration, le gel est fixé pendant 30 minutes dans une solution de 5% (v/v) méthanol et 7.5% (v/v) d'acide acétique glacial et trempé dans une solution Amplify (Amersham) pendant 30 minutes avec agitation constante. Finalement, le gel est séché sous vide, puis exposé à -70°C sur un film Kodak XAR-5.

2. Détection de l'activité kinasique associée à l'antigène T moyen

L'antigène T moyen forme un complexe avec le produit de l'oncogène cellulaire *c-src* (Courtneidge et Smith, 1984). Cette association provoque une augmentation de l'activité kinasique de *c-src* qui peut être décelée lors d'une phosphorylation *in vitro* de T moyen (Schaffhausen et Benjamin, 1981b). Lorsque les cellules ont atteint 80% de confluence dans des boîtes de 100 mm, elles sont lavées deux fois avec du tampon PBS+ froid. Afin d'extraire les protéines cellulaires, 1

ml de tampon TEB (18 mM Tris-Cl [pH 7.0], 120 mM NaCl, 0.8 mM CaCl₂, 0.45 mM MgCl₂, 1% [v/v] NP-40, 10% [v/v] glycérol) est ajouté à chaque boîte. Les boîtes sont alors incubées pendant 20 minutes à 4°C avec agitation aux 5 minutes. Le lysat cellulaire est recueilli dans un tube de 1.5 ml et centrifugé pendant 5 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube contenant 2 µl de sérum anti-T polyome et 40 µl de protéine A-sépharose 50% (v/v). Ceci permet d'immunoprécipiter l'antigène T moyen des protéines cellulaires totales. À la suite d'une incubation de 60 minutes à 4°C, la protéine A-sépharose est lavée 2 fois avec le tampon PBS+, 2 fois avec la solution de lavage au LiCl et une fois avec le tampon de kinase (20 mM Tris-Cl [pH 7.5], 5 mM MgCl₂). Après le dernier lavage, l'antigène T moyen est marqué lors d'une réaction de phosphorylation *in vitro*. Pour ce faire, la protéine A est resuspendue dans 400 µl de tampon de kinase contenant 50 µCi de [γ -³²P] ATP (Amersham) et incubée pendant 15 minutes à la température de la pièce. Ensuite, la protéine A-sépharose est lavée 2 fois avec du tampon PBS+, 2 fois avec la solution de lavage au LiCl, 2 fois avec la solution RIPA (10 mM Tris-Cl [pH 7.0], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% Déoxycholate de sodium, 0.1% SDS) et une fois avec de l'eau bidistillée. Les échantillons sont resuspendus dans 25 µl de tampon de dissociation, bouillis pendant 2 minutes puis déposés sur un gel SDS-polyacrylamide 12.5%. Après la migration, le gel est rincé à l'eau courante puis incubé 2 heures à 55°C dans une solution de 1 M NaOH, 10 mM K₂HPO₄. Ce traitement permet de mettre en évidence la phosphorylation des résidus tyrosine par l'oncogène c-src. En milieu alcalin, la liaison entre le groupement phosphate et la tyrosine demeure stable tandis que celle entre le groupement phosphate et une sérine ou une thréonine est hydrolysée. Suite au traitement alcalin, le gel est fixé pendant 30 minutes dans une solution d'acide acétique glacial 15% (v/v) et méthanol 50% (v/v) puis 30 minutes dans une solution d'acide acétique 7.5% et méthanol 5%. Finalement, le gel est traité 10 minutes dans une solution de glycérol 1% (v/v), séché sous vide et exposé à -70°C sur un film Kodak XAR-5.

IV. Caractérisation du patron d'intégration de l'ADN viral dans l'ADN chromosomique des cellules transformées

1. Extraction de l'ADN chromosomique des cellules transformées

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de pétri de 100 mm contenant 10 ml de DMEM complet. Lorsque les cellules ont atteint un état de confluence, elles sont lavées deux fois avec 5 ml de tampon PBSA (0.17 M NaCl, 3.3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 6.8) puis 1 ml de tampon de lyse est ajouté à chaque boîte. Le tampon de lyse (10 mM Tris-Cl [pH 7.9], 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% [p/v] SDS, 50 ug/ml de protéinase K [Sigma]) est préalablement incubé une heure à 37°C afin que la protéinase K détruise les nucléases présentes dans la solution. Les boîtes sont ensuite agitées régulièrement et gardées à la température de la pièce pendant 10 minutes. À l'aide d'un policeman, le lysat cellulaire est récolté dans un tube conique de 50 ml et agité pendant 12 heures à la température de la pièce sur un agitateur rotatif. L'ADN chromosomique est purifié par une extraction au phénol (0.1% [p/v] 8-hydroxyquinoline, saturé en TE), une extraction avec un mélange 1:1 de phénol-chloroforme et une extraction avec un mélange 24:1 de chloroforme-alcool isoamylique. Chaque extraction consiste à agiter le lysat pendant une heure à la température de la pièce, suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 3500 rpm. La phase aqueuse contenant l'ADN chromosomique est prélevée et transférée dans un nouveau tube. Après les trois étapes de purification, la concentration en NaCl de la phase aqueuse est ajustée à 0.4 M et deux volumes d'éthanol 95% froid sont délicatement déposés de façon à former deux phases bien distinctes. A l'aide d'une tige de verre, les deux phases sont agitées tout en embobinant l'ADN qui précipite à l'interface. Le précipité formé sur la tige de verre est rincé dans de l'éthanol 70% pendant 15 minutes, puis dans de l'éthanol 95% pendant 2 minutes. L'ADN est resuspendu dans

du tampon TE contenant 20 ug/ml de ribonucléase I (Pharmacia) et incubé pendant deux heures à 37°C. L'ADN est ensuite dialysé pendant 12 heures à 4°C contre du tampon TE et sa concentration en ADN est évaluée selon sa densité optique à 260 nm.

2. Transfert de l'ADN chromosomique sur membrane de nylon (Southern blotting).

La technique utilisée est celle décrite par Southern (1975). L'ADN chromosomique (10 à 20 µg) est digéré par différents enzymes de restriction et les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.4% à 2.0% (p/v). Les digestions enzymatiques sont effectuées selon les recommandations des fabricants Amersham, Promega et Pharmacia. La migration est faite en présence de tampon TE 1X (40 mM Tris-acétate [pH 7.4], 2 mM EDTA). Le gel est coloré pendant 15 minutes dans une solution de bromure d'éthidium 2 µg/ml. L'état des digestions est vérifié sous une lumière ultraviolette. Le gel est trempé pendant 40 minutes à la température de la pièce avec agitation constante dans une solution dénaturante (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) pour être ensuite placé dans une solution neutralisante (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-Cl (pH 7.4), 1 mM EDTA) pendant 40 minutes. Le transfert de l'ADN est fait par capillarité sur une membrane de nylon (Amersham) en présence d'une solution 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M citrate de sodium, pH 7.5 avec une solution 3 M NaCl, 0.3 M acide citrique). Le montage utilisé est celui décrit par Maniatis *et al.* (1982). Après 12 heures de transfert, la membrane est séchée pendant 2 heures sous vide à 80°C afin de permettre la fixation de l'ADN.

3. Préhybridation et hybridation de la membrane de nylon.

Afin d'éviter l'attachement non-spécifique de la sonde radioactive, la membrane est préalablement

incubée pendant 18 heures à 68°C avec agitation constante dans un sac de plastique scellé contenant 15 ml d'une solution de préhybridation (120 mM Tris-Cl [pH 7.4], 600 mM NaCl, 8 mM EDTA, 1% [p/v] Tétrasonium pyrophosphate, 0.2% [p/v] SDS, 100 µg/ml héparine [Sigma #H-7005]). La membrane est ensuite incubée pendant 48 heures à 68°C dans 5 ml d'une solution d'hybridation (120 mM Tris-Cl [pH 7.4], 600 mM NaCl, 8 mM EDTA, 1% [p/v] Tétrasonium pyrophosphate, 0.2% [p/v] SDS, 100 µg/ml héparine, 10% [p/v] sulfate de dextran) contenant 10^7 cpm d'une sonde radioactive. La sonde est préalablement dénaturée avec 0.1 volume de 1 N NaOH pendant 5 minutes à 37°C. Pour éliminer la radioactivité retenue de façon non-spécifique sur la membrane, un lavage est effectué à la température de la pièce dans du 2X SSC pendant 20 minutes suivi d'un autre lavage à 68°C dans une solution 0.02X SSC, 0.2% (p/v) SDS pendant 60 minutes. La membrane est ensuite séchée et exposée à -70°C sur un film Kodak XAR-5.

4. Préparation d'une sonde d'ADN radioactive.

La sonde est préparée à l'aide du système " Multiprime DNA labelling" développé par Feinberg et Vogelstein (1983, 1984) et manufacturé par Amersham. Cette technique implique le marquage d'une séquence d'ADN simple brin par le fragment Klenow de l'ADN polymérase I de *E. coli*. Le plasmide, qui contient la séquence d'ADN désirée, est digéré par les enzymes de restriction appropriés. Les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel horizontal d'agarose 1%. Le fragment d'ADN utilisé comme sonde est extrait de l'agarose à l'aide d'une membrane DEAE-cellulose (Schleider and Schuell NA-45; Dretzen *et al.*, 1981). La réaction de marquage est effectuée dans le mélange suivant: 20 à 30 ng du fragment d'ADN préalablement dénaturé 5 minutes à 100°C; 10 µl d'un tampon contenant les déoxyribonucléotides dGTP, dATP et dTTP; 5 µl d'un tampon contenant des amorces synthétisées au hasard; de l'eau distillée est ajoutée de façon à compléter

le mélange à un volume final de 50 μ l; 5 μ l de [α - 32 P]-dCTP (10 μ Ci/ μ l, Amersham #PB10205) et 2 μ l du fragment Klenow de l'ADN polymérase I de *E. coli*. La réaction se fait pendant 2 à 3 heures à la température de la pièce. La sonde est ensuite conservée à -20C.

V. Détermination *in-vivo* de l'efficacité de réplication de l'ADN recombinant.

1. Extraction de l'ADN épisomique des lignées Hy5, 3T6 et des cellules primaires de rat.

L'ADN épisomique est extrait des cellules selon la procédure d'extraction d'ADN de faible poids moléculaire de Hirt (1967). Soixante-douze heures après la transfection au polybrène, les cellules sont lavées au moins deux fois avec 5 ml de tampon PBS+. La lyse cellulaire est provoquée par l'addition de 0.5 ml de solution de Hirt (10 mM Tris-Cl [pH 8.0], 1 mM EDTA, 0.6% [p/v] SDS). Après 10 minutes à la température de pièce, le lysat cellulaire est recueilli dans un tube de 1.5 ml à l'aide d'un policeman et 140 μ l d'une solution de 5 M NaCl sont ajoutés à chaque tube. Les tubes sont vortexés et conservés à 4°C pendant une nuit. Le lendemain, ils sont centrifugés pendant 30 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires et l'ADN chromosomique. L'ADN épisomique est purifié par des extractions successives au phénol, phénol-chloroforme 1:1 et chloroforme-alcool isoamylique 24:1. L'ADN est ensuite précipité à -70°C avec 2 volumes d'éthanol 95% et lavé avec de l'éthanol 70% pour éliminer les sels. Pour terminer, l'ADN est resuspendu dans 200 μ l de tampon TE et dialysé pendant 12 heures à 4°C contre du tampon TE.

2. Mesure indirecte de l'efficacité de réplication de l'ADN recombinant (Muller *et al.*, 1983).

Pour évaluer l'efficacité de réplication de l'ADN recombinant dans les cellules de rat, l'état de

méthylation de l'ADN épisomique est étudié à l'aide des enzymes de restriction DpnI et BclI. L'enzyme DpnI élimine l'ADN utilisé lors de la transfection tandis que BclI linéarise l'ADN répliqué. L'ADN utilisé lors de la transfection provient d'une souche *E. coli* qui possède une dam méthylase. Cette méthylase introduit un groupement méthyl à la position N⁶ des résidus adénines. L'enzyme DpnI coupe l'ADN seulement si les résidus adénines sont méthylés tandis que l'enzyme BclI ne coupe pas si l'ADN est méthylé. L'ADN répliqué dans les cellules de souris est hémiméthylé ou non-méthylé car les cellules de mammifères ne possèdent pas de dam méthylase. Donc, l'ADN répliqué n'est pas coupé par l'enzyme DpnI et est linéarisé par l'enzyme BclI.

L'ADN extrait selon la méthode de Hirt est digéré avec l'enzyme BclI pendant 6 heures à 55°C. L'enzyme est ensuite éliminée par une extraction au phénol-chloroforme 1:1 et l'ADN est précipité avec de l'éthanol 95% en présence de 0.2 M NaCl. L'ADN est ensuite resuspendu dans 40 µl d'eau et digéré avec l'enzyme DpnI pendant 6 heures à 37°C. Les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% et transférés sur une membrane de nylon pour être hybridés avec une sonde radioactive.

VI. Analyse de l'expression du gène T moyen dans les cellules transformées

1. Extraction de l'ARN cytoplasmique

Les cellules transformées sont cultivées dans 10 boîtes de pétri de 100 mm contenant 10 ml de DMEM complet tandis que les cellules non transformées sont cultivées dans 20 boîtes de 150 mm contenant 20 ml de milieu. Lorsque les cellules ont atteint un état de confluence, elles sont lavées une fois avec du tampon PBSA pour ensuite être grattées à l'aide d'un policeman dans 1 ml de

PBSA et recueillies dans un tube de 15 ml stérile. Après une centrifugation de 5 minutes à 1800 rpm, le culot cellulaire est resuspendu dans 10 ml d'une solution 3 M LiCl-6 M Urée et passé une fois à travers une seringue de 10 ml munie d'une aiguille 18g1½. Les cellules sont ensuite soniquées plusieurs fois pendant 20 secondes jusqu'à ce que la solution soit fluide et libre de tout amas. Les tubes sont alors placés une nuit à 4°C. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés à 10 000 rpm pendant 30 minutes puis le culot est lavé une fois avec 10 ml de la solution au LiCl-Urée. Le culot final est rapidement resuspendu dans 300 µl de solution TES (10 mM Tris-Cl [pH 7.6], 1 mM EDTA, 0.5% [p/v] SDS) pour ensuite être transféré dans un tube de 1.5 ml. Un volume égal d'un mélange phénol-chloroforme 1:1 est ajouté et les tubes sont agités pendant une heures à la température de la pièce. Après avoir centrifugé 5 minutes dans une microcentrifugeuse, 30 µl d'une solution d'acétate de sodium 3M et 2 volumes d'éthanol 95% sont ajoutés à la phase supérieure afin de précipiter l'ARN. Les tubes sont incubés pendant 30 minutes à -70°C puis centrifugés pendant 20 minutes. L'ARN est resuspendu dans 50 µl d'H₂O et sa concentration est évaluée selon la densité optique à 260 nm.

2. Préparation d'une ribosonde radioactive (Melton *et al.* 1984)

Une sonde d'ARN simple brin peut être synthétisée *in vitro* à partir d'un fragment d'ADN inséré en amont d'un promoteur provenant des bactériophages SP6, T7 ou T3. L'ARN polymérase du bactériophage est très spécifique pour son promoteur et transcrit le fragment d'ADN inséré en ARN.

Le vecteur pSP72-MT est préalablement linéarisé avec l'enzyme de restriction XhoI afin de ne permettre que la transcription des séquences correspondant au virus du polyome. La réaction de

synthèse se fait en présence de 2.5 µg d'ADN linéarisé, 2.5 µl rNTP (ATP 5 mM, CTP 5 mM, GTP 1 mM), 1.0 µl GpppG 10 mM (Pharmacia #27-4635-01), 5.0 µl [α -³²P]-UTP 20mCi/ml (Amersham #PB20383), 2.5 µl UTP 100 mM, 5.0 µl SP6 buffer (200 mM Tris-Cl [pH 7.5], 30 mM MgCl₂, 10 mM Spermidine, 50 mM DTT), 2.0 µl BSA 2mg/ml, 1.0 µl RNAGuard (Pharmacia #27-0815-01), 1.0 µl ARN polymérase T7 (15 U/µl; Pharmacia #27-0805-01). Après une incubation d'une heure à 37°C, 10 µl de colorant à la formamide (10 µM EDTA, 1 mg/ml xylène cyanol et 1 mg/ml bleu de bromophénol préparés dans de la formamide déionisée) est ajouté à la réaction. La sonde est incubée 2 minutes à 100°C puis déposée sur un gel dénaturant. Le gel (1.5 mm d'épaisseur) est préparé à partir de 5 ml d'une solution 38% acrylamide-2% N,N' méthylène-bis-acrylamide, 21 g Urée, 5 ml de tampon TBE 10X (0.9 M Tris, 25 mM EDTA, 0.89 M acide borique), 30 µl TEMED et 500 µl d'une solution de persulfate d'ammonium 10% (p/v). L'électrophorèse est faite dans du tampon TBE 1X à 300 volts jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit au bas du gel. Le gel est ensuite exposé 40 secondes sur un film Kodak XAR-5. En se servant de l'autoradiogramme, le fragment correspondant à la ribosonde est découpé du gel puis transféré dans un tube de 1.5 ml. L'acrylamide est cassé à l'aide d'une tige de verre et 400 µl d'une solution de 0.3 M sodium acétate, 0.2% [p/v] SDS sont ajoutés aux morceaux afin d'extraire la sonde. Après avoir agité pendant 3 heures, le tube est centrifugé 30 minutes et le surnageant est soumis à 2 extractions consécutives au phénol-chloroforme 1:1. La sonde est ensuite précipitée pendant 30 minutes en présence de 30 µg d'ARNt de levure et 2 volumes éthanol 95%. Elle est ensuite centrifugée pendant 30 minutes et resuspendue dans 30 µl d'eau.

3. Essai de protection aux ribonucléases A et T₁

L'ARN provenant du gène T moyen est mis en évidence en utilisant la technique décrite par Zinn

et al. (1983). Elle consiste à hybrider l'ARN d'un gène particulier avec une ribosonde complémentaire suivi d'une digestion avec les ribonucléases A et T₁. Les fragments d'ARN protégés par l'hybridation sont ensuite séparés sur un gel dénaturant.

L'ARN cellulaire (10 à 20 µg) est coprecipité en présence de 10⁶ cpm de ribosonde et 50 µg d'ARNt de levure dans 2 volumes d'éthanol 95% pendant 30 minutes. Après une centrifugation de 15 minutes, le culot est séché et resuspendu dans 30 µl de tampon d'hybridation (40 mM PIPES [pH 6.4], 1 mM EDTA, 400 mM NaCl, 80% [v/v] formamide déionisée). Afin d'éliminer les structures secondaires de l'ARN, les échantillons sont chauffés pendant 5 minutes à 85°C. Ils sont ensuite transférés à 45°C pour toute une nuit. Ceci permet l'hybridation de la ribosonde à l'ARN complémentaire. Le lendemain, 300 µl de tampon de digestion (10 mM Tris-Cl [pH 6.4], 5 mM EDTA, 300 mM NaCl) contenant 5 µg de RNase A (Calbiochem #556746) et 6 Unités de RNase T₁ (Calbiochem #556785) sont ajoutés aux échantillons à la température d'hybridation. Les échantillons sont ensuite transférés à 30°C pendant une heure. L'ARN simple brin sera digéré par les RNases tandis que les hybrides ARN-ribosonde seront protégés. La réaction de digestion est arrêtée en ajoutant 10 µl de SDS 20% (p/v) et 2 µl de protéinase K 10 mg/ml. À la suite d'une incubation de 15 minutes à 37°C, une extraction au phénol-chloroforme 1:1 est effectuée. Les échantillons sont alors précipités dans deux volumes d'éthanol 95% et 25 µg d'ARNt de levure pendant 30 minutes. Après une centrifugation de 15 minutes, le culot final est resuspendu dans 3 µl de colorant à la formamide, bouilli pendant 2 minutes et déposé sur un gel dénaturant de 0.4 mm d'épaisseur. Le gel est préparé de la même façon que celui utilisé pour purifier la ribosonde. À la fin de l'électrophorèse, le gel est fixé sur une feuille de Whatman 3 mm et exposé sur un film Kodak XAR-5.

VII. Liaison de l'antigène grand T à l'ADN bicaténaire

La liaison des mutants de l'antigène grand T à l'ADN est analysée selon la procédure McKay (1981). Les différentes mutations ont été insérées dans le vecteur d'expression p91023LT (Cowie *et al.*, 1986) en insérant les fragments de restriction appropriés. Ils ont ensuite été transfectés dans les cellules Cos-1 (Gluzman 1981) selon la méthode au polybrène-DMSO. Le vecteur p91023LT possède le gène grand T du virus du polyome sous le contrôle du promoteur "major late" d'adénovirus. Le vecteur contient aussi les gènes VA d'adénovirus pour augmenter l'efficacité de traduction de l'ARNm et l'origine de réplication de SV40 pour permettre l'amplification du vecteur dans les cellules Cos.

1. Préparation des extraits nucléaires et immunoprécipitation de l'antigène grand T

Le noyau des cellules Cos est isolé 72 heures après la transfection afin d'améliorer la quantité d'antigène grand T immunoprécipité. Les cellules sont lavées 2 fois avec du tampon PBS+ puis grattées dans 1 ml de ce même tampon à l'aide d'un policeman. Elles sont ensuite transférées dans un tube de 15 ml et centrifugées 5 minutes à 2000 rpm. Le culot est resuspendu dans 1 ml de tampon de lyse cellulaire (10 mM PIPES [pH 6.2], 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 100 µg/ml PMSF). Le tube est alors placé 10 minutes dans la glace pour que les cellules gonflent. La lyse cellulaire est provoquée en passant 15 fois les cellules dans un homogénéisateur "Dounce" muni d'un pilon de type B. Le lysat est ensuite transféré dans un tube de 1.5 ml et centrifugé pendant 20 secondes. Le culot nucléaire est lavé une fois dans 1 ml de tampon de lyse cellulaire puis resuspendu dans 1 ml de solution de lyse nucléaire (100 mM Tris-Cl [pH8.0], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% [v/v] NP-40, 1% [v/v] aprotinine). Les débris nucléaires sont éliminés lors d'une

centrifugation de 30 minutes. L'antigène grand T du virus du polyome est immunoprécipité en ajoutant 2 μ l de sérum anti-T de polyome et 40 μ l de Pansorbin (Calbiochem #507858). Cette immunoprécipitation permet d'éliminer les protéines cellulaires incluant le grand T de SV40 présent dans les cellules Cos. La Pansorbin lie le fragment Fc du complexe anticorps-antigène. À la suite d'une incubation de 90 minutes à 4 °C, la Pansorbin est lavée 2 fois avec 1 ml de tampon PBS+, 2 fois avec la solution de lavage au LiCl et 2 fois avec de l'eau distillée.

2. Liaison à l'ADN

Après le dernier lavage, la Pansorbin est resuspendue dans 100 μ l de tampon de fixation (20 mM PIPES [pH 7.0], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 μ g/ml BSA, 10 μ g/ml ADN sperme de saumon) contenant 10 ng d'ADN radioactif. La fixation de l'ADN par grand T se produit à la température de la pièce pendant 30 minutes. La Pansorbin est alors lavée 3 fois avec 1 ml de tampon de lavage (20 mM Tris-Cl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 μ g/ml BSA, 2 mM DTT, 0.5% [v/v] NP-40, 10 μ g/ml ADN sperme de saumon). L'ADN est élué avec 200 μ l de tampon TE contenant 1% SDS et purifié par deux extractions au phénol-chloroforme 1:1. Après une précipitation dans 2 volumes d'éthanol 95%, l'ADN est déposé sur un gel d'agarose 2%. Suite à la migration, le gel est séché sous vide et exposé sur film Kodak XAR-5.

L'ADN radioactif est préparé dans le mélange réactionnel suivant: 1 μ g de plasmide pMT3 digéré avec l'enzyme de restriction HinfI, 5 μ l de tampon "nick translation" (500 mM Tris-Cl [pH 7.5], 100 mM MgSO₄, 500 μ g/ml BSA, 1 mM DTT), 1.25 μ l dCTP 10 mM, 1.25 μ l dTTP 10 mM, 1.25 μ l dGTP 10 mM, 2.5 μ l [α -³²P]-dATP (10 μ Ci/ μ l, Amersham #PB10204), 32 μ l eau distillée et 2 μ l du fragment Klenow de l'ADN polymérase de *E.coli*. La réaction de marquage se fait pendant une heure à 37°C.

RÉSULTATS

I. Stratégie utilisée pour observer la recombinaison homologue dans les cellules de mammifère

Avec pour but d'étudier la recombinaison homologue dans les cellules de mammifère, nous avons construit deux lignées cellulaires de rat possédant un tandem tête-à-queue de gènes T moyen inactifs pour la transformation néoplasique (figure 5a). Ces gènes sont inactivés par des délétions à des endroits différents et sont intégrés de façon stable dans le génome cellulaire. Une recombinaison entre les séquences répétées de T moyen devrait reconstituer un gène intact capable de transformer la cellule.

Les détails sur l'établissement des deux lignées cellulaires ont été décrit précédemment (St-Onge, 1989). Brièvement, les plasmides pMT97.484 et p214xSVHygro ont été introduits dans les cellules de rat FR3T3 selon la méthode de copréciptation au phosphate de calcium (Stow et Wilkie, 1976). Le plasmide p214xSVHygro confère la résistance à l'antibiotique hygromycine tandis que pMT97.484 (figure 5b) contient deux copies défectueuses du gène T moyen séparées par des séquences provenant des vecteurs pBR322 et pAT153. La première copie (*pmt-dl1*) correspond au fragment BamHI-HindIII (nt. 4632-1656) du génome du virus du polyome. Cette copie possède une délétion de 30 pb (nt. 1367-1397) qui réduit les propriétés transformantes de l'antigène (Asselin *et al.*, 1986) et une délétion de 63 pb (nt. 746-809) qui élimine l'intron de T moyen pour empêcher l'expression des antigènes grand T et petit T (Treisman *et al.*, 1981). La deuxième copie (*pmt-dl2*)

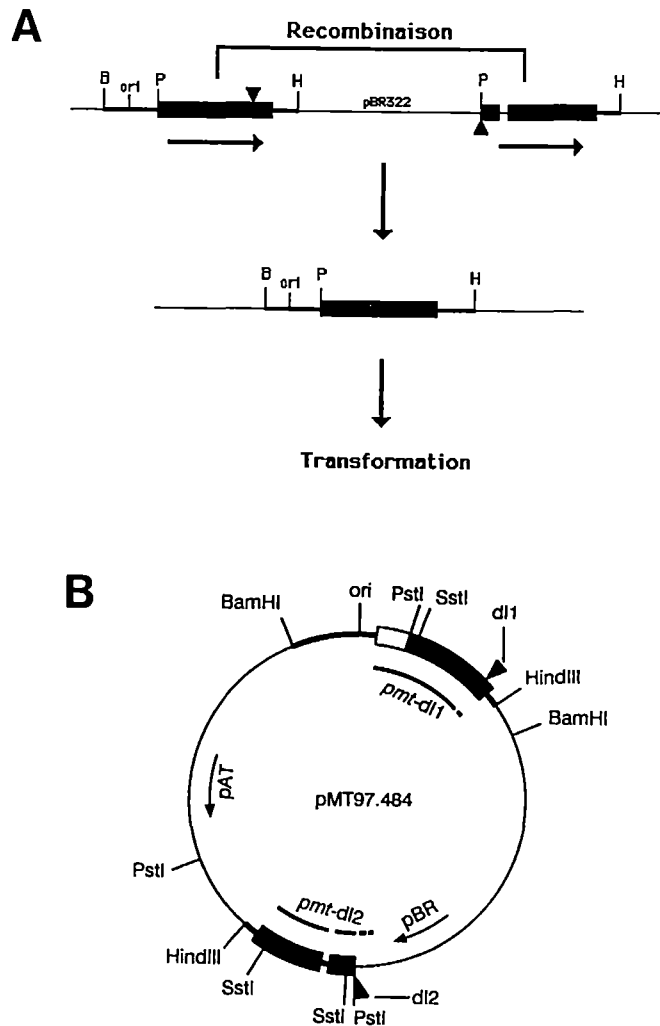


Figure 5. Stratégie utilisée pour étudier la recombinaison homologue.

A. Un tandem tête-à-queue de gènes T moyen inactivés par des délétions à des endroits différents est intégré de façon stable dans le génome cellulaire. Une recombinaison entre les séquences homologues reconstituera un gène T moyen intact capable de transformer les cellules. Les séquences T moyen homologues sont représentées par les boîtes rouge et bleue. La position des délétions est indiquée par les triangles noirs. Abréviations: ori, origine de réplication virale; B, BamHI; P, PstI; H, HindIII.

B. Structure du plasmide utilisé pour la construction des lignées Hy2 et Hy5. Le plasmide pMT97.484 contient deux copies défectueuses de l'oncogène T moyen, séparées d'une part par 3,5 kb de pBR322 et d'autre part par 3,3 kb de pAT153. Les deux gènes T moyen sont disposés dans la même orientation sur le plasmide tandis que les séquences pBR322 et pAT153 sont en orientation inverse. Le premier gène T moyen (pmt-dl1) possède une délétion de 30 pb qui élimine le site de restriction SstI au nucléotide 1373. Les séquences 5' du deuxième gène (pmt-dl2) allant jusqu'au site PstI (nt 484) sont absentes. L'intron est présent dans le deuxième gène mais est absent du premier. Les séquences homologues entre les gènes T moyen sont illustrées en noir.

correspond au fragment PstI-HindIII (nt. 484-1656) du génome viral. Le promoteur, l'origine de réplication et la séquence codant pour les 104 premiers acides aminés de T moyen sont délétés dans cette copie.

Après la transfection, les cellules ont été soumises à une sélection à l'hygromycine et après 15 jours, six colonies résistantes ont été prélevées. Les lignées isolées de cette façon possédaient toutes un phénotype normal, identique à la lignée FR3T3. Après de multiples passages, des foyers de cellules transformées ont été observés dans seulement deux des lignées. Nous avons nommé ces lignées Hy2 et Hy5. Elles ont été étudiées davantage car l'apparition de cellules transformées suggérait une recombinaison homologue entre les gènes T moyen défectueux. Le patron d'intégration de l'insert viral dans les lignées Hy2 et Hy5 sera décrit en détail plus loin.

II. Étude de la recombinaison homologue dans la lignée Hy2

1. Description de la lignée cellulaire Hy2

Nous avons étudié le patron d'intégration des séquences virales dans la lignée Hy2 en digérant l'ADN cellulaire avec différents enzymes de restriction et en analysant les fragments par blot de Southern (St-Onge, 1989; St-Onge *et al.*, 1990). Une seule copie du plasmide pMT97.484 est intégrée dans le génome cellulaire. Les deux gènes T moyen sont séparés par des séquences du vecteur pAT153 (figure 6b). La première copie (*pmt-dl2*) possède une délétion qui élimine l'origine de réplication, le promoteur précoce et les séquences codant pour les 104 premiers acides aminés de T moyen. L'origine et le promoteur sont présents dans la deuxième copie (*pmt-dl1*). Toutefois, le gène est interrompu entre les sites AvaI (nt 1016) et AccI (nt 1500) du génome viral. Cette

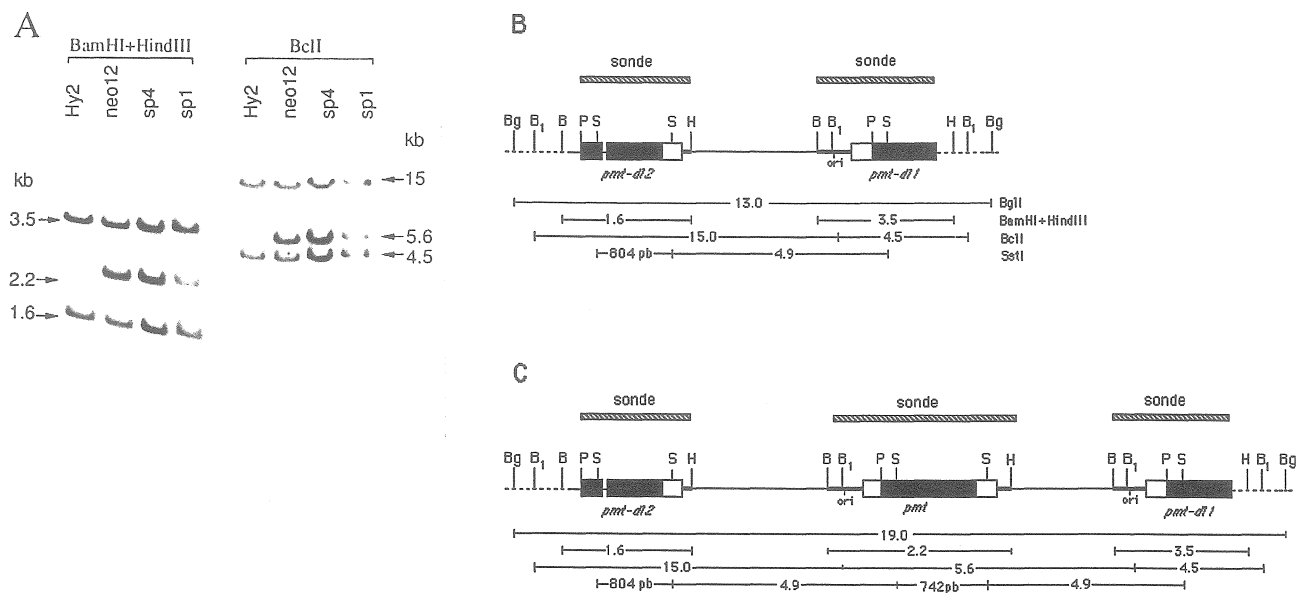


Figure 6. Analyse par blot de Southern de l'ADN des transformants spontanés de la lignée Hy2.

A. Analyse par les enzymes BamHI+HindIII et BclI. 20 μ g d'ADN cellulaire ont été digérés par différents enzymes de restriction. Les fragments générés ont été séparés sur gel d'agarose 1% et transférés sur filtre de nylon. Les filtres ont été hybridés avec une sonde radioactive préparée à partir du fragment BamHI-HindIII (nt 4632-1656) du génome de polyome. L'apparition d'un fragment BclI de 5,6 kb indique une addition d'ADN au niveau de l'insert *pmt*. Le fragment BamHI-HindIII de 2,2 kb signale la reconstitution d'un gène T moyen intact. Les fragments de 3,5 et 1,6 kb indiquent cependant que les gènes *pmt-dl1* et *pmt-dl2* sont conservés malgré la recombinaison.

B. Structure de l'insert *pmt* non recombiné. Les gènes *pmt-dl1* et *pmt-dl2* sont séparés par les séquences du vecteur plasmidique pAT153. Le gène *pmt-dl1* est interrompu entre les sites AvaI (nt 1016) et AccI (nt 1500) du génome viral et il produit une protéine tronquée de 53 kDa. Les séquences homologues entre les deux gènes sont illustrées en noir. L'ADN cellulaire est représenté par une ligne pointillée. Abréviations: ori, origine de réplication; Bg, BglII; B₁, BclI; B, BamHI; P, PstI; H, HindIII; S, SstI. La taille des fragments est en kb sauf si indiquée.

C. Structure de l'insert recombiné dans les transformants spontanés. La duplication de 5,6 Kb comprend un gène T moyen intact (*pmt*) et des séquences de pAT153. La duplication est située entre *pmt-dl2* et *pmt-dl1*.

copie produit une protéine de 53 kDa inactive dans la transformation néoplasique car les séquences codant pour la portion C-terminale de T moyen sont absentes.

2. Recombinaison spontanée

Après de nombreux passages en culture, nous avons noté l'apparition de foyers de cellules transformées dans la lignée Hy2. En collaboration avec le Dr. Louise Bouchard, le taux de conversion du phénotype normal au phénotype transformé a été évalué selon la méthode d'analyse de fluctuation développée par Luria et Delbruck (1943). Cette analyse permet de déterminer le taux auquel se produit un événement (i.e. la transformation) dans une population cellulaire en fonction du nombre de générations. La lignée Hy2 a étéensemencée à raison de quelques cellules par puits Linbro de 15 mm. Chaque puits représente une culture indépendante et est observé régulièrement pour un changement dans la morphologie des cellules. Après plus de 4 semaines à confluence, seulement une culture sur 96 s'est transformée. Le taux de conversion par génération cellulaire est donné par l'équation suivante:

$$\alpha = -(\ln P_o \cdot \ln 2) / (N_f N_i)$$

où P_o correspond à la probabilité qu'aucun événement ne se produise (95/96) tandis que N_f représente le nombre de cellules finales (~80000) et N_i le nombre de cellules initiales (~100). Nous avons estimé que le taux de transformation spontanée dans la lignée Hy2 est de 9×10^{-8} événement par génération cellulaire.

Afin de vérifier si l'insert viral *pmt* s'est recombéné, l'ADN de trois transformants spontanés a été

digéré avec différentes enzymes de restriction et les fragments ont été analysés par blot de Southern. Nous avons d'abord utilisé l'enzyme BglI qui ne coupe pas les séquences de l'insert *pmt*. Cette enzyme produit un fragment unique de 13 kb dans la lignée Hy2 et un fragment de 19 kb dans les transformants néo12, sp4 et sp1 (non illustré). Cette différence dans la taille des fragments suggère une addition d'environ 6 kb d'ADN dans l'insert *pmt*. Nous avons ensuite digéré avec l'enzyme BclI qui possède un seul site de coupure dans l'insert. Des fragments de 4.5 et 15.0 kb ont été observés dans la lignée Hy2 (figure 6a). Dans les transformants, nous avons remarqué l'apparition d'un fragment supplémentaire de 5.6 kb. Ce fragment indique une addition de 5.6 kb d'ADN située entre les deux copies défectueuses de T moyen. Des analyses subséquentes avec les enzymes BamHI et HindIII ont montré que cette addition reconstituait un gène T moyen intact capable de transformer les cellules. La structure de l'insert *pmt* recombiné est illustrée à la figure 6c et un mécanisme de recombinaison est proposé dans la discussion. La reconstitution du gène T moyen intact a été confirmée par immunoprécipitation d'une protéine complète de 56 kDa (non illustré).

3. Effet de l'antigène grand T du virus du polyome

Nous avons étudié précédemment l'effet de l'antigène grand T du virus du polyome sur la recombinaison au niveau de l'insert *pmt* (St-Onge, 1989). En résumé, la lignée Hy2 a été transfectée avec le gène grand T lié au marqueur de sélection *néo*. Nous avons ensuite soumis les cellules à une sélection au G418 et après 15 jours, nous avons isolé des colonies résistantes. Au moment de la sélection, les colonies possèdent toutes une morphologie non-transformée. Les colonies ont été transférées dans des puits Linbro de 15 mm et elles ont été observées tous les deux jours pour un changement dans leur phénotype. Nous avons détecté l'apparition de foyers de cellules transformées

dans environ la moitié des colonies transfectées avec le gène grand T (tableau 1). Aucune transformation n'a été observée en introduisant le gène *neo* seul dans la lignée. L'ADN de plusieurs colonies transformées a été analysé par blot de Southern (St-Onge *et al.*, 1990). On observe l'apparition d'un fragment BamHI-HindIII de 2.2 kb et d'un fragment SstI de 742 pb dans tous les transformants (figure 7a,b). Ces fragments indiquent une reconstitution d'un gène T moyen intact. Cependant, la structure exacte de l'insert recombiné n'a pu être identifiée du fait que l'antigène grand T provoque une amplification des séquences virales. La restauration d'un gène T moyen intact par recombinaison a aussi été démontrée par immunoprécipitation d'une protéine T moyen de 56 kDa dans les cellules Hy2 transformées (figure 7c).

Afin de caractériser la fonction de l'antigène grand T impliquée dans l'induction de la recombinaison homologe, nous avons étudié l'effet de différents mutants. La lignée Hy2 a d'abord été transfectée avec des mutants du gène grand T possédant une délétion dans le deuxième exon (tableau 1). Les mutants *dl-8*, *dl-23*, *dl-45* et *dl-141* ont provoqué de la recombinaison au niveau de l'insert *pmt*. Cependant, l'efficacité des mutants était inférieure à celle du grand T de type sauvage. Ces mutants immortalisent peu ou pas des cellules fibroblastiques d'embryon de rat (Larose *et al.*, 1990, 1991). Les mutants *dl-8* et *dl-141* contiennent des délétions qui affectent une séquence d'acides aminés impliquée dans la liaison avec le produit du gène de la susceptibilité au rétinoblastome (Rb). Nos résultats suggèrent que la liaison entre l'antigène grand T et la protéine Rb n'est pas nécessaire pour l'induction de la recombinaison.

Botchan *et al.* (1979) proposent que l'antigène grand T induit la recombinaison en initiant plusieurs cycles de réplication à l'origine virale pour créer une structure organisée en pelure d'oignon. Dans le but d'adresser le rôle des fonctions réplcatives de l'antigène grand T dans la

Tableau 1. Activité des mutants de l'antigène grand T du virus du polyome dans la lignée Hy2

Plasmide transfecté	Mutation ¹	Réplication	Nbre de colonies transformées	
			Exp 1	Exp 2
pSVneo	aucune	+	0/53 (0%)	0/60 (0%)
pneoLT1	aucune	+	22/40 (55%)	35/87 (40.2%)
pneoLTd18	del 145-174	+		19/94 (20.2%)
pneoLTd145	del 173-195	+		16/46 (34.8%)
pneoLTd123	del 195-228	+		7/52 (13.5%)
pneoLTd1141	del 141-146	+		12/42 (28.6%)
pneoLTd197	del 270-280	-	0/52 (0%)	
pRNLTΔ300	del 300-310	-	0/46 (0%)	
pneoLTd113	del 13-17	-	22/69 (31.9%)	
pneoLT13val	Leu-13 → Val	-	46/87 (52.9%)	
pneoLT16val	Leu-16 → Val	+	22/64 (34.4%)	

Les colonies résistants au G418 ont été isolées et transférées dans des puits Linbro de 15 mm. Les colonies ont ensuite été observées tous les 2 jours pour un changement dans la morphologie des cellules. Le nombre de colonies transformées a été déterminée 10 jours après qu'elles aient atteint la confluence.

¹ Position des acides aminés délétées ou modifiées dans l'antigène grand T.

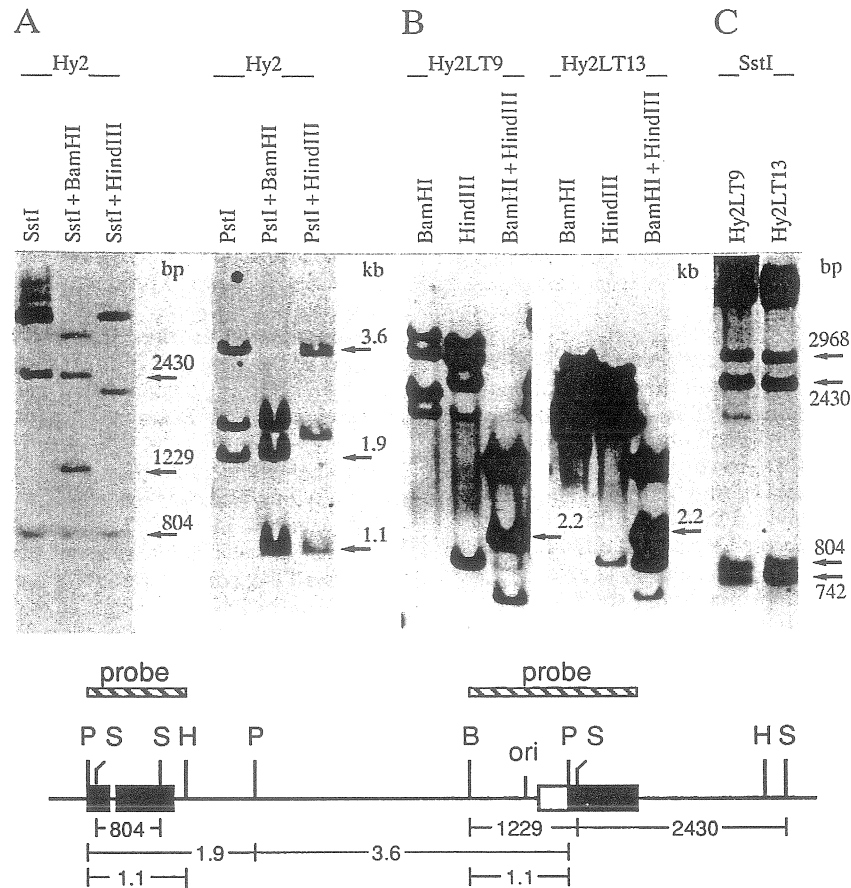


Figure 7. Analyse de la structure des séquences virales dans la lignée Hy2.

A. Analyse par blot de Southern des séquences virales intégrées dans la lignée Hy2. Le fragment SstI-BamHI de 1229 pb est le produit de la digestion du site BamHI à la jonction pAT153/polyome (nt 4632) et du site SstI (nt 569) dans *pmt-dl1*. Le fragment SstI de 804 pb provient de la copie *pmt-dl2*. Le fragment PstI-HindIII de 1172 pb provient également de *pmt-dl2*. L'absence d'un fragment de 1080pb signifie que la copie *pmt-dl1* est interrompue. La présence d'un fragment PstI de 3,6 Kb indique que les séquences pAT153 sont intactes et séparent les deux gènes T moyen. Abréviations: ori, origine de répliation; B, BamHI, H, HindIII; P, PstI; S, SstI.

B. Analyse de l'insert *pmt* dans les cellules Hy2 transformées. Après transfection de la lignée Hy2 par le plasmide pnéoLT1, des colonies résistantes au G418 ont été isolées et transférées dans des puits Linbro de 15 mm. Les colonies ont été désignées Hy2LT1, Hy2LT2, Hy2LT3, etc. Elles ont été observées tous les deux jours pour l'apparition de foyers de cellules transformées. Un foyer provenant d'une colonie a été prélevé et propagé en culture (ex. Hy2LT9-t). La lignée Hy2 possède des fragments de 1,6 et 3,5 kb. L'apparition du fragment de 2,2 kb dans les transformants indique la reconstitution d'un gène T moyen intact. L'intensité de ce fragment dans les lignées Hy2LT9-t et Hy2LT13-t suggère une amplification des séquences de l'insert.

C. Analyse par l'enzyme SstI. La reconstitution du site SstI au nucléotide 1373 produit un fragment de 742 pb dû à l'absence de l'intron. Ce fragment confirme la restauration d'un gène T moyen intact. Le fragment de 2968 pb provient de la digestion aux nucléotides 1373 et 4341 de pnéoLT1.

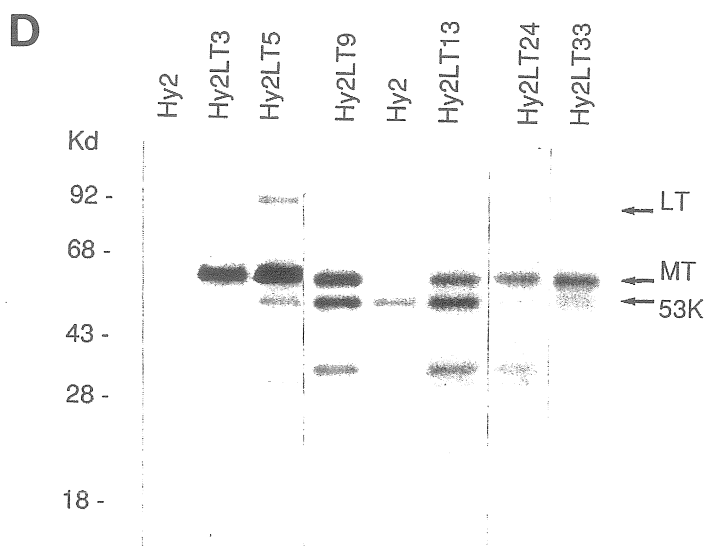


Figure 7. Analyse de la structure des séquences virales dans les cellules Hy2. (suite)

D. Détection des antigènes tumoraux dans les cultures transformées sous l'action de grand T. Les protéines cellulaires ont été marquées 90 minutes avec de la ^{35}S -méthionine et immunoprécipitées avec un anticorps spécifique pour les antigènes tumoraux de polyome. Les protéines ont ensuite été séparées sur un gel de polyacrylamide-SDS 12,5%. La position des antigènes grand T et T moyen est indiquée.

recombinaison, on a introduit dans la lignée Hy2 des mutants inactifs dans l'initiation de la réplication virale. Les mutants *dl-97* et *Δ300* contiennent des délétions dans le deuxième exon du gène grand T inactivant un domaine de l'antigène nécessaire à la réplication virale (Asselin *et al.*, 1986; Cowie *et al.*, 1986). Les mutants *dl-13*, *13val* et *16val* possèdent des mutations dans le premier exon du gène, situées dans un domaine de l'antigène interagissant avec l'ADN polymérase α (Dornreiter *et al.*, 1990). Afin de confirmer l'inactivité de ces mutants dans la réplication virale, ils ont été introduits dans la lignée Hy5 avec le plasmide pPLCAT. Le plasmide pPLCAT possède l'origine de réplication du virus du polyome ainsi que le gène codant pour l'enzyme chloramphénicol acétyltransférase (CAT). La réplication du plasmide est dévoilée grâce à une sonde radioactive spécifique pour les séquences du gène CAT. La réplication du plasmide pPLCAT est étudiée plutôt que celle du génome viral car il n'y a pas d'interférence avec les séquences virales déjà présentes dans la lignée Hy5. On remarque que l'antigène grand T de type sauvage ainsi que le mutant *16val* ont activé la réplication du plasmide pPLCAT malgré le fait que les cellules de rat ne soient que semi-permissives pour le virus du polyome (figure 8). Les mutants *dl-13*, *13val* et *dl-97* n'ont pu ou pas initié de réplication. Les mêmes résultats ont été reproduits avec des essais dans des cellules fibroblastiques d'embryon de rat et des cellules permissives de souris 3T6 (non illustré).

Les mutants ont ensuite été introduits dans la lignée Hy2 pour analyser leur capacité d'induire la recombinaison. Les mutants *dl-13*, *13val* et *16val* ont tous provoqué de la recombinaison homologe au niveau de l'insert *pmt*. Ces mutants montrent que l'antigène grand T induit la recombinaison indépendamment de la réplication virale. La recombinaison n'est donc pas le résultat d'une réplication multiple à l'origine virale formant la structure en pelure d'oignon. Puisque les mutants *dl-13* et *13val* sont inactifs dans l'initiation de la réplication, nous avons examiné par blot de Southern, l'ADN de plusieurs colonies transformées afin de vérifier si les antigènes mutants

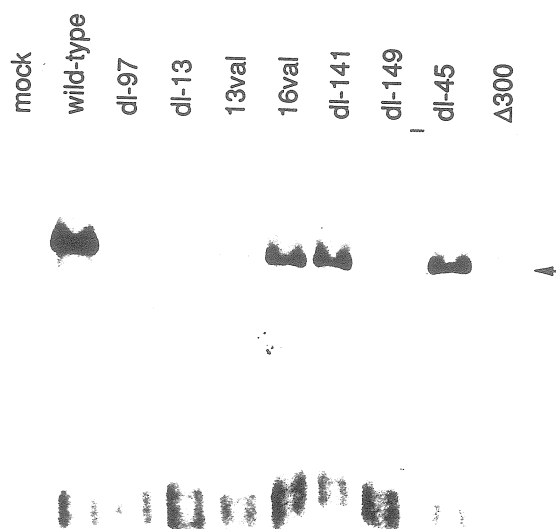


Figure 8. Efficacité de réplication des antigènes grand T mutants.

10 μ g des plasmides grand T mutants et pPLCAT ont été transfectés dans la lignée Hy5 selon la méthode au polybrène-DMSO. Soixante-douze heures après la transfection, l'ADN épisomique de faible poids moléculaire a été extrait selon la méthode de Hirt et digéré par les enzymes BclI et DpnI. L'ADN répliqué est linéarisé par l'enzyme BclI tandis que l'ADN non-répliqué est éliminé par l'enzyme DpnI. Les fragments ont été séparés sur gel d'agarose 1% et transférés sur filtre de nylon. Le filtre a été hybridé avec une sonde radioactive préparée à partir du fragment EcoRI de 2.2 kb du plasmide pPLCAT. Cette sonde est spécifique aux séquences du gène CAT. L'ADN répliqué est indiqué par une flèche tandis que l'ADN non-répliqué apparaît au bas de l'autoradiogramme.

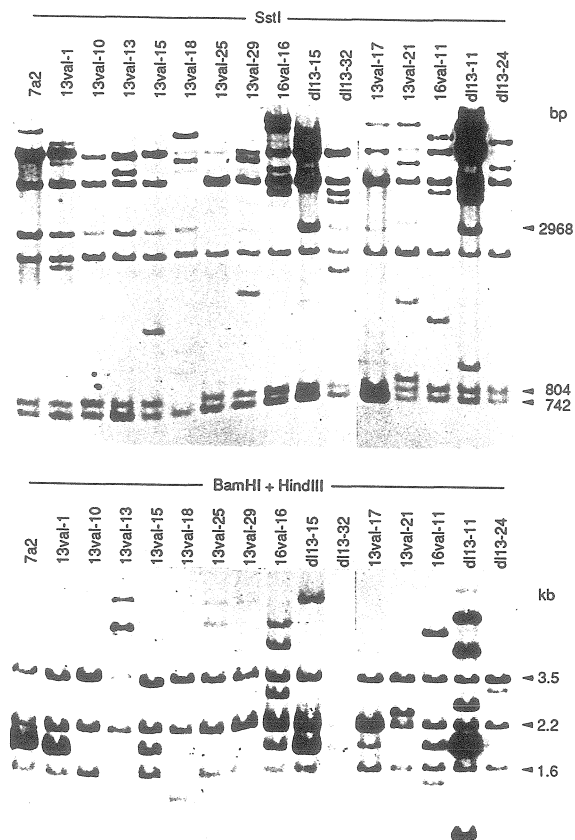


Figure 9. Analyse de la structure des séquences virales dans la lignée Hy2 transfectée avec des mutants de l'antigène grand T inactifs pour l'initiation de la réplication virale.

À la suite de la transfection de la lignée Hy2 par les plasmides pneoLTdl13, pneoLT13val et pneoLT16val, des colonies résistantes au G418 ont été isolées et transférées dans des puits Linbro de 15 mm. Les colonies ont été nommées 13val-1, 16val-2, dl13-3, etc. Elles ont été observées tous les deux jours pour l'apparition de foyers de cellules transformées. Un foyer provenant d'une colonie a été prélevé et propagé en culture (ex. 13val-10). L'ADN de ce foyer a été extrait et analysé par blot de Southern utilisant une sonde radioactive spécifique aux séquences du virus du polyome. 20 µg d'ADN cellulaire ont été digérés par différents enzymes de restriction et les fragments générés ont été séparés sur gel d'agarose 1%. L'apparition du fragment BamHI + HindIII de 2,2 kb et du fragment SstI de 742pb indique la reconstitution d'un gène T moyen intact. L'intensité des fragments de 2.2 kb et de 742 pb dans les lignées 13val-25, 16val-16, dl13-15 et 13val-17 suggère une amplification des séquences virales au niveau de l'insert *pmt*.

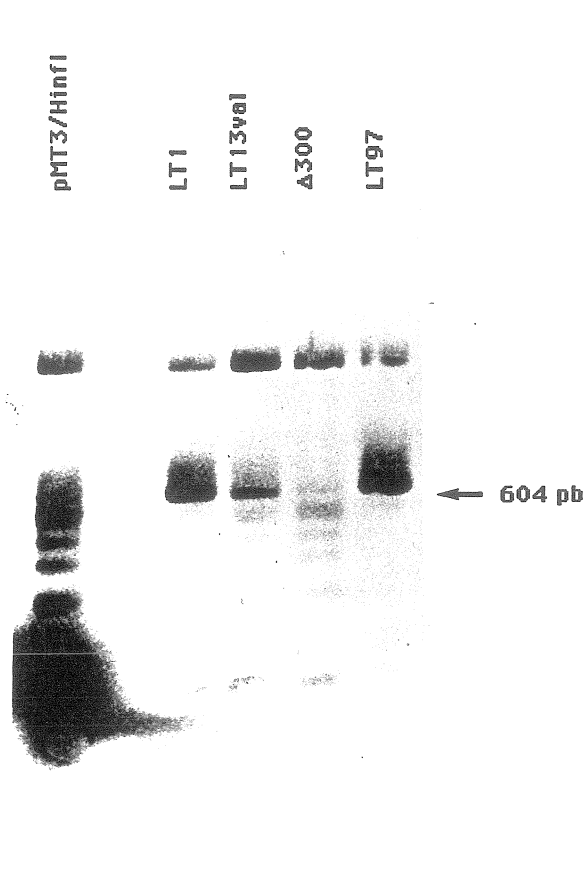


Figure 10. Liaison des antigènes grand T mutants à l'origine de réplication virale.

Les mutants sont transfectés dans la lignée cellulaire COS selon la méthode au polybrène-DMSO. 72 heures après la transfection, l'antigène grand T est immunoprécipité à partir des noyaux avec un anticorps polyclonal dirigé contre les antigènes tumoraux du virus du polyome. Cette étape permet d'éliminer les protéines cellulaires incluant l'antigène grand T de SV40 présent dans les cellules COS. L'immunoprécipité est ensuite incubé avec les fragments HinfI du plasmide pMT3 marqués au ^{32}P (1^{ère} piste). Après plusieurs lavages, l'ADN fixé par l'antigène grand T est élué de l'immunoprécipité et séparé sur gel d'agarose 2%. L'antigène grand T de type sauvage (LT1) ainsi que les mutants 13val et dl-97 ont formé une liaison spécifique avec le fragment HinfI de 604 pb. Ce fragment contient l'origine de réplication du virus du polyome. Une certaine quantité de liaison non spécifique est également observée.

provoquent l'amplification des séquences virales (figure 9). Selon l'intensité relative du fragment BamHI-HindIII de 2.2 kb et du fragment SstI de 742 pb, on constate que les mutants causent l'amplification des séquences virales en dépit d'être inactifs dans l'initiation de la réplication. Ces résultats confirment davantage que la recombinaison et l'amplification des séquences virales dans la lignée Hy2, ne se font pas selon le modèle de la pelure d'oignon.

Les mutants *dl-97* et $\Delta 300$ se sont avérés intéressants car ils n'ont pas provoqué de recombinaison dans la lignée Hy2. Une étude a montré que le mutant $\Delta 300$ ne se lie pas à l'ADN viral (Cowie *et al.*, 1986) tandis que la délétion *dl-97* est située près d'une région de l'antigène grand T importante pour la liaison avec l'origine virale (Sunstrom *et al.*, 1991). Il est donc possible que les mutant *dl-97* et $\Delta 300$ soient inactifs dans la recombinaison parce qu'ils sont incapables de former une liaison avec l'origine de réplication virale. Afin de mieux caractériser la mutation *dl-97*, nous avons étudié sa capacité de se lier à l'ADN selon la procédure décrite par McKay (1981). Comme attendu, le mutant $\Delta 300$ ne s'est pas lié à l'ADN viral tandis que l'antigène grand T de type sauvage a formé une liaison spécifique avec le fragment HinfI de 604 pb contenant l'origine de réplication (figure 10). On remarque que les mutants *dl-97* et *13val* se sont fixés à l'origine virale. Le mutant *dl-97* s'est lié avec un rendement supérieur à celui du grand T de type sauvage. On ne connaît pas les raisons permettant à la protéine *dl-97* de mieux se lier à l'origine. Il est possible que cette liaison soit reliée à la stabilité de la protéine mutante lors de l'essai. Néanmoins, nos résultats suggèrent qu'une fonction autre que la liaison à l'ADN empêche le mutant *dl-97* d'initier la réplication et d'induire la recombinaison dans la lignée Hy2.

4. Effet de l'antigène grand T de SV40

Nous avons également transfecté la lignée Hy2 avec le gène grand T du virus SV40. Contrairement à l'antigène grand T du virus du polyome, l'antigène grand T de SV40 possède la propriété de transformer les cellules en culture. De ce fait, l'événement de recombinaison ne peut plus être sélectionné selon la morphologie des cellules. Nous avons donc analysé par blot de Southern l'ADN de huit colonies choisies au hasard (figure 11). Dans cinq des colonies transformées par SV40, on observe un insert *pmt* recombiné identique à celui observé dans les transformants spontanés (St-Onge *et al.*, 1990; St-Onge, 1989). Aucune amplification des séquences virales n'est détectée dans les transformants. Nous concluons que l'antigène grand T de SV40 induit une recombinaison au niveau de l'insert *pmt* tout comme l'antigène grand T du virus du polyome. Nous avons aussi examiné l'effet de différents mutants de SV40 ne possédant pas d'activité hélicase et ne fixant pas l'origine de réplication virale (tableau 2). Ces mutants ont tous été incapables de provoquer de la recombinaison dans la lignée Hy2. Ces résultats confirment que la liaison à l'origine ainsi que l'activité hélicase de grand T sont nécessaire pour l'induction de la recombinaison. Toutefois, ces propriétés ne seraient pas suffisantes car le mutant C8A est demeuré inactif dans la recombinaison bien qu'il possède des activités hélicase et de liaison à l'origine de réplication.

III. Étude de l'amplification des séquences virales de la lignée Hy2 par l'antigène grand T ts-a du virus du polyome

1. Établissement de la lignée Hy2-ts5

Dans le but de faciliter l'étude de la recombinaison et l'amplification des séquences de l'insert

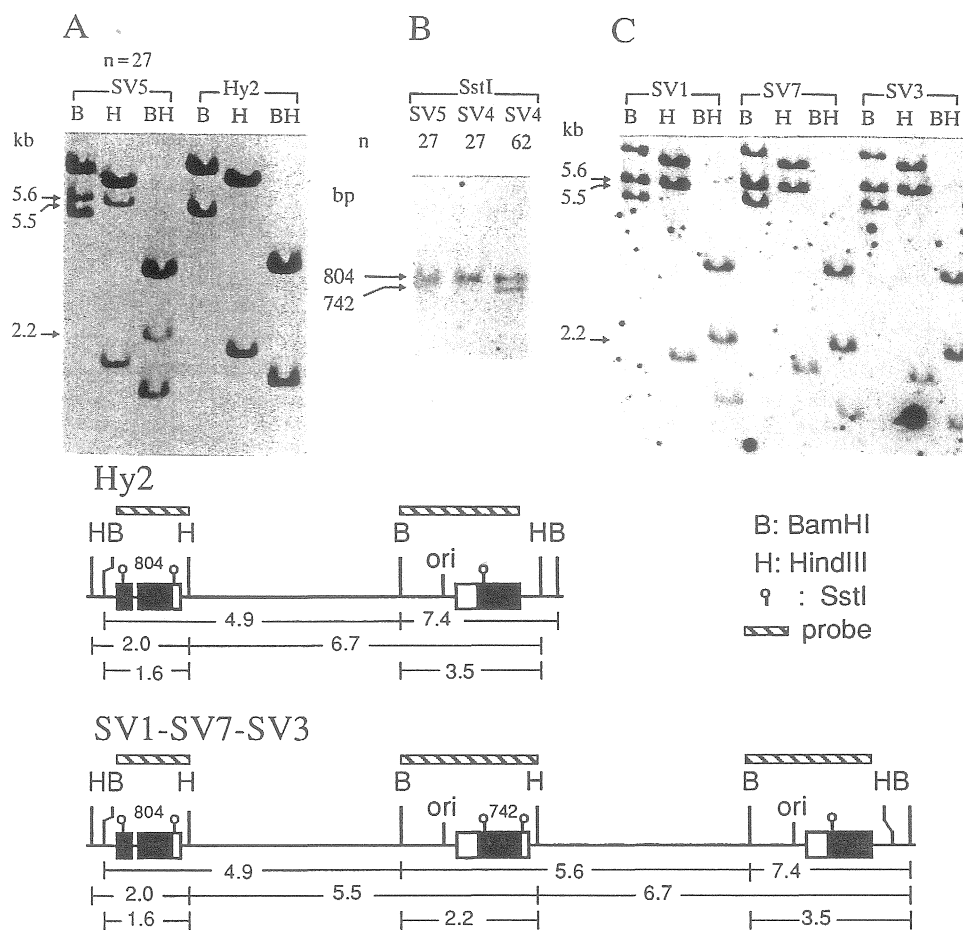


Figure 11. Analyse des cellules Hy2 transformées par l'antigène grand T de SV40.

Après transfection de la lignée Hy2 par le plasmide pSV2neo, des colonies transformées et résistantes au G418 sont isolées et transférées dans des puits Linbro de 15 mm. Les colonies ont été désignées SV1, SV2, SV3 etc.. Les colonies sont ensuite propagées en culture et leur ADN est extrait et analysé par blot de Southern. 20 µg d'ADN cellulaire sont digérés par différents enzymes de restriction et les fragments générés sont séparés sur gel d'agarose 1%. Par la suite, le gel est transféré sur une membrane de nylon et hybridé avec une sonde radioactive préparée à partir du fragment BamHI+HindIII (nt 4632-1656) du génome de polyome.

L'apparition d'un fragment BamHI+HindIII de 2,2 kb et d'un fragment SstI de 742 pb signale la reconstitution d'un gène T moyen intact. La présence des fragments BamHI+HindIII de 3,5 et 1,6 kb dans les colonies transformées indique que les copies *pmt-dl1* et *pmt-dl2* sont conservées après recombinaison.

Tableau 2. Activité des mutants de l'antigène grand T de SV40 dans la lignée Hy2

Plasmide transfecté	Mutation	Liaison à l'origine	Activité hélicase	Recombinaison
pneo-SV2	aucun	+	+	5/8
pneo-C6-2	Asn-153 Thr	-	+	0/4
pneo-C8A	Lys-224 Glu	+	+	0/11
pneo-C11A	Pro-522 Ser	+	-	0/16
pneo-T22	His-203 Gln	-	+	0/10

Environ la moitié des colonies résistantes au G418 possédaient une morphologie transformées. Certaines colonies choisies au hasard ont été propagées en culture et leur ADN a été analysé par blot de Southern. L'événement de recombinaison a été détecté par l'apparition du fragment BamHI-HindIII de 2.2 kb.

pmt, la lignée Hy2 a été transfectée avec un gène grand T *ts-a* du virus du polyome. Ce gène produit une protéine grand T instable à la température restrictive de 39°C dû à la conversion du résidu alanine 539 en thréonine (Thomas *et al.*, 1981). À la température permissive de 33°C, l'antigène grand T est stable et fonctionnel. On remarque l'apparition de foyers de cellules transformées dans les colonies isolées et maintenues à 33°C (figure 12a). Cette transformation est le produit d'une recombinaison qui reconstitue un gène T moyen intact (voir ci-dessous). Aucune transformation n'est observée lorsque les colonies sont cultivées à 39°C.

Les colonies isolées à 39°C ont été transférées à 33°C afin de sélectionner une lignée cellulaire capable d'induire la recombinaison de l'insert *pmt* à la température permissive. Seulement deux colonies sur 50 ont produit des foyers à 33°C tout en restant non transformées à 39°C. Nous avons nommé ces lignées Hy2-ts1 et Hy2-ts5. Des analyses par blot de Southern ont montré que la lignée Hy2-ts1 possédait plusieurs copies du gène grand T *ts-a* intégrées dans le génome cellulaire tandis que la lignée Hy2-ts5 ne possédait que deux copies (non illustré). Nous avons étudié davantage la lignée Hy2-ts5 car l'insert *plt* est simple et se distingue bien de l'insert *pmt*.

Nous avons exposé la lignée Hy2-ts5 à une température de 33°C pendant différentes périodes pour étudier la recombinaison homologe et l'amplification induites par l'antigène grand T. À 39°C, la lignée conserve une morphologie normale. Cependant, lorsqu'elle est placée 24 heures à 33°C puis retournée à 39°C, des foyers de transformation se développent (figure 12b). Aucune transformation n'est détectée lorsque la lignée Hy2 est transférée à 33°C. Donc, la transformation n'est pas provoquée par le changement de température mais est bien reliée à l'expression d'un antigène grand T fonctionnel à 33°C. De plus, lorsque les cellules sont retournées à 39°C, elles

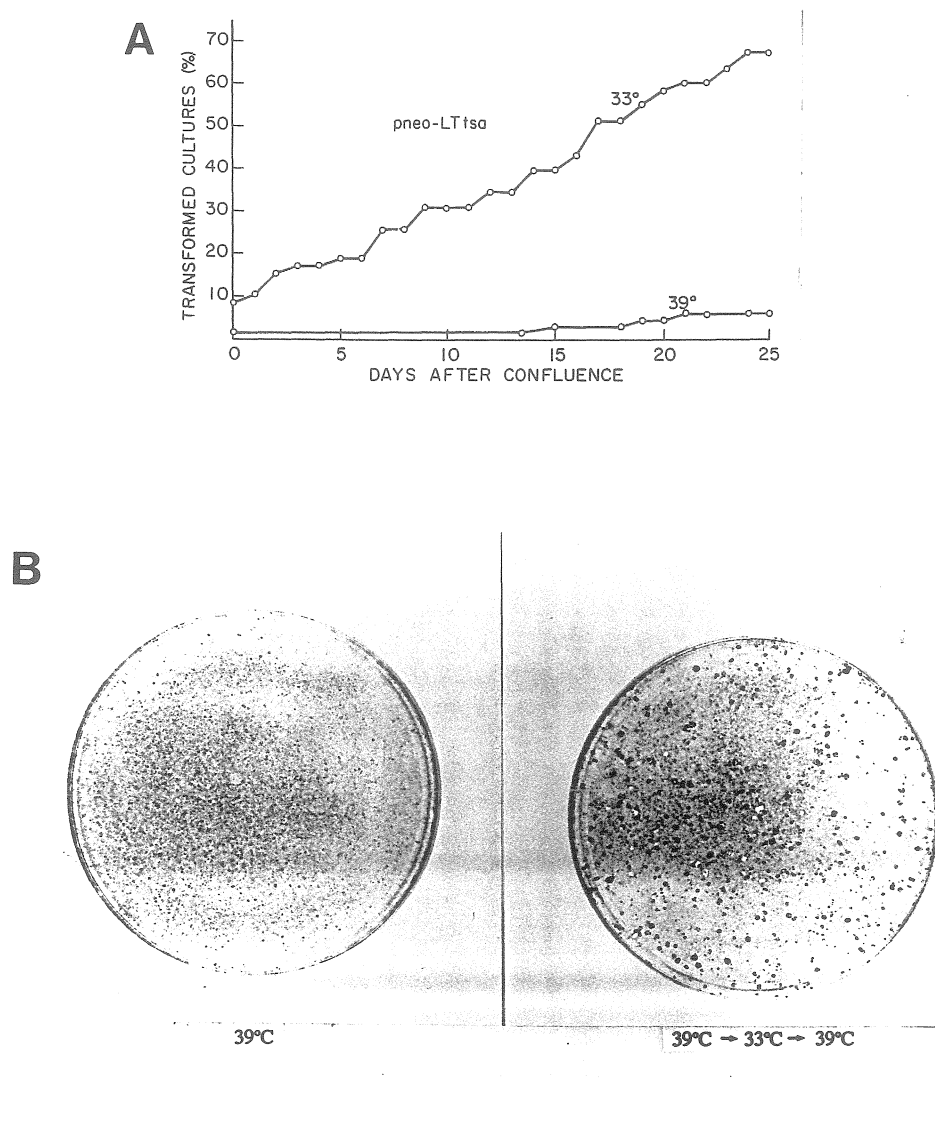


Figure 12. Activité de l'antigène grand T ts-a du virus du polyome dans la lignée Hy2.

A. Le mutant thermosensible pneoLTtsa de grand T a été introduit dans la lignée Hy2 selon la méthode de coprécipitation au phosphate de calcium. Après la sélection au G418, des colonies ont été prélevées dans des puits Linbro de 15 mm et incubées à 33°C ou à 39°C. La morphologie des cellules a été vérifiée tous les deux jours pour l'apparition de cellules transformées.

B. Phénotype de la lignée Hy2-ts5 aux températures restrictive et permissive. La lignée Hy2-ts5 a été cultivée à 39°C dans des boîtes de 100 mm jusqu'à ce que les cellules atteignent 20% de confluence. Les boîtes ont ensuite été placées 24 heures à 33°C puis retournées à 39°C. Au moment de la confluence, les boîtes ont été colorées au bleu de giemsa. Des foyers de cellules transformées sont apparus dans la boîte exposée à 33°C.

conservent une morphologie transformée. Donc, l'expression continue d'un antigène grand T fonctionnel n'est pas nécessaire au maintien de l'état transformé.

2. Analyse de l'expression des antigènes tumoraux dans les cellules Hy2-ts5

Pour vérifier l'expression des antigènes T moyen et grand T aux différentes températures, les cellules ont été marquées à la [³⁵S]-méthionine et les protéines ont été immunoprécipitées avec un anticorps spécifique aux antigènes T du virus du polyome. À 39°C, on détecte dans la lignée Hy2-ts5, une protéine de 100 kDa correspondant à l'antigène grand T et une protéine de 53 kDa représentant le produit d'un des gènes défectueux de l'insert *pmt* (figure 13). La protéine de 53 kDa a également été observée dans la lignée Hy2 (non illustré). Nous avons aussi analysé les protéines provenant de quatre foyers isolés au hasard après transfert de la lignée à 33°C. Les quatre foyers produisent un antigène T moyen intact de 56 kDa. Ce résultat montre que l'exposition des cellules à un antigène grand T fonctionnel provoque une recombinaison entre les séquences homologues de l'insert *pmt* pour reconstituer un gène T moyen complet.

3. Analyse de la structure des inserts viraux

Dans le but d'identifier le mécanisme par lequel l'antigène grand T induit la recombinaison, l'ADN de plusieurs foyers de transformation est analysé par blot de Southern afin de déterminer la structure des séquences recombinées. La lignée Hy2-ts5 possède deux inserts viraux: l'insert *pmt* dont la structure a déjà été décrite (figure 14a) et l'insert *plt* qui est composé d'un gène *néo* suivi d'un tandem tête-à-queue de gènes grand T *ts-a* (figure 14b).

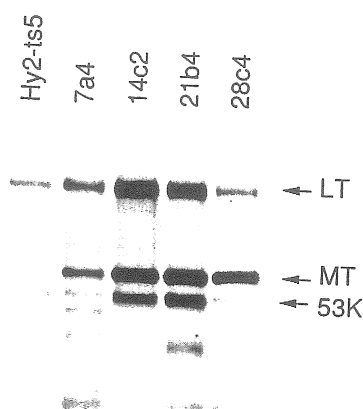


Figure 13. Détection des antigènes tumoraux du virus du polyome dans la lignée Hy2-ts5.

Les protéines cellulaires ont été marquées 90 minutes avec de la $^{35}\text{[S]}$ -méthionine et immunoprécipitées avec un anticorps spécifique pour les antigènes tumoraux de polyome. Les protéines ont ensuite été séparées sur un gel de polyacrylamide-SDS 12,5%. La position des antigènes grand T et T moyen ainsi que la protéine de 53 kDa est indiquée. La première piste représente des cellules Hy2-ts5 non-transformées et maintenues à 39°C. Les lignées 7a4, 14c2, 21b4 et 28c4 proviennent de foyers de cellules transformées isolées après que la lignée Hy2-ts5 fût exposée à 33°C pendant 7, 14, 21 et 28 jours.

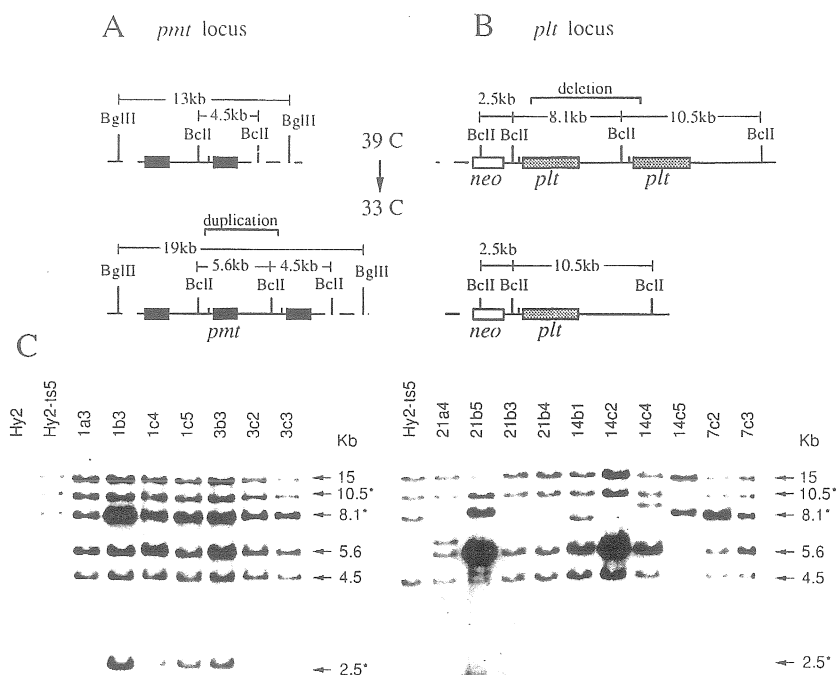


Figure 14. Analyse des inserts viraux dans la lignée Hy2-ts5.

A. Structure de l'insert *pmt* avant et après recombinaison.

B. Structure de l'insert *plt* avant et après recombinaison.

C. Analyse par l'enzyme de restriction BclI. 20 µg d'ADN cellulaire sont digérés par l'enzyme BclI et les fragments générés sont séparés sur gel d'agarose 1%. Le gel est ensuite transféré sur une membrane de nylon qui est hybridée avec une sonde radioactive préparée à partir du fragment BamHI-HindIII (nt 4632-1656) du génome de polyome. L'enzyme BclI possède un seul site de coupure dans l'insert *pmt* et deux sites dans l'insert *plt*. Les fragments de 15 et 4.5 kb proviennent de l'insert *pmt*. Les fragments provenant de l'insert *plt* sont identifiés par les astérisques (*). L'apparition du fragment de 5.6 kb indique la reconstitution d'un gène T moyen intact.

Lorsque l'ADN de la lignée Hy2-ts5 est digéré avec l'enzyme BclI, on détecte des fragments de 15 et 4.5 kb correspondant à l'insert *pmt* et des fragments additionnels de 10.5, 8.1 et 2.5 kb provenant de l'insert *plt* (figure 14c). Dans tous les foyers analysés, on remarque l'apparition d'un fragment de 5.6 kb identique à celui observé dans les transformants spontanés de Hy2. Ce fragment indique la reconstitution d'un gène T moyen intact entre les deux gènes défectueux de l'insert (figure 14a). Une incubation de 24 heures à 33°C est suffisante pour induire une recombinaison dans l'insert *pmt* (lignées 1a3, 1b3, 1c4 et 1c5). On observe aussi une recombinaison au niveau des séquences de l'insert *plt* lorsque la lignée est maintenue pendant plusieurs jours à la température permissive. Certaines lignées ont subi une recombinaison homologue réciproque qui élimine une des copies du gène grand T *ts-a* (21b3, 21b4 et 14c2). Dans d'autres lignées, les fragments de restriction suggèrent une recombinaison plus complexe de l'insert *plt* (21a4 et 14c4). Finalement dans une des lignées, une portion de l'insert *pmt* a aussi été délétée (14c5).

Lorsque les cellules sont exposées à 33°C pendant 7, 14 et 21 jours, on constate une amplification des séquences virales dans plusieurs foyers de transformation. Dans les lignées 1b3, 21b5 et 7c2, l'intensité relative du fragment de 8.1 kb est compatible avec une amplification des séquences de l'insert *plt* tandis que l'intensité du fragment de 5.6 kb dans les lignées 21b5, 14b1, 14c2 et 14c4 laisse sous-entendre une amplification de l'insert *pmt*. Les lignées ont été analysées davantage avec l'enzyme BglII. Cette enzyme ne digère pas les séquences retrouvées dans l'insert *pmt*. Dans la lignée Hy2-ts5, on identifie des fragments de 13 et 11 kb correspondant aux inserts *pmt* et *plt* respectivement (figure 15). Cependant, un fragment de 19 kb est observé dans les lignées 14a3 et 7c2. Ce fragment possède une taille semblable à celui observé pour le transformant spontané Hy2-sp4 et correspond à une addition de 5.6 kb entre les deux gènes T moyen défectueux. Des analyses avec d'autres enzymes ont montré que cette addition contient un gène T moyen intact (non-illustré).

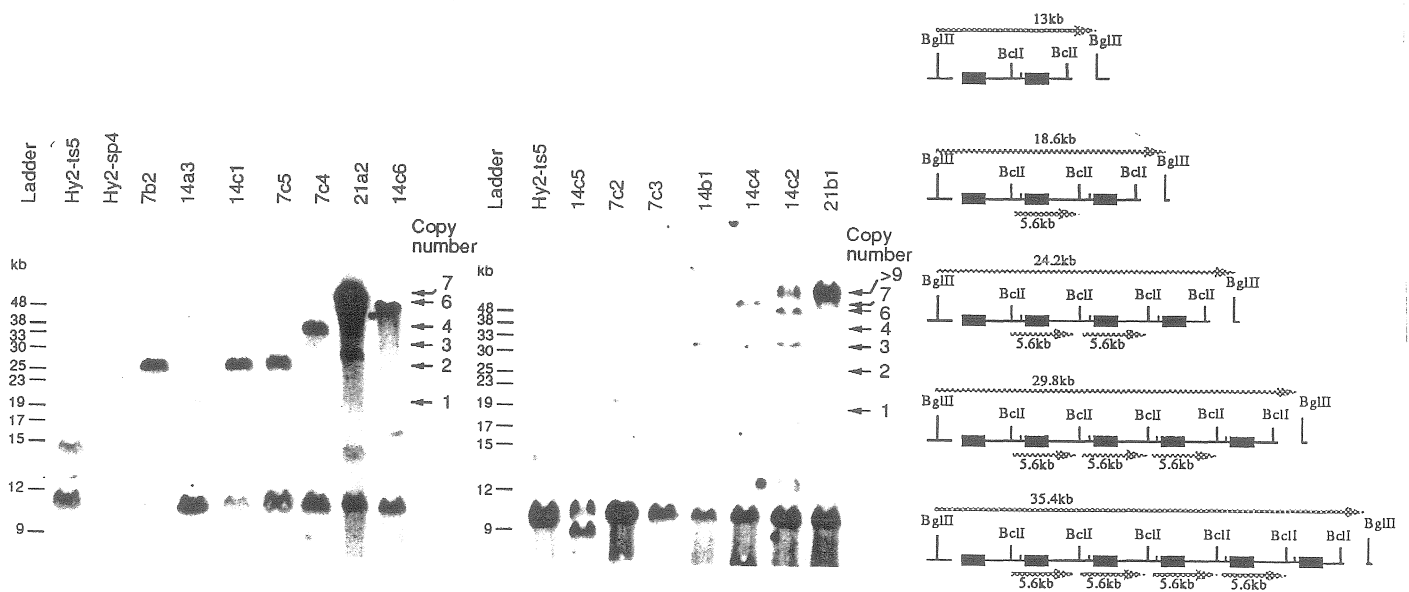


Figure 15. Analyse des transformants de la lignée Hy2-ts5 par l'enzyme BglII.

20 μ g d'ADN cellulaire ont été digérés par l'enzyme de restriction BglII et les fragments produits ont été séparés sur un gel d'agarose 0.4% à 4°C. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane de nylon et hybridé avec une sonde radioactive spécifique pour les séquences du virus du polyome. L'enzyme BglII ne possède pas de site de coupure dans les inserts *pmt* et *plt*. La lignée Hy2-sp4 est un transformant spontané de la lignée Hy2 possédant une seule addition de 5.6 kb d'ADN.

D'autres lignées (7b2, 14c1, 7c5, et 7c3) ont produit un fragment de 25 kb indiquant deux additions consécutives de 5.6 kb. Nous avons aussi observé des lignées contenant 3 additions ou plus de 5.6 kb (ex. 14c6, 21b1). Ces additions ont toujours lieu entre les deux copies défectueuses de T moyen et suggèrent que l'amplification se produit par duplication successive du gène T moyen intact. Dans quelques lignées (ex. 14c2), on observe plusieurs fragments BglII. On ne connaît pas l'origine de ces fragments mais ils sont possiblement le résultat d'événements de recombinaison qui se produisent après l'amplification des séquences virales.

4. Taux de recombinaison induit par l'antigène grand T

Afin d'évaluer l'efficacité avec laquelle l'antigène grand T induit la recombinaison homologue, nous avons déterminé le taux de recombinaison de l'insert *pmt* lorsque la lignée Hy2-ts5 est exposée à 33°C. Dans ce cas-ci, nous ne pouvons utiliser l'équation d'analyse de fluctuation développée par Luria et Delbruck car le nombre de cellules ayant subi de la recombinaison en présence d'un grand T fonctionnel est trop élevé. Nous avons plutôt employé une méthode développée par Bastin *et al* qui permet d'évaluer le taux de recombinaison en étudiant l'ADN d'une population totale de cellules exposée à 33°C. Dans cette population, l'antigène grand T provoque une recombinaison dans les cellules de départ A avec un taux α pour produire des cellules B avec un insert recombiné. Selon l'intensité du fragment recombiné, la proportion de cellules B est déterminée et le taux de recombinaison est défini selon la formule:

$$\Phi_B = 1 - \frac{r-1 + \alpha}{r-1 + \alpha \cdot 2^{n(r-1+\alpha)}}$$

où Φ_B représente la proportion de cellules avec un insert recombiné, r est la constante de croissance des cellules B (k_2) sur celle des cellules A (k_1), n correspond au nombre de générations cellulaires et α est le taux de recombinaison qui convertit les cellules A en cellules B. Nous avons comparé la

vitesse de croissance des cellules normales à celle des cellules transformées afin de définir la valeur de r . Nous avons estimé qu'une cellule normale (A) se divise tous les 0.965 jour tandis qu'une cellule transformée (B) se divise au 0.736 jour. La constante de croissance est déterminée selon l'équation: $k = \ln 2/t$

Donc, k_1 correspond à 0.72, k_2 à 0.94 et la valeur de r est égale à 1.3.

La lignée Hy2-ts5 a été cultivée à 39°C dans des boîtes de 100 mm jusqu'à ce que les cellules atteignent 50% de confluence. Les boîtes sont ensuite transférées et maintenues à 33°C pendant 4 jours. Lorsque les cellules sont arrivées à confluence, l'ADN a été extrait et analysé par blot de Southern. Sous ces conditions, les cellules transformées n'envahissent pas le reste de la population cellulaire et la recombinaison peut être étudiée sans sélection. La proportion de cellules avec un insert recombiné est déterminée en comparant l'intensité relative du fragment BclI de 5.6 kb. Lors d'un premier essai (figure 16a), le nombre de cellules ayant un insert *pmt* recombiné représentait 23 % de la population totale de cellules. En utilisant la formule décrite ci-haut, nous avons mesuré un taux de recombinaison d'environ 3.7×10^{-1} événement par génération cellulaire. Lors d'un second essai (figure 16b), l'intensité du fragment HindIII de 5.5 kb indique que 50% des cellules totales possédaient un insert recombiné. Ceci correspond à un taux de recombinaison de 1.0 événement par génération. Donc, l'antigène grand T stimule de plus d'un million de fois la recombinaison de l'insert *pmt* dans les lignées Hy2 et Hy2-ts5.

5. Mécanisme de recombinaison

Un aspect important qui émerge des résultats obtenus avec les lignées Hy2 et Hy2-ts5 est que

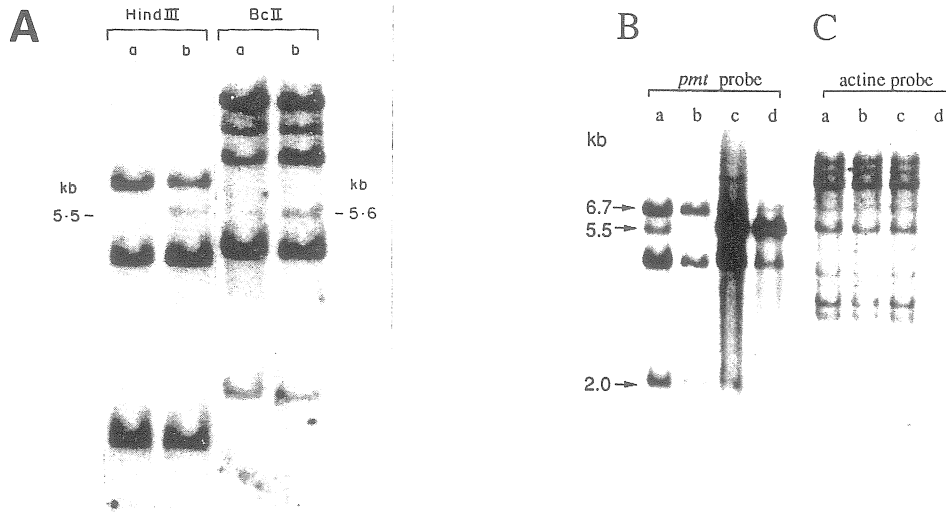


Figure 16. Analyse des produits de recombinaison de la lignée Hy2-ts5.

A. La lignée Hy2-ts5 est cultivée à 39°C jusqu'à ce que les cellules atteignent 50% de confluence. Les cellules sont ensuite transférées et maintenues à 33°C pendant 4 jours (i.e. une génération cellulaire). Au moment de la confluence, l'ADN de la population cellulaire est extrait et analysé par blot de Southern. 20 µg d'ADN cellulaire sont digérés par l'enzyme HindIII ou BclI. Les fragments générés sont séparés sur gel d'agarose 1%. Le gel est ensuite transféré sur une membrane de nylon qui est hybridée avec une sonde radioactive préparée à partir du fragment BamHI-HindIII (nt 4632-1656) du génome de polyome.

B. Analyse des produits de recombinaison avec l'enzyme HindIII. La membrane est hybridée avec une sonde radioactive T moyen. Piste a: La lignée Hy2-ts5 est cultivée à 39°C jusqu'à ce que les cellules atteignent 50% de confluence. Les cellules sont ensuite transférées et maintenues à 33°C pendant 4 jours (i.e. une génération cellulaire). 20 µg d'ADN cellulaire sont déposés dans le puits. Piste b: Lignée Hy2-ts5 maintenue à 39°C. Piste c: La lignée Hy2-ts5 est cultivée à 39°C jusqu'à ce que les cellules atteignent 20% de confluence. Les cellules sont ensuite transférées et maintenues à 33°C pendant 7 jours (i.e. ≈ quatre générations cellulaires). 20 µg d'ADN sont déposés dans le puits. Piste d: Même échantillon que la piste c sauf que 4 µg d'ADN sont déposés.

C. Même analyse qu'en B sauf que la membrane est hybridée avec une sonde détectant le gène de l'actine.

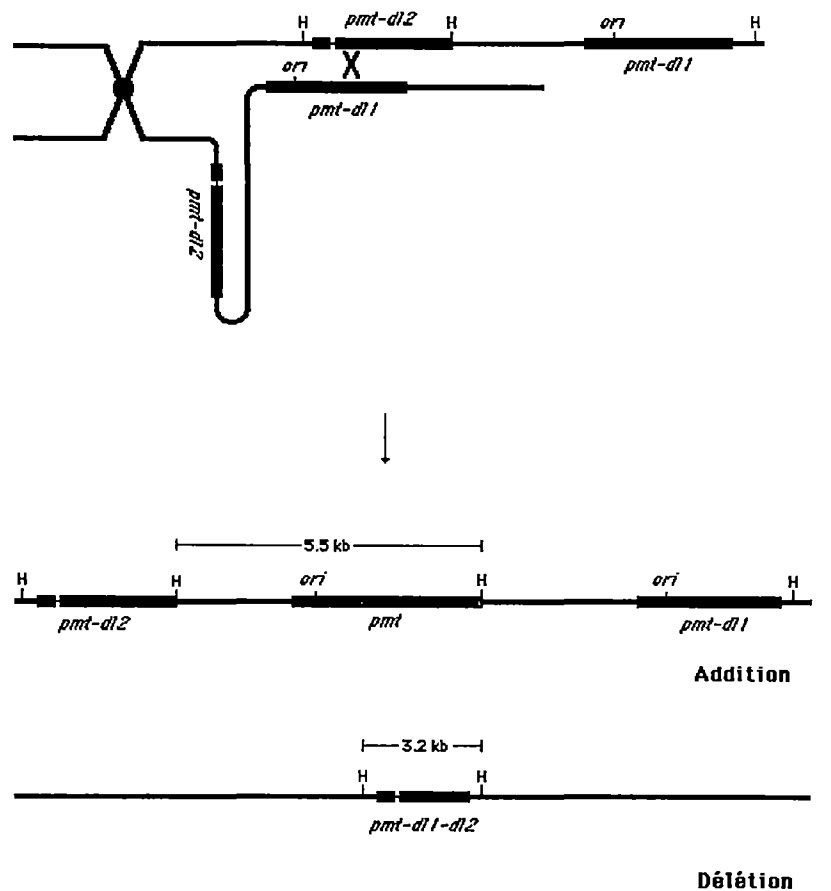


Figure 17. Produits de recombinaison obtenus après un échange inégal entre chromatides-soeurs

Structure des produits de recombinaison. Un échange inégal entre chromatides-soeurs produit une chromatide avec une addition d'ADN au niveau de l'insert *pmt* et une chromatide avec une délétion d'ADN. Les chromatides sont ségréguées dans deux cellules filles lors de la mitose. La chromatide avec addition présente un fragment HindIII de 5,5 kb et contient un gène T moyen intact. Le produit avec une délétion génère un fragment HindIII de 3,2 kb. Abréviation: ori, origine de réplication; H, HindIII.

la structure de l'insert recombiné peut provenir d'un échange inégal entre chromatides-soeurs. Ce type d'échange génère normalement deux produits réciproques. Ces produits sont répartis dans deux cellules filles lors de la division cellulaire et se distinguent par une addition ou une délétion d'ADN. Pour l'insert *pmt*, une addition d'ADN devrait produire un fragment HindIII de 5.5 kb tandis qu'une délétion devrait engendrer un fragment HindIII de 3.2 kb (figure 17). Étant donné qu'il y a sélection pour un gène T moyen intact dans les transformants spontanés, seulement le produit avec une addition est observé (non illustré). Lorsque la lignée Hy2-ts5 est cultivée pendant une génération à 33°C (voir ci-haut), l'ADN est extrait et analysé avant que les cellules transformées n'envahissent le reste de la population cellulaire. Dans ces conditions, il n'y a pas de sélection pour l'événement de recombinaison et les deux produits devraient être observés. Or, on n'observe que le fragment de 5.5 kb (figure 16b, piste a). Le fragment de 3.2 kb attendu avec une délétion n'est jamais détecté. L'insert *pmt* avec une addition est aussi le seul produit observé lorsque les cellules sont exposées à 33°C pendant 3 à 4 divisions cellulaires (figure 16b, piste c et d). L'absence du produit de délétion indique que la recombinaison de l'insert *pmt* n'a pas lieu selon un mécanisme d'échange inégal entre chromatides-soeurs. Un mécanisme permettant d'expliquer le produit de recombinaison est présenté dans la discussion.

IV. Étude de la recombinaison homologue dans la lignée Hy5

1. Description de la lignée cellulaire Hy5

L'ADN de la lignée Hy5 a précédemment été extrait, digéré avec différents enzymes de restriction et analysé par blot de Southern afin de déterminer la structure de l'insert *pmt* (St-Onge, 1989). Comme la lignée Hy2, la lignée Hy5 contient deux gènes T moyen défectueux intégrés de

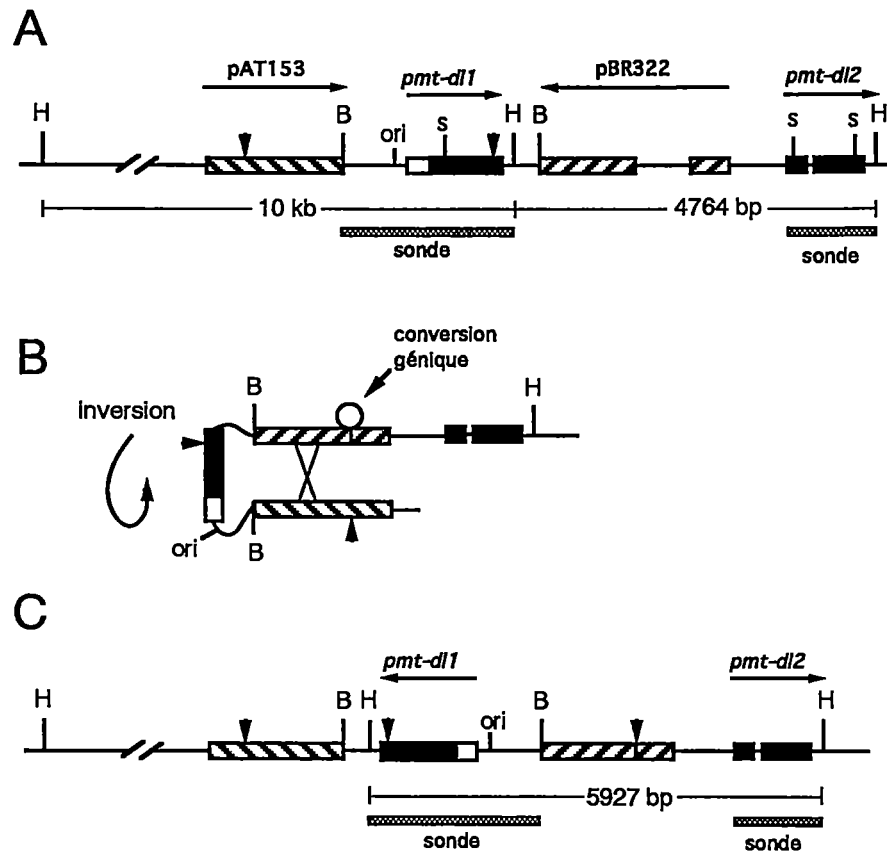


Figure 18. Recombinaison homologue dans la lignée Hy5.

A. Structure de l'insert *pmt* avant recombinaison. Le gène *pmt-dl1* contient une délétion de 30 pb (triangle inversé) réduisant les propriétés transformantes de T moyen. Cette délétion élimine également le site *SstI* au nucléotide 1373. Le gène *pmt-dl2* possède une délétion supprimant l'origine de répliation et les promoteurs viraux. Les deux gènes T moyen sont séparés par des séquences du vecteur *pBR322* tandis que des séquences du vecteur *pAT153* sont retrouvées en amont de la copie *pmt-dl1*. Les séquences homologues entre les gènes T moyen sont illustrées en noir tandis que l'homologie entre les séquences plasmidiques est représentée par les boîtes hachurées. Les séquences du vecteur *pAT153* sont identiques à celles du vecteur *pBR322* sauf pour une délétion de 705 pb (triangle inversé). Abréviations: ori, origine de répliation; H, *HindIII*; S, *SstI*.

B et C. Recombinaison entre les séquences plasmidiques. Un échange réciproque entre les séquences plasmidiques provoque l'inversion de *pmt-dl1*. L'inversion est détectée par l'apparition d'un fragment *HindIII* de 6682 pb. Le fragment est de 5927 pb lorsqu'il y a transfert de la délétion de 705 pb dans les séquences *pBR322* par conversion génique.

façon stable dans le génome cellulaire (figure 18a). La première copie (*pmt-dl1*) possède une délétion de 63 pb (nt. 746-809) éliminant l'intron de T moyen et une délétion de 30 pb (nt. 1367-1397) provenant de la mutation *dl-97*. Malgré l'expression de cette copie (figure 23), les cellules maintiennent un phénotype normal, semblable à celui de la lignée FR3T3 car la mutation *dl-97* réduit les propriétés transformantes de l'antigène. La deuxième copie (*pmt-dl2*) possède une délétion qui élimine l'origine de réplication virale, les promoteurs viraux et les séquences correspondant aux 104 premiers acides aminés de T moyen. Cette copie n'est pas exprimée dans la cellule car le promoteur viral est absent. Les copies *pmt-dl1* et *pmt-dl2* sont séparées par des séquences du vecteur pBR322 tandis que des séquences du vecteur pAT153 sont retrouvées en amont de la copie *pmt-dl1*. Une recombinaison entre les deux gènes défectueux devrait reconstituer un gène T moyen intact capable de transformer la cellule.

L'insert *pmt* de la lignée Hy5 est différent de celui de la lignée Hy2. Dans Hy5, l'origine de réplication virale est située en amont de la première copie de T moyen tandis que dans Hy2, l'origine est située entre les deux gènes T moyen. De plus dans la lignée Hy5, on retrouve deux types de séquences homologues au niveau de l'insert *pmt*. Il existe une homologie entre les séquences des deux gènes T moyen et une homologie entre les séquences des vecteurs pBR322 et pAT153 puisque le vecteur pAT153 est identique au vecteur pBR322 sauf pour une délétion de 705 pb entre les nucléotides 1647 et 2352 (Lusky et Botchan, 1981). Finalement, les séquences T moyen sont disposées dans la même orientation tandis que les séquences plasmidiques sont dans une orientation inversée.

2. Recombinaison spontanée

Nous avons utilisé la méthode d'analyse de fluctuation Luria et Delbruck afin d'évaluer le taux de transformation spontanée de la lignée Hy5. La lignée a étéensemencée à raison de 20 cellules par puits Linbro de 6 mm et au total, 185 puits ont été observés pour un changement dans la morphologie des cellules. Après plusieurs semaines à confluence ($N_t = 18000$), nous avons détecté de la transformation dans 43 puits, ce qui correspond à un taux de transformation spontanée de 10^{-5} événement par génération cellulaire.

Le taux de recombinaison spontanée a été évalué en analysant l'ADN de la lignée Hy5 extrait après différents nombres de générations cellulaires (figure 19). Après 26 et 36 générations, la lignée possède un phénotype non transformé et on observe des fragments HindIII de 4.7 et 10.0 kb. Ces fragments correspondent à un insert *pmt* non recombiné. On remarque cependant l'apparition d'un fragment de 5.9 kb après 45 générations cellulaires. Ce fragment est le résultat d'une recombinaison entre les séquences plasmidiques (figure 18b). La présence du fragment de 5.9 kb coïncide avec l'apparition de cellules transformées dans la lignée. Après 55 générations, les fragments de 4.7 et 10 kb ne sont plus détectés et toutes les cellules de la lignée possèdent un phénotype transformé. Selon l'intensité du fragment de 5.9 kb à 45 générations, nous avons déterminé la proportion de cellules transformées (Φ_B) présentes dans la lignée pour ensuite calculer le taux de recombinaison spontanée selon la formule décrite ci-haut. Pour la lignée Hy5, nous avons estimé que le taux de recombinaison spontanée était de 10^{-5} événement par génération cellulaire. Ce taux est égal au taux de transformation spontanée calculé par la méthode de Luria et Delbruck.

Afin d'étudier davantage la structure de l'insert recombiné, l'ADN provenant de 60 sous-clones

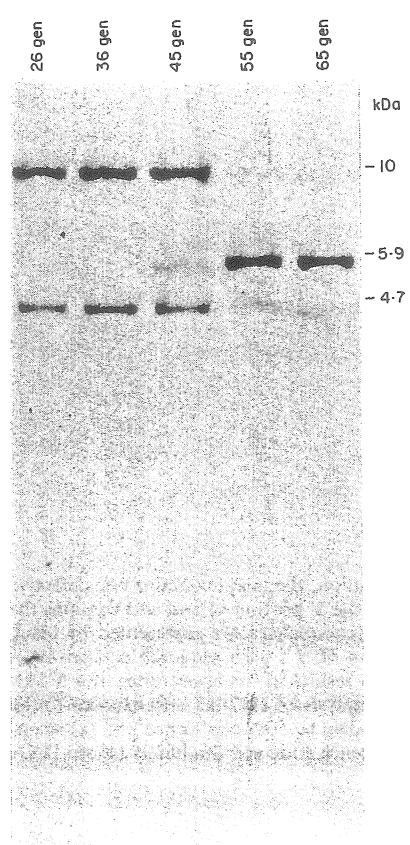


Figure 19. Analyse de la lignée Hy5 subissant la recombinaison spontanée.

L'ADN de la lignée Hy5 est extrait après différentes générations cellulaires. 20 μ g d'ADN cellulaire sont digérés par l'enzyme HindIII et les fragments générés sont séparés sur gel d'agarose 1%. Le gel est ensuite transféré sur une membrane de nylon et hybridé avec une sonde radioactive spécifique aux séquences du virus du polyome. L'insert *pmt* produit des fragments de 10 et 4,7 kb. Après recombinaison, l'insert produit un fragment unique de 5.9 kb.

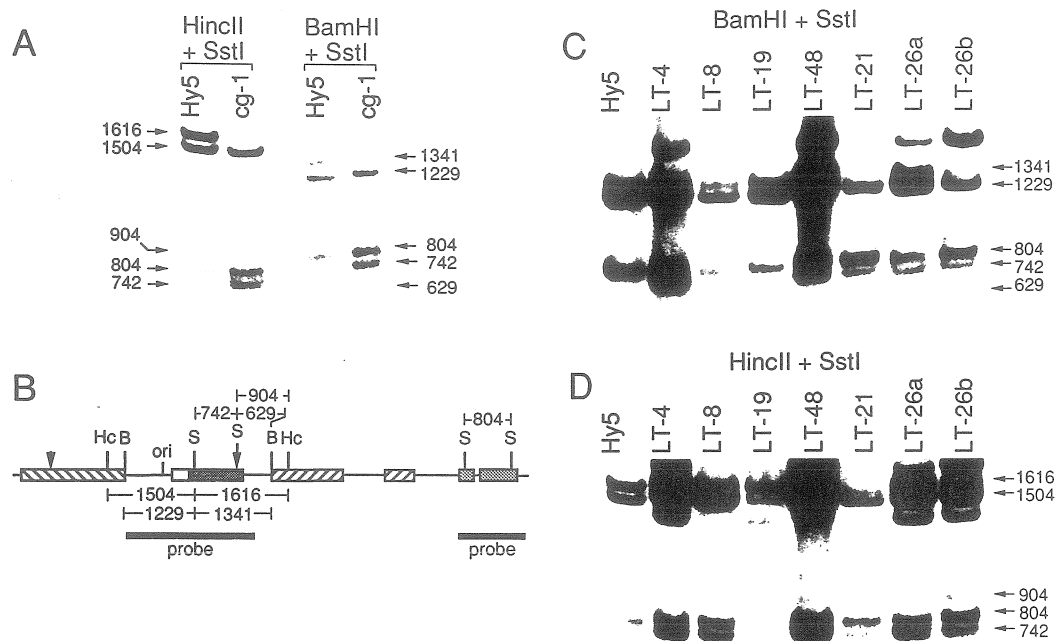


Figure 20. Identification d'un événement de conversion génique dans la lignée Hy5.

A. Analyse du transformant spontané *cg-1*. 20 μ g d'ADN cellulaire sont digérés par les enzymes HincII+SstI et BamHI+SstI. Les fragments sont ensuite séparés sur gel d'agarose 1.2%. Le gel est ensuite transféré sur une membrane de nylon et hybridé avec une sonde radioactive spécifique aux séquences du virus du polyome.

B. Structure de l'insert recombiné dans *cg-1*. La conversion génique de la délétion de 30 pb est caractérisée par l'apparition des fragments HincII+SstI de 742 et 904 pb et la disparition du fragment de 1616 pb. L'analyse par les enzymes BamHI+SstI confirme l'événement. Abréviations: ori, origine de répliation; Hc, HincII; B, BamHI; S, SstI.

C et D. Analyse de la lignée Hy5 transfectée avec l'antigène grand T du virus du polyome. L'ADN des colonies transformées est analysé au moment où les cultures atteignent ≈ 27 générations cellulaires. Notez la présence du fragment HincII+SstI de 904 pb et du fragment BamHI+SstI de 629 pb dans les lignées LT-48, LT-21 et LT-26b.

transformés isolés au hasard à partir de la lignée Hy5 a été analysé par blot de Southern. Seulement un des transformants examinés contient un gène T moyen intact (lignée cg-1, figure 20). La lignée Hy5 non transformée possède un fragment SstI de 804 pb qui provient du gène *pmt-dl2*. Le gène *pmt-dl1* renferme une délétion de 30 pb qui élimine le site SstI au nucléotide 1373 et produit des fragments HincII-SstI de 1616 et 1504 pb. Dans la lignée cg-1, l'apparition d'un fragment de 904 et 742 pb ainsi que la disparition du fragment de 1616 pb indiquent la correction de la délétion de 30 pb et la restauration du site SstI. Le gène *pmt-dl1* corrigé produit un fragment de 742 pb au lieu de 804 pb car l'intron de T moyen est absent. L'analyse du sous-clone cg-1 avec d'autres enzymes de restriction a montré que les séquences plasmidiques situées entre les deux gènes T moyen sont conservées (non illustré). La reconstitution d'un gène T moyen intact n'est donc pas le résultat d'une recombinaison réciproque qui excise les séquences intercalaires. Le produit de recombinaison est plutôt compatible avec un événement de conversion génique. La copie *pmt-dl2* vient corriger par recombinaison non-réciproque la délétion de 30 pb présente dans la copie *pmt-dl1* pour reconstituer un gène T moyen intact capable de transformer la cellule.

Dans les 59 autres sous-clones transformés, on n'observe jamais les fragments HincII-SstI de 742 et 904 pb tandis que le fragment de 1616 pb est toujours présent. Ces résultats indiquent que la délétion de 30 pb n'a pas été corrigée et qu'il n'y a pas reconstitution d'un gène T moyen intact. On note cependant la présence d'un fragment HindIII unique de 6.6 ou de 5.9 kb dans chacun de ces sous-clones (figure 21). Des études subséquentes ont montré que le fragment de 6.6 kb provenait d'une recombinaison réciproque entre les séquences pBR322 et pAT153. Cette recombinaison provoque une inversion des séquences du gène *pmt-dl1*. Le fragment de 5.9 kb est le résultat d'une conversion génique entre les séquences pAT153 et pBR322. Cette recombinaison non-réciproque provoque aussi l'inversion de *pmt-dl1* et crée une délétion de 705 pb dans les séquences pBR322

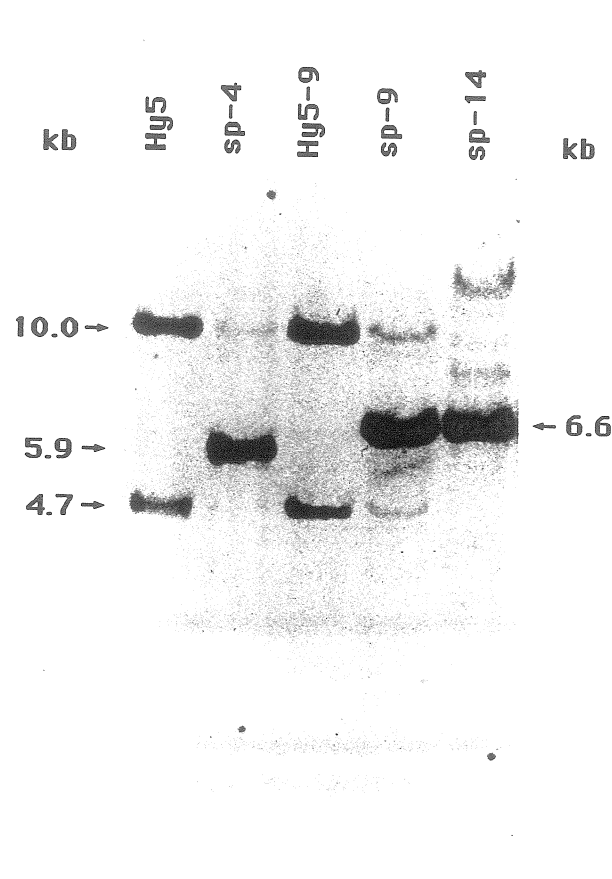


Figure 21. Analyse des transformants spontanés de la lignée Hy5 avec l'enzyme HindIII.

20 μ g d'ADN cellulaire est digéré par l'enzymes HindIII et les fragments générés sont séparés sur gel d'agarose 1%. Le gel est ensuite transféré sur une membrane de nylon et hybridé avec une sonde radioactive spécifique aux séquences du virus du polyome. La lignée Hy5 produit des fragments de 10 et 4.7 kb tandis que les transformants génèrent un fragment unique de 6.6 ou 5.9 kb. L'apparition du fragment de 6.6 kb indique un échange réciproque entre les séquences plasmidiques provoquant l'inversion de *pmt-dl1*. Le fragment est de 5.9 kb lorsqu'il y a transfert de la délétion de 705 pb dans les séquences pBR322 par conversion génique.

(figure 18b). Finalement, l'ADN de 50 sous-clones non transformés de la lignée Hy5 a été analysé. Aucune recombinaison entre les séquences plasmidiques ou les séquences T moyen n'a été observée dans ces sous-clones (non illustré). Ce résultat confirme que le phénotype transformé est relié à l'inversion du gène *pmt-dll*.

Pour expliquer le phénotype des 59 sous-clones qui ne restaurent pas un gène T moyen intact, nous avons examiné l'activité kinasique associée à l'antigène T moyen dans deux transformants spontanés ayant subi une recombinaison entre les séquences plasmidiques et une inversion du gène *pmt-dll*. L'antigène T moyen forme un complexe avec le produit de l'oncogène cellulaire *c-src* (Courtneidge et Smith, 1984). Cette association stimule l'activité kinasique de *c-src* dans la cellule. Il existe une forte corrélation entre le niveau d'activité kinasique associée à l'antigène T moyen et le degré d'expression du phénotype transformé dans la cellule. L'activité kinasique est décélée lors d'une phosphorylation *in vitro* de T moyen (Schaffhausen et Benjamin, 1981b). On détecte peu d'activité dans le sous-clone non transformé Hy5-2 (figure 22b). Par contre, l'activité kinasique est très élevée dans les sous-clones transformés. L'expression du gène *pmt-dll* a également été vérifiée par immunoprécipitation des protéines marquées à la [³⁵S]-méthionine et par protection de l'ARN T moyen aux ribonucléases. L'essai de protection consiste à hybrider l'ARN provenant du gène T moyen avec une sonde d'ARN complémentaire synthétisée *in vitro* (Zinn *et al.*, 1983; Melton *et al.*, 1984). L'hybride est ensuite digéré avec les ribonucléases A et T₁ afin d'éliminer les brins monocaténares d'ARN. Les fragments d'ARN protégés par la sonde sont séparés sur un gel dénaturant d'acrylamide. L'ARN de T moyen est protégé par une sonde reconnaissant à l'extrémité 5' du transcrit. Les deux sous-clones transformés ont produit plus d'antigène T moyen et plus de transcrit T moyen que le sous-clone non transformé (figure 22a et 23). On remarque que la lignée Hy5 non transformée et les sous-clones transformés produisent tous des transcrits de 336 et 331 nt.

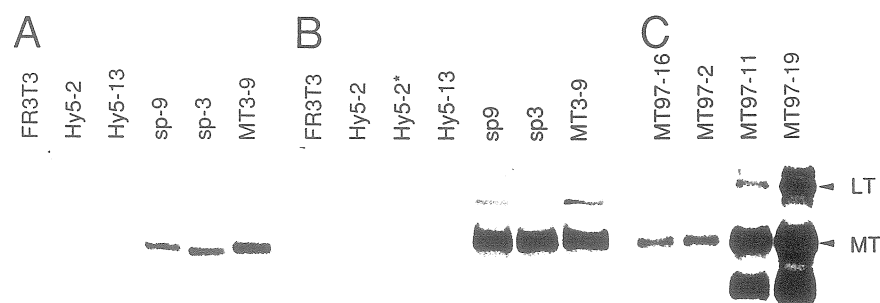


Figure 22. Détection des antigènes tumoraux du virus du polyome dans la lignée Hy5.

A. Immunoprécipitation de l'antigène T moyen. Les protéines d'environ 2×10^6 cellules sont marquées 90 minutes avec de la ^{35}S -méthionine et immunoprécipitées avec un anticorps spécifique pour les antigènes tumoraux de polyome. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel de polyacrylamide-SDS 12,5%. La position de l'antigène T moyen mutant de 56 kDa est indiquée. La première piste représente la lignée cellulaire de rat FR3T3. La deuxième piste correspond à la lignée Hy5 non-transformée. Hy5-13 est un sous-clone ne subissant aucune recombinaison en présence de l'antigène grand T. Les lignées sp-9 et sp-3 sont des transformants spontanés de la lignée Hy5. Finalement, MT3-9 est une lignée de rat transformée par l'antigène T moyen du virus du polyome.

B. Activité kinasique associée à l'antigène T moyen dans les transformants spontanés de Hy5. L'antigène T moyen d'environ 2×10^6 cellules est immunoprécipité avec un anticorps spécifique aux antigènes tumoraux de polyome. L'antigène est ensuite marqué lors d'une réaction de phosphorylation *in vitro* en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP et est séparé sur un gel de polyacrylamide-SDS 12,5%.

C. Activité kinasique de la lignée FR3T3 transformée par pMT97. À la suite d'une transfection de la lignée FR3T3 avec le plasmide pneoMT97, des colonies résistantes au G418 sont isolées et transférées dans des puits Linbro de 15 mm. Les colonies présentant une morphologie transformée sont prélevées et propagées en culture. L'activité kinasique associée à T moyen est alors déterminée de la même façon qu'en B. Une immunoprécipitation de l'antigène T moyen a également été effectuée afin de s'assurer qu'il y avait une quantité d'antigène semblable entre les lignées (non illustré).

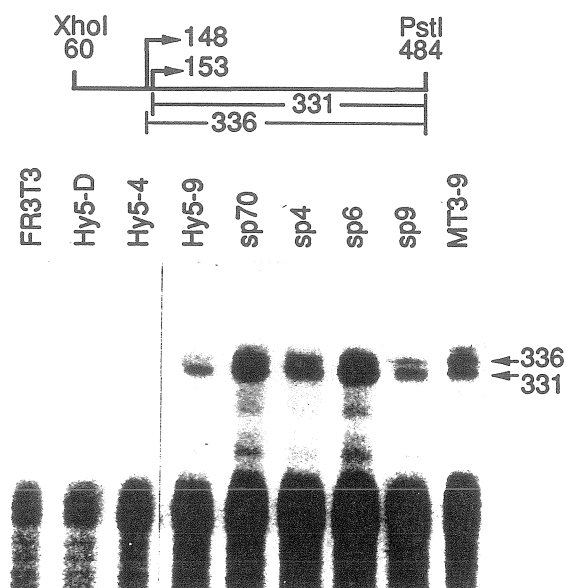


Figure 23. Niveau d'expression du gène *pmt-dll1* dans les transformants spontanés de la lignée Hy5.

L'ARN cytoplasmique des transformants spontanés a été isolé selon la méthode au LiCl-Urée. 20 μ g d'ARN cytoplasmique a été hybridé avec une ribosonde de 493 nt marquée au 32 P. La ribosonde comprend des nucléotides provenant du vecteur pSP72 et des nucléotides complémentaires à l'extrémité 5' du transcrite du gène *pmt-dll1*. L'hybride ARN-ribosonde a ensuite été digéré pendant 30 minutes à 45°C en présence de 5 μ g de ribonucléase A et 6 unités de ribonucléase T₁. Les fragments d'ARN protégés ont été séparés sur un gel dénaturant d'acrylamide 4%. La lignée Hy5 non transformée ainsi que les transformants spontanés ont produit des transcrits de 336 et 331 nucléotides correspondant aux deux sites d'initiation du gène T moyen.

Ces transcrits correspondent aux deux sites d'initiation des gènes précoces (voir l'introduction). Nous avons déjà mentionné que la mutation *dl-97* réduit la propriété transformante de l'antigène T moyen. Dans des expériences complémentaires, la lignée de rat FR3T3 a été transfectée avec le plasmide *pneoMT97*. Ce plasmide contient le gène de sélection *néo* et le gène T moyen mutants *dl-97*. Dans certains essais, le plasmide *pLT97* est également introduit. Lorsque la protéine T moyen mutante est exprimée en grande quantité dans les cellules FR3T3, l'activité kinasique associée à l'antigène T moyen est élevée et les cellules adoptent une morphologie transformée (figure 22c). Ceci montre qu'une surproduction de l'antigène T moyen *dl-97* induit la transformation des cellules. Nous concluons donc que l'inversion du gène *pmt-dl1* augmente l'expression de la protéine T moyen mutante et induit la transformation cellulaire.

3. Effet de l'antigène grand T du virus du polyome

Nous avons vérifié si l'antigène grand T du virus du polyome peut induire une recombinaison au niveau de l'insert *pmt* de la lignée Hy5. Afin de ne pas confondre les événements de recombinaison induits par grand T avec les événements de recombinaison spontanée, la lignée Hy5 a été régulièrement sous-clonée et les transfections ont été faites lorsque la lignée avait peu de générations cellulaires. La lignée Hy5 a été transfectée avec le plasmide *pnéoLT1* qui contient le gène grand T du virus du polyome lié au marqueur de sélection *néo*. Suite à la transfection, les cellules ont été soumises à une sélection au G418 et des colonies résistantes ont été transférées après 15 jours dans des puits Linbro de 15 mm. Les colonies ainsi isolées ont été observées tous les deux jours pour l'apparition de foyers de cellules transformées. En moyenne, on note l'apparition de foyers de cellules transformées dans environ 20% des colonies transfectées avec le gène grand T (tableau 3). Aucun foyer n'est observé avec le gène *néo* seul. Ces observations sont faites avant

Tableau 3. Activité des mutants de l'antigène grand T du virus du polyome dans la lignée Hy5

Plasmide transfecté	Mutation ¹	Réplication	Nbre de colonies transformées				
			Exp 1	Exp 2	Exp3	Exp4	Exp5
pSVneo	aucune	+	0/18	0/42	0/44	0/48	0/48
pneoLT1	aucune	+	10/30	8/46	8/48	16/23	4/46
pneoLTd197	del 270-280	-		0/47	0/48		
pneoLTd113	del 13-17	-		2/44	6/48	19/46	12/47
pneoLT13val	Leu-13 → Val	-				27/47	5/47
pneoLT16val	Leu-16 → Val	+				22/46	7/48

Les colonies résistants au G418 ont été isolées et transférées dans des puits Linbro de 15 mm. Les colonies ont ensuite été observées tous les 2 jours pour un changement dans la morphologie des cellules. Le nombre de colonies transformées a été déterminée 10 jours après qu'elles aient atteint la confluence.

¹ Position des acides aminés délétées ou modifiées dans l'antigène grand T.

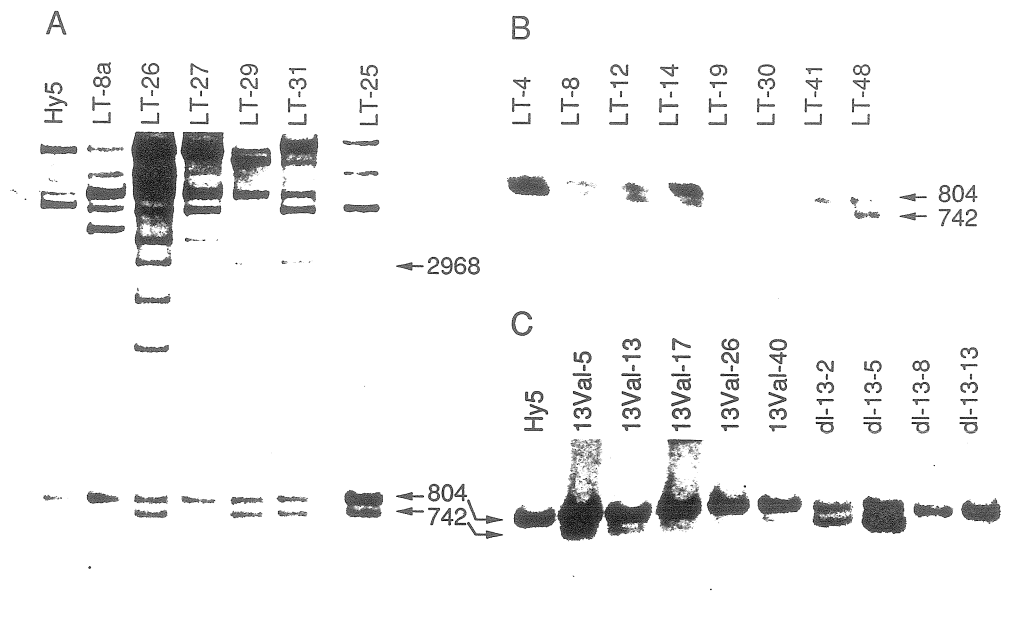


Figure 24. Analyse de la structure de l'insert *pmt* dans les cellules Hy5 transfectées avec l'antigène grand T du virus du polyome.

Après transfection de la lignée Hy5 par le plasmide pneoLT1, des colonies résistantes au G418 ont été isolées et transférées dans des puits Linbro de 15 mm. Les colonies ont été désignées LT-1, LT-2, LT-3, etc. Elles ont été observées tous les deux jours pour l'apparition de foyers de cellules transformées. Un foyer provenant d'une colonie a été prélevé et propagé en culture. L'ADN cellulaire a été extrait au moment où la culture atteignait 27 générations cellulaires. 20 µg d'ADN cellulaire ont été digérés par l'enzyme SstI et les fragments générés ont été séparés sur gel d'agarose 1.2%. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane de nylon et hybridé avec une sonde radioactive spécifique aux séquences du virus du polyome.

A et B. Analyse par l'enzyme SstI. La reconstitution du site SstI au nucléotide 1373 produit un fragment de 742 pb dû à l'absence de l'intron. Le fragment de 2968 pb (nt 1373 à 4341 de pneoLT1) indique l'intégration du gène grand T dans le génome cellulaire.

C. Analyse par l'enzyme SstI des cellules Hy5 transfectées avec les mutants *13val* et *dl-13* de l'antigène grand T.

que les colonies atteignent 9 jours de confluence. Nous n'avons pas tenu compte des foyers qui sont apparus par la suite afin d'exclure les événements de recombinaison spontanée.

Pour étudier les changements dans la structure de l'insert *pmt*, l'ADN de 32 foyers de cellules transformées a été extrait et examiné par blot de Southern. L'analyse des produits de recombinaison s'est révélée compliquée à cause du chevauchement entre les séquences du gène grand T et celles de l'insert *pmt*. La présence d'un fragment SstI de 2.9 kb dans tous les transformants indique cependant que le gène grand T s'est intégré de façon stable dans le génome cellulaire (figure 24a,b). Dans plusieurs transformants, on a remarqué des fragments provenant d'une recombinaison entre les séquences plasmidiques qui engendre une inversion des séquences T moyen (non illustré). Dans 21 des 32 transformants, on note l'apparition d'un fragment SstI de 742 pb typique d'une recombinaison entre les séquences T moyen. Cette recombinaison reconstitue un gène T moyen intact. Toutefois, seulement quelques uns de ces transformants (ex. LT-26b, LT-21; figure 20c,d) ont produit des fragments BamHI-SstI et HincII-SstI de 629 pb et 904 pb compatibles avec un événement de conversion génique. Ce type de recombinaison non-réciproque corrige la délétion de 30 pb du gène *pmt-dII* pour restaurer un gène intact. Dans la lignée LT-26b, on observe également une recombinaison réciproque entre les séquences plasmidiques qui inverse les séquences T moyen. Donc, grand T induit une recombinaison au niveau des deux types de séquences homologues présentes dans l'insert *pmt*. Le produit de recombinaison de plusieurs transformants n'a pu être identifié à cause de l'interférence provoquée par les séquences de grand T. Toutefois, la structure de certains de ces produits a été élucidée en étudiant les produits de la recombinaison induite par l'antigène grand T de SV40 (voir ci-dessous). Finalement, on remarque que l'antigène grand T ne provoque pas l'amplification des séquences virales dans les transformants analysés.

Nous avons également examiné l'effet des mutants de grand T inactifs dans l'initiation de la réplication virale (tableau 3). On observe aucune transformation lorsque le plasmide p néoLTdl97 est introduit dans la lignée Hy5. Donc, le mutant *dl-97* est incapable d'induire de la recombinaison au niveau de l'insert *pmt*. Les mutants *dl-13*, *13val* et *16val* ont cependant provoqué de la recombinaison indépendamment de leur effet sur la réplication de l'ADN viral. L'ADN de huit colonies transformées avec *dl-13* a été analysé par blot de Southern. Dans cinq transformants, on observe un fragment SstI de 742 pb caractéristique d'un gène T moyen reconstitué (figure 24c). Pareillement, sur cinq colonies transformées avec *13val*, trois ont produit un fragment SstI de 742 pb. Ces résultats indiquent que les mutants *dl13* et *13val* inactifs dans la réplication de l'ADN viral sont aussi efficaces que l'antigène grand T de type sauvage dans l'induction de la recombinaison au niveau de l'insert *pmt* de la lignée Hy5.

4. Effet de l'antigène grand T de SV40

La lignée Hy5 a également été transfectée avec le gène grand T du virus SV40 lié au marqueur de sélection *néo*. L'événement de recombinaison ne peut pas être sélectionné selon la morphologie des cellules car l'antigène grand T de SV40 induit à lui seul la transformation néoplasique. Nous avons donc propagé en culture 44 colonies transformées et nous avons analysé leur l'ADN par blot de Southern au moment où elles atteignaient 25 générations cellulaires. Environ 50% des transformants examinés ont subi une recombinaison au niveau de l'insert *pmt* (tableau 4). Nous avons remarqué une recombinaison entre les séquences plasmidiques dans 13 transformants (fragment HindIII de 5.9 kb, figure 25a) tandis que la reconstitution d'un gène T moyen intact n'a été observée que dans 3 transformants. Finalement, nous avons noté des événements de recombinaison complexes au niveau de l'insert *pmt* dans cinq transformants (non illustré). La

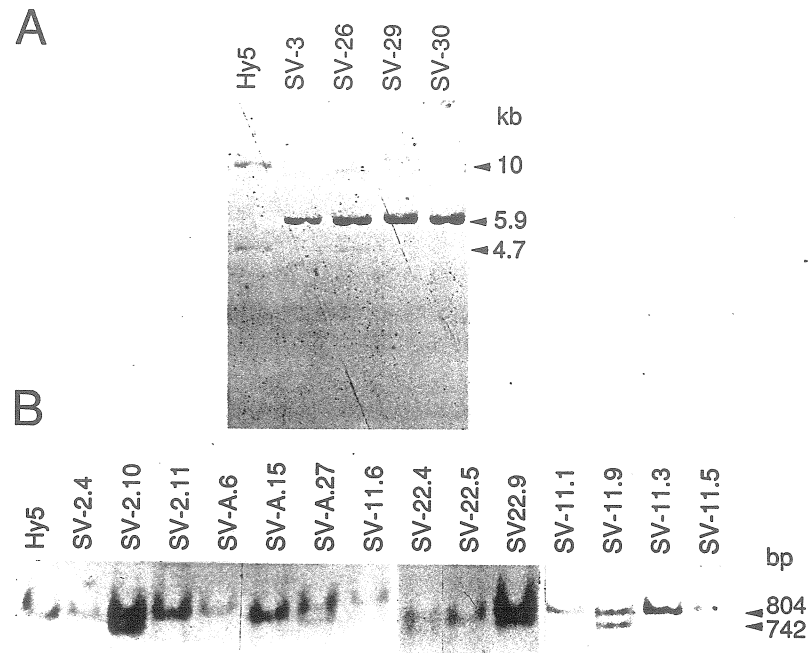


Figure 25. Analyse des cellules Hy5 transformées par l'antigène grand T de SV40.

Après transfection de la lignée Hy5 par le plasmide pSV2neo, des colonies transformées et résistantes au G418 sont isolées et transférées dans des puits Linbro de 15 mm. Les colonies sont désignées SV-1, SV-2, SV-3 etc. Les colonies sont propagées en culture et leur ADN est extrait et analysé par blot de Soutern avant qu'elles atteignent 27 générations. 20 μ g d'ADN cellulaire sont digérés par différents enzymes de restriction et les fragments générés sont séparés sur gel d'agarose 1% et 1.2%. Le gel est ensuite transféré sur une membrane de nylon. La membrane est hybridée avec une sonde radioactive spécifique aux séquences du virus du polyome.

A. Analyse des transformants par l'enzyme HindIII. L'inversion du gène *pmt-dll* est détectée par l'apparition d'un fragment de 5.9 kb.

B. Analyse par l'enzyme SstI des cellules Hy5 transformées avec des mutants de l'antigène grand T de SV40 inactifs dans l'initiation de la réplication virale. Les transformants sont identifiés SV-2.1 pour le mutant C6-2, SV-A.1 pour le mutant C8.A, SV-11.1 pour le mutant C11A et SV-22.1 pour le mutant T22. La reconstitution d'un gène T moyen intact est détectée par l'apparition du fragment de 742 pb dans les transformants SV-2.10, SV-A.27, SV-22.4, SV-22.9 et SV-11.9.

Tableau 4. Activité des mutants de l'antigène grand T de SV40 dans la lignée Hy5

Plasmide transfecté	Mutation	Liaison à l'origine	Activité hélicase	Inversion de <i>pmt-d11</i>	T moyen reconstitué	Autre	Total
pneo-SV2	aucun	+	+	13/44	3/44	5/44	21/44
pneo-C6-2	Asn-153 Thr	-	+	1/7	1/7	0/7	2/7
pneo-C8A	Lys-224 Glu	+	+	2/11	0/11	0/11	2/11
pneo-C11A	Pro-522 Ser	+	-	18/37	0/37	0/37	20/37
pneo-T22	His-203 Gln	-	+	7/25	1/25	1/25	9/25

Environ la moitié des colonies résistantes au G418 possédaient une morphologie transformées. Certaines colonies choisies au hasard ont été propagées en culture. L'ADN a été analysé au moment où les cultures atteignaient 25 générations cellulaires.

structure de l'insert recombiné n'a pu être identifiée dans ces transformants.

En collaboration avec le Dr. Louise Bouchard, nous avons aussi étudié l'effet des mutants du grand T de SV40 défectueux dans l'initiation de la réplication virale. Contrairement aux résultats obtenus avec la lignée Hy2, les mutants C6-2, C8A, C11A et T22 ont tous induit une recombinaison au niveau de l'insert *pmt* de la lignée Hy5 (tableau 4). On détecte un fragment SstI de 742 pb dans cinq transformants (figure 25b). Ce fragment est typique d'une recombinaison entre les séquences T moyen qui reconstitue un gène intact. Puisque les séquences provenant du gène grand T de SV40 sont différentes de celles de l'insert *pmt*, les transformants ont été étudiés davantage avec plusieurs enzymes de restriction afin de définir le produit de recombinaison. Dans deux transformants (SV-A.27 et SV-22.4), nous avons observé un événement de conversion génique semblable à celui observé dans le transformant spontané cg-1 (non illustré). Dans deux autres transformants (SV-2.10 et SV-11.9), on détecte la présence d'un fragment HindIII unique de 6.6 kb indiquant l'inversion des séquences T moyen (figure 26a). Ce résultat suggère une recombinaison entre les séquences plasmidiques se produisant avant ou après une conversion génique entre les séquences T moyen. Cependant, de tels événements devraient produire un fragment BamHI-ClaI de 2.6 kb et un fragment BglI de 2.4 kb. Or, on observe un fragment BamHI-ClaI de 2.2 kb tandis que le fragment BglI de 2.4 kb n'est pas détecté dans ces transformants. La présence d'un fragment ClaI de 6.6 kb indique l'apparition d'un site ClaI en amont du gène T moyen inversé (figure 26b). Ces résultats suggèrent que le gène T moyen intact provient plutôt d'une recombinaison réciproque entre les deux copies défectueuses. Un mécanisme de recombinaison impliquant de l'échange inégale entre chromatides-soeurs est présenté dans la discussion afin d'expliquer la structure de l'insert recombiné. On n'a pas réussi à identifier le produit de recombinaison dans le transformant SV22.9.

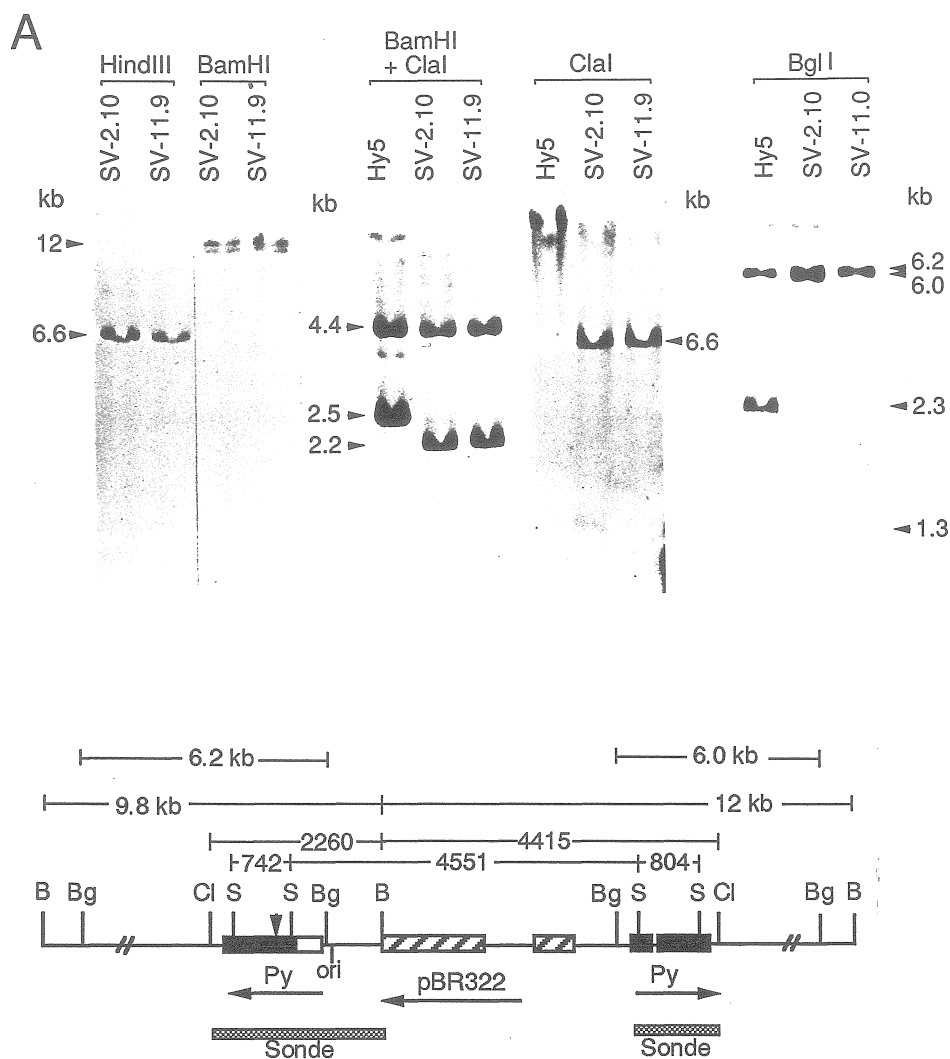


Figure 26. Analyse des cellules Hy5 transformées avec les mutants C11A et C6-2 de l'antigène grand T de SV40

A. Analyse des transformants SV-2.10 et SV-11.9 par différents enzymes de restrictions. Le transformant SV-2.10 correspond au mutant C6-2 tandis que le transformant SV-11.9 est issu du mutant C11A.

B. Structure de l'insert *pmt* recombiné. Notez l'apparition du site ClaI en amont du gène T moyen intact. La délétion éliminant l'intron de T moyen est illustrée par le triangle inversé. Les séquences T moyen sont représentées par les boîtes noires tandis que les séquences plasmidiques correspondent aux boîtes hachurées. Abréviations: ori, origine de répliation; B, BamHI; Bg, BglI; Cl, ClaI; H, HindIII; S, SstI.

Comme il a été mentionné plus haut, l'analyse des transformants avec l'antigène grand T du virus du polyome est incommodée par le chevauchement existant entre les séquences du gène grand T et celles de l'insert *pmt*. Toutefois, lorsque l'ADN de sept transformants est digéré avec les enzymes BamHI et ClaI, on observe un patron de restriction comparable à celui décrit ci-haut (non illustré). L'antigène grand T du virus du polyome peut donc induire de la recombinaison réciproque ainsi que de la recombinaison non réciproque (i.e. conversion génique) entre les séquences T moyen pour reconstituer un gène intact.

V. Effet de la méthylation sur la recombinaison homologue

Nous avons montré antérieurement que la lignée Hy5 subit une recombinaison spontanée au niveau de l'insert *pmt* après 45 générations cellulaires. Cette recombinaison induit la transformation de la cellule donc, nous avons régulièrement sous-cloné la lignée afin que les cellules transformées n'envahissent pas les cellules normales. Lors de cette étape, nous avons isolé deux sous-clones (Hy5-13, Hy5-D) qui ont maintenu une morphologie normale après plus de 100 générations en culture. Aussi, aucune transformation n'est détectée lorsque les sous-clones sont transfectés avec le gène grand T du virus du polyome (tableau 5). L'antigène grand T est donc incapable d'induire la recombinaison homologue au niveau de l'insert *pmt* de ces sous-clones.

Les sous-clones Hy5-13 et Hy5-D ont été étudiés davantage afin de découvrir ce qui empêche la recombinaison de se produire. Des analyses de l'ADN par blot de Southern ont montré que l'insert *pmt* était toujours présent et n'avait subi aucune modification dans sa structure (non illustré). Toutefois, on remarque un patron de restriction différent lorsqu'on utilise des enzymes sensibles à la méthylation des résidus cytosines de l'ADN. Seuls les résultats obtenus avec la lignée Hy5-13

Tableau 5. Activité des mutants de l'antigène grand T du virus du polyome différents sous-clones de la lignée Hy5

Plasmide transfecté	Lignée cellulaire		
	Hy5-4	Hy5-13	Hy5-D
pSV2neo	0/48	0/14	0/23
pneo-LT1	4/46	0/36	0/24
pneo-LTd113	12/47	0/38	0/20
pneo-LT13val	5/47		0/48
pneo-LT16val	7/48		0/45

Les colonies résistants au G418 ont été isolées et transférées dans des puits Linbro de 15 mm. Les colonies ont ensuite été observées tous les 2 jours pour un changement dans la morphologie des cellules. Le nombre de colonies transformées a été déterminée 10 jours après qu'elles aient atteint la confluence.

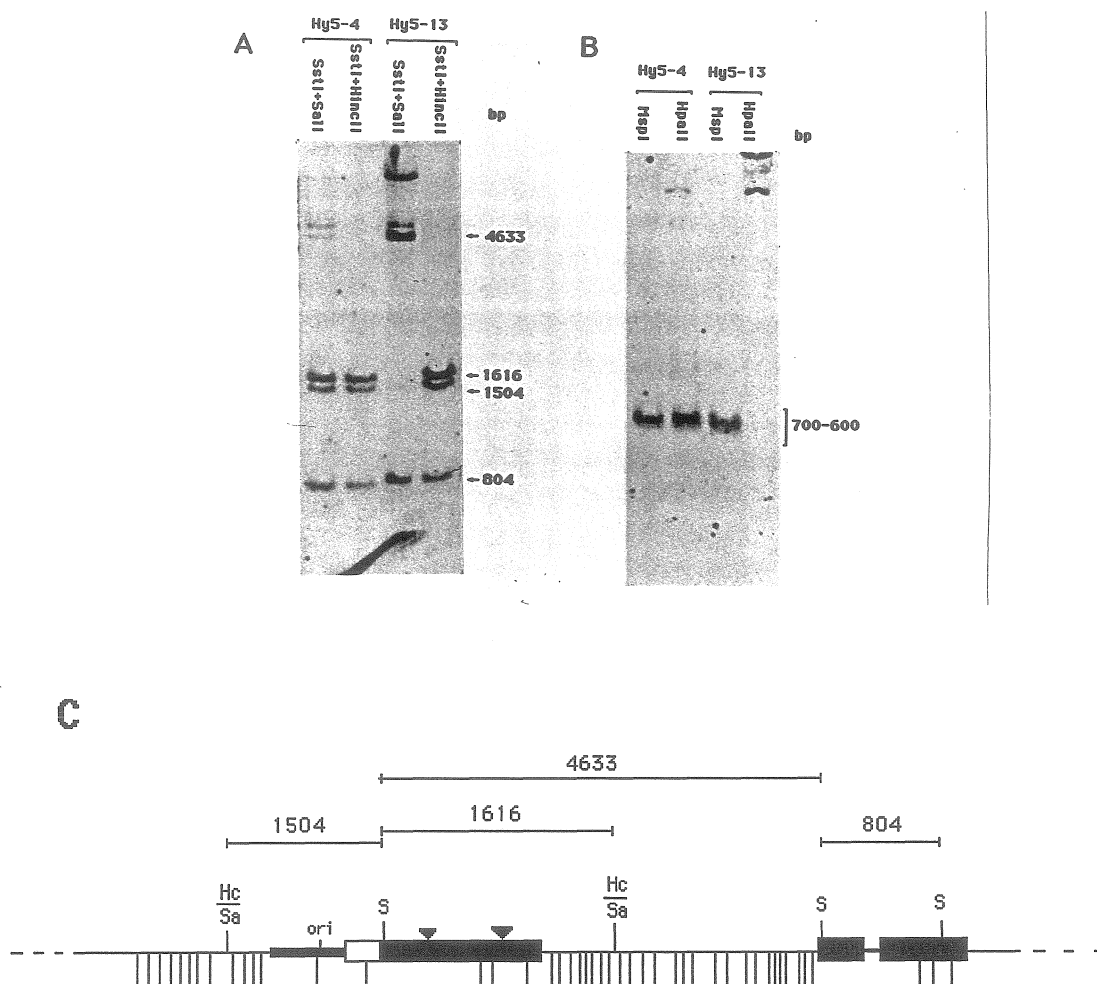


Figure 27. Analyse du degré de méthylation de l'insert *pmt* dans le sous-clone Hy5-13.

A. Analyse par les enzymes SstI+SalI et SstI+HincII. 20 μ g d'ADN cellulaire sont digérés par les différents enzymes de restriction et les fragments générés sont séparés sur gel d'agarose 1.2%. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane de nylon et hybridé avec une sonde radioactive spécifique aux séquences du virus du polyome. L'enzyme SalI ne coupe pas l'ADN lorsque les résidus CpG sont méthylés tandis que l'activité de l'enzyme HincII n'est pas affectée par la méthylation. L'absence des fragments SstI+SalI de 1616 et 1504 pb indique la méthylation des sites SalI au niveau de l'insert *pmt* du sous-clone Hy5-13.

B. Analyse par les enzymes MspI et HpaII. Les fragments ont été séparés sur un gel d'agarose de 2%. L'enzyme HpaII est sensible à la méthylation des résidus CpG.

C. Structure de l'insert *pmt* dans la lignée Hy5. Les séquences homologues entre les deux gènes T moyen sont illustrées en noir. Les séquences plasmidiques sont représentées par une ligne pleine. Les lignes orientées vers le bas correspondent aux sites HpaII/MspI. Abréviations: ori, origine de répliation; A, AvaI; Hc, HincII; S, SstI; Sa, SalI.

sont illustrés (figure 27). Les enzymes Sall et HpaII sont des enzymes qui ne coupent pas l'ADN lorsque la cytosine d'un résidu CpG est méthylée tandis que les enzymes HincII et MspI digèrent aux mêmes endroits, mais ne sont pas affectés par la méthylation. L'insert *pmt* de la lignée Hy5 possède deux sites Sall/HincII et 46 sites HpaII/MspI. Nous avons comparé le degré de méthylation entre les sous-clones Hy5-13 et un sous-clone d'Hy5 dont l'insert s'est recombinaison après 45 générations cellulaires (Hy5-4). On observe des fragments SstI-Sall de 1616 pb et 1504 pb dans la lignée Hy5-4 tandis que ces fragments sont absents dans la lignée Hy5-13 (figure 27a). La lignée Hy5-13 a pourtant produit ces fragments par digestion avec les enzymes SstI-HincII. Des observations semblables ont été réalisées avec la lignée Hy5-D (non illustré). La digestion de l'ADN de la lignée Hy5-13 avec l'enzyme MspI a produit des fragments inférieurs à 700 pb tandis que ces fragments sont absents lorsque l'enzyme HpaII est utilisé (figure 27b). Nous concluons donc que l'ADN de l'insert *pmt* est fortement méthylé dans les lignées Hy5-13 et Hy5-D.

Plusieurs études ont montré une corrélation entre le degré de méthylation des résidus CpG et l'expression des gènes (Jaenisch et Jähner, 1984; Cedar, 1988; Renzo *et al.*, 1989). D'autres études ont évoqué la possibilité que la transcription d'un gène stimule la recombinaison (Thomas et Rothstein, 1989; Nickoloff et Reynold, 1990; Martin *et al.*, 1991; Schlissel *et al.*, 1991). Nous avons donc étudié l'expression du gène *pmt-dl1* dans les lignées Hy5-13 et Hy5-D par immunoprécipitation des protéines marquées à la [³⁵S]-méthionine et par protection des transcrits T moyen aux ribonucléases. Comme on peut le voir dans la figure 22, on n'observe pas d'antigène T moyen ou d'activité kinasique associée à T moyen dans la lignée Hy5-13 tandis que la lignée Hy5-D ne produit pas de transcrit T moyen (figure 23). Le gène *pmt-dl1* n'est donc pas exprimé dans les lignées Hy5-13 et Hy5-D. Nos résultats suggère que la méthylation exerce une influence négative sur la transcription et la recombinaison de l'insert *pmt*.

Nous avons exposé la lignée Hy5-13 à différentes concentrations de 5-azacytidine dans le but de modifier le degré de méthylation de l'insert *pmt*. La 5-azacytidine provoque l'apparition de sites déméthylés dans le génome cellulaire. Ce composé est un analogue de la cytidine et il est incorporé dans l'ADN à la place de la cytidine. Toutefois, la 5-azacytidine ne peut pas être méthylé en position 5' car elle contient un atome d'azote au lieu d'un atome de carbone (Taylor et Jones, 1979). À la suite de traitements avec 3, 10 et 20 μM de 5-azacytidine, on détecte l'apparition de plusieurs foyers de cellules transformées dans la lignée Hy5-13. L'analyse de l'ADN génomique de plus de 10 transformants n'a révélé aucune recombinaison et aucun changement dans le degré de méthylation de l'insert (non illustré). Nous croyons que la transformation observée dans la lignée Hy5-13 est le résultat de la déméthylation d'oncogènes cellulaires. En effet, des études ont montré que la 5-azacytidine induit la transformation des cellules en activant l'expression de différents proto-oncogènes cellulaires (Hsiao *et al.*, 1984; 1985).

DISCUSSION

Dans le but de comprendre le rôle de l'antigène grand T dans la recombinaison homologe, nous avons établi deux lignées cellulaires de rat contenant un tandem tête-à-queue de gènes T moyen défectueux pour la transformation néoplasique. Nous avons nommé ces lignées Hy2 et Hy5. Une recombinaison homologe entre les deux copies T moyen devrait reconstituer un gène intact, capable de transformer la cellule. L'avantage d'étudier la recombinaison entre deux gènes T moyen plutôt que deux gènes *néo* (Thomas *et al.*, 1986) ou deux gènes *tk* (Liskay *et al.*, 1984) est que le phénotype transformé des cellules permet de détecter les événements de recombinaison sans avoir recours à une sélection avec des agents cytotoxiques. La structure des séquences virales peut alors être analysée dans l'ensemble de la population cellulaire et la recombinaison peut être étudiée en absence de sélection.

Recombinaison spontanée

Dans la lignée Hy2, nous avons évalué le taux de recombinaison spontanée de l'insert *pmt* à environ 10^{-7} événement par génération cellulaire. Dans la lignée Hy5, le taux est de 10^{-5} événement par génération. Ces taux sont semblables aux taux de recombinaison observés entre deux gènes *tk* ou *néo* (Bollag *et al.*, 1989). La divergence entre le taux de la lignée Hy2 et celui de la lignée Hy5 peut provenir du fait que l'insert *pmt* dans Hy5 possède de l'homologie entre les séquences plasmidiques et entre les séquences T moyen. L'insert *pmt* dans Hy2 ne possède de l'homologie qu'entre les séquences T moyen. Il est possible que la position de l'insert dans le génome cellulaire influence également le taux de recombinaison spontanée. En effet, il a été démontré que les propriétés spécifiques d'une région d'ADN telles que la structure de la chromatine et l'activité

transcriptionnelle affectent la fréquence de recombinaison des gènes d'immunoglobulines (Blackwell *et al.*, 1986; Persiani et Selsing, 1989; Schlissel *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1991) et la fréquence de recombinaison homologue chez la levure (Voelkel-Meiman *et al.*, 1987; Thomas et Rothstein, 1989). La disponibilité de séquences homologues non interrompues et contiguës, la taille de l'insertion ou la délétion à être corrigée et la distance entre les séquences homologues sont également des paramètres influençant le taux de recombinaison homologue dans des cellules de mammifère (Rubnitz et Subramani, 1986; Letsou et Liskay, 1987; Waldman et Liskay, 1988).

L'analyse de l'ADN génomique de cellules transformées spontanément a permis d'identifier la structure de l'insert *pmt* recombiné. Dans la lignée Hy2, la recombinaison reconstitue un gène T moyen intact entre les deux copies défectueuses de l'insert *pmt* (figure 6c). Dans la lignée Hy5, un seul transformant sur un total de 60 analysés possède un gène T moyen intact. Nous avons montré que le gène intact est le résultat d'un événement de conversion génique (voir plus bas). Dans les 59 autres lignées, nous avons observé une recombinaison réciproque entre les séquences plasmidiques provoquant l'inversion du gène *pmt-dl1*. Le taux de recombinaison entre les séquences plasmidiques (10^{-5} événement) est donc d'environ 60 fois plus élevé que le taux de conversion génique reconstituant un gène T moyen intact (1.7×10^{-7} événement). On remarque que l'inversion du gène *pmt-dl1* provoque un changement dans la morphologie des cellules semblable à la transformation cellulaire. Cette transformation est surprenante car il n'y a pas reconstitution d'un gène T moyen. Nous avons montré que cette transformation était due à une augmentation d'expression du gène défectueux. Le gène *pmt-dl1* contient la mutation *dl-97* qui réduit les propriétés transformantes de T moyen. Cependant, une surproduction de la protéine dl-97 provoque la transformation de la cellule. Nos résultats n'ont pas permis d'expliquer pourquoi l'inversion de *pmt-dl1* active son expression. Il est possible que la recombinaison entre les séquences plasmidiques

modifie la structure de la chromatine pour augmenter la transcription du gène. L'inversion pourrait également positionner le promoteur précoce près d'un élément cellulaire ayant un effet positif sur l'expression du gène mutant.

Effet de l'antigène grand T

Nos résultats ont montré que l'antigène grand T du virus du polyome induisait une recombinaison à haute fréquence au niveau de l'insert *pmt* des lignées Hy2 et Hy5. L'antigène grand T augmente de 10 000 à 1 000 000 de fois le taux de recombinaison de l'insert. Dans la lignée Hy2, l'antigène grand T stimule la reconstitution d'un gène T moyen intact capable de transformer les cellules. Cependant, les produits de recombinaison n'ont pu être identifiés car l'analyse de la structure de l'insert recombiné présentait des difficultés à cause de l'interférence des séquences du gène grand T. De plus, nous avons remarqué que l'antigène grand T provoquait une amplification des séquences de l'insert *pmt*. Nous avons obtenu des résultats inattendus lorsque le gène codant pour la protéine grand T de SV40 a été introduit dans la lignée Hy2. Les antigènes grand T de SV40 et de polyome possèdent certaines propriétés analogues et des besoins semblables en ce qui concerne leur spécificité de se fixer à l'ADN (Pipas, 1992). L'antigène grand T de SV40 est capable de fixer les sites normalement reconnus par l'antigène grand T du virus du polyome (Pomerantz et Hassell, 1984; Scheller et Prives, 1985). Toutefois, les deux antigènes ne sont pas interchangeables dans l'initiation de la réplication de leur génome viral (Bennett *et al.*, 1989). Il est probable que la réplication de l'ADN viral nécessite des facteurs permissifs spécifiques à l'espèce tels que l'association à l'ADN polymérase α -primase ou l'association de protéines cellulaires à ce complexe (Murakami *et al.*, 1986a; 1986b). Nos résultats montrent que les antigènes grand T du virus du polyome et de SV40 sont interchangeables dans la recombinaison. De plus, l'antigène grand T de

SV40 facilite l'analyse du produit de recombinaison car son gène n'interfère pas avec les séquences de l'insert *pmt* et il n'induit pas l'amplification des séquences virales. Plus de la moitié des colonies transformées par l'antigène grand T de SV40 présentent un produit de recombinaison identique à celui observé dans les transformants spontanés, c'est-à-dire une duplication de 5,6 kb d'ADN entre les deux copies défectueuses de T moyen (figure 11).

Afin de définir l'événement de recombinaison induit par l'antigène grand T du virus du polyome, nous avons établi la lignée Hy2-ts5. Cette lignée possède un insert *plt* produisant une protéine grand T thermosensible. Un transfert pour aussi peu que 24 heures à la température permissive produit une protéine grand T fonctionnelle capable de provoquer de la recombinaison au niveau de l'insert *pmt*. La lignée Hy2-ts5 permet l'étude du produit de recombinaison avant l'amplification des séquences virales. Nous avons montré que la structure de l'insert *pmt* recombiné était semblable à celle observée dans les transformants spontanés et les transformants de SV40. L'antigène grand T a également occasionné une recombinaison réciproque au niveau de l'insert *plt* éliminant une des copies du gène grand T *ts-a*.

Plusieurs études ont montré que le génome intégré du virus du polyome peut subir une amplification ou une excision dans des cellules transformées (Botchan *et al.*, 1979; Pellegrini *et al.*, 1984; Bourgaux *et al.*, 1982). Ces deux phénomènes nécessitent la présence d'un antigène grand T fonctionnel ainsi qu'une région d'homologie à l'intérieur des séquences virales intégrées (Miller *et al.*, 1984). Cette homologie provient d'une duplication partielle ou complète du génome viral lors de son intégration dans le génome cellulaire. Botchan et collaborateurs (1979) ont proposé un modèle par lequel l'antigène grand T initie une réplication multiple à l'origine virale pour générer des séquences amplifiées d'ADN organisées en structure de pelure d'oignon. Cette structure

représenterait un substrat favorable à la recombinaison homologue, permettant une amplification ou une excision des séquences virales. Des expositions de la lignée Hy2-ts5 durant différentes périodes de temps à la température permissive ont permis l'analyse de l'amplification induite par l'antigène grand T. L'analyse de l'ADN des cellules transformées révèle que l'amplification se produit par additions consécutives de 5.6 kb d'ADN. Cette addition a toujours lieu entre les deux copies défectueuses de T moyen. Nous suggérons que l'amplification provient de duplications consécutives du gène T moyen intact. Comme nous le verrons plus loin, l'amplification au niveau de l'insert *pmt* n'est pas le résultat d'une réplication multiple à l'origine virale mais provient d'événements de recombinaison successifs induits par grand T.

Dans la lignée Hy5, l'antigène grand T induit différents événements de recombinaison au niveau de l'insert *pmt*. Dans plusieurs lignées transformées, on détecte une recombinaison entre les séquences plasmidiques de l'insert engendrant l'inversion des séquences T moyen. L'antigène grand T provoque donc une recombinaison entre des séquences autres que les séquences T moyen. Néanmoins, dans plus de la moitié des lignées analysées, on remarque une recombinaison entre les séquences T moyen reconstituant un gène T moyen intact. Aucune amplification des séquences virales n'a été détectée parmi les lignées analysées. Ce résultat démontre que la reconstitution du gène intact n'est pas le produit d'une amplification selon le modèle de la pelure d'oignon. La restauration d'un gène T moyen intact est plutôt le résultat d'échange inégal entre chromatides soeurs, de conversion génique et d'événements de recombinaison complexes (voir plus bas). L'antigène grand T de SV40 induit des événements de recombinaison semblables à ceux observés avec l'antigène grand T du virus du polyome.

Jasmin et collaborateurs (1985) ont noté une recombinaison à haute fréquence entre un génome mutant de SV40 transfecté et les séquences SV40 endogènes de la lignée COS. Sans écarter totalement cette possibilité, plusieurs observations suggèrent que la reconstitution d'un gène T moyen intact ne provient pas d'une recombinaison entre l'insert *pmt* et le gène grand T transfecté. Premièrement, les séquences du gène grand T ne sont jamais observées à l'intérieur de l'insert *pmt*. Au niveau de l'insert *pmt* de la lignée Hy5, les séquences T moyen se terminent au nucléotide 1656 du génome de polyome tandis que les séquences du gène grand T transfecté s'arrêtent au nucléotide 4632. Une recombinaison entre le gène grand T et l'insert produirait un gène T moyen intact se terminant au nucléotide 4632 et un gène grand T tronqué s'arrêtant au nucléotide 1656. Or, ces produits n'ont jamais été détectés dans les transformants analysés. Deuxièmement, dans la lignée Hy2-ts5, les séquences du gène grand T sont intégrées de façon stable dans le génome cellulaire et subissent une recombinaison qui est indépendante de celle observée au niveau de l'insert *pmt*. Finalement, l'antigène grand T de SV40 induit les mêmes produits de recombinaison que l'antigène grand T de polyome malgré le fait que son gène n'est pas homologue aux séquences de l'insert *pmt*.

Mécanisme de recombinaison

Le produit de recombinaison observé dans la lignée Hy2 est compatible avec un échange inégal entre chromatides soeurs. Toutefois, ce mode de recombinaison génère deux produits réciproques, ségrégués dans deux cellules filles lors de la division cellulaire (figure 17). Les produits se distinguent par une addition ou une délétion d'ADN au niveau de l'insert *pmt*. Puisque l'événement de recombinaison peut être détecté sans utiliser un agent cytotoxique, on peut analyser l'état de l'insert *pmt* dans l'ensemble de la population cellulaire sans sélectionner un produit particulier. Lorsque la lignée Hy2-ts5 est transférée à la température permissive pendant une seule génération

cellulaire, le produit avec une délétion n'est jamais observé dans la population. Nous concluons que l'événement de recombinaison détecté dans la lignée Hy2 n'est pas un échange inégal entre chromatides soeurs.

Plusieurs études suggèrent que la recombinaison intramoléculaire dans les cellules de mammifère est un processus non-conservateur. Lorsqu'une molécule d'ADN possédant des répétitions directes subit une recombinaison intramoléculaire, seulement un des deux produits réciproques est observé (Chakrabarti et Seidman, 1986). Sternberg et collaborateurs obtiennent des conclusions semblables lors de la résolution d'une molécule contenant deux gènes *tk* (Lin *et al.*, 1984). Ces auteurs proposent un modèle par lequel une lésion entre les deux gènes crée un environnement favorable à la recombinaison. Cette lésion favorise une dégradation bidirectionnelle de l'ADN par une exonucléase 5'→3', exposant ainsi des brins d'ADN complémentaires. À la suite de l'appariement des brins complémentaires, les séquences non-appariées sont éliminées par une endonucléase qui coupe l'ADN à la jonction des régions appariées et non-appariées. La synthèse d'ADN aux intervalles monocaténaire de la molécule reconstitue un gène *tk* intact. Nos résultats sont en accord avec un tel mode de recombinaison non-conservateur. Afin d'interpréter l'effet de l'antigène grand T dans la recombinaison des séquences virales de la lignée Hy2, nous proposons les modèles illustrés à la figure 28.

Dans le premier modèle, l'antigène grand T reconnaît et se fixe aux séquences $G_C^A GGC$ présentes dans l'origine de réplication. Grâce à son activité hélicase, il provoque l'ouverture de l'ADN double brin sans initier la synthèse de l'ADN (b). Un mauvais appariement des séquences T moyen homologues à la suite d'un glissement des brins (c) produit deux boucles d'ADN monocaténaire (Slipped-strand mispairing). Chacune des boucles contient une copie monocaténaire du gène T

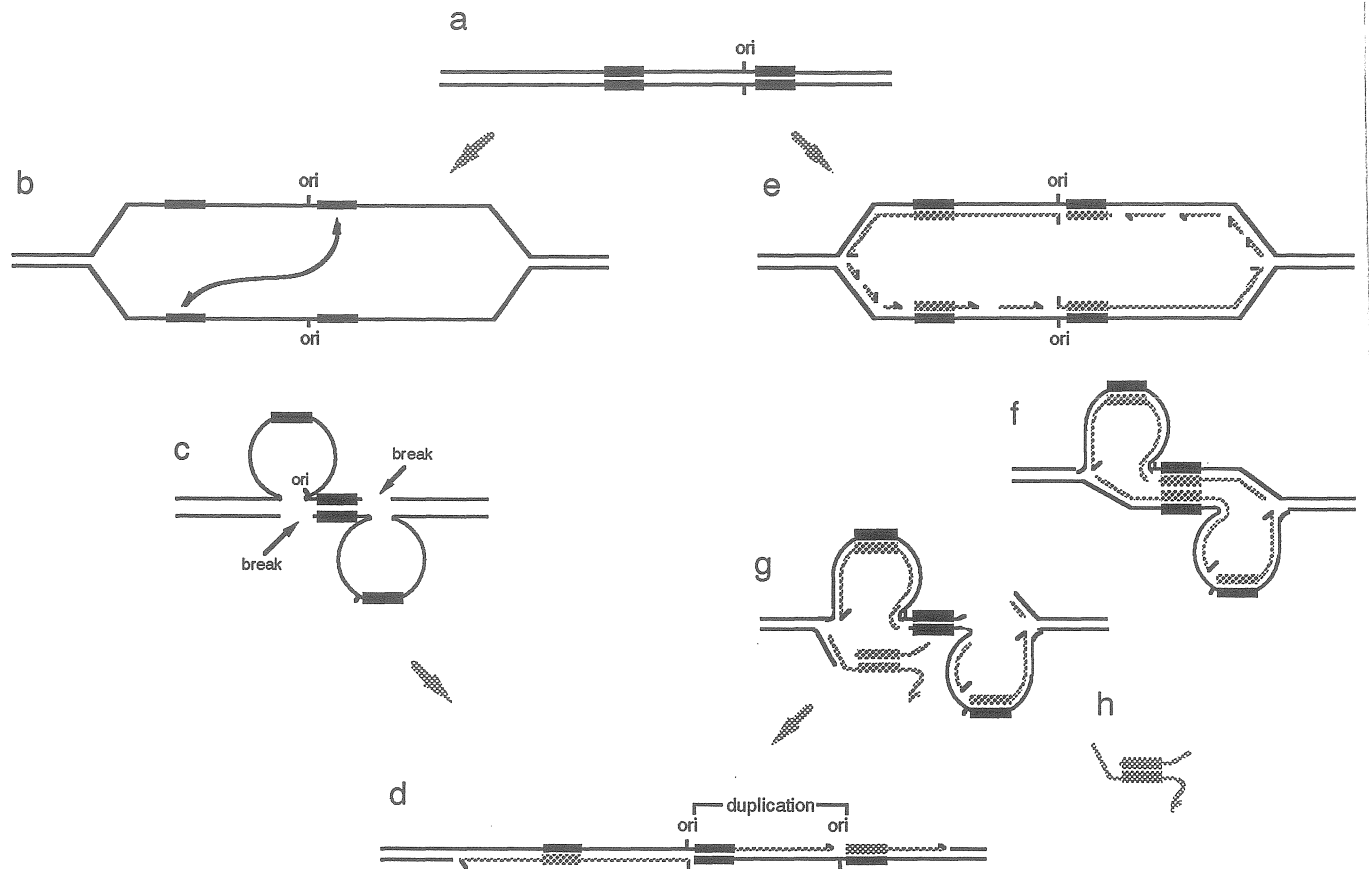


Figure 28. Modèles de recombinaison homologue dans la lignée Hy2.

Ces modèles sont décrits en détail dans la discussion. Les séquences T moyen homologues sont illustrées par les boîtes noires tandis que les brins nouvellements synthétisés sont présentés en pointillé.

moyen ainsi que les séquences séparant les deux gènes. Une délétion est produite si les enzymes du système de réparation de l'ADN excisent les boucles. Toutefois, une lésion par une endonucléase sur le brin opposé à la boucle produit une structure avec des intervalles d'ADN monocaténaire. La synthèse d'ADN à l'endroit des intervalles, par les enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN, résulte en une addition de 5.6 kb d'ADN contenant un gène T moyen intact (d). Cette addition se fait entre les deux gènes défectueux de l'insert. Le mécanisme de "slipped-strand mispairing" a déjà été proposé pour expliquer la production de petites délétions au niveau du gène *lac I* de *E.coli* (Farabaugh et Miller, 1978), du gène de la β -globine humaine (Efstratiadis *et al.*, 1980) et de la production de courtes répétitions lors de l'évolution du génome des eucaryotes (Levinson et Glutman, 1987).

Dans le second modèle, grand T se lie à l'origine de réplication et il y a synthèse d'ADN (f). Un échange inégal entre les brins bicaténaires naissants (f) reconstitue un gène T moyen intact et permet d'obtenir la structure observée dans les cellules après recombinaison (d). Ce modèle de recombinaison n'engendre pas de produit réciproque car la structure (g) est mitotiquement instable et le produit avec délétion est perdu lors de la division cellulaire (h).

Ces deux modèles sont semblables du point de vue de leur mécanisme. Ils impliquent tous deux un mauvais appariement entre les copies défectueuses de T moyen. Toutefois dans le second modèle, l'antigène grand T initie une synthèse d'ADN à l'origine virale. Les deux modèles peuvent également générer un produit avec une délétion au lieu d'une duplication des séquences de l'insert. Toutefois, nous ne savons pas pourquoi le produit avec délétion n'est jamais observé dans la lignée Hy2.

Dans la lignée Hy2-ts5, l'amplification des séquences virales provoque toujours une addition de 5.6 kb d'ADN ou d'un de ses multiples entre les deux copies défectueuses de T moyen. Le modèle de la structure en pelure d'oignon ne permet pas d'expliquer cette addition successive de 5.6 kb d'ADN. Nous suggérons plutôt que l'antigène grand T provoque une amplification des séquences de l'insert *pmt* en induisant des événements successifs de "slipped-strand mispairing" ou d'échange inégal au niveau de l'insert. Chaque événement ajoute 5.6 kb d'ADN à l'insert et reconstitue un gène T moyen intact additionnel au niveau de l'insert.

Dans la lignée Hy5, différents produits de recombinaison sont observés au niveau de l'insert *pmt*. Certains de ces produits sont le résultat d'événements complexes que nous n'avons pu identifier. Cependant dans certaines lignées transformées, on détecte des événements de conversion génique et d'échange inégal entre chromatides soeurs. Lors de la conversion génique (figure 29), les brins de la copie *pmt-dl2* envahissent la copie *pmt-dl1* pour former deux hétéroduplexes (a). Puisque le brin provenant de la copie *pmt-dl2* ne possède pas la délétion de 30 pb, il y a formation d'une boucle à l'endroit du mauvais appariement. Les systèmes cellulaires d'excision et de réparation de l'ADN viennent corriger la délétion de 30 pb en utilisant le brin de *pmt-dl2* comme matrice (b). La résolution de la structure permet la restauration d'un gène T moyen intact produisant un fragment SstI de 742 pb (c). La copie *pmt-dl2* conserve son intégrité et produit un fragment de 804 pb.

Nous avons aussi identifié un produit de recombinaison suggérant un échange inégal entre chromatides-soeurs. La restauration d'un gène T moyen est le résultat de deux événements de recombinaison. Dans un premier temps, une recombinaison réciproque entre les séquences plasmidiques provoque l'inversion de la copie *pmt-dl1* sur une des chromatides (figure 30b). Il y a ensuite une recombinaison réciproque entre la copie *pmt-dl1* inversés et la copie *pmt-dl2* de la

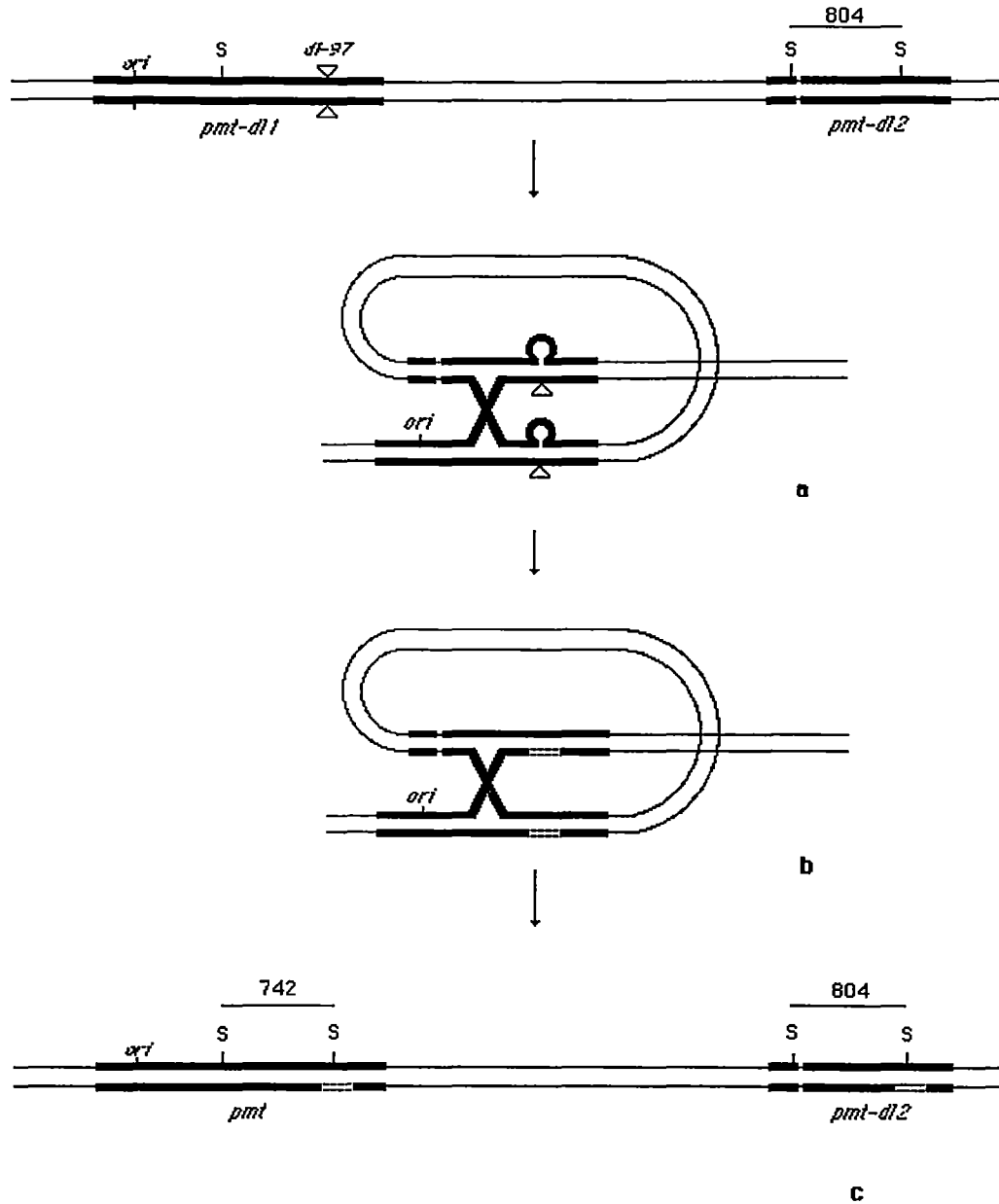


Figure 29. Conversion génique au niveau de l'insert *pmt* de la lignée Hy5.

Le mécanisme est décrit en détails dans la discussion. Les brins du gène *pmt-dl1* sont illustrés en bleu tandis que les brins du gène *pmt-dl2* sont en rouge. L'ADN nouvellement synthétisé est en jaune. La délétion de 30 pb est représentée par le triangle inversé. Abréviations: *ori*, origine de réplication; S, SstI.

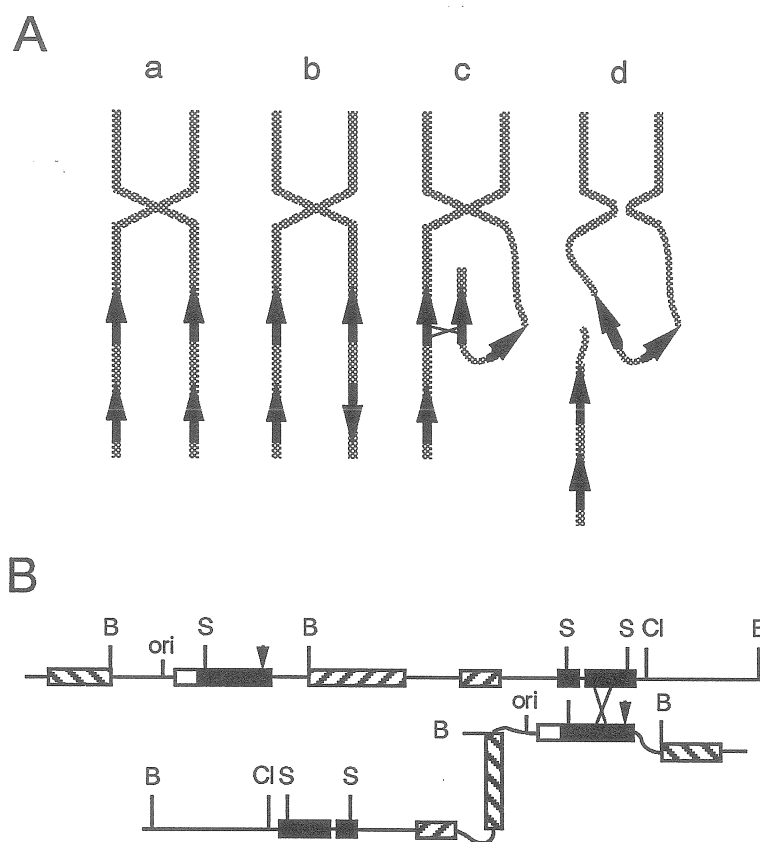


Figure 30. Échange inégal entre chromatides-soeurs au niveau de l'insert *pmt* de la lignée Hy5.

A. Échange inégal entre le gène *pmt-dl2* d'une chromatide et le gène *pmt-dl1* inversé de l'autre chromatide. Cette recombinaison produit un chromosome dicentrique et un fragment acentrique. L'orientation des gènes T moyen est indiquée par les flèches.

B. Recombinaison réciproque entre *pmt-dl1* et *pmt-dl2*. Cette recombinaison a lieu après l'inversion du gène *pmt-dl1* sur une des chromatides.

chromatide-soeur pour reconstituer un gène T moyen intact (figure 30a). Cette recombinaison incite la perte d'un fragment acentrique formant ainsi un chromosome dicentrique. Ce mécanisme permet d'expliquer l'apparition du site ClaI en amont du gène T moyen intact. Les résultats obtenus avec les lignées Hy2 et Hy5 démontrent que le mécanisme de recombinaison induit par grand T diffère d'une lignée à l'autre. Nous croyons que cette différence est reliée à la structure initiale et à la position de l'insert dans le génome cellulaire.

Fonctions de grand T impliquées dans la recombinaison

Afin de caractériser la fonction de grand T responsable de l'induction de la recombinaison homologue, différents mutants des antigènes grand T du virus du polyome et de SV40 ont été introduits dans les lignées Hy2 et Hy5. Nos résultats avec les mutants *dl-8* et *dl-141* montrent que la liaison entre l'antigène grand T et la protéine Rb n'est pas nécessaire pour l'induction de la recombinaison. Nous avons également étudié l'effet de mutants inactifs dans l'initiation de la réplication virale. Les mutants *dl-13* et *13val* ont induit la recombinaison au niveau des inserts *pmt* tandis que les mutants *dl-97* et *Δ300* se sont avérés inactifs. Les mutations *dl-13* et *13val* sont localisées dans le premier exon du gène grand T. Le premier exon de l'antigène grand T du virus du polyome possède une certaine homologie avec celui de l'antigène grand T de SV40. Une étude récente a montré que le premier exon de l'antigène grand T de SV40 contenait un domaine permettant l'association avec l'ADN polymérase α (Dornreiter *et al.*, 1990). On peut penser que les mutations *dl-13* et *13val* abolissent également l'association entre l'antigène grand T du virus du polyome et l'ADN polymérase α . Cette association ne serait donc pas essentielle à l'induction de la recombinaison homologue. Les résultats obtenus avec les mutants *dl-13* et *13val* confirment

également que la recombinaison de l'insert *pmt* des lignées Hy2 et Hy5 ne se produit pas selon le modèle de la pelure d'oignon.

Le mutant *dl-97* est inactif dans la réplication virale et il est incapable d'induire la recombinaison dans les lignées Hy2 et Hy5. Cette mutation est située près d'un domaine qui assure la liaison de l'antigène grand T à l'ADN. Il est donc possible que le mutant *dl-97* n'induisse pas la réplication, ni la recombinaison parce qu'il est incapable de se fixer à l'origine de réplication virale. Or, nos résultats montrent qu'il peut former une liaison spécifique avec l'origine virale. Nous suggérons qu'une fonction autre que la liaison à l'ADN empêche le mutant *dl-97* d'initier la réplication et d'induire la recombinaison. Toutefois, nous ne connaissons pas la nature de cette fonction.

Nous avons aussi étudié l'effet de différents mutants de SV40 inactifs pour l'activité hélicase et la liaison à l'origine de réplication. Ces mutants ont été incapables de provoquer la recombinaison au niveau de l'insert *pmt* de la lignée Hy2. Toutefois, ils ont tous induit la recombinaison dans la lignée Hy5. Nous concluons que la liaison à l'origine ainsi que l'activité hélicase de grand T sont nécessaires pour initier la recombinaison dans la lignée Hy2. Toutefois ces propriétés sont insuffisantes car le mutant C8A est demeuré inactif dans la recombinaison bien qu'il possède des activités hélicase et de liaison à l'origine. Dans la lignée Hy5, nous avons constaté que les fonctions d'hélicase et de liaison à l'ADN n'étaient pas nécessaires pour induire la recombinaison. Nous attribuons ceci au fait que la structure de l'insert et les mécanismes permettant la recombinaison dans les lignées Hy2 et Hy5 sont différents. Différents mécanismes de recombinaison impliqueraient différentes fonctions de grand T.

Recombinaison et méthylation

Nous avons isolé deux sous-clones de la lignée Hy5 ne subissant aucune recombinaison en présence de l'antigène grand T. L'analyse de l'ADN cellulaire révèle une forte méthylation des résidus CpG au niveau des séquences plasmidiques de l'insert *pmt*. De plus, aucune transcription n'a été détectée au niveau de l'insert. Des études récentes suggèrent que la méthylation de l'ADN influence la recombinaison intrachromosomique (Schwartz et Dennis, 1986; Puchta *et al.*, 1992). Une corrélation existe également entre le degré de méthylation des résidus CpG et l'expression des gènes (Cedar, 1988, et références s'y rapportant). Renzo et collaborateurs (1989) ont montré que la méthylation d'une séquence riche en résidus CpG placée devant le gène T moyen diminue la transcription du gène. Nos résultats suggèrent une telle relation entre la méthylation des séquences plasmidiques et l'inhibition de l'expression de l'insert *pmt*.

L'activité transcriptionnelle d'une région d'ADN peut influencer la recombinaison homologue dans les cellules de mammifère (Mansour *et al.*, 1988; Johnson *et al.*, 1989). Des évidences indirectes suggérant que la transcription stimule la recombinaison proviennent surtout d'études sur le réarrangement des gènes d'immunoglobulines (Martin *et al.*, 1991; Schlissel *et al.*, 1991). Dans les gènes d'immunoglobulines, seules les régions transcriptionnellement actives subissent une recombinaison à haute fréquence. L'efficacité de l'expression des gènes semble donc contrôler la fréquence de recombinaison (Alt *et al.*, 1986; Blackwell *et al.*, 1986). La transcription pourrait exercer son contrôle de différentes façons. La transcription pourrait agir directement sur le mécanisme de recombinaison. Certains auteurs proposent que le brin monocaténaire d'ADN déplacé durant la transcription envahit une séquence homologue pour stimuler la recombinaison (Ikeda et Matsumoto, 1979; Nickoloff et Reynolds, 1990). La transcription pourrait également jouer

un rôle indirect en modifiant la structure de la chromatine afin de favoriser l'événement de recombinaison. Il est possible cependant que la transcription n'ait aucune influence sur la recombinaison. Hsieh et Lieber (1992) suggèrent une relation temporelle entre la transcription et la recombinaison dépendante de la structure de la chromatine. L'efficacité serait déterminée selon l'accessibilité d'une région de la chromatine aux protéines impliquées dans la transcription et la recombinaison.

L'absence ou la présence de résidus CpG méthylés dans une région du génome cellulaire modifie la structure de la chromatine et réduit l'accessibilité de l'ADN (Selker, 1990). Des études montrent que la méthylation empêche la liaison de certains facteurs de transcription à l'ADN (Watt et Molloy, 1988; Iguchi-Arigo et Schaffner, 1989). Il est possible que la méthylation inhibe la recombinaison de façon semblable. Les groupements méthyls empêcheraient les protéines impliquées dans la recombinaison d'interagir avec l'ADN. Cette interaction pourrait également être inhibée par la liaison de protéines ayant une spécificité pour les groupements méthyls. Bird et ses collaborateurs ont récemment identifié deux protéines cellulaires, appelées MeCP1 et MeCP2, capables de se lier à l'ADN seulement lorsque les résidues CpG sont méthylés (Meehan *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1992). Ces protéines empêcheraient la liaison des facteurs de transcription à l'ADN pour ainsi inhiber l'expression des gènes. Dans la même optique, la liaison de MeCP1 et MeCP2 aux résidus CpG méthylés de l'insert *pmt* pourrait empêcher des protéines impliquées dans la recombinaison d'interagir avec l'ADN.

Rôle de l'activité recombinogène de l'antigène grand T dans la transformation

Plusieurs études ont démontré que l'introduction d'oncogènes immortalisants tels que c-myc et

les antigènes grand T des papovavirus provoque une instabilité génomique et augmente la fréquence d'apparition de caryotypes anormaux dans des cellules fibroblastiques de rat (Léopold *et al.*, 1986; Ray *et al.*, 1990; Stewart et Baccetti 1990). Ces modifications dans la stabilité et l'intégrité du génome cellulaire engendrent des sous-populations de cellules mutantes héritant de nouvelles propriétés contribuant à l'immortalisation et au développement tumoral. Le chromosome dicentrique est l'aberration structurale la plus fréquemment induite par les oncogènes immortalisants. Dans la lignée Hy5, l'antigène grand T induit des événements de recombinaison homologue permettant l'obtention de chromosomes dicentriques (figure 30b). Il est probable que l'antigène grand T provoque des altérations plus subtiles au niveau du génome des cellules transformées. Nos lignées permettent d'étudier la recombinaison entre des séquences virales et des séquences plasmidiques cointégrées sous forme de tandem. L'antigène grand T provoque des duplications, des délétions et des inversions au niveau de ces séquences. On peut concevoir qu'il induit des événements semblables au niveau de séquences répétitives présentes dans le génome cellulaire.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement le Dr. Marcel Bastin, mon directeur de thèse, pour les discussions fructueuses et les nombreux conseils qu'il m'a prodigués au cours de ce travail.

Je tiens aussi à souligner l'appui financier de la Société de Recherche sur le Cancer Inc. durant mes études.

Je veux également adresser mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidé dans ce travail:

- * Mesdames Carole Bergeron et Johanne Toutant pour leur aide technique précieuse en culture de tissu. Sans elles, je serais présentement en train de passer des cellules.
- * Le Dr Louise Bouchard pour de nombreuses discussions fructueuses et parfois amusantes
- * Mes collègues de laboratoire pour leur collaboration et de nombreuses discussions.
- * Toutes les personnes à qui j'ai mis de la glace dans le cou pour m'avoir enduré pendant mes cinq ans au département.

Finalement, je remercie mesdames Julie Pigeon et Sylvie Deslandes pour la correction de cette thèse (je ne suis donc pas responsable des phautes d'ortogafes restant ☺).

BIBLIOGRAPHIE

1. Alt, F.W., T.K. Blackwell, R.A. Depinho, M.G. Reth, et G.D. Yancopoulos. (1986). Regulation of genome rearrangement events during lymphocyte differentiation. *Immunol. Rev.* **89**:5-30.
2. Asselin, C., C. Gélinas, et M. Bastin. (1983). Role of the polyoma virus early proteins in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **3**:1451-1459.
3. Asselin, C., et M. Bastin. (1985). Sequences from polyomavirus and Simian virus 40 large T genes capable of immortalizing primary rat embryo fibroblasts. *J. Virol.* **56**:958-968.
4. Asselin, C., J. Vass-Marengo, et M. Bastin. (1986). Mutation in the polyomavirus genome that activates the properties of large T associated with neoplastic transformation. *J. Virol.* **57**:165-172.
5. Bagchi, S., R. Weinmann, et P. Raychaudhuri. (1991). The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* **65**:1063-1072.
6. Bandara, L.R., J.P. Adamczewski, T. Hunt, et N.B. La Thangue. (1991). Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor. *Nature* **352**:249-251.
7. Bastin, M. (1992). Polyomavirus-mediated transformation: A model of multistep carcinogenesis. *Cancer Invest.* **10**:85-92.
8. Bastin, M., L. St-Onge, et L. Bouchard. (1992). A mathematical model for homologous recombination in cultured cells. *J. Theor. Biol.* **156**:513-524.
9. Bautch, V.L., S. Toda, J.A. Hassell, et D. Hanahan. (1987). Endothelial cell tumors develop in transgenic mice carrying polyoma virus middle T oncogene. *Cell* **51**:529-538.
10. Bendig, M.M., T. Thomas, et W.R. Folk. (1980). Viable deletion mutant in the medium and large T antigen coding sequences of the polyoma virus genome. *J. Virol.* **33**:1215-1220
11. Bennett, E.R., M. Naujokas, et J.A. Hassell. (1989). Requirements for species-specific DNA replication. *J. Virol.* **63**:5371-5385.
12. Berger, H, et E. Wintersberger. (1986). Polyomavirus small T antigen enhances replication of the viral genome in 3T6 mouse fibroblasts. *J. Virol.* **60**:768-770
13. Bishop, J.M. (1987). The molecular genetics of cancer. *Science* **235**:305-311.
14. Bishop, J.M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**:235-248.

15. Blackwell, T.K., M.W. Moore, G.D. Yancopoulos, H. Suh, S. Lutzker, E. Selsing, et F.W. Alt. (1986). Recombination between immunoglobulin variable region gene segments is enhanced by transcription. *Nature* **324**:585-589.
16. Bollag, R.J., et R.M. Liskay. (1988). Conservative intrachromosomal recombination between inverted repeats in mouse cells: association between reciprocal exchange and gene conversion. *Genetics* **119**:161-169.
17. Bollag, R.J., A.S. Waldman, et R.M. Liskay. (1989). Homologous recombination in mammalian cells. *Annu. Rev. Genet.* **23**:199-225.
18. Borowiec, J.A., et J. Hurwitz. (1988). Localized melting and structural changes in the SV40 origin of replication induced by T-antigen. *EMBO J.* **7**:3149-3158.
19. Botchan, M., W. Topp, et J. Sambrook. (1979). Studies on SV40 excision from cellular chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**:709-719.
20. Bouchard, L. (1987). Étude de l'activité des protéines précoces du virus du polyome dans le processus d'oncogénèse *in vivo* et *in vitro*. Thèse de Ph.D. Université de Sherbrooke. Sherbrooke, Québec. 168p.
21. Bouchard, L., F. Mathieu, et M. Bastin. (1987). Polyoma large T can activate middle T expression by a hit-and-run mechanism. *Oncogene* **2**:379-386.
22. Bourgaux, P., B.S. Sylla, et P. Chartrand. (1982). Excision of polyoma virus DNA from that of a transformed mouse cell: identification of a hybrid molecule with direct and inverted repeat sequences at the viral-cellular joints. *Virology* **122**:84-97.
23. Boyer, H.W., et D. Roulland-Dussoix. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459-472.
24. Buchkovich, K., L.A. Duffy, et E. Harlow. (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*. **58**:1097-1105.
25. Cahill, K.B., A.J. Roome, et G.G. Carmichael. (1990). Replication-dependent transactivation of the polyomavirus late promoter. *J. Virol.* **64**:992-1001.
26. Capizzi, R.L., et J.W. Jameson. (1973). A table for the estimation of spontaneous mutation rate of cell in culture. *Mutat. Res.* **17**:147-148.
27. Caporossi, D., et S. Bacchetti. (1990). Definition of adenovirus type 5 functions involved in the induction of chromosomal aberrations in human cells. *J. Gen. Virol.* **71**:801-808.
28. Carbone, M.J., J. Hauser, M.P. Carty, K. Rundell, K. Dixon, et A.S. Levine. (1992). Simian virus 40 (SV40) small t antigen inhibits SV40 DNA replication *in vitro*. *J. Virol.* **66**:1804-1808.

29. Cartwright, C.A., P.L. Kaplan, J.A. Cooper, T. Hunter, et W. Eckhart. (1986). Altered sites of tyrosin phosphorylation in pp60^{c-src} associated with polyomavirus middle tumor antigen. *Mol. Cell. Biol.* **6**:1562-1570.
30. Cartwright, C.A., W. Eckhart, S. Simmon, et P.L. Kaplan. (1987). Cell transformation by pp60^{c-src} mutated in carboxy terminal regulatory domain. *Cell* **49**:83-91.
31. Cedar, H. (1988). DNA methylation and gene activity. *Cell* **53**:3-4.
32. Cerni, C., E. Mougneau, G. Connan, M. Rassoulzadegan, et F. Cuzin. (1986). *c-myc* and fonctionnally related oncogenes induce both high rates of sister cromatid exchange and abnormal caryotypes in rat fibroblasts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **132**:193-201.
33. Chakrabarti, S., et M.M. Seidman. (1986). Intramolecular recombination between transfected repeated sequences in mammalian cells is nonconservative. *Mol. Cell. Biol.* **6**:2520-2526.
34. Chellappan, S.P., S. Hiebert, M. Mudryj, J.M. Horowitz, et J.R. Nevins. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target fo the RB protein. *Cell* **65**:1053-1061.
35. Cheng, S.H., R. Harvey, H. Piwnica-Worms, P.C. Espino, T.M. Roberts, et A.E. Smith. Mechanism of activation of complexed pp60^{c-src} by the middle T antigen of polyomavirus. Dans R. Knippers and A.J. Levine (Ed.): *Current topics in microbiology and immunology 144: transforming proteins of DNA tumor viruses.* Springer-Verlag, New York. (1989). p.109.
36. Chittenden, T., D.M. Livingston, et W.G. Kaelin Jr. (1991). The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein. *Cell* **65**:1073-1082.
37. Cogen, B. (1978). Virus-specific early RNA in 3T6 cells infected by a ts-A mutant of polyoma virus. *Virology* **85**:222-230.
38. Colantuoni, V., L. Dailey, G. Della-Valle, et C. Basilico. (1982). Requirements for excision and amplification of integrated viral DNA molecules in polyoma virus transformed cells. *J. Virol.* **43**:617-628.
39. Cooper, J.A., et C.S. King. (1986). Dephosphorylation or antibody binding to the carboxy terminus stimulates pp60^{c-src}. *Mol. Cell. Biol.* **6**:4467-4477.
40. Courtneidge, S.A. Further characterisation of the complex containing middle T antigen and pp60. Dans R. Knippers et A.J. Levine (Ed.): *Current topics in microbiology and immunology 144: Transforming proteins of DNA tumor viruses.* Springer-Verlag, New York. (1989). p.121.
41. Courtneidge, S.A., et A. Heber. (1987). An 81 kd protein complexed with the middle T antigen and pp60^{c-src}: a possible phosphatidylinositol kinase. *Cell* **50**:1031-1037.
42. Courtneidge, S.A., et A.E. Smith. (1983). Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene. *Nature* **303**:435-439.

43. Courtneidge, S.A., and A.E. Smith. (1984). The complex of polyoma middle T antigen et pp60^{c-src}. *EMBO J.* **3**:585-591.
44. Cowie, A., J. DeVilliers, et R. Kamen. (1986). Immortalization of rat embryo fibroblasts by mutant polyomavirus large T antigens deficient in DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* **6**:4344-4352.
45. Cowie, A., P. Jat, et R. Kamen. (1982). Determination of sequences at the capped 5'-ends of polyomavirus early region transcripts synthesized *in vivo* and *in vitro* demonstrate an unusual microheterogeneity. *J. Mol. Biol.* **159**:225-255.
46. Cowie, A., et R. Kamen. (1984). Multiple binding sites for polyomavirus large T antigen within regulatory sequences of polyomavirus DNA. *J. Virol.* **52**:750-760.
47. Cowie, A., C. Tyndall, et R. Kamen. (1981). Sequences at the capped 5'ends of polyoma virus late region mRNAs; An example of extreme heterogeneity. *Nucleic Acids Res.* **9**:6305-6322.
48. Cuzin, F. (1984). The polyoma oncogenes. Coordinated functions of the three distinct proteins in the transformation of the rodents cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* **781**:193-204.
49. Dailey, L., et C. Basilio. (1985). Sequences in the polyomavirus DNA regulatory region involved in viral DNA replication and early gene expression. *J. Virol.* **54**:739-749.
50. Dean, F.B., P. Bullock, Y. Murakami, C.R. Wobbe, L. Weissbach, et J. Hurwitz. (1987). Simian virus 40 (SV40) DNA replication: SV40 large T antigen unwinds DNA containing the SV40 origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:16-20.
51. De Caprio, J.A., J.W. Ludlow, D. Lynch, Y. Furukawa, J. Griffin, H. Piwnica-Worms, C.-H. Huang, et D.M. Livingston. (1989). The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* **58**:1085-1095.
52. deVilliers, J., W. Schaffner, C. Tyndall, S. Lupton, et R. Kamen. (1984). Polyomavirus DNA replication requires an enhancer. *Nature* **312**:242-246.
53. Dilworth, S.M., H.-A. Hansson, C. Darnfors, G. Bjursell, C.H. Streuli, et B.E. Griffin. (1986). Subcellular localisation of the middle and large T antigens of polyoma virus. *EMBO J.* **5**:491-499.
54. Dodson, M., F.B. Dean, P. Bullock, H. Echols, et J. Hurwitz. (1987). Unwinding of duplex DNA from the SV40 origin of replication by T antigen. *Science* **238**:964-967.
55. Dornreiter, I., A. Höss, A.K. Arthur, et E. Fanning. (1990). SV40 T antigen binds directly to the large subunit of purified DNA polymerase alpha. *EMBO J.* **9**:3329-3336.
56. Dretzen, G., M. Bellard, P. Sassone-Corsi, et P. Chambon. (1981). A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **112**:295-298.

57. Dyson, N., R. Bernards, S.H. Friend, L.R. Gooding, J.A. Hassell, E.O. Major, J.M. Pipas, T. Vandyque, et E. Harlow. (1990). Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma product. *J. Virol.* **64**:1353-1356.
58. Dyson, N., K. Buchkovich, P. Whyte, et E. Harlow. (1989). The cellular 107K protein that binds to adenovirus E1A also associates with the large T antigens of SV40 and JC virus. *Cell* **58**:249-255.
59. Efstratiadis, A., J.W. Posakony, T. Maniatis, R.M. Lawn, C. O'Connell, R.A. Spritz, J.K. DeRiel, B.G. Forget, S.M. Weissman, J.L. Slightom, A.E. Blechl, O. Smithies, F.E. Baralle, C.C. Shoulders, et N.J. Proudfoot. (1980). The structure and evolution of the human β -globin gene family. *Cell* **21**:653-668.
60. Fanning, E., et R. Knippers. (1992). Structure and function of simian virus 40 large tumor antigen. *Annu. Rev. Biochem.* **61**:55-85.
61. Farmerie, W.G., et W.R. Folk. (1984). Regulation of polyomavirus transcription by large tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:6919-6923.
62. Farabaugh, P.J., U. Schmeissner, M. Hoffer, et J.H. Miller. (1978). Genetic studies of the lac repressor. VII. On the molecular nature of spontaneous hotspots in the lac I gene of *Echerichia coli*. *J. Mol. Biol.* **126**:847-863.
63. Feinberg, A.P., et B. Vogelstein. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**:6-13.
64. Feinberg, A.P., et B. Vogelstein. (1984). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum *Anal. Biochem.* **137**:266-267.
65. Fine, R., M. Mass, et W.T. Murakami. (1968). Protein composition of polyoma virus. *J. Mol. Biol.* **36**:167-177.
66. Francke, B., et W. Eckhart. (1973). Polyoma gene function required for viral DNA synthesis. *Virology* **55**:127-135.
67. Gaudray, P., P. Clertant, et F. Cuzin. (1980). ATP phosphohydrolase (ATPase) activity of a polyoma virus T antigen. *Eur. J. Biochem.* **109**:553-560.
68. Gelinas, C., et M. Bastin. (1985). Malignant transformation of rat cells by polyomavirus middle T gene. *Virology* **146**:233-245.
69. Gibson, W. (1974). Polyoma virus proteins: a description of the structural proteins of the virion based on polyacrilamide gel electrophoresis and peptide analysis. *Virology* **62**:319-336.
70. Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cell support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**:175-182.

71. Griffin, B.E., et C. Maddock. (1979). New classes of viable deletion mutants in the early region of polyoma virus. *J. Virol.* **31**:645-656.
72. Guy, C.T., R.D. Cardiff, et W.J. Muller. (1992). Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol. Cell. Biol.* **12**:954-961.
73. Heiser, W.C., et W. Eckhart. (1982). Polyoma virus early and late mRNA's in productively infected mouse 3T6 cells. *J. Virol.* **44**:175-188.
74. Herbomel, P., B. Bourachot, et M. Yaniv. (1984). Two distinct enhancers with different cell specificities coexist in the regulatory region of polyoma. *Cell.* **39**:653-662.
75. Hirt, B., (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* **26**:365-369.
76. Hsiao, W.-L.W., S. Gattoni-Celli, P. Kirschemeier, et I.B. Weinstein. (1984). Effects of 5-azacytidine on methylation and expression of specific DNA sequences in C3H 10T1/2 cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**:634-641.
77. Hsiao, W.-L.W., S. Gattoni-Celli, et I.B. Weinstein. (1985). Effects of 5-azacytidine on the progressive nature of cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* **5**:1800-1803.
78. Hsieh, C.-L., et M.R. Lieber. (1992). CpG methylated minichromosomes become inaccessible for V(D)J recombination after undergoing replication. *EMBO J.* **11**:315-325.
79. Huang, H.-J.S., J.-K. Yee, J.-Y. Shew, P.L. Chen, R. Bookstein, T. Friedmann, E.Y.-H.P. Lee, et W.-H. Lee. (1988). Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* **242**:1563-1566.
80. Hunter, T. (1991). Cooperation between oncogenes. *Cell* **64**:249-270.
81. Iguchi-Ariga, S.M.M., et W. Schaffner. (1989). CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev.* **3**:612-619.
82. Ikeda, H., et T. Matsumoto. (1979). Transcription promotes *recA*-independent recombination mediated by DNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:4571-4575.
83. Ito, Y., J.R. Blocklehurst, et R. Dulbecco. (1977). Virus specific proteins in the plasma membrane of cell lytically infected or transformed by polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:4666-4670.
84. Ito, Y. (1979). Polyoma specific 55K protein isolated from plasma membrane of productively infected cells is virus coded and important for cell transformation. *Virology* **98**:261-266.

85. Jack, H.-M., M. McDowell, C.M. Steinberg, et M.Wabl. (1988). Looping out and deletion mechanism for the immunoglobulin heavy-chain class switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:1581-1585.
86. Jasin, M., J. deVilliers, F. Weber, et W. Schaffner. (1985). High frequency of homologous recombination in mammalian cells between endogenous and introduced SV40 genomes. *Cell* **43**:695-703.
87. Johnson, R.S., M. Sheng, M.E. Greenberg, R.D. Kolodner, V.E. Papaioannou, et B.M. Spiegelman. (1989). Targeting of nonexpressed genes in embryonic stem cells via homologous recombination. *Science* **245**:1234-1236.
88. Kamen, R., P. Jat, R. Triesman, et J. Favaro. (1982). 5' termini of polyoma virus early region transcripts synthesized *in vivo* by wild type virus and viable deletion mutants. *J. Mol. Biol.* **159**:189-224.
89. Kaplan, D.R., D.C. Pallas, W. Morgan, B. Schaffhausen, et T.M. Roberts. (1988). Mechanisms of transformation by polyoma virus middle T antigen. *Biochim. Biophys. Acta* **948**:345-364.
90. Kawai, S., et M. Nishizawa. (1984). New procedure for DNA transfection polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **4**:1172-1174.
91. Kenny, M.K., S.-H. Lee, et J. Hurwitz. (1989). Multiple functions of human single-stranded-DNA binding protein in simian virus 40 DNA replication: Single-strand stabilization and stimulation of DNA polymerases α and δ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**:9757-9761.
92. Kern, F.G., S. Pellegrini, A.Cowie, et C. Basilico. (1986). Regulation of polyomavirus late promoter activity by viral early proteins. *J. Virol.* **60**:275-285.
93. Khoury, G., et P. Gruss. (1983). Enhancer elements. *Cell* **33**:313-314.
94. Kingston, R.E., A. Cowie, R.I. Morimoto, et K.A. Gwinn. (1986). Binding of polyoma large T antigen to the human hsp70 promoter is not required for trans-activation. *Mol. Cell. Biol.* **6**:3180-3190.
95. Klein, G. (1987). The approaching era of the tumor suppressor genes. *Science* **238**:1539-1545.
96. Klein, G., et E. Klein. (1984). Oncogene activation and tumor progression. *Carcinogenesis* **5**:429-435.
97. Kmiecik, T.E., et D. Shalloway. (1987). Activation and suppression of pp60^{c-src} transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell* **49**:65-73.
98. Kornbluth, S., S.H. Cheng, W. Markland, Y. Fukui, et H. Hanafusa. (1990). Association of p62^{c-yes} with polyomavirus middle T-antigen mutants correlates with transforming ability. *J. Virol.* **64**:1584-1589.

99. Kornbluth, S., M. Sudol, et H. Hanafusa. (1986). Association of the polyomavirus middle-T antigen with c-yes protein. *Nature* **325**:171-173.
101. Krieg, P.A., et D.A. Melton. (1988). *In vitro* RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Meth. Enzymol.* **155**:397-415.
102. Kypta, R.M., A. Hemming, et S.A. Courtneidge. (1988). Identification and characterization of p59^{l^{mn}} (a *src*-like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.* **7**:3837-3844.
103. Larose, A., Dyson, N., Sullivan, M., Harlow, E., et M. Bastin. (1991). Polyomavirus large T mutants affected in retinoblastoma protein binding are defective in immortalization. *J. Virol.* **65**:2308-2313.
104. Larose, A., L. St-Onge, et M. Bastin. (1990). Mutations in polyomavirus large T affecting immortalization of primary rat embryo fibroblasts. *Virol.* **176**:98-105.
105. Lee, W.-H., R. Bookstein, et E.Y.-H.P. Lee. (1988). Studies on the human retinoblastoma susceptibility gene. *J. Cell. Biochem.* **38**:213-227.
106. Léopold, P., E. Mougneau, J. Vailly, C. Cerni, M. Rassoulzadegan, et F. Cuzin. (1986). Genetic instabilities at the chromosomal and molecular levels induced by the *plt* oncogene of polyoma virus. *Ann. Clin. Res.* **18**:304-306.
107. Letsou, A., et R.M. Liskay. (1987). Effect of the molecular nature of mutation on the efficiency of intrachromosomal gene conversion in the mouse cells. *Genetics* **117**:759-769.
108. Levinson, G., et G.A. Gutman. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**:203-221.
109. Lewis, J.D., R.R. Meehan, W.J. Henzel, I. Maurer-Fogy, P. Jeppesen, F. Klein, et A. Bird. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* **69**:905-914.
110. Lin, F.-L., et N. Sternberg. (1984). Homologous recombination between overlapping thymidine kinase gene fragments stably inserted into a mouse cell genome. *Mol. Cell. Biol.* **4**:852-861.
111. Lin, F.-L., K. Sperle, et N. Sternberg. (1984). Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol. Cell. Biol.* **4**:1020-1034.
112. Liskay, R.M., et J.L. Stachelek. (1983). Evidence for intrachromosomal gene conversion in culture mouse cells. *Cell* **35**:157-165.
113. Liskay, R.M., J.L. Stachelek, et A. Letsou. (1984). Homologous recombination between repeated chromosomal sequences in mouse cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **49**:183-189.

114. Luria, S.E., et M. Delbruck. (1943). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* **28**:491-511.
115. Lusky, M., et M. Botchan. (1981). Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences. *Nature* **293**:79-81.
116. Luthman, H., M.G. Nilsson, et G. Magnusson. (1982). Noncontiguous segments of the polyoma gene required in cis for DNA replication. *J. Mol. Biol.* **161**:533-550.
117. Mäkelä, T.P., et K. Atilato. (1986). Proto-oncogene amplification: role in tumour progression. *Ann. Clin. Res.* **18**:290-296.
118. Maniatis, T., E.F. Fritsch, et J. Sambrook. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 545p.
119. Mansour, S.L., K.R. Thomas, et M.R. Capecchi. (1988). Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**:348-352.
120. Marshall, C.J. (1991). Tumor suppressor genes. *Cell* **64**:313-326.
121. Martin, D., R. Huang, T. LeBien, et B. Van Ness. (1991). Induced rearrangement of κ genes in the BLIN-1 human pre-B cell line correlates with germline J-C κ and V κ transcription. *J. Exp. Med.* **173**:639-645.
122. Mastrangelo, I.A., P.V.C. Hough, J.S. Wall, M. Dodson, F.B. Dean, et J. Hurwitz. (1989). ATP-dependent assembly of double hexamers of SV 40 T antigen at the viral origin of DNA replication. *Nature* **338**:658-662.
123. McKay, R.D.G. (1981). Binding of a SV40-T antigen related protein to DNA. *J. Mol. Biol.* **145**:471-488.
124. Meehan, R.R., J.D. Lewis, S. McKay, E.L. Kleiner, et A.P. Bird. (1989). Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* **58**:499-507.
125. Melton, D.A., P.A. Krieg, M.R. Rebagliati, T. Maniatis, K. Zinn, et M.R. Green. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl. Acids Res.* **12**:7035-7056.
126. Mes, A.-M., et J.A. Hassell. (1982). Polyoma viral middle T antigen is required for transformation. *J. Virol.* **42**:621-629.
127. Miller, J., P. Bullock, et M. Botchan. (1984). Simian virus 40 T antigen is required for viral excision from chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:7534-7538.

128. Mudryj, M., S.H. Devoto, S.W. Hiebert, T. Hunter, J. Pines et J.R. Nevins. (1991). Cell cycle regulation of the E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A. *Cell* **65**:1243-1253.
129. Mudryj, M., S.W. Hiebert, et J.R. Nevins. (1990). A role for the adenovirus inducible E2F transcription factor in a proliferation dependent signal transduction pathway. *EMBO J.* **9**:2179-2184.
130. Mueller, C.R., W.J. Muller, et J.A. Hassell. (1988). The polyomavirus enhancer comprises multiple functional elements. *J. Virol.* **62**:1667-1678.
131. Mueller, C.R., A.-M. Mes-Masson, M. Bouvier, et J.A. Hassell. (1984). Location of sequences in polyomavirus DNA that are required for early gene expression *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **4**:2594-2609.
132. Muller, W.J., D. Dufort, et J.A. Hassell. (1988). Multiple subelements within the polyomavirus enhancer function synergistically to activate DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **8**:5000-5015.
133. Muller, W.J., M.A. Naujokas, et J.A. Hassell. (1983). Polyomavirus-plasmid recombinants capable of replicating have an enhanced transforming potential. *Mol. Cell. Biol.* **3**:1670-1674.
134. Murakami, Y., E. Toshikhiko, M.-A. Yamada, C. Prives, et J. Hurwitz. (1986a). Species-specific *in vitro* synthesis of DNA containing the polyomavirus origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:6347-6351.
135. Murakami, Y., C.R. Wobbe, L. Weissbach, R.B. Dean, et J. Hurwitz. (1986b). Role of DNA polymerase α and DNA primase in simian virus 40 DNA replication *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:2867-2873.
136. Nevins, J.R. (1992). E2F: A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**:424-429.
137. Nickoloff, J.A., et R.J. Reynolds. (1990). Transcription stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **10**:4837-4845.
138. Ogris, E., I. Mudrak, et E. Wintersberger. (1992). Polyomavirus large and small T antigens cooperate in induction of the S phase in serum-starved 3T3 mouse fibroblasts. *J. Virol.* **66**:53-61.
139. Pallas, D.C., V. Cherington, W. Morgan, J. DeAnda, D. Kaplan, B. Schaffhausen, et T.M. Roberts. (1988). Cellular proteins that associate with the middle and small T antigens of polyomavirus. *J. Virol.* **62**:3934-3940.
140. Pallas, D.C., L.K. Shahrik, B.L. Martin, S. Jaspers, T.M. Miller, D.L. Brautigan, et T.M. Roberts. (1990). Polyoma small and middle T antigens and the SV40 small T antigen form stable complexes with phosphatase 2A. *Cell* **60**:167-176.

141. Pannuti, A., A. Pascucci, G. La Mantia, L. Fischer-Fantuzzi, C. Vesco, et L. Lania. (1987). Trans-activation of cellular and viral promoters by a transforming nonkaryophilic Simian Virus 40 large T antigen. *J. Virol.* **61**:1296-1299.
142. Parsons, R., M.E. Anderson, et P. Tegtmeyer. (1990). Three domains in the simian virus 40 core origin orchestrate the binding, melting, and DNA helicase activities of T antigen. *J. Virol.* **64**:509-518.
143. Pellegrini, S., L. Dailey, et C. Basilico. (1984). Amplification and excision of integrated polyoma DNA sequences require a functional origin of replication. *Cell* **36**:943-949.
144. Persiani, D.M., et E. Selsing. (1989). DNase I sensitivity of immunoglobulin light chain genes in Abelson murine leukemia virus transformed pre-B cell lines. *Nucl. Acid Res.* **17**:5539-5348.
145. Piché, A., et P. Bourgaux. (1987). Resolution of a polyomavirus-mouse hybrid replicon: viral function r required for recombination. *J. Virol.* **61**:845-850.
146. Pipas, J.M. (1992). Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. *J. Virol.* **66**:3979-3985.
147. Pinsonneault, C., L. Bouchard, et M. Bastin. (1988). Transfert of mlt mutation into polyomavirus intronless genome by intramolecular recombination in bacteria. *Gene* **62**:153-158.
148. Piwnica-Worms, H., K.B. Saunders, T.M. Roberts, A.E. Smith, et S.H. Cheng. (1987). Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60^{c-src}. *Cell* **49**:75-82.
149. Pomerantz, B.J., et J.A. Hassell. (1984). Polyomavirus and simian virus 40 large T antigens bind to common DNA sequences. *J. Virol.* **49**:925-937.
150. Pomerantz, B.J., C.R. Muller, et J.A. Hassell. (1983). Polyomavirus large T antigen binds independently to multiple, unique regions on the viral genome. *J. Virol.* **47**:600-610.
151. Prives, C. (1990). The replication functions of SV40 T antigen are regulated by phosphorylation. *Cell* **61**:735-738.
152. Prives, C., Y. Murakami, F.G. Kern, W. Folk, C. Basilico, et J. Hurwitz. (1987). DNA sequence requirements for replication of polyomavirus DNA *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **7**:3694-3704.
153. Puchta, H., S. Kocher, et B. Hohn. (1992). Extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells is fast and is not affected by CpG methylation. *Mol. Cell. Biol.* **12**:3372-3379.

154. Rassoulzadegan, M., A. Cowie, A. Carr, N. Glaichenhaus, R. Kamen, et F. Cuzin. (1982). The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* **300**:713-718.
155. Rassoulzadegan, M., Z. Naghashfar, A. Cowie, A. Carr, M. Grisoni, R. Kamen, et F. Cuzin. (1983). Expression of large T protein of polyoma virus promotes the establishment in culture of normal rodent fibroblast cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**:4354-4358.
156. Ray, F.A., D.S. Peabody, J.L. Cooper, L.S. Cram, et P.M. Kraemer. (1990). SV40 T antigen alone drives karyotype instability that precedes neoplastic transformation of human diploid fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* **42**:13-31.
157. Renzo, A., L. Bouchard, et M. Bastin. (1989). Effects of CpG-rich sequences in transformation and tumorigenesis by polyomavirus. *Oncogene* **4**:1469-1475.
158. Rubnitz, J., et S. Subramani. (1986). Extrachromosomal and chromosomal gene conversion in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **6**:1608-1614.
159. Ruediger, R., D. Roeckel, J. Fait, A. Bergqvist, G. Magnusson, et G. Walter. (1992). Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus. *Mol. Cell. Biol.* **12**:4872-4882.
160. Sager, R., A. Anisowicz, et N. Howell. (1981). Genomic rearrangements in a mouse cell line containing integrated SV40 DNA. *Cell* **23**:41-50.
161. Salzman, N.P., *ed.*, (1986). *The papovaviridae*. Vol.1. Plenum Press. New York, U.S.A., 459p.
162. Schaffhausen, B.S., J.E. Silver, et T.L. Benjamin. (1978). Tumor antigens in cells productively infected by wild type polyoma virus and mutant NG-18. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**:79-83.
163. Schaffhausen, B.S., et T.L. Benjamin. (1981a). Protein kinase activity associated with polyoma virus middle T antigen. *Cold Spring Harbor Conf. Cell. Prolif.* **8**:1281-1298.
164. Schaffhausen, B.S., et T.L. Benjamin. (1981b). Comparison of phosphorylation of two polyoma virus middle T antigens *in vivo* and *in vitro*. *J. Virol.* **40**:184-196.
165. Scheffner, M., R. Wessel, et H. Stahl. SV40 T antigen catalyzed duplex DNA unwinding. Dans R. Knippers et A.J. Levine (Ed.): *Current topics in microbiology and immunology* 144: Transforming proteins of DNA tumor viruses. Springer-Verlag, New York (1989), p.37.
166. Scheidtmann, K.H., M.C. Mumby, K. Rundell, et G. Walter. (1991a). Dephosphorylation of simian virus T antigen and p53 protein by protein phosphatase 2A: inhibition by small T antigen. *Mol. Cell. Biol.* **11**:1996-2003.

167. Scheidtmann, K.H., D.M. Virshup, et T.J. Kelly. (1991b). Protein phosphatase 2A dephosphorylates simian virus 40 large T antigen specifically at residues involved in the regulation of the DNA-binding activity. *J. Virol.* **65**:2098-2101.
168. Scheller, A., et C. Prives. (1985). Simian virus 40 and polyomavirus large tumor antigens have different requirements for high-affinity sequence specific DNA binding. *J. Virol.* **54**:532-545.
169. Schlegel, R., et T.L. Benjamin. (1978). Cellular alterations dependent upon the polyoma virus hr-t function: separation of mitogenic from transforming capacities. *Cell* **14**:587-599.
170. Schlissel, M.S., L.M. Corcoran, et D. Baltimore. (1991). Virus-transformed pre-B cells show ordered activation but not inactivation of immunoglobulin gene rearrangement and transcription. *J. Exp. Med.* **173**:711-720.
171. Schramayr, S., D. Caporossi, I. Mak, T. Jelinek, et S. Bacchetti. (1990). Chromosomal damage induced by human adenovirus type 12 requires expression of the E1B 55-kilodalton viral protein. *J. Virol.* **64**:2090-2095.
172. Schwartz, D., et E. Dennis. (1986). Transposase activity of the *Ac* controlling element in maize is regulated by its degree of methylation. *Mol. Gen. Genet.* **205**:476-482.
173. Selker, E.U. (1990). DNA methylation and chromatin structure: a view from below. *Trend Bioch. Sci.* **15**:103-107.
174. Shenolikar, S., et A.C. Nairn. (1991). Protein phosphatases: recent progress. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **23**:1-121.
175. Silver, J., B. Schaffhausen, et T. Benjamin. (1978). Tumor antigens induced by nontransforming mutants of polyomavirus. *Cell* **15**:485-496.
176. Smale, S.T., et R. Tjian. (1986). T-antigen-DNA polymerase α complex implicated in simian virus 40 DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **6**:4077-4087.
177. Smith, A.J.H., et P. Berg. (1984). Homologous recombination between defective neo genes in mouse 3T6 cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **49**:171-181.
178. Soeda, E., J.R. Arrand, N. Smolar, J.E. Walsh, et B.E. Griffin. (1980). Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome. *Nature* **283**:167-177.
179. Solomon, E., J. Borrow, et A.D. Goddard. (1991). Chromosome aberrations and cancer. *Science* **254**: 1153-1160.
180. Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.

181. Southern, P.J., et P. Berg. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under the control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:327-341.
182. Stachelek, J.L., et R.M. Liskay. (1988). Accuracy of intrachromosomal gene conversion in mouse cells. *Nucleic Acids Res.* 16:4069-4076.
183. Stahl, H., P. Droge, et R. Knippers. (1986). DNA helicase activity of SV40 large T tumor antigen. *EMBO J.* 5:1939-1944.
184. Stark, G.R., et G.M. Wahl. (1984). Gene amplification. *Annu. Rev. Biochem.* 53:447-491.
185. Stark, G.R., M. Debatisse, E. Giulotto, et G.M. Wahl. (1989). Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell* 57:901-908.
186. Stewart, N., et S. Bacchetti. (1991). Expression of SV40 large T antigen, but not small t antigen, is required for the induction of chromosomal aberrations in transformed human cells. *Virology* 180:49-57.
187. Stillman, B. (1989). Initiation of eukaryotic DNA replication *in vitro*. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 5:197-245.
188. St-Onge, L. (1989). Recombinaison à haute fréquence dans des cellules de mammifère. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec. 73p.
189. St-Onge, L., L. Bouchard, S. Laurent, et M. Bastin. (1990). Intrachromosomal recombination mediated by papovavirus large T antigens. *J. Virol.* 64:2958-2966.
190. Stow, N.D., et N.M. Wilkie. (1976). An improved technique for obtaining enhanced infectivity with herpes simplex virus type I DNA. *J. Gen. Virol.* 33:447-458.
191. Stringer, J.R., R.M. Kuhn, L. Newman, et J.C. Meade. (1985). Unequal recombination between tandemly arranged sequences stably incorporated into cultured rat cells. *Mol. Cell. Biol.* 5:659-666.
192. Subramani, S., et J. Rubnitz. (1985). Recombination events after transient infection and stable integration of DNA into mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 5:2613-2622.
193. Sunstrom, N.-A., N.H. Acheson, et J.A. Hassell. (1991). Determination of the origin-specific DNA-binding domain of polyomavirus large T antigen. *J. Virol.* 65:6998-7003.
194. Templeton, D., S. Simon, et W. Eckhart. (1986). Truncated forms of the polyomavirus middle T can substitute for the small T antigen in lytic infection. *J. Virol.* 57:367-370.
195. Taylor, S.M., et P.A. Jones. (1979). Multiple new phenotypes induced in 10T½ and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 17:771-779.

196. Testa, J.R. (1990). Chromosome translocations in human cancer. *Cell Growth Different.* 1:97-101.
197. Thomas, B.J., et R. Rothstein. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56:619-630.
198. Thomas, T., P. Vollmer, et W.R. Folk. (1981). Nucleotide sequence changes in the polyoma virus A gene mutants. *J. Virol.* 37:1094-1098.
199. Thomas, K.R., K.R. Folger, et M.R. Capecchi. (1986). High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 44:419-428.
200. Tooze, J. (ed.), *Molecular biology of the tumor viruses: DNA tumor viruses, second edition part 2.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York. (1981). 1073p.
201. Treisman, R., U. Novak, J. Favalaro, et R. Kamen. (1981). Transformation of rat cells by an altered polyomavirus genome expressing only the middle T protein. *Nature* 292:595-600.
202. Tüller, H, et C. Salomon. (1985). Small and middle T antigens contribute to lytic and abortive polyomavirus infection. *J. Virol.* 53:579-586.
203. Tyndall, C., G. La Mantia, C.M. Thacker, J. Favalaro, et R. Kamen. (1981). A region of the polyomavirus genome between the replication origin and the late protein coding sequences is required in cis for both early gene expression and viral DNA replication. *Nucleic Acids Res.* 9:6231-6250.
204. Twigg, A.J., et D. Sherratt. (1980). Trans-complementable copy number mutants of plasmid ColE1. *Nature* 283:216-218.
205. Villareal, L.P., *ed.*, (1989). *Common mechanisms of transformation by small DNA tumor viruses.* American Society for Microbiology. Washington, U.S.A., 259p.
206. Virshup, D.M., M.G. Kauffman, et T.J. Kelly. (1989). Activation of SV40 DNA replication *in vitro* by cellular protein phosphatase 2A. *EMBO J.* 8:3891-3898.
207. Virshup, D.M., A.A.R. Russo, et T.J. Kelly. (1992). Mechanism of activation of simian virus 40 DNA replication by protein phosphatase 2A. *Mol. Cell. Biol.* 12:4883-4895.
208. Voelkel-Meiman, K., R.L. Keil, et G.S. Roeder. Recombination-stimulating sequences in yeast ribosomal DNA correspond to sequences regulating transcription by RNA polymerase I. *Cell* 48:1071-1079.
209. Waldman, A.S., et R.M. Liskay. (1988). Dependence of intrachromosomal recombination in mammalian cells on uninterrupted homology. *Mol. Cell. Biol.* 8:5350-5357.
210. Watt, F., et P.L. Molloy. (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* 2:1136-1143.

211. Weinberg, R.A. (1990). The retinoblastoma gene and cell growth control. *Trends Biochem. Sci.* **15**:199-202.
212. Wessel, R., J. Schweizer, et H. Stahl. (1992). Simian virus 40 T-antigen DNA helicase is a hexamer which form a binary complex during bidirectional unwinding from the viral origin of DNA replication. *J. Virol* **66**:804-815.
213. Whitman, M., C.P. Downes, M. Keeler, T. Keller, et L. Cantley. (1988). Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* **332**:644-646.
214. Whitman, M., D. Kaplan, T. Roberts, et L. Cantley. (1987). Evidence for two distinct phosphatidylinositol kinases in fibroblasts: implication for cellular regulation. *Biochem. J.* **247**:165-174.
215. Whitman, M., D.R. Kaplan, B. Schaffhausen, L. Cantley, et T.M. Roberts. (1985). Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature* **315**:239-242.
216. Williams, R.L., S.A. Courtneidge, et E.F. Wagner. (1988). Embryonic lethalties and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. *Cell* **52**:121-131.
217. Williams, R.L., W. Risau, H.-G. Zerwes, H. Drexler, A. Aguzzi, et E.F. Wagner. (1989). Endothelioma cells expressing the polyoma middle T oncogene induce hemangiomas by host cell recruitment. *Cell* **57**:1053-1063.
218. Wold, M.S., J.J. Li, et T.J. Kelly. (1987). Initiation of the simian virus 40 DNA replication *in vitro*: Large-tumor-antigen and origin-dependent unwinding of the template. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**:3643-3647.
219. Yang, S.-L., R.L. Lickteig, R. Estes, K. Rundell, G. Walter, et M.C. Mumby. (1991). Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Mol. Cell. Biol.* **11**:1988-1995.
220. Yunis, J.J. (1987). Multiple recurrent genomic rearrangements and fragile sites in human cancer. *Somatic Cell. Mol. Genet.* **25**:149-159.
221. Zinn, K., D. DiMaio, et T. Maniatis. (1983). Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human β -interferon gene. *Cell* **34**:865-879.
222. Zhu, Z., G.M. Veldman, A. Cowie, A. Carr, B. Schaffhausen, et R. Kamen. (1984). Construction and functional characterization of polyomavirus genomes that separately encode the three early proteins. *J. Virol.* **51**:170-180.