

Université de Sherbrooke

Résolution d'une molécule d'ADN hybride
virale-cellulaire dans des cellules de
mammifères: rôle de la protéine virale grand T

par

Alain Piché

Département de microbiologie

Thèse présentée à la Faculté de
médecine en vue de l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Juillet 1987

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord les Drs Pierre et Danielle Bourgaux pour m'avoir fourni l'opportunité de m'initier à la recherche fondamentale en m'accueillant dans leur laboratoire. Ma formation a grandement été facilitée grâce aux nombreuses idées, propositions et explications qu'ils m'ont fournies pendant ces trois années.

Je veux remercier également le Dr Louis Delbecchi pour toute l'aide technique qu'il m'a apportée et surtout pour le temps qu'il a bien voulu me consacré en me faisant partager une partie de son immense savoir.

Enfin je voudrais remercier tous les membres du laboratoire pour avoir bien voulu, à contrecœur parfois, m'endurer jour après jour pendant les trois ans que j'ai passé dans le laboratoire. Un merci spécial à Daniel Gendron, Danielle Frappier et Huy Vu à qui j'ai spécialement "cassé les pieds".

Evidemment je m'en voudrais si j'omettais de remercier Andrée Houle pour la frappe de ce mémoire mémorable.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	II
TABLE DES MATIERES	III
LISTE DES ILLUSTRATIONS	V
LISTE DES ABREVIATIONS	VII
SOMMAIRE	VIII
RESUME	X
INTRODUCTION	1
A. Recombinaison	1
B. Le virus du polyome	4
C. Organisation structurale et fonctionnelle du génome du polyome	5
D. Les antigènes T	6
E. Permissivité	10
F. Transformation cellulaire - La lignée Cyp	11
MATERIEL ET METHODES	20
I. Solutions et milieux	20
II. Cellules	21
III. Transfection	22
IV. Titrage de virus par formation de plages	24
V. Extraction et purification de l'ADN viral	24
VI. Enzymes de restriction et électrophorèse	25
VII. Transfert de l'ADN sur filtre de nitrocellulose	25
VIII. Préparation de sondes radioactives	26
IX. Isolement de fragments d'ADN spécifiques	26
X. Transformation bactérienne	27
XI. Amplification et extraction d'ADN plasmidique	27
XII. Recircularisation "in vitro"	28

RESULTATS	29
I. Réplication de RmI	29
II. Recombinaison générant Pl55 à partir de RmI	36
A. Analyse de la recombinaison par production de plages de lyse	36
B. Analyse de la recombinaison par la technique de Southern	42
III. Réciprocité de la recombinaison	46
A. Les séquences "ORI-LIKE" de INS ne permettent pas une amplification marquée	47
B. Mise en évidence de IR, deuxième produit de recombinaison, quand on lui insère une origine fonctionnelle	49
C. Effet de l'origine de SV40 sur la réplication de SV-RmI _c dans des cellules de souris	54
D. Recombinaison aberrante de SV-RmI _c dans des cellules de souris produisant un grand T de SV40 de façon constitutive	59
Annexe I	67
DISCUSSION	75
EXPERIENCES FUTURES	85
REFERENCES	87

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Tableau I:	Caractéristiques des différents types de recombinaison	2
Figure 1:	Organisation fonctionnelle du virus du polyome et du virus simien 40	7
Figure 2:	La lignée Cyp	15
Figure 3:	Carte physique détaillée de RmI et schéma d'excision à partir du génome intégré	17
Tableau II:	Propriétés des différentes lignées cellulaires	23
Figure 4:	Analyse de la réplication de RmI dans les 3T6	31
Figure 5:	Carte physique des plasmides recombinants utilisés dans les essais de production de plages de lyse	34
Figure 6:	Substrats pour l'analyse de la recombinaison	38
Tableau III:	Recombinaison dans RmI mesurée par la formation de plages de lyse après transfection de cellules 3T6 .	40
Figure 7:	Analyse de la réplication et de la recombinaison de RmI _c et pI-1	43

Figure 8:	Carte physique de SV-RmI _c et de ses produits de recombinaison attendus	50
Figure 9:	Analyse de la réplication et de la recombinaison de SV-RmI _c dans les cellules COS et 3T6	52
Figure 10:	Analyse de la réplication et de la recombinaison de SV-RmI _c dans les cellules SCOP-T et 3T6	56
Tableau IV:	Détermination par immunofluorescence du pourcentage de cellules exprimant la protéine VP1 après transfection .	58
Figure 11:	Analyse de la réplication et de la recombinaison de SV-RmI _c dans les cellules R1-4 et ORI-1	61
Tableau V:	Taux de réplication et de recombinaison obtenus avec RmI _c , pI-1 et SV-RmI _c après transfection dans les différents types de cellules	66
Figure 12:	Transcription relative de RmI _c , pI-1 et SV-RmI _c dans les cellules 3T6	73

LISTE DES ABREVIATIONS

- CPE: effet cytopathique
DEAE: diéthyl-amino-ethyl
DMEM: Dulbecco's modified eagle medium
EtBr: bromure d'éthidium
pb: paire de bases
PFU: "unité formant plaque"
PM: poids moléculaire
Py: virus du polyome
SV40: virus simien 40

SOMMAIRE

RmI est une molécule hybride contenant 1,03 copie du génome de polyome (mutant ts-P155) liée à une insertion d'ADN de souris de 1628 pb. Cette molécule est le résultat d'un événement de recombinaison site-spécifique entre les séquences virales du génome intégré et les séquences cellulaires de souris situées immédiatement à sa "gauche". Dans RmI, l'insertion cellulaire (Ins) interrompt la région tardive du génome de ts-P155 et est bordée par des répétitions virales directes de 182 pb. La région virale précoce est toutefois intacte. Parce que RmI est une molécule produite "naturellement" dans des cellules de souris, et à cause de sa structure qui rappelle celle des structures cointégrées, (intermédiaires transpositionnels chez les bactéries), nous nous sommes intéressés à la répllication et à la recombinaison de cette molécule lorsqu'elle existe sous forme épisomique dans la cellule. Dans ce but, nous avons introduit RmI par transfection dans diverses cellules de mammifères. Nous avons ainsi trouvé que RmI était répliqué efficacement dans la cellule de souris normales, mais que la répllication de la molécule clonée RmI était fortement inhibée par la présence de séquences plasmidiques.

Par recombinaison intramoléculaire entre les répétitions virales, RmI est capable de générer 2 molécules plus petites dont l'une est l'ADN de ts-P155. En utilisant des essais permettant de sélectionner ou non pour cette molécule infectieuse, nous avons montré que ts-P155 était produit à une fréquence relativement élevée dans la cellule de souris et que ce processus semblait favorisé quand la répllication de RmI était

restreinte, deux caractéristiques généralement absentes des événements de recombinaison homologue ou de recombinaison illégitime. De plus, en insérant l'origine de répllication du virus SV40 dans Ins, nous avons montré que la recombinaison était réciproque, c'est-à-dire capable de générer non pas un seul mais les deux produits attendus, l'ADN de ts-P155 d'une part, et Ins plus une répétition d'autre part. Ceci a pu être démontré après transfert de ce recombinant véhiculant l'origine de SV40 dans des cellules transformées fournissant de façon constitutive le grand T de polyome (cellules SCOP-T) ou celui de SV40 (cellules COS). Toutefois l'observation la plus intéressante est sans doute le fait que la résolution de RmI est entièrement dépendante de la présence d'une des protéines virales précoces codées par le génome de polyome, l'antigène grand T. Cette fonction peut cependant être remplacée par la fonction analogue chez SV40.

RESUME

RmI est une molécule hybride contenant 1,03 copie du génome du virus du polyome liée à une insertion cellulaire d'ADN de souris par des répétitions virales directes de 182 pb. Dans ce travail, nous avons examiné la recombinaison intramoléculaire de RmI en utilisant différents recombinants contenant cette molécule. Après transfection dans diverses lignées cellulaires, la recombinaison a été mise en évidence par la production de plages de lyse, ou directement par la méthode de Southern. Nous avons montré que des molécules de taille génomique étaient produites à une fréquence élevée dans des cellules de souris et qu'il s'agissait là d'un événement de recombinaison réciproque. Il semble que la présence de la protéine virale grand T soit nécessaire à cet événement de recombinaison.

INTRODUCTION

Depuis quelques années de nombreux travaux ont permis d'associer la recombinaison (réarrangements de séquences d'ADN) à des phénomènes d'un extrême intérêt en biologie moléculaire, comme les translocations chromosomiques ou le réarrangement des gènes des immunoglobulines. Malgré tous ces efforts, la plupart des connaissances que nous avons sur la recombinaison nous viennent d'études effectuées chez des organismes simples tels que les procaryotes. Dans ce travail nous avons voulu, en utilisant le génome d'un virus eucaryotique de petite taille, le virus du polyome, étudier la recombinaison chez des cellules de mammifères en culture.

A. Recombinaison

La recombinaison peut être définie comme un réarrangement de matériel génétique impliquant la brisure et la réunion d'ADN pour former de nouvelles jonctions. Ce processus intervient dans plusieurs phénomènes biologiques importants comme l'intégration et l'excision des rétrovirus, des papovavirus et du phage lambda, l'activation de certains oncogènes, le réarrangement des gènes des immunoglobulines et l'échange des chromatides soeurs pendant la méiose. On distingue 4 types de recombinaison dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau I.

TABLEAU I. Caractéristiques des différents types de recombinaison

Type de recombinaison	Homologie requise	Protéine RecA ou fonction similaire requise	Séquence spécifique reconnue par un ou des enzymes
Homologue	Oui	Oui	Non
Site-spécifique	Oui	Non	Oui
Transposition	Non	Non	Oui
Illégitime (ou non-homologue)	Non	Non	?

Tiré de Freifelder (1983).

Recombinaison homologue

Lorsque la recombinaison a lieu entre des séquences qui sont identiques ou presque identiques, on dit qu'elle est homologue. L'homologie s'étend en général sur plusieurs centaines de paires de bases. Ce type de recombinaison requiert la présence inconditionnelle d'une fonction codée par la cellule hôte. Chez E. coli ce rôle est rempli par le gène Rec A qui code pour la protéine du même nom. Comme la recombinaison homologue nécessite la présence de cette protéine, on dit qu'elle est Rec A-dépendante. La protéine Rec A intervient dans les premières étapes de la recombinaison pour l'appariement des molécules et elle ne fait intervenir aucune séquence spécifique sur l'ADN (Howard-Flanders et al., 1984). Une fonction analogue à la protéine Rec A vient d'être partiellement purifiée chez les cellules eucaryotes (Hsieh et al., 1986), laissant croire que le mécanisme de recombinaison homologue n'est pas tellement différent dans ces cellules.

Recombinaison site-spécifique

La recombinaison site-spécifique est distincte et indépendante de la recombinaison homologue. L'homologie présente près du site de recombinaison est relativement courte: 15 pb pour l'intégration du phage lambda (Nash, 1981), 34 pb pour le système cre-lox du phage P1 (Sternberg et Hamilton, 1981), 599 pb pour le plasmide 2 um de la levure (Broach et al., 1982). Comme son nom l'indique, la recombinaison site-spécifique fait intervenir une brisure à un endroit spécifique de l'ADN, endroit auquel a lieu l'échange entre les deux partenaires pour

la formation d'une nouvelle jonction. Les enzymes impliqués dans ce type de recombinaison sont des formes spécialisées de topoisomérases capables de reconnaître des séquences spécifiques d'ADN. De plus les gènes codant pour ces enzymes sont portés par la molécule intervenant dans la recombinaison et sont situés à proximité des séquences d'ADN impliquées. La recombinaison site-spécifique se distingue donc de la recombinaison homologue par les gènes qui la catalysent.

La transposition est étroitement apparentée à la recombinaison site-spécifique et possède des propriétés semblables.

Recombinaison non-homologue ou illégitime

Peu de choses sont connues sur la recombinaison non-homologue sinon qu'elle a lieu entre des séquences d'ADN n'ayant entre elles aucune homologie ou très peu. De plus la présence de la protéine Rec A ou d'une fonction similaire n'est pas nécessaire. Il a été démontré récemment, chez des cellules de mammifères, que lorsqu'on transfecte une molécule construite de façon à ce que les produits de recombinaison homologue ou non-homologue puissent être détectés, la recombinaison non-homologue se produit à une fréquence 2 à 3 fois plus élevée (Roth et Wilson, 1985).

B. Le virus du polyome

Le virus du polyome (Py) est un petit virus à ADN double-brin circulaire, découvert par Gross et al. en 1953 dans des extraits cellulaires de souris leucémiques. Sa taille réduite, sa structure

relativement simple, l'intérêt qu'il a suscité à cause de son pouvoir oncogénique (Gross, 1970) et l'établissement assez rapide d'un système de cellules permissives en culture (Stewart, 1960), ont fait de lui un des virus eucaryotiques les plus étudiés. Le polyome appartient à la famille des papovavirus. Il est structuralement et fonctionnellement très semblable au virus SV40. La séquence nucléotidique complète de ces 2 virus est d'ailleurs connue aujourd'hui (SV40, souche 776: Fiers et al., 1978; Reddy et al., 1978; Py, souche A2: Soeda et al., 1980; souches A3 et CSP: Rothwell et Folk, 1984). Tout au long de ce travail, la numérotation nucléotidique adoptée pour les molécules contenant des séquences Py est celle de Soeda et al. (1980).

C. Organisation structurale et fonctionnelle du génome du polyome

L'ADN extrait de Py se présente sous la forme d'un cercle covalent fermé enroulé en superhélice (forme I). Si on interrompt un lien phosphodiester sur l'un des brins, la superhélice est convertie en un cercle relaxé (forme II). Enfin l'introduction d'une coupure double-brin linéarise la molécule (forme III). La réplication du génome viral est initiée au niveau d'une séquence unique d'ADN et se poursuit de façon bidirectionnelle pour se terminer à un point situé à l'opposé sur la molécule. L'origine de réplication (Ori) se trouve dans la région non-codante du génome située entre les nucléotides (nt) 5003 et 173 (fig. 1). Plusieurs expériences de mutagénèse ont permis de définir dans cette région, outre l'origine de réplication, un certain nombre d'éléments de régulation essentiels pour la transcription et la réplication du virus (Dailey et Basilico, 1985; Katinka et Yaniv, 1983;

Muller et al., 1983; Tyndall et al., 1981; Veldman et al., 1985). Ces éléments fonctionnent tous en cis et ont pour rôle de stimuler la transcription et la réplication. Ces analyses ont également réduit considérablement les limites de l'origine pour les ramener entre les nt 5265 et 50. Plusieurs des caractéristiques des séquences présentes à l'origine de réplication chez Py se retrouvent aussi chez SV40 dans la région correspondante (nt 5202 à 34; Tooze, 1980).

Pendant un cycle lytique normal le génome est transcrit temporellement en 2 phases: la phase précoce et la phase tardive. La région précoce, désignée ainsi parce qu'elle est transcrite avant le début de la réplication virale, code pour au moins 3 protéines. Il s'agit des protéines petit T (22 K), moyen T (55 K) et grand T (90 K) (Ito et al., 1977). Cette région s'étend de 72 à 26 unités cartographiques (fig. 1). Après la réplication virale débute la transcription tardive dont les produits servent à la formation de la capside.

D. Les antigènes T

Aucune fonction précise n'a pu être associée, aussi bien in vitro qu'in vivo, à la protéine petit T. Néanmoins certaines observations montrent qu'elle pourrait jouer un rôle dans la transformation cellulaire (Asselin et al., 1984) ainsi que dans la formation de particules virales complètes pendant le cycle lytique (Garcea et al., 1984; Magnusson et al., 1984).

Figure 1. Organisation fonctionnelle du virus du polyome et du virus simien 40.

- 1 a. La carte physique de Py (souche A₂) est divisée en 100 unités cartographiques, le site EcoRI étant le point 0/100. L'origine de réplication, O_R (5292/0), est le point de départ de la numérotation en nucléotides. La portion codante de l'ADN et les protéines correspondantes sont indiquées par des flèches épaisses. Les numéros situés à l'intérieur de ces flèches représentent les coordonnées en nucléotides des différentes protéines. Les lignes en zigzag sont les parties épissées des ARNm. La position de certains sites de restriction est indiquée, avec entre parenthèses le nucléotide où a lieu la coupure. Les fragments HpaII (1 à 8) sont également représentés.
- 1 b. La carte physique de SV40 (souche 777) est aussi divisée en 100 unités cartographiques, le point 0/100 étant encore le site EcoRI. La légende est la même que pour la figure 1 a. Les fragments HincII/HindIII (A à M) sont représentés. Noter que la séquence nucléotidique progresse, contrairement au génome de Py, en sens inverse de la transcription précoce.

Tiré de Tooze (1980).

Les fonctions de la protéine moyen T sont beaucoup mieux connues. In vitro, moyen T possède une activité kinasique spécifique pour la tyrosine, propriété caractéristique des protéines jouant un rôle dans la transformation ou dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Griffin et Dilworth, 1983). In vivo, la protéine est suffisante à elle seule pour transformer une lignée cellulaire continue ainsi que l'a démontré l'introduction, dans des cellules de rat, d'un recombinant n'exprimant que le gène moyen T de Py (Treisman et al., 1981). Cette protéine n'existe pas chez SV40; sa région précoce ne code que pour 2 protéines connues: le petit T et le grand T.

Le grand T de SV40 a souvent été comparé au grand T de Py. Ces 2 protéines possèdent plusieurs caractéristiques communes. Ce sont des phosphoprotéines nucléaires de 700 à 800 acides aminés capables de se fixer à des régions discrètes de l'ADN viral situées dans la région régulatrice. Le grand T possède 3 sites de fixation mais 2 seulement seront considérés; un est situé près de l'origine (nt 30 à 70) et un autre placé près du bout 5' des ARN messagers précoces (nt 120 à 160) (Dilworth et al., 1984). Ces 2 sites de fixation, dont l'affinité est la plus grande pour le grand T, permettent de rendre compte des observations in vivo qui ont montré que cette protéine intervenait dans l'initiation de la répllication et la régulation de sa propre synthèse (Tooze, 1980). Le grand T de SV40 possède de façon similaire des sites de fixation dans les régions correspondantes (Jessel et al., 1976; Prives et al., 1980). Grand T est aussi impliqué dans la stimulation de la transcription tardive ainsi que dans celle de la synthèse de l'ADN cellulaire de l'hôte (Tooze, 1980). Les propriétés des 2 protéines

différent cependant dans la transformation. Le grand T de SV40 est capable à lui seul de transformer in vitro des cellules primaires alors que chez le Py, la transformation de telles cellules requiert la participation d'au moins 2 protéines: grand T et moyen T. Grand T altère les fonctions régulatrices de la cellule et est suffisant pour immortaliser des cellules primaires en culture (Rassoulzadegan et al., 1983). De plus cette protéine intervient dans l'intégration et l'excision du génome viral (Colantuoni et al., 1982; Della Valle et al., 1981; Miller et al., 1984).

La région tardive code aussi pour 3 protéines: VP1, VP2 et VP3. Les 3 protéines participent à la formation de la capside et ne semblent jouer aucun rôle dans la transformation.

E. Permissivité

Les cellules de souris sont totalement permissives pour le virus du Py, c'est-à-dire qu'après infection le génome est complètement transcrit et répliqué, des particules virales infectieuses sont produites et les cellules sont lysées. De la même façon les cellules de singe sont permissives pour le virus SV40. A l'opposé les cellules non-permissives ne répliquent pas l'ADN du virus; quelques génomes libres peuvent être transcrits mais de façon transitoire seulement. Eventuellement ces cellules intègrent l'ADN viral et deviennent transformées. Intermédiaires entre ces 2 extrêmes, il existe des cellules dites semi-permissives. Un faible pourcentage de ces cellules supportent la réplication du virus et sont lysées, les autres étant non-permissives.

La permissivité dépend principalement de 2 fonctions: l'une est apportée par la cellule hôte, l'autre est située dans la région régulatrice de l'ADN du virus ("enhancer"). Dandolo et al. (1983) ont trouvé que le Py n'était pas transcrit dans des cellules de carcinome embryonnaire de souris (cellules EC) mais que ce blocage pouvait être supprimé par des mutations dans la région "enhancer". De même, Sleight et Lockett (1985) ont montré qu'un gène placé sous le contrôle du promoteur précoce et des séquences "enhancer" de SV40 n'était pas transcrit dans des cellules EC mais qu'après induction de la différenciation par l'acide rétinoïque, les cellules devenaient permissives pour la transcription. Le modèle proposé pour expliquer ces résultats et certains autres suppose qu'un (ou plusieurs) facteur cellulaire spécifique pour certaines séquences d'ADN se fixe dans la région régulatrice ("enhancer") pour stimuler l'expression des gènes précoces (Sassone-Corsi et al., 1985; Schàoler et Gruss, 1985). En réalité le phénomène de permissivité est probablement plus complexe.

F. Transformation cellulaire - La lignée Cyp

Les mutants précoces de Py se sont montrés fort utiles pour définir les fonctions des gènes précoces de même que pour étudier la transformation cellulaire induite par le virus. Ceci est particulièrement vrai pour les mutations thermosensibles affectant le gène de grand T (mutants ts-a); tous ces mutants font partie du même groupe de complémentation et les mutations sont localisées dans la région C-terminale de la protéine grand T (Miller et Fried, 1976). A la température restrictive de 39°C, ces mutants sont incapables de se répliquer et de transformer (Eckhart 1969, 1974; Fried, 1965, 1970).

Dans le laboratoire, nous avons utilisé un mutant précoce, ts-P155, incapable de se répliquer à 39°C mais capable de transformer à cette température (Eckhart, 1969, 1974).

La mutation de ts-P155 d'abord localisée entre 14,2 et 26,7 unités cartographiques (Galup et al., 1984) vient d'être située précisément au nt 2658 (D. Gendron et P. Bourgaux, manuscrit en préparation). Il s'agit donc d'une mutation ponctuelle. Des cellules embryonnaires de souris ont été transformées à 39°C avec ts-P155. La lignée de cellules transformées isolées a été appelée Cyp (Bourgaux et al., 1978). Les cellules Cyp présentent deux caractéristiques intéressantes: d'une part, il s'agit d'un système inductible où un cycle viral lytique peut être déclenché dans une grande majorité des cellules par transfert à 33°C et d'autre part, c'est un des rares exemples de transformation de cellules permissives par Py. A partir de cette lignée différents clones ont été isolés et certains analysés plus en détails (C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃). Pour chacun de ces quatre clones une carte de restriction des génomes intégrés a été construite. Dans tous les cas l'ADN proviral est intégré sous forme de tandem partiel, plus ou moins long selon le clone considéré (Chartrand et al., 1981). Lorsqu'on transfère les cellules Cyp à la température permissive de 33°C, l'ADN viral intégré est excisé, présumément par recombinaison homologue (Lania et al., 1982), puis amplifié sous forme de molécules circulaires de taille génomique qui sont encapsidées dans des particules infectieuses (Bourgaux et al., 1978). La quantité de ts-P155 produite dans les cellules après transfert à 33°C varie d'un clone à l'autre (Delbecchi et al., 1981) et semble indépendante de la longueur des séquences homologues qui existent dans les génomes intégrés.

Les quatre clones cités ont été sous-clonés pour donner naissance à des cellules ayant des propriétés identiques à celles de leurs parents (fig. 2). Cependant un des sous-clones isolés, C12/a1, produit après induction, en plus des molécules de ts-P155, une molécule de poids moléculaire plus élevé appelée RmI (Sylla et al., 1980). RmI et ts-P155 sont produits dans des proportions de 20:1 dans le sous-clone C12/a1.

La structure de RmI se présente de la façon suivante: elle contient une insertion cellulaire d'ADN de souris (Ins) de 1628 pb bordée par une répétition virale directe de 182 pb (nt 3092 à 3273). Ins est terminée par une répétition inversée imparfaite de 7 pb et interrompt la région virale tardive codant pour la protéine VP1. La région précoce de RmI est toutefois intacte (Bourgaux et al., 1982; voir fig. 3a).

De par sa structure RmI présente plusieurs analogies intéressantes avec d'autres molécules produites naturellement dans certains organismes, telles que le plasmide 2 um chez les levures (Broach et al., 1982) et les structures cointégrées chez les bactéries (Carlos et Miller, 1980). Ces molécules interviennent dans des événements de recombinaison site-spécifique chez leur hôte naturel. Il a été démontré récemment que RmI est excisé du génome de souris via justement un événement de recombinaison site-spécifique (Sylla et al., 1984). Le schéma d'excision proposé pour RmI et P155 dans le sous-clone C12/a1 est présenté à la fig. 3b. Comme on peut le voir RmI est excisé par recombinaison site-spécifique alors que P155 est plutôt excisé par recombinaison homologue. Il est toutefois possible d'envisager une autre voie que celle de l'excision directe à partir du génome intégré pour la

production de P155. En effet, grâce aux répétitions virales qu'il contient, RmI pourrait subir un événement de recombinaison intramoléculaire pour générer P155. Cet événement pourrait rendre compte en partie ou en totalité de la présence minoritaire de P155 dans le sous-clone C12/a1. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai introduit RmI directement dans des cellules de souris et suivi l'apparition de l'ADN de P155, apparition liée donc à une recombinaison intramoléculaire dans RmI.

Ceci nous a permis de mettre en évidence certaines propriétés du processus de recombinaison générant P155 qui se distinguent nettement de ce qui a déjà été observé par d'autres avec des constructions semblables dans des systèmes analogues.

Figure 2. La lignée Cyp

Une culture de cellules embryonnaires de souris a été transformée par un mutant thermosensible du virus du polyome, ts-P155, pour donner naissance à la lignée Cyp. Après plusieurs passages, les cellules transformées ont été clonées, chaque clone produisant de l'ADN ts-P155 après transfert à 33°C. Le clone C12 a été à son tour cloné, donnant naissance au sous-clone C12/a1 qui produit en plus de P155 une molécule hybride appelée RmI. Tous les clones de la troisième génération, issus du sous-clone C12/a1, produisent RmI et P155, sauf le clone S48 qui produit en plus une molécule appelée RmII.

FIGURE 2

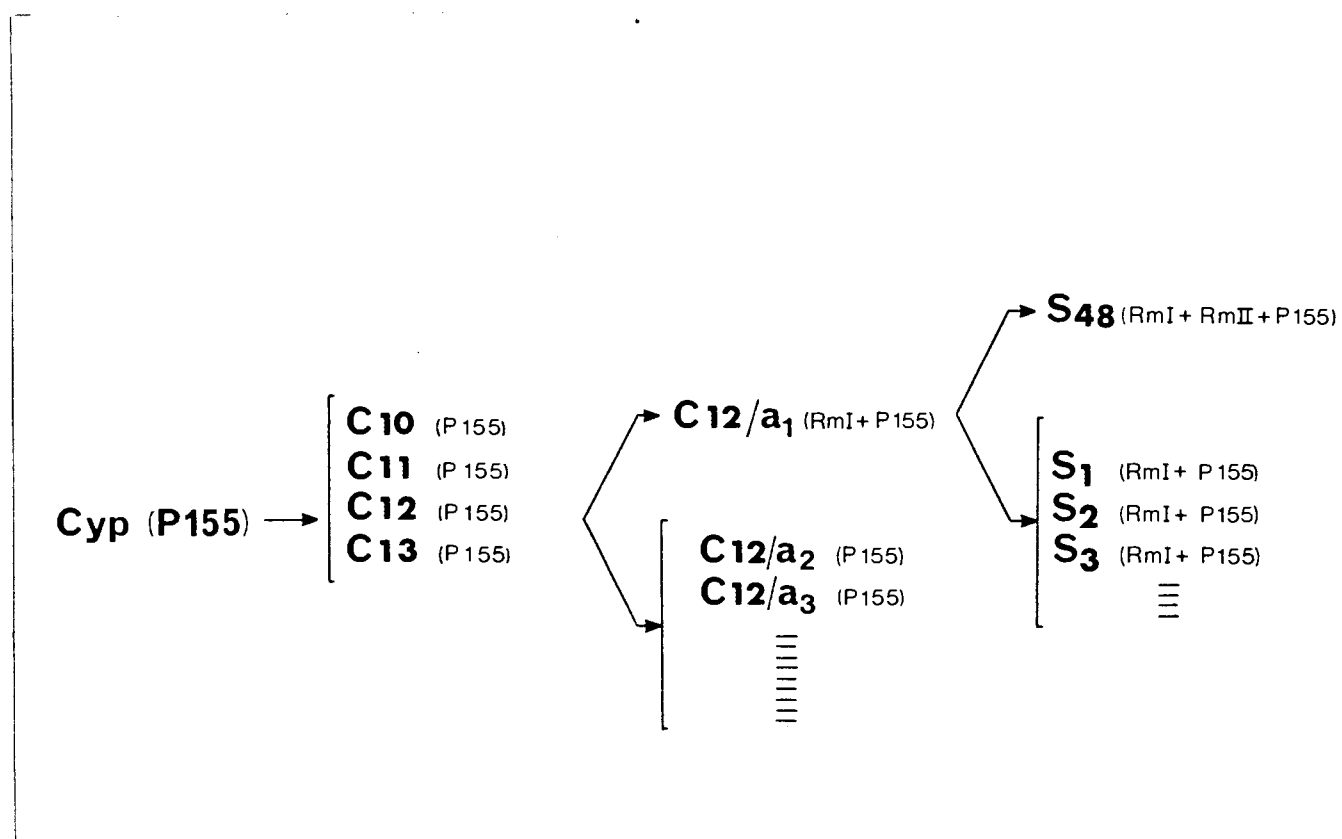
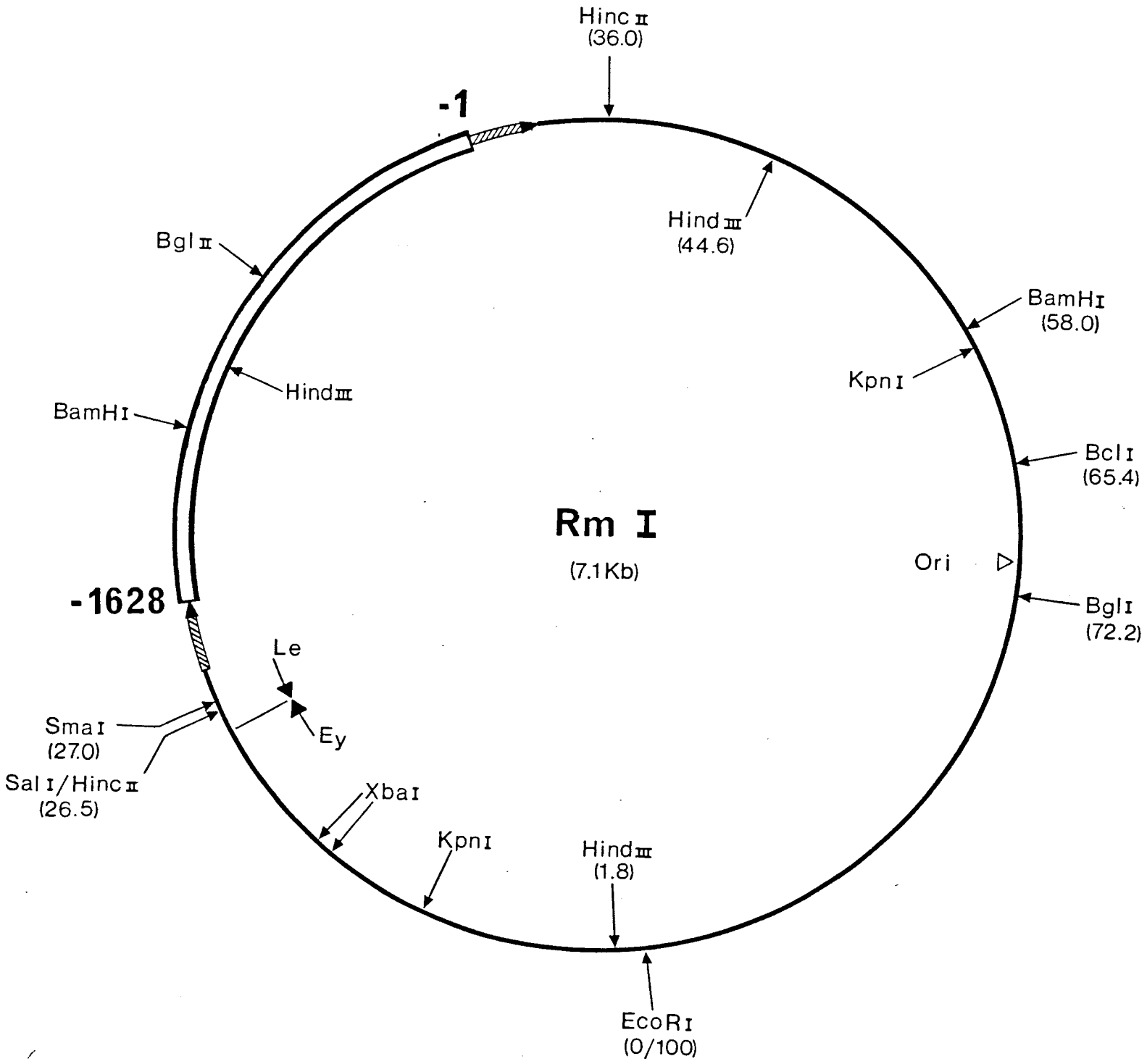


Figure 3. Carte physique détaillée de RmI et son schéma d'excision à partir du génome intégré.

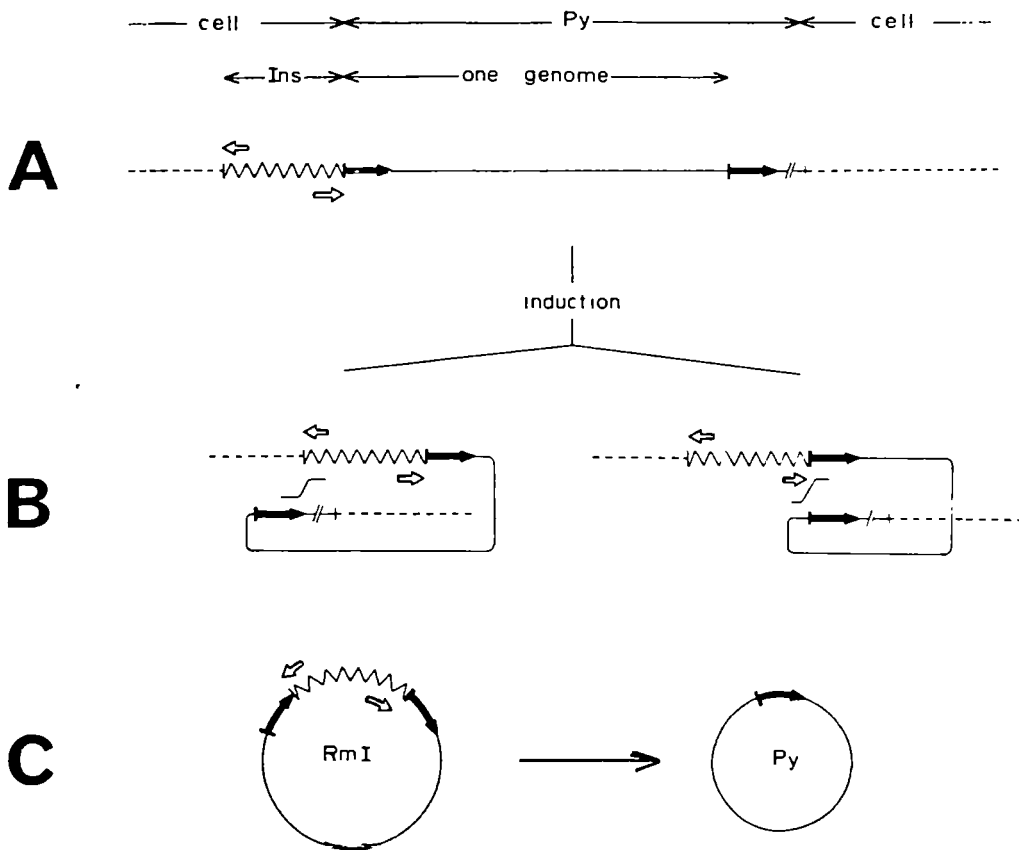
- 3a. Différents sites de restriction sont distribués le long de la carte avec, pour les sites viraux, leur position en unités cartographiques. La position de l'origine de réplication est indiquée par Ori. Le génome de ts-P155 est représenté par un trait noir fin, les répétitions virales par une flèche hachurée et l'insertion cellulaire (Ins) par un double trait. Les nucléotides de Ins sont numérotés de -1 à -1628. La jonction entre les parties virales précoce et tardive est indiquée près du site SalI à 26.5. Ins interrompt la région tardive à la position 30 environ. RmI possède une région précoce complète.
- 3b. Schéma d'excision de RmI et Py dans les Cl2/a1. (A) L'intégration du génome viral s'est fait à un seul site dans le chromosome. La partie du chromosome correspondant à Ins est indiquée en zigzag. Les flèches noires indiquent la répétition virale de 182 pb. Les flèches blanches représentent une répétition inversée imparfaite dans l'ADN de souris. (B) Lors de l'induction à 33°C, l'ADN viral se recombine avec l'ADN de souris via un événement de recombinaison site-spécifique; ou l'ADN viral se recombine avec une partie du génome viral qui lui est homologue pour former P155. (C) Les produits d'excision: RmI et P155 sont produits dans une proportion de 20:1. RmI pourrait aussi directement par recombinaison intramoléculaire générer P155.

FIGURE 3

a.



b.



MATERIEL ET METHODES

I. Solutions et milieux

Le milieu DMEM pour la culture des cellules ainsi que les solutions de fungizone (2.5 ug/ml), antibiotiques (pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 ug/ml), le PBS A et le Tris-salin ont été préparés par le laboratoire de culture de tissus.

Tampon E

Tris-HCl	40 mM
Acétate de sodium	5 mM
EDTA	1 mM

Le pH de la solution est ajusté à 7,9 avec de l'acide acétique glacial.

SSC 20X

NaCl	3 M
Citrate de sodium	0.3 M

Denhardt 10X

Serum albumine bovine (BSA)	1 gr.
Ficoll	1 gr.
Polyvinylpyrrolidone	1 gr.
SSC 20X	150 ml
Complété à 1 litre avec H ₂ O bidistillée	

Milieu L.B. (Luria-Bertani)

Bacto-Tryptone (Difco)	10 gr.
Extrait de levure (Difco)	5 gr.
NaCl	10 gr.

Complété à 1 litre avec H₂O bidistillée

II. Cellules

Les conditions de culture des cellules Cyp ont déjà été décrites (Bourgaux et al., 1978).

La lignée SCOP-T (lignée cellulaire de souris dérivée des C127, transformée par un recombinant contenant le fragment HaeII-A du génome de Py sous la dépendance du promoteur précoce de SV40) nous a été donnée par le Dr Nicolas Glaichenhaus (Rautman et al., 1982). Les cellules COS (lignée de cellules de singe dérivée des CV-1, transformée par un mutant ori⁻ de SV40, lequel code pour un grand T sauvage) nous ont été fournies par le Dr Joseph Weber (Gluzman, 1981). Les lignées R1-4 et ORI-1 (lignées de souris dérivées des NIH 3T3 et transformées, respectivement, par un plasmide contenant le génome entier de SV40 et par un mutant ori⁻ de ce virus) nous ont été données par le Dr Suzie Chen (Chen et al., 1983).

Toutes ces lignées ainsi que les cellules 3T6 et les NIH 3T3 ont été cultivées à 37°C dans du DMEM contenant 10% de sérum foetal de veau (FBS), en présence de 10% CO₂.

Les principales propriétés de ces cellules sont résumées dans le Tableau I.

III. Transfection

L'ADN a été introduit dans les cellules eucaryotes en utilisant le DEAE-Dextran (PM 500,000, Pharmacia Fine Chemicals), selon la méthode décrite par Sussman et Milman (1984).

Chaque pétri (diamètre 100 mm) a étéensemencé avec 2×10^6 cellules, et 1 ug d'ADN dans une solution de DEAE-Dextran 500 ug/ml a été ajouté le jour suivant. Les pétris ont été ensuite incubés à 33°C, d'abord pendant 1 heure dans 2% CO₂, puis pendant 3 heures dans 10% CO₂. Après cette période, 1 ml d'une solution de 10% diméthyl sulfoxide a été placée sur les cellules durant 2 minutes. Après 2 lavages avec du PBS A, les cellules ont été incubées à 33°C ou 39°C, dans 10% CO₂, en présence de 10% FBS.

Pour le titrage du virus par formation de plages, les transfections ont été faites sur une couche monocellulaire (pétris de 60 mm) à 70% confluence.

TABLEAU II
Propriétés des différentes lignées cellulaires

Lignées cellulaires	Permissivité	Grand T codé par le génome intégré et exprimé de façon constitutive par les cellules
SCOP-T ^a	Py	Py
COS ^b	SV-40	SV-40
R1-4	Py	SV-40
ORI-1	Py	SV-40
3T6	Py	-
NIH 3T3	Py	-

a: La présence de la protéine grand T dans ces cellules a été démontrée par immunofluorescence (J. Guérin, communication personnelle).

b: L'introduction dans les cellules COS, par transfection au DEAE-Dextran du fragment PstI-1 du génome de SV40 a permis de montrer que ces cellules pouvaient supporter la réplication d'une molécule d'ADN viral incapable de coder pour un grand T (résultats non montrés).

IV. Titration de virus par formation de plages

Dix-huit heures après transfection, les cellules ont été recouvertes d'une couche d'agar 0,9% dans du DMEM contenant 2% de sérum de cheval, puis incubées pendant 3 semaines à 33°C. Les plages ont été visualisées par coloration au rouge neutre (Dulbecco et Freeman, 1959).

Dans certains cas, les plages ont été transférées sur filtre de nitrocellulose (Villareal et Berg, 1977) afin d'être hybridées avec une sonde radioactive appropriée. Dans d'autres cas, les plages ont été prélevées à l'aide d'une pipette pasteur stérile dans 0,5 ml de Tris-salin et les virus extraits par 3 congélations-décongélations successives. 0,25 ml ont été utilisés pour infecter une couche monocellulaire de cellules 3T6 légèrement sous-confluente (pétris 100 mm). Après apparition d'un CPE, les virus ont été extraits des débris cellulaires et titrés par hémagglutination (Crawford et al., 1962).

V. Extraction et purification de l'ADN viral

A différents temps après transfection (voir légende des figures 4, 7, 9, 10, 11 et 12), l'ADN de petit poids moléculaire a été récolté selon la méthode de Hirt (1967), puis déprotéinisé par 2 extractions au phénol saturé avec du Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 et une extraction au chloroform-isoamyl-alcool. L'ADN a été ensuite précipité avec un égal volume d'isopropanol et resuspendu dans un tampon Tris-HCl pH 7,4 10 mM, EDTA 1 mM (TE).

VI. Enzymes de restriction et électrophorèse

Tous les enzymes ont été utilisés selon les recommandations du fabricant (Boehringer, Amersham ou BRL). Les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8% - 1,5%) en tampon E, dans des appareils verticaux (14 X 18 X 0,3 cm) ou horizontaux (20 X 15 X 0,5 cm). Après électrophorèse, les gels ont été colorés dans une solution d'ETBr (2 ug/ml) pendant environ 15 minutes et photographiés sous lumière ultraviolette (254 nm) avec une caméra polaroid.

VII. Transfert de l'ADN sur filtre de nitrocellulose

La méthode de transfert sur filtre de nitrocellulose (BA 85, Schleicher ans Schuell) utilisée a été essentiellement celle décrite par Southern (1975).

Les conditions d'hybridation, de préhybridation et de lavage ont été celles décrites par van der Ploeg et Flavell (1980), avec les modifications apportées par Chartrand et al. (1981).

Après séchage à 37°C, les filtres ont été autoradiographiés à -80°C sur film Kodak XRP-1 en présence d'un écran intensifiant (Cronex Par Speed, Dupont).

VIII. Préparation de sondes radioactives

La présence de l'ADN sur filtre de nitrocellulose a été mise en évidence grâce à l'hybridation avec des sondes radioactives spécifiques. Ces sondes ont été préparées selon la méthode décrite par Maniatis (1975) avec les modifications suivantes: 0,1 ug d'ADN a été mis en présence de 50 uCi de 2 [α -P³²] NTP (\sim 3000 Ci/m mole, Amersham), de 25 uM des 2 autres NTP froids et de 5 unités de la DNA polymérase I de E. coli (enzyme de Kornberg, Boehringer Mannheim). Après 90 minutes à 18°C, la réaction a été arrêtée par addition d'EDTA et l'ADN précipité avec 2 volumes d'éthanol. L'ADN a ensuite été resuspendu dans du TE et la radioactivité comptée. L'activité spécifique des sondes obtenues variait généralement entre $2,5 \times 10^8$ et 7×10^8 cpm/ug.

IX. Isolement de fragments d'ADN spécifiques

Après traitement de l'ADN par l'enzyme de restriction approprié, électrophorèse sur gel et coloration à l'ETBr, la tranche d'agarose contenant le fragment voulu a été découpée à l'aide d'une lame de scalpel. L'ADN a été ensuite électrolué selon la méthode de Chouick et al., 1979. Après électrolution, l'ADN a été extrait au phénol, à l'éther et précipité à l'éthanol.

X. Transformation bactérienne

Cinq à cent ng d'ADN ont été utilisés pour transformer des bactéries E. coli (HB 101 ou DH:1) rendues compétentes soit par la méthode de Mendel et Higa (1970), soit par celle de Hanahan (1982). Après transformation et sélection sur milieu approprié, les clones isolés ont été maintenus dans une solution de L.B. contenant 0,1% de glucose et l'antibiotique de sélection approprié. Les plasmides contenus dans ces bactéries ont été extraits selon la méthode décrite par Birboin (1983) et caractérisés par traitement avec des enzymes de restriction.

Les bactéries recombinantes recherchées ont été purifiées de façon plus poussée (voir section suivante).

XI. Amplification et extraction d'ADN plasmidique

Dix ml d'une culture de bactéries contenant le plasmide désiré ont été utilisés pour ensemercer 1 litre de milieu L.B. Lorsque la D.O. a atteint 0,6 à 550 nm, 12,5 mg de chloramphénicol ont été ajoutés et l'incubation s'est poursuivie pendant 18 heures. L'ADN plasmidique a été ensuite extrait et purifié selon la méthode de Guerry et al. (1973).

XII. Recircularisation "in vitro"

Dix ug de l'ADN du recombinant voulu ont été digérés par l'enzyme approprié permettant d'exciser les séquences plasmidiques, puis déprotéinisés grâce à 2 extractions au phénol et précipités à l'éthanol. L'ADN a ensuite été resuspendu et traité dans 300 ul d'une solution contenant 0,6 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothréitol, 20 mM Tris-HCl pH 8 et 25 unités de T4 DNA ligase (Amersham), à 16°C pendant une nuit. Après ligation, l'ADN a été précipité à l'éthanol puis resuspendu dans du TE.

RESULTATS

A cause de ses caractéristiques particulières, RmI représente un substrat plus qu'intéressant pour étudier les mécanismes de recombinaison dans les cellules eucaryotes. Dans ce but, nous avons introduit cette molécule par transfection dans des cellules eucaryotes, puis analysé sous certaines conditions les événements de recombinaison dont elle pouvait être le siège. Cette démarche n'est toutefois réalisable que si l'on a d'abord sommairement précisé les caractéristiques importantes d'un autre phénomène dont le déroulement, par le choix même des procédures expérimentales, est étroitement lié à l'étude de la recombinaison: ce phénomène est la réplication de l'ADN. En effet les expériences in vivo décrites plus loin nécessitent, à un moment ou à un autre, la réplication du substrat et des éventuels produits de recombinaison.

I. Réplication de RmI

Différentes molécules ont été utilisées pour étudier la réplication. R6-1 est un recombinant dans lequel RmI, coupé par SallI, a été introduit au site SallI de pBR322; pB₁-20 est un recombinant dans lequel RmI est cloné au site SallI de pAT 153 (figure 5). Nous avons aussi utilisé une molécule appelée RmI_c, produite après traitement de pB₁-20 par SallI et recircularisation in vitro de la molécule RmI obtenue (Matériel et Méthodes, section XII), et enfin RmI_c sous forme linéaire, après digestion de pB₁-20 par SallI sans recircularisation.

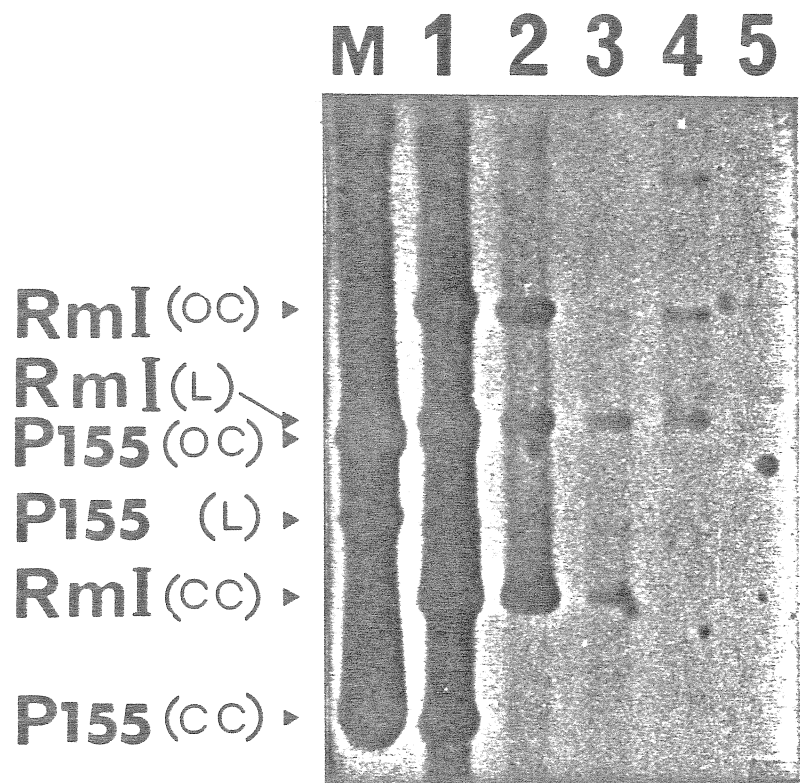
Il a été montré dans l'Introduction que RmI et p155, après excision, s'accumulaient à 33°C dans les cellules C12/a1 (Sylla et al., 1980). Chacun de ces épisomes est autonome pour sa propre réplication. Nous avons donc utilisé une préparation purifiée de cet ADN extrait des C12/a1 en guise de témoin positif, ainsi que les substrats décrits plus haut, pour transfecter, en présence de DEAE-Dextran, des cellules de souris 3T6 à 33°C (figure 4). A différents moments après transfection, l'ADN de petit poids moléculaire a été extrait et placé sur gel d'agarose. Après électrophorèse, l'ADN a été transféré sur filtre, puis hybridé avec une sonde virale radioactive.

Dans cette analyse illustrée à la figure 4, RmI_C a montré une accumulation d'ADN comparable à celle du témoin positif RmI provenant d'une préparation de C12/a1 et une accumulation nettement supérieure aux autres molécules transfectées. Il est important de noter que la présence de séquences plasmidiques liées physiquement à RmI inhibe fortement la réplication de cette molécule (pistes 4 et 5). Un effet semblable des séquences procaryotiques sur la réplication de molécules d'origine eucaryotique a déjà été rapporté par Luska et Botchan (1981). Le fait de linéariser la molécule avant sa transfection semble aussi avoir une action négative sur l'accumulation de l'ADN (piste 3). Cet effet reflète probablement l'inefficacité de la machinerie enzymatique cellulaire à joindre les bouts cohésifs produits par coupure avec Sall (Mertz et Davis, 1972; Miller et Temin, 1983).

Figure 4. Analyse de la réplication de RmI dans les 3T6.

Différentes préparations contenant RmI ont été transfectées dans des cellules 3T6 et l'ADN de petit poids moléculaire a été extrait 5 jours plus tard. Après électrophorèse sur gel d'agarose 1% l'ADN a été transféré sur filtre et hybridé avec une sonde virale. Piste 1: ADN provenant d'une préparation de Cl2/a1, piste 2: RmI_c, piste 3: pB₁-20 traité par Sal I (RmI_c linéaire), piste 4: pB₁-20 non traité (RmI lié à pAT 153), piste 5: R6-1 non traité (RmI lié à pBR322). M (marqueur): ADN purifié à partir des Cl2/a1 induite à 33°C. La position des formes I(CC), II(OC) et III(L) de RmI et P155 est indiquée.

FIGURE 4



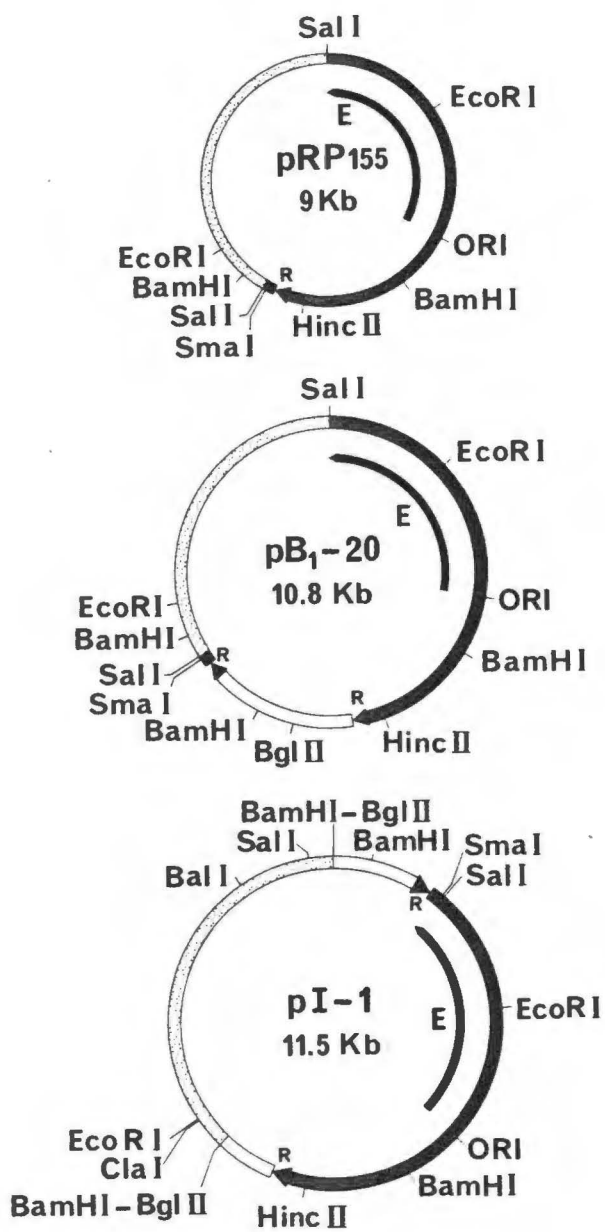
La position et l'intensité relative des bandes montrées à la figure 4 demeurent les mêmes après traitement de l'ADN par DpnI juste avant de le mettre sur gel (résultats non montrés). DpnI est un enzyme qui coupe l'ADN à la séquence GATC uniquement si le A est méthylé, ce qui est le cas dans les recombinants utilisés pour la transfection. Comme la cellule eucaryote ne possède pas cette méthylase, la quantité d'ADN échappant à l'action de DpnI est une mesure directe du taux de réplication dans les cellules transfectées (Peden et al., 1980).

Ajoutons enfin que si l'on extrait l'ADN de petit poids moléculaire 18 heures après transfection, on ne détecte que les formes relaxées et linéaires. Au fur et à mesure que le temps augmente, l'ADN est converti sous forme de superhélice et repliqué progressivement pour atteindre un maximum d'accumulation qui se situe entre 3 et 4 jours. La quantité d'ADN en superhélice est aussi en fait une mesure du taux de réplication et l'on voit que cette forme n'est pas détectable dans les pistes 4 et 5 (RmI lié à des séquences plasmidiques). Ensuite l'intensité des bandes décroît graduellement pour devenir difficilement détectable après 9 jours (résultats non montrés). Ces observations sont en accord avec celles faites précédemment par d'autres auteurs (Cereghini et Yaniv, 1984).

Figure 5. Carte physique des plasmides recombinants utilisés dans les essais de production de plages de lyse.

pB₁-20 contient RmI cloné au site SalI de pAT153 et pRP155, l'ADN d'un révertant de ts-P155 (Delbecchi et al., 1981) inséré également au site SalI de pAT153. Pour construire pI-1, RmI a été linéarisé au site BglII puis lié à pBR322 coupé au site BamHI (Sylla et al., 1984). Le vecteur plasmidique est indiqué en pointillés. Les séquences virales sont en noir et l'insertion cellulaire en blanc. Les répétitions virales de 182 bp sont indiquées par des têtes de flèche noires. L'origine de répllication virale (ORI) et différents sites de restriction cités dans le texte sont montrés, ainsi que la région codant pour les gènes précoces (E). Noter que tous ces vecteurs possèdent une région virale précoce intacte.

FIGURE 5



II. Recombinaison générant P155 à partir de RmI

A. Analyse de la recombinaison par production de plages de lyse.

RmI ne peut être encapsidé, vraisemblablement à cause de sa trop grande taille (Sylla et al., 1980); sa capacité à produire des plages dépendra donc uniquement de la fréquence des événements de recombinaison qui permettront de générer une molécule de taille génomique infectieuse.

Deux substrats, RmI_c (provenant de pBl-20, voir section précédente) et pI-1 (figure 5), ont été utilisés dans ces expériences. De par leur structure, ces 2 molécules sont potentiellement capables de générer par recombinaison intramoléculaire un génome viral infectieux grâce à leurs répétitions de 182 pb (figure 6). De fait, après introduction dans des cellules 3T6, les 2 molécules se sont montrées infectieuses comme le démontre leur capacité à produire des plages de lyse (tableau III).

Deux processus sont à considérer ici, ainsi que nous l'avons mentionné en début de chapitre: la recombinaison elle-même, et la réplication des molécules d'ADN. La deuxième est fortement inhibée par la présence de séquences procaryotiques liées à l'ADN eucaryote, comme nous l'avons vu dans la section précédente et comme le confirment les résultats du tableau III concernant le plasmide pR-P155 (figure 5), non traité ou traité par SalI puis

recircularisé. L'ADN de ts-P155 éventuellement produit par recombinaison dans RmI ne devrait pas être handicapé à ce niveau-là (légende figure 6), et le fait que RmI_C et pI-1 possèdent des infectivités relatives assez élevées indique que les séquences plasmidiques, qu'elles soient liées physiquement à RmI (pI-1) ou simplement présentes dans la préparation d'ADN utilisée (RmI_C), ont peu ou pas d'effet sur la recombinaison proprement dite. Kovar et Wintersberger (1985) avaient déjà montré que la présence de séquences plasmidiques dans la préparation d'ADN employée n'a aucune influence sur l'efficacité de transfection ou sur la fréquence de recombinaison. Il faut souligner enfin que pB₁-20, sans traitement, est incapable de générer une molécule infectieuse à moins de faire intervenir 2 événements de recombinaison (voir figure 5), ce qui explique sa très faible infectivité relative.

Le recombinant pI-1 a une infectivité relative environ 4 fois plus forte que RmI_C, alors que les 2 molécules possèdent la même longueur d'homologie intramoléculaire (182 pb). La signification de ce résultat sera analysée dans la section suivante.

La longueur minimale de l'homologie nécessaire à la recombinaison homologue n'a pu être établie de façon exacte à cause des variations observées d'un système à l'autre (Rubnitz and Subramani, 1984; Singer et al., 1982; Watt et al., 1985). Certains résultats indiquent néanmoins que, chez les eucaryotes, 200 pb d'homologie constitue un seuil critique en-dessous duquel la

Figure 6. Substrats pour l'analyse de la recombinaison.

A gauche: RmI_c , formé après digestion de pB_1-20 par $Sal I$ et recircularisation in vitro, se réplique efficacement dans les cellules de souris (Rep:++). La recombinaison dans RmI_c peut donner naissance à une molécule de taille génomique infectieuse (P155), se répliquant efficacement elle aussi dans les cellules de souris (Rep:++), et à une autre molécule, IR, contenant l'une des répétitions virales plus la totalité de l'insertion cellulaire, qui ne devrait pas être amplifiée dans des cellules de souris (Rep:-). A droite: $pI-1$, par recombinaison, peut générer 2 molécules, P155 et une autre, pIR , qui est incapable de s'amplifier (Rep:-).

FIGURE 6

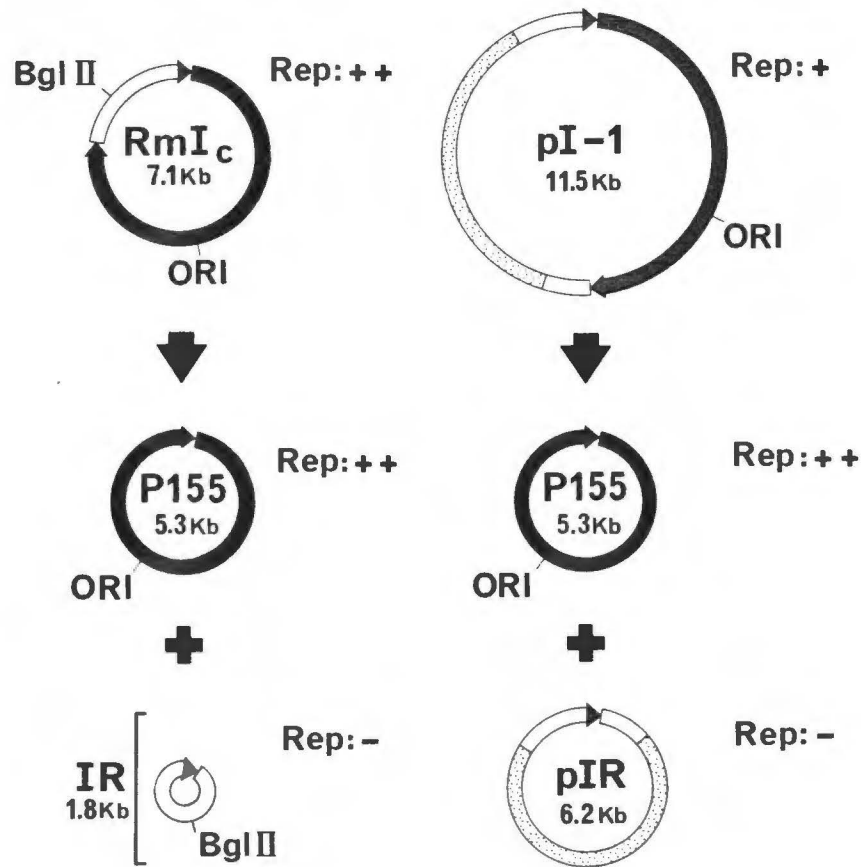


TABLEAU III. Recombinaison dans RmI mesurée par la formation de plages de lyse après transfection de cellules 3T6

Molécule d'ADN transfectée	Traitement par enzyme de restriction avant transfection	Infectivité relative ^a
pR-p155	Aucun	<1
pR-p155 + SalI + ligase ^b	Aucun	100
pB ₁ -20	Aucun	<1
pB ₁ -20 + SalI + ligase (RmI _c) ^b	Aucun	10
pB ₁ -20 + SalI + ligase (RmI _c) ^b	BglII	20
pB ₁ -20 + SalI + ligase (RmI _c) ^b	SmaI	1
pI-1	Aucun	42
pI-1	BalI	21
pI-1	ClaI	31
pI-1	BalI + ClaI	15
pI-1	SmaI	1

a: L'infectivité relative d'une molécule donnée est le rapport de son infectivité à celle du témoin positif, pR-P155 + SalI + ligase, multiplié par 100. 3 expériences indépendantes ont été faites pour chaque molécule. Dans chaque cas, 3 séries de 3 pétris ont été transfectées avec 0,01, 0,1 et 1 ug d'ADN, respectivement. Le nombre de plages obtenues a été porté sur un graphique en fonction de la quantité d'ADN et l'infectivité (PFU/ug) a été extrapolée à partir des courbes obtenues. Puisque chaque droite avait une pente semblable, les données peuvent être comparées entre elles.

b: L'efficacité de la recircularisation variait entre 70% et 80% d'après estimation par électrophorèse sur gel d'agarose.

fréquence de recombinaison diminue rapidement en fonction de la longueur de l'homologie (Rubnitz et Subramani, 1984). Par exemple la fréquence diminue de 0,306% à 0,027% lorsque l'homologie passe de 243 pb à 163 pb. Même si ces mesures ont été réalisées dans un système différent (SV40 et cellules de singe), les valeurs obtenues pour RmI_C et pI-1 sont nettement plus élevées (plus de 100 fois pour pI-1), pour une homologie comparable à celles utilisées par Rubnitz et Subramani), et pourraient bien refléter l'action d'un mécanisme de recombinaison différent de celui de la recombinaison homologue.

Plusieurs auteurs, notamment Lin et al (1984), ont récemment rapporté une augmentation de 10 à 100 fois de la fréquence de recombinaison homologue lorsque le substrat subit une coupure double-brin entre les 2 régions d'homologie. Le mécanisme par lequel une telle coupure stimule la recombinaison n'est pas tout à fait clair même si plusieurs modèles ont été proposés (Lin et al., 1984; Szostak et al., 1983). Cette stimulation a aussi été observée pour la recombinaison non-homologue (Roth et Wilson, 1985). Dans l'espoir de préciser le mécanisme de recombinaison dans lequel RmI_C et pI-1 sont impliqués, nous avons fait une coupure double-brin soit entre les 2 régions d'homologie soit à l'extérieur de celles-ci, et nous avons mesuré, d'après la production de virus infectieux, l'influence de ces coupures sur la fréquence de recombinaison (tableau III). Tout d'abord le traitement de pI-1 ou RmI_C par SmaI, lequel interrompt la région virale tardive codant pour la protéine de capsid VP1, réduit

fortement l'infectivité relative de ces molécules, ce qui n'est pas surprenant. Cependant le traitement de RmI_C par $BglII$, un enzyme qui coupe entre les 2 régions d'homologie, a peu d'effet sur la fréquence de recombinaison. Le même phénomène est observé si l'on traite $pI-1$ par $ClaI$ et $BalI$, 2 enzymes qui coupent aussi entre les régions d'homologie (figure 5 et tableau III). Si l'on considère ces résultats, de même que les précédents, il n'est pas exclu de penser que ces molécules soient réarrangées pour donner un ADN de taille génomique selon une voie différente de la recombinaison homologue.

Il est donc moins étonnant que RmI_C et $pI-1$, même s'ils possèdent tous deux une répétition virale de 182 pb, aient des infectivités relatives différentes (tableau III), des facteurs autres que la simple homologie de séquence intervenant sans doute dans le mécanisme mis en jeu, que ce soit pour l'une ou l'autre molécule, les fréquences de recombinaison mesurées sont, de toute façon, très supérieures à celles de la recombinaison homologue.

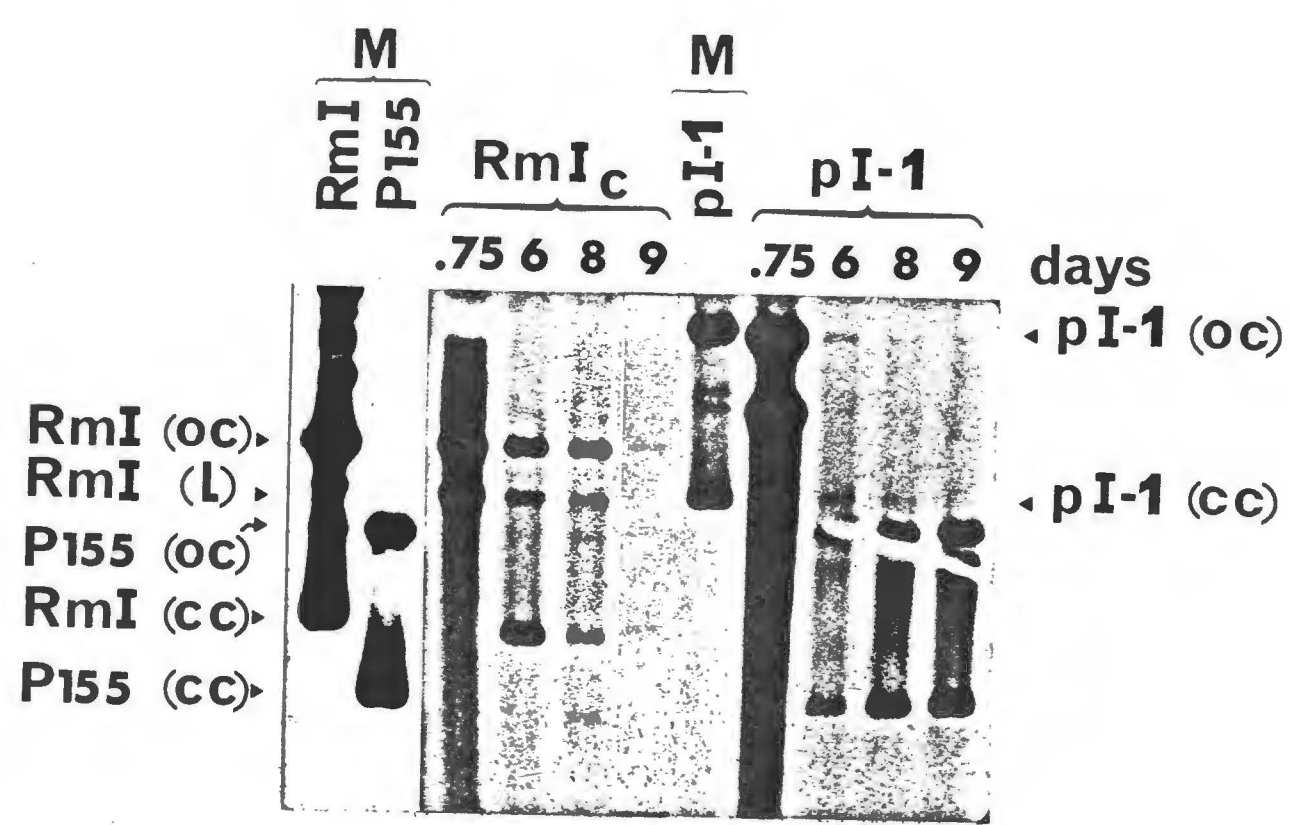
B. Analyse de la recombinaison par la technique de Southern.

Comme il est mentionné à la section précédente, la fréquence de recombinaison de RmI_C et $pI-1$ est particulièrement élevée. En se basant sur cette observation, il est raisonnable d'envisager la possibilité de suivre la cinétique de recombinaison au cours du temps grâce à l'extraction périodique de l'ADN de petit poids moléculaire, à son fractionnement sur gel d'agarose, son transfert

Figure 7. Analyse de la réplication et de la recombinaison de RmI_C et pI-1.

RmI_C et pI-1 ont été transfectés dans des cellules 3T6 incubées ensuite à 33°C pendant différentes périodes de temps. L'ADN de petit poids moléculaire a été extrait 18 heures (0,75 jours), 6 jours, 8 jours et 9 jours après transfection. Après électrophorèse sur gel d'agarose 1% à 40 volts pendant 16 heures, l'ADN a été transféré sur filtre puis hybridé avec une sonde virale. RmI provenant d'un extrait de C12/a1, P155 purifié à partir de cellules 3T6 infectées et pI-1 isolé d'une préparation de E. coli transformée, ont été utilisés comme marqueurs (M). Toutes ces molécules ont été préalablement purifiées sur gradient de CsCl (Bauer et Vinograd, 1968). OC, L et CC: formes circulaire ouverte, linéaire et circulaire covalente, respectivement.

FIGURE 7



sur filtre de nitrocellulose et son hybridation avec des sondes radioactives sélectives. Cette approche pourrait permettre aussi d'expliquer la différence de fréquence de recombinaison entre pI-1 et RmI_C. De fait, comme le montre la figure 7, P155 est présent aussi bien dans les cellules transfectées par RmI_C que dans celles transfectées par pI-1. Dans le cas de RmI_C toutefois, l'accumulation de P155 est peu spectaculaire et demeure, en tout temps, inférieure à la quantité de RmI_C répliqué. Par contre on observe l'inverse chez les cellules dans lesquelles on a introduit pI-1: l'accumulation de P155 est toujours supérieure à celle de pI-1 (qui contient, rappelons-le, des séquences plasmidiques). Si l'on traite l'ADN de petit poids moléculaire extrait des cellules transfectées par DpnI avant de le mettre sur gel, la position et l'intensité des bandes demeurent inchangées (résultats non montrés). Ces observations sont identiques à celles obtenues dans la section I (Réplication de RmI).

Donc, comme c'était le cas avec les expériences de plages de lyse, la quantité de P155 produite après transfection de pI-1 est plus importante que celle obtenue avec RmI_C. En somme, dans le cas où le substrat se réplique efficacement, la recombinaison est peu efficace; par contre si la réplication du substrat est faible, la recombinaison, à l'inverse, est très efficace. Ces résultats sont interprétables dans un contexte où les 2 phénomènes, la réplication et la recombinaison, seraient en compétition pour un même facteur limitant.

III. Réciprocité de la recombinaison

Dans le contexte qui nous intéresse ici, la réciprocité peut être définie de la façon suivante: si, par exemple, RmI_c subit un événement de recombinaison et que les 2 molécules résultant de ce processus, P155 et IR (pour insertion cellulaire + répétition virale, voir figure 6), sont détectées, la recombinaison est dite réciproque parce que les 2 produits possibles sont formés. Si, par contre, une seule des molécules est produite, la recombinaison est non-réciproque.

Sur la base des résultats présentés jusqu'ici, il est clair qu'au moins l'un des 2 partenaires attendus d'un événement de recombinaison réciproque dans RmI a pu être mis en évidence, soit P155. Les preuves en sont d'une part l'obtention de plages de lyse chez des cellules permissives, d'autre part la détection par des sondes radioactives spécifiques d'une molécule de taille génomique après séparation de l'ADN sur gel d'agarose. Ces 2 séries d'observations illustrent bien l'importance de la capacité de réplication que doit posséder un produit de recombinaison pour être détectable. Deux conditions sont essentielles, du moins pour Py et SV40, pour qu'une molécule d'ADN viral puisse se répliquer dans des cellules permissives. Il faut d'abord une fonction qui peut être fournie en cis ou complémentée en trans, il s'agit de la protéine grand T qui permet, entre autres, d'initier la réplication, et il faut ensuite une fonction obligatoirement présente en cis, l'origine de réplication.

A. Les séquences "ORI-LIKE" de INS ne permettent pas une amplification marquée.

Pour être détectable, le partenaire réciproque de P155, IR, doit lui aussi être capable de se répliquer et pour cela, posséder une origine de réplication fonctionnelle. A ce sujet, l'analyse de la séquence de Ins (insertion cellulaire de RmI) a montré une homologie de 12 pb, entre les nucléotides -507 et -518 (voir figure 3) avec la séquence consensus de l'origine de réplication de certains papovavirus, notamment SV40 et Py (Sylla et al., 1984). Ins contient aussi des séquences d'ADN répétitif de souris (Sylla et al., 1984), et il a été montré que certaines de ces séquences cellulaires répétitives contenaient des origines fonctionnelles, pouvant permettre la réplication d'un recombinant dans un système in vitro permissif pour SV40 (Hiroyoshi, 1984; Hiroyoshi et al., 1985).

En coupant pB₁-20 par l'enzyme de restriction HincII (qui coupe aussi au site Sall), on génère 3 fragments dont un contient la totalité de Ins (HincII-L) et un autre, entièrement viral, comprend la partie précoce complète et une partie de la région tardive du génome de Py (voir fig. 5). Si l'on recircularise in vitro ces fragments, puis que l'on transfecte le mélange dans des cellules de souris 3T6, l'ADN de petit poids moléculaire extrait après 5 jours et analysé par la méthode de Southern ne contient aucune séquence homologue à une sonde cellulaire d'ADN unique chevauchant une partie de Ins: (sonde HincII-BamHI, voir

fig. 8), ce qui indique que le fragment HincII-L n'est pas amplifié de façon notable (résultats non montrés). Par contre l'hybridation du filtre avec une sonde virale permet de mettre en évidence l'amplification du fragment HincII viral. Rappelons-le, ce fragment contient l'origine de répllication de Py et code pour la protéine grand T. Si l'origine de répllication de Ins, semblable à celle de Py, avait été fonctionnelle, on aurait dû détecter, grâce à la sonde cellulaire, l'amplification du fragment HincII-L complémenté en trans par le grand T codé par le fragment HincII entièrement viral. Naturellement la validité de cette affirmation repose sur le fait que la quantité de protéine grand T n'est pas un facteur limitant et qu'une proportion suffisante des cellules captent simultanément les 2 fragments. Avec la méthode de transfection au DEAE-dextran, cette proportion est estimée à environ 5% (Wake et al., 1985).

Nous avons refait le même type d'expérience dans un système répllicatif spécifique pour SV40. RmI_C a été transfecté dans des cellules de singe COS, lesquelles fournissent la protéine grand T de SV40 de façon constitutive (tableau II, Matériel et Méthodes). Ces cellules ne sont pas permissive pour Py et l'origine de répllication virale de RmI_C n'est donc, en principe, pas fonctionnelle. La seule façon dont cette molécule peut être répliquée dans ces cellules dépend donc entièrement de la présence d'une origine fonctionnelle dans Ins. Toutefois aucune amplification de RmI_C n'a pu être détectée (résultats non montrés).

Prises ensemble, ces 2 expériences permettent de constater que, dans les conditions utilisées ici, les séquences d'ADN de Ins ne sont pas en mesure d'agir comme des origines de réplication.

B. Mise en évidence de IR, deuxième produit de recombinaison, quand on lui insère une origine fonctionnelle.

Afin de rendre la molécule IR amplifiable, dans la mesure où la recombinaison est réciproque bien sûr, nous avons introduit au site BglIII de Ins dans pB₁-20 un fragment de SV-40 contenant l'origine de réplication de ce virus. Ce recombinant, une fois débarrassé de ses séquences plasmidiques et recircularisé, a été appelé SV-RmI_C (RmI_C + origine de SV40; figure 8). Par recombinaison intramoléculaire réciproque, celui-ci doit générer 2 molécules plus petites, dont l'une est P155, amplifiable dans des cellules de souris 3T6, et l'autre SV-IR, amplifiable dans des cellules COS d'après ce que nous venons de dire.

La transfection de SV-RmI_C dans des cellules COS et l'analyse subséquente de l'ADN de petit poids moléculaire sur gel d'agarose permet nettement de distinguer l'accumulation spécifique de 2 types de molécules (fig. 9 A), l'une étant vraisemblablement le recombinant complet (SV-RmI_C) et l'autre un des produits de recombinaison attendus: c'est-à-dire SV-IR. Notons que P155, l'autre produit de recombinaison, ne peut être amplifié dans ce type de cellules, non permissives pour Py. La présence de ces 2 molécules est confirmée si l'on digère l'ADN de petit poids

Figure 8. Carte physique de SV-RmI_C et de ses produits de recombinaison attendus.

SV-RmI_C est similaire à RmI_C: la seule différence réside dans la présence d'un fragment de SV40, contenant l'origine de réplication de ce virus, cloné au site Bgl II de Ins. Les séquences de SV40 sont représentées par un double trait hachuré, celles de Ins sont en blanc et les séquences de ts-P155 en noir. Les répétitions virales de 182 pb sont indiquées par deux têtes de flèche noires. La position des origines de réplication de chaque virus est aussi indiquée. La partie de la sonde HincII-BamHI chevauchant Ins est également montrée (H-B).

Par recombinaison intramoléculaire SV-RmI_C peut générer 2 molécules, P155 et SV-IR, chacune portant une origine distincte. La digestion de SV-RmI_C par Bam HI produit 2 fragments (4,6 Kb et 3,8 Kb) alors que P155 et SV-IR sont linéarisés (voir figure 9).

FIGURE 8

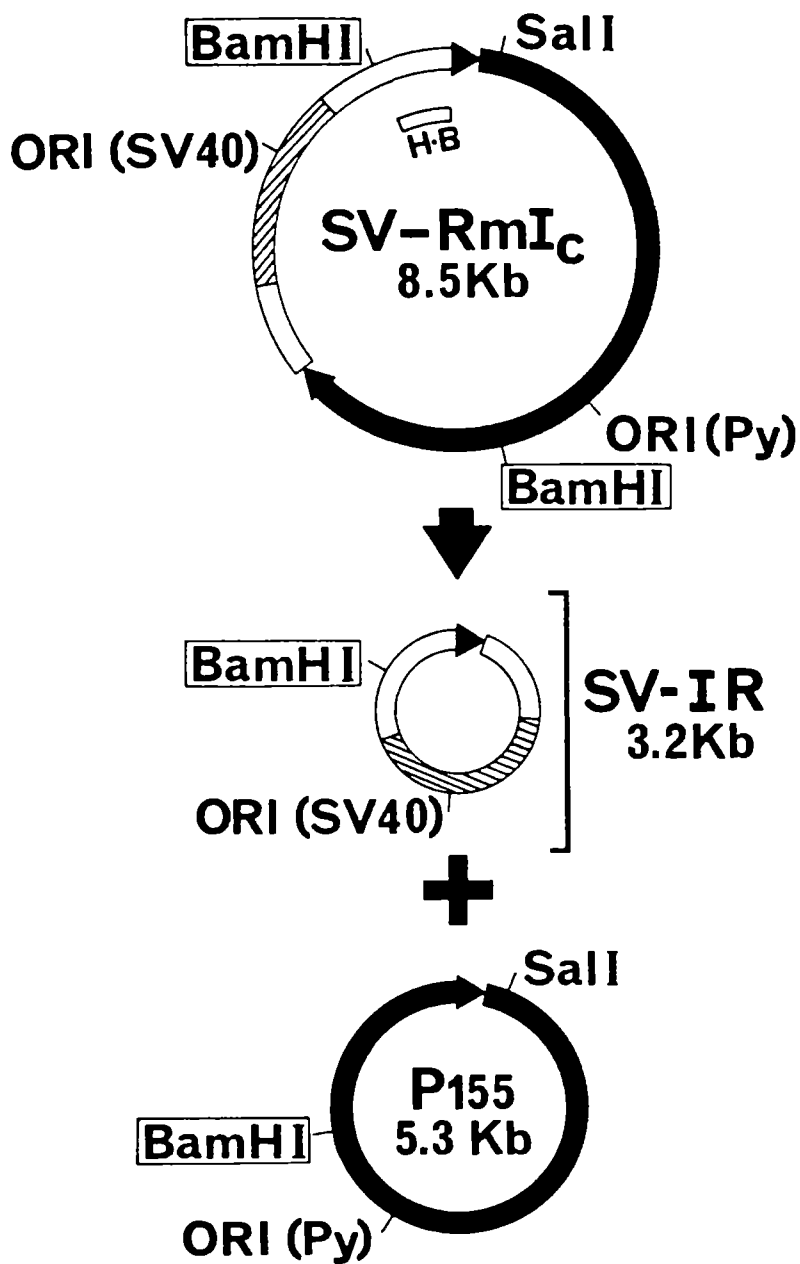


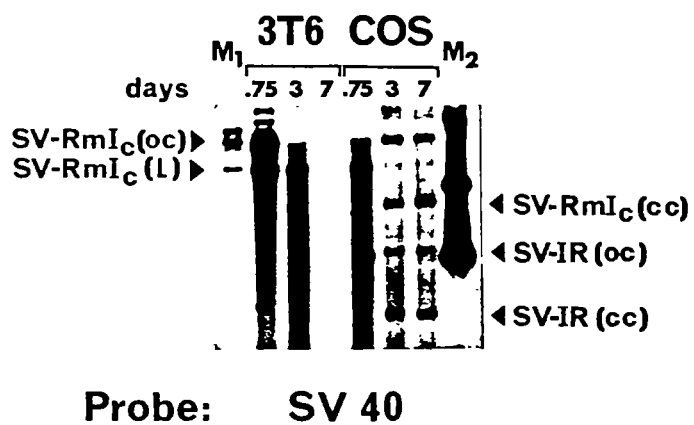
Figure 9. Analyse de la réplication et de la recombinaison de SV-RmI_c dans les cellules COS et 3T6.

A. SV-RmI_c a été transfecté dans des cellules COS et 3T6 incubées ensuite à 33°C. L'ADN de petit poids moléculaire a été extrait après 18 heures (0,75 jours), 3 jours ou 7 jours, puis placé sur gel et transféré sur filtre avant hybridation avec une sonde SV40. SV-RmI_c (M₁) et l'ADN de SV40 extrait de cellules infectées (M₂) ont été utilisés en guise de marqueurs. La position des bandes attendues pour SV-RmI_c et SV-IR (OC, L et CC) est indiquée.

B, C, D. SV-RmI_c a été transfecté dans les cellules COS puis l'ADN de petit poids moléculaire, extrait 5 jours plus tard, a été digéré par Bam HI. 3 aliquots de cette digestion ont été placés sur gel, chacun en parallèle avec une échelle de PM ("ladder" 1 Kb, BRL) marquée au P³² (L), puis hybridés avec 3 sondes différentes. B: sonde SV40, C: sonde HincII-BamHI, D: sonde Py.

FIGURE 9

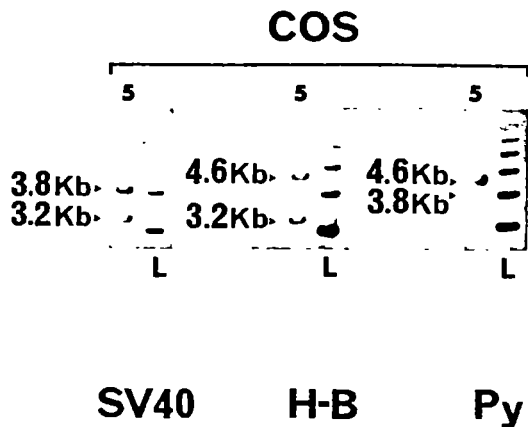
A



B

C

D



moléculaire par l'enzyme BamHI avant de le mettre sur gel (fig. 9 B, C, D). En effet, 3 fragments de tailles distinctes, pouvant être sélectivement mis en évidence par des sondes radioactives différentes, sont attendus si l'on coupe un mélange de SV-RmI_c et SV-IR par BamHI (fig. 8). Un premier fragment de 4,6 Kb, contenant notamment la partie précoce de Py, est illuminé à la fois par une sonde cellulaire (HincII-BamHI) et une sonde Py (fig. 9 C, D). Un second fragment de 3,8 Kb contenant l'origine de SV40 est mis en évidence par des sondes Py et SV40 (fig. 9 B, D). Enfin un troisième fragment de 3,2 Kb, correspondant à la molécule SV-IR entière, est révélé par des sondes SV40 et HincII-BamHI (fig. 9 B, C).

Même si ces résultats démontrent incontestablement l'existence de SV-IR, les expériences ne nous permettent toutefois pas de conclure que P155 et SV-IR sont formés simultanément dans une même cellule au moment de la recombinaison. Cependant le fait que les 2 produits réciproques soient détectés, chacun dans un système cellulaire approprié, milite grandement en faveur d'un mécanisme de recombinaison conservatif.

C. Effet de l'origine de SV40 sur la répllication de SV-RmI_c dans des cellules de souris.

SV-RmI_c a aussi été transfecté dans des cellules de souris 3T6. Comme le montre la figure 9 A, pratiquement aucune amplification de la molécule, de même que de ses 2 produits de recombinaison

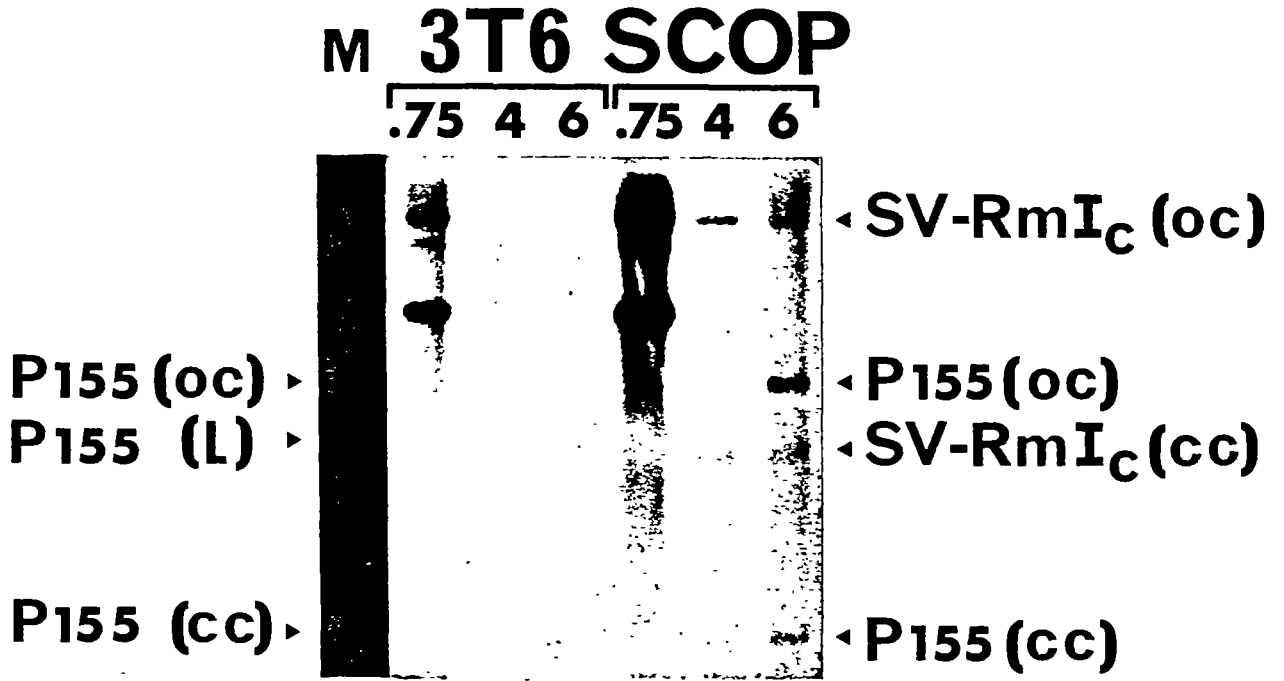
attendus, n'a pu être détectée aux différents temps indiqués. Ces résultats sont valables que le filtre soit hybridé avec une sonde spécifique pour SV-40 ou pour Py. Cette observation a été confirmée par l'absence de cellules présentant l'antigène VP1 de Py dans un essai d'immunofluorescence (tableau IV). Ces résultats sont à tout le moins surprenants. En effet, SV-RmI_C ne diffère de RmI_C, lequel se réplique très bien dans des cellules 3T6, que par la présence d'un fragment de SV40 dans Ins et, par conséquent, devrait toujours pouvoir coder pour la protéine grand T de Py et posséder une origine de répllication (de Py également) fonctionnelle. Dès lors la plus simple explication permettant de rendre compte de cette observation est de supposer que la présence d'une seconde origine, celle de SV40, inhibe la transcription virale précoce et/ou la répllication de la molécule SV-RmI_C.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons refait la même expérience que celle illustrée à la figure 9, mais cette fois en parallèle dans des cellules 3T6 et dans des cellules SCOP-T, ces dernières générant de façon constitutive un grand T de Py (voir tableau II, Matériel et Méthodes). Encore une fois, on note une forte inhibition de la répllication de SV-RmI_C dans les cellules 3T6. Par contre on détecte nettement l'accumulation de cette molécule, ainsi que celle de P155, dans les cellules SCOP-T (figure 10). Le fait que SV-RmI_C puisse être amplifié si on lui fournit la protéine grand T de Py en trans, milite grandement en faveur d'une inhibition de la transcription virale précoce chez SV-RmI_C dans les cellules 3T6. Les séquences d'ADN de SV40

Figure 10. Analyse de la réplication et de la recombinaison de SV-RmI_c dans les cellules SCOP-T et 3T6.

SV-RmI_c a été transfecté dans des cellules SCOP-T et 3T6 incubées ensuite à 33°C. L'ADN de petit poids moléculaire a été extrait 18 heures, 4 jours et 6 jours après transfection, placé sur gel d'agarose et transféré sur nitrocellulose. Le filtre a été hybridé avec une sonde Py. Le marqueur (M) utilisé est de l'ADN de ts-P155 purifié à partir de cellules 3T6 infectées. Les différentes formes OC, L et CC sont toujours indiquées.

FIGURE 10



Probe: Py

TABLEAU IV. Détermination par immunofluorescence du pourcentage de cellules exprimant la protéine VP1 après transfection

ADN utilisé	Mode d'introduction de l'ADN dans les cellules	Pourcentage ^a relatif de cellules VP1-positives
P155	Infection	39
pI-1	Transfection	7
RmI _c	Transfection	1
SV-RmI _c	Transfection	0

a: Les valeurs sont données après soustraction du pourcentage de cellules immunofluorescentes obtenues lors d'une transfection "à blanc" (sans plasmide). L'immunofluorescence a été réalisée 4 jours après transfection, selon la méthode décrite par Bourgaux et al. (1978).

présentes dans SV-RmI_c joueraient probablement un rôle dans cette inhibition. De plus le fait qu'il y ait recombinaison dans les SCOP-T, et non dans les 3T6, nous porte à croire que la ou les fonctions nécessaires à la recombinaison sont absentes chez les 3T6 mais présentes dans les SCOP-T. Il pourrait donc s'agir de protéines codées par la région précoce de Py, notamment l'antigène grand T, ou de fonctions cellulaires dépendant de ces protéines. Cette hypothèse est étayée par le fait que la molécule pI-1, incapable elle aussi de se répliquer dans des 3T6 à cause des séquences plasmidiques qu'elle contient (se reporter à la section II), est cependant un substrat efficace, dans ces cellules, pour la recombinaison générant P155 (tableau III et figure 7). La seule différence avec SV-RmI_c, c'est que pI-1 ne contient pas de séquences de SV40 et doit donc exprimer normalement, dans des cellules permissives, la région précoce de Py qu'il contient (figure 6).

D. Recombinaison aberrante de SV-RmI_c dans des cellules de souris produisant un grand T de SV40 de façon constitutive.

Jusqu'ici, nous avons démontré que SV-RmI_c pouvait être répliqué et réarrangé dans des cellules de singe produisant un grand T de SV40 (cellules COS) ainsi que dans des cellules de souris codant pour un grand T de Py (cellules SCOP-T). Considérant ces résultats, et la dualité des fonctions de répllication de SV-RmI_c, nous avons transfecté cette molécule dans des cellules de souris transformées par un génome de SV40 et exprimant de façon

constitutive le grand T de ce virus. La présence de cette protéine devrait permettre la recombinaison de SV-RmI_C, toujours selon l'hypothèse où le grand T (ou une autre protéine virale précoce) est impliqué directement ou indirectement dans la recombinaison, le fragment SV40 de SV-RmI_C ne devant pas gêner l'expression de la région précoce du génome viral intégré. L'ADN de P155 produit, débarrassé des séquences de SV40, pourrait être transcrit normalement et se répliquer efficacement dans ces cellules de souris, grâce à son origine de répllication.

Chen et al. (1983) ont transformé des cellules NIH 3T3 avec un génome complet de SV40 ou avec un génome origine-défectif du même virus. Ils ont montré que certaines des lignées obtenues exprimaient un grand T de SV40 de façon constitutive.

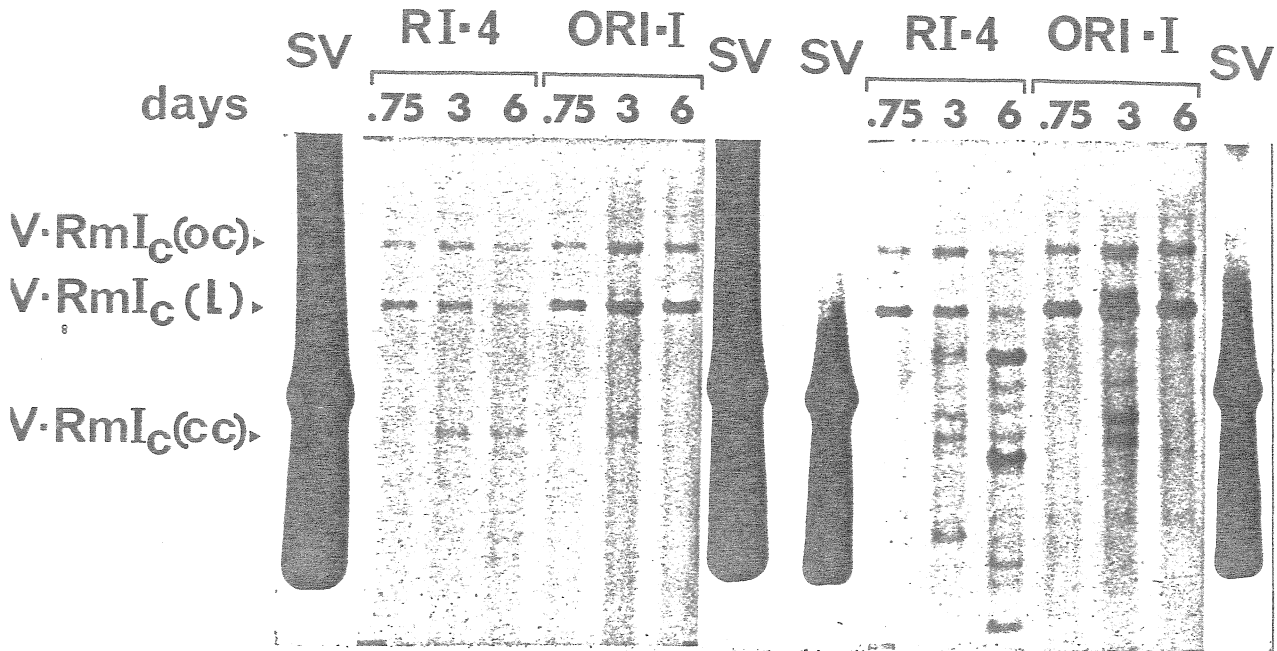
J'ai utilisé 2 de ces lignées, R1-4 et ORI-1 (voir tableau II), pour suivre la répllication et la recombinaison de SV-RmI_C après transfection. Contrairement à ce que l'on avait observé dans les 3T6, on peut détecter facilement la présence de SV-RmI_C, aux différents temps d'extraction de l'ADN, bien que l'accumulation totale de la molécule augmente peu en fonction du temps. Le plus étonnant toutefois est la présence de plusieurs bandes de plus petite taille que SV-RmI_C, qui sont particulièrement mises en évidence par une sonde Py (fig. 11).

Toutes ces bandes, non détectables après 18 heures, apparaissent aux temps d'extraction subséquents et leurs positions

Figure 11. Analyse de la réplication et de la recombinaison de SV-RmI_c dans les cellules R1-4 et ORI-1.

SV-RmI_c a été transfecté dans des cellules R1-4 et ORI-1 incubées ensuite à 33°C. L'ADN a été extrait des cellules 18 heures, 3 jours et 6 jours après transfection, analysé sur gel, puis hybridé avec une sonde SV40 (à gauche). Après lavage du filtre, une deuxième hybridation a été faite mais cette fois avec une sonde Py (à droite). Le marqueur (SV) est de l'ADN de SV40 purifié à partir de cellules de singe infectées par le virus.

FIGURE 11



Probe:

SV40

Py

et intensités varient en fonction de ces mêmes temps. Cette hétérogénéité observée au sein des produits de recombinaison contraste fortement avec la spécificité avec laquelle SV-RmI_c se recombine pour donner P155 dans les cellules SCOP-T et SV-IR dans les cellules COS. Il semble s'agir ici d'événements de recombinaison partiellement non-spécifiques toutefois: si l'on observe une polydispersion des produits de recombinaison qui contraste, donc, avec les observations précédentes, il s'agit cependant d'un nombre limité de bandes discrètes dont certaines sont présentes à 2 temps différents d'extraction (3 jrs et 6 jrs), ce qui indique que les événements de recombinaison en question ne se produisent pas complètement au hasard mais plutôt comme si certains sites étaient privilégiés.

Une autre observation est que les quelques bandes illuminées par une sonde SV40 (fig. 11, panneau de gauche) le sont aussi par la sonde Py (panneau de droite) alors que l'inverse n'est pas observé, comme si la plus grande partie des produits de recombinaison intramoléculaire avaient perdu la totalité ou presque des séquences SV40. Cette observation est peu surprenante dans la mesure où la présence de ces séquences interfère avec l'expression de la région précoce Py, et donc avec la réplication de la molécule qui les porte (voir section précédente). Tout événement de recombinaison intramoléculaire permettant d'éliminer ces séquences devrait produire des molécules n'ayant plus ce handicap pour leur amplification, les rendant ainsi plus facilement détectables. Par ailleurs, la réplication de molécules

à partir de leur origine SV40, et à l'aide du grand T correspondant, est très défavorisée dans des cellules de souris, non permissives pour ce virus (voir paragraphe suivant).

Il est difficile de définir la part exacte que le grand T de SV40 joue dans les phénomènes décrits jusqu'ici. Néanmoins certaines expériences, non montrées, nous permettent d'envisager un rôle possible dans la réplication et la recombinaison de SV-RmI_C. D'abord si l'on transfecte un génome complet de SV40 dans des cellules ORI-1, on décèle une faible, mais détectable, accumulation de l'ADN de SV40 même après traitement par DpnI. La même expérience faite avec des cellules de souris NIH 3T3 est négative. Ceci démontre que même si les R1-4 et ORI-1 sont des cellules de souris, non-permissives pour SV40, elles peuvent néanmoins permettre sa réplication jusqu'à un certain point. Nous avons noté aussi une faible accumulation de SV-RmI_C, mais non de P155, après transfection de la première molécule dans les R1-4 ou ORI-1, lorsque celles-ci sont maintenues à 39°C. Il semble donc que le grand T de SV40 pourrait jouer un rôle non négligeable dans la réplication de SV-RmI_C ou de produits de recombinaison qui portent toujours une origine de SV40 intacte. Son rôle dans la recombinaison est moins clair. On sait d'après les résultats de transfection dans les cellules COS (voir section III B) que cette protéine, lorsqu'elle est présente, est suffisante pour que la recombinaison s'effectue normalement. D'un autre côté, l'existence de bandes de poids moléculaire inférieur à celui de SV-RmI_C dans les R1-4 et les ORI-1 semble aussi appuyer cette hypothèse, bien

que la recombinaison dans ce cas soit moins spécifique. Nous examinerons ce point davantage dans la Discussion.

Quant au rôle du grand T de Py dans la réplication et la recombinaison au sein des cellules R1-4 et ORI-1, il est aussi difficile à définir. Il est clair que les molécules ayant perdu, par recombinaison, l'ADN de SV40, mais ayant par ailleurs gardé la région précoce complète de ts-P155, sont capables d'exprimer normalement l'antigène grand T, et de se répliquer à partir de leur origine. Il est probable aussi que le grand T de Py puisse initier la réplication de SV-RmI_c à partir de l'origine de ts-P155. De plus il est possible d'imaginer une interaction entre les 2 grands T, celui de Py et celui de SV40, qui pourrait rendre compte de la non-spécificité relative de la recombinaison dans ce cas particulier.

TABLEAU V. Taux de réplication et de recombinaison obtenus avec RmI_C, pI-1 et SV-RmI_C après transfection dans les différents types de cellules

Type de cellules transfectées	Réplication			Recombinaison		
	RmI _C	pI-1	SV-RmI _C	RmI _C	pI-1	SV-RmI _C
3T6	+++	+	-	+	+++	-
NIH 3T3	+++	N.T.	-	+	N.T.	-
SCOP T	+++	+	++	+	++	++
				(hétérogène)	(hétérogène)	
COS-1	-	N.T.	+++	-	N.T.	+++
R1-4	+++	N.T.	+	+	N.T.	+++
				(hétérogène)		(hétérogène)
ORI-1	++	N.T.	+	+	N.T.	+++
				(hétérogène)		(hétérogène)

N.T.: non testé

+: indique le taux d'amplification ou de recombinaison approximatif tel que déterminé d'après l'intensité des bandes apparaissant sur l'autoradiogramme. +++ représente l'intensité la plus forte.

Suivant les cellules dans lesquelles ils ont été transfectés, RmI_C et pI-1 produisent après recombinaison, en plus de P155, une ou 2 bandes supplémentaires. Le mot hétérogène est aussi utilisé dans ce cas.

Annexe 1

Modèle théorique pour la résolution de RmI

Dans le modèle de recombinaison que nous nous proposons de décrire ici, nous avons essayé de tenir compte de toutes les observations expérimentales faites au cours de ce travail, et la majorité des idées avancées sont basées sur ces observations ou d'autres déjà publiées. Néanmoins certains éléments n'en demeurent pas moins spéculatifs et proviennent surtout d'analogies faites avec d'autres systèmes biologiques. Ce modèle n'est cependant applicable qu'à un "système biologique fermé".

L'interaction de la protéine grand T avec l'ADN viral dans RmI peut avoir deux conséquences distinctes: 1) son attachement spécifique à des séquences situées près de l'origine de réplication, où elle agirait alors comme une topoisomérase de type II (gyrase), laquelle nécessite l'hydrolyse d'ATP, pour initier la réplication de l'ADN viral (Gaudray et al., 1980; Wang, 1985); ce type d'enzyme a aussi été impliqué dans la terminaison de la réplication pour dissocier les brins nouvellement synthétisés (Wang, 1985), 2) sa fixation à une ou des régions discrètes des répétitions virales de 182 pb, où elle catalyserait la recombinaison en jouant le rôle d'une topoisomérase spécifique.

Les deux phénomènes, réplication et recombinaison, sont tributaires de la fixation de la protéine grand T sur l'ADN; aussi est-il plausible de supposer qu'il s'agit là d'une étape-clé pour leur régulation.

Afin de connaître l'environnement favorisant l'un ou l'autre de ces phénomènes, il s'avère pratique d'exprimer en termes mathématiques l'interaction de la protéine grand T avec l'ADN du génome viral. Notre objectif ici est de définir une équation reliant les paramètres qui décrivent la fixation de grand T à des quantités expérimentales mesurables, comme la concentration de grand T lié et la concentration d'ADN présent.

Pour ce faire, on peut envisager raisonnablement un certain nombre d'hypothèses de départ nécessaires: les molécules d'ADN sont présentes sous une seule forme active, d'une part; d'autre part, s'il peut y avoir interaction entre les sites de fixation situés à l'origine, sites physiquement très proches l'un de l'autre (Dilworth et al., 1984; Introduction), il n'y en a aucune entre ceux-ci et les sites éventuellement présents dans les répétitions virales de RmI (nt 3092 à 3273).

En gardant ceci en tête, la fixation de grand T sur un site libre quelconque du génome viral peut être décrite par la formule (1):



où E est la concentration en sites libres présents sur l'ADN, X la concentration de forme active de grand T libre et K la constante d'association. La concentration du complexe à l'équilibre est donnée par:

$$[EX] = [E] [X] K \quad (2)$$

On peut définir une quantité B, nombre moyen de molécules ligand par molécule d'ADN.

$$B = \frac{[EX]}{A} \quad (3)$$

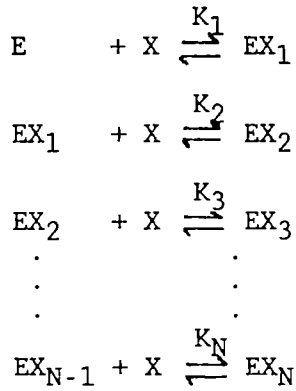
où A correspond au nombre de molécules d'ADN présentes en solution. La fraction des sites occupés sur une molécule d'ADN, v , est alors définie par:

$$v = \frac{B}{N} = \frac{[EX]}{NA} \quad (4) \quad v \text{ varie de } 0 \text{ à } 1.$$

N étant le nombre de sites de fixation présents sur une molécule d'ADN. L'on suppose ici qu'une molécule de forme active de grand T peut se fixer par site.

Dans le cas qui nous intéresse, RmI, le nombre de sites possibles sur le génome viral où la protéine grand T peut se fixer est inconnu, néanmoins on sait qu'il en existe au minimum 5. Trois sont situés dans la région régulatrice près de l'origine de répllication, et chacun des 2 autres se trouve dans une des répétitions de 182 pb. De plus, on peut supposer que les constantes d'association des sites de fixation situés près de l'origine sont supérieures à celles des sites présents dans les répétitions car la répllication constitue une nécessité impérative pour la survie du virus contrairement à la recombinaison qui est secondaire. En somme $K_1 \geq K_2 \geq K_3 > K_4 = K_5$

En termes plus mathématiques, la fixation du grand T sur RmI peut être décrite de la façon suivante:



L'indice assigné à EX désigne le nombre de sites occupés par grand T sur l'ADN présent dans le complexe.

En appliquant la relation (2), l'on obtient pour 5 sites:

$$\begin{aligned}
 [EX_1] &= K_1 [E] [X] \\
 [EX_2] &= K_2 [EX_1] [X] = K_1 K_2 [E] [X]^2 \\
 [EX_3] &= K_3 [EX_2] [X] = K_1 K_2 K_3 [E] [X]^3 \\
 [EX_4] &= K_4 [EX_3] [X] = K_1 K_2 K_3 K_4 [E] [X]^4 \\
 [EX_5] &= K_5 [EX_4] [X] = K_1 K_2 K_3 K_4 K_5 [E] [X]^5
 \end{aligned} \tag{5}$$

Si l'on se réfère à la relation (3), l'on peut écrire (en ayant à l'esprit qu'il y a un site occupé sur EX₁, 2 sur EX₂, etc):

$$B = \frac{[EX_1] + 2 [EX_2] + 3 [EX_3] + 4 [EX_4] + 5 [EX_5]}{A} \tag{6}$$

D'après les équations en (5):

$$B = \frac{K_1 [E][X] + 2 K_1 K_2 [E][X]^2 + 3 K_1 K_2 K_3 [E][X]^3 + 4 K_1 K_2 K_3 K_4 [E][X]^4 + 5 K_1 K_2 K_3 K_4 K_5 [E][X]^5}{A}$$

Soit, d'après (4):

$$v = \frac{[E]}{NA} (K_1 [X] + 2 K_1 K_2 [X]^2 + 3 K_1 K_2 K_3 [X]^3 + 4 K_1 K_2 K_3 K_4 [X]^4 + 5 K_1 K_2 K_3 K_4 K_5 [X]^5) \quad (7)$$

Cette équation nous permet de connaître le pourcentage des sites occupés par grand T sur une molécule d'ADN. On peut facilement en tirer des renseignements utiles pour déterminer les conditions favorisant la réplication ou la recombinaison. Par exemple, si la concentration de grand T, $[X]$, est faible, les termes d'ordre supérieur de l'équation (7) deviennent très inférieurs à $K_1[X]$ et l'équation se simplifie:

$$v = \frac{[E]}{NA} (K_1[X]) \quad (8)$$

Dans ce cas, seul le site possédant l'affinité la plus grande, en l'occurrence un des sites se trouvant près de l'origine, fixe la protéine grand T efficacement et la recombinaison ne peut donc se faire. C'est ce qui se produit notamment lorsqu'on transfecte SV-RmI_c dans les 3T6.

Si, dans un autre exemple, la quantité d'ADN présent (A) est faible et que la concentration de grand T disponible est élevée, v augmente, ce qui veut dire que les sites des répétitions de 182 pb sont occupés aussi, favorisant ainsi la recombinaison. C'est ce qu'on observe pour pI-1 après transfert dans les 3T6. Si, par contre, A est élevée et $[X]$

intermédiaire, la recombinaison se produit, mais de façon limitée, c'est le cas de RmI_c dans les 3T6.

Cette équation s'avère utile aussi pour déterminer approximativement la concentration minimum de grand T nécessaire pour qu'il se produise un événement de recombinaison. Si l'on suppose qu'il existe 5 sites de fixation comme on l'a dit plus haut, 60% des sites doivent être obligatoirement occupés avant que la recombinaison puisse avoir lieu, soit:

$$0.60 = \frac{[E]}{NA} \text{ (dépend uniquement de [X])}$$

E, N et A sont des quantités connues ou expérimentalement mesurables permettant ainsi d'établir la concentration minimum de grand T nécessaire à la recombinaison. Ce type de raisonnement pourrait être particulièrement utile pour définir les conditions optimales de fonctionnement d'un système de recombinaison "in vitro". Cette approche générale est une des plus simples possible; différentes variantes peuvent être introduites comme la présence d'un second ligand (l'ATP par exemple), la coopération entre ligands, etc... Plusieurs modèles ont été ainsi décrits permettant d'arriver à des valeurs se rapprochant davantage de la réalité (Chen et al., 1986; McGhee et Van Hippel, 1974).

En gardant en mémoire que la réplication aussi bien que la recombinaison peuvent être définies uniquement en terme d'interactions préférentielles protéine: ADN, il est possible d'expliquer ce qui se produit au niveau moléculaire dans les cellules R1-4 ou ORI-1, bien que le tout demeure entièrement spéculatif. Comme ces cellules produisent le

grand T de SV40 de façon constitutive, la protéine ne constitue plus de ce fait un facteur limitant pour la recombinaison (le grand T de SV40 au même titre que celui de Py catalysant la recombinaison). SV-RmI_C, à cause des séquences SV40, est peu transcrit et produit peu de grand T de Py; mais contrairement aux cellules 3T6, il est probable que les séquences contenant l'origine de SV40 dans SV-RmI_C soient complètement saturées par le grand T de SV40 produit sans arrêt par le génome viral intégré. La faible quantité de grand T de Py présente est alors entièrement disponible pour la réplication (SV-RmI_C est, en effet, faiblement répliqué dans les R1-4 ou les ORI-1).

L'hétérogénéité de la recombinaison, quant à elle, peut être expliquée de diverses manières. La formation d'oligomères de la protéine grand T semble indispensable à sa fixation sur l'ADN et à l'initiation de la réplication (Bradley et al., 1982; Schürmann et al., 1985; Wachter et al., 1985). Il est possible que dans les cellules R1-4 et ORI-1, les grands T de SV40 et de Py forment des oligomères hétérologues qui agiraient différemment sur la recombinaison par rapport aux oligomères homologues. On peut aussi envisager simplement que l'environnement non-permissif des cellules envers le grand T de SV40 modifie son action sur la recombinaison.

Dans le sous-clone Cl2/a1, RmI et Pl55 sont produits dans une proportion de 20 à 1 à en juger par l'intensité relative de leurs bandes sur gel (Sylla et al., 1980). Si l'on transfecte RmI_C dans les 3T6, on obtient un rapport semblable (voir fig. 7). Bien qu'elle ne constitue par une preuve, cette similitude suggère que c'est la molécule RmI, et non pas le génome intégré, qui sert de substrat pour la formation de

P155 dans les C12/a1. De plus, la fréquence relativement peu élevée de la recombinaison générant P155 dans les C12/a1 est en accord avec le modèle présenté plus haut. Puisque RmI se réplique abondamment dans ces cellules, on ne s'attend pas à ce que la fréquence de recombinaison soit très grande.

DISCUSSION

La molécule RmI, produite dans les cellules Cyp par excision du génome intégré selon une recombinaison spécifique du site (Sylla et al., 1984), nous a servi à son tour de substrat pour étudier la recombinaison intramoléculaire dans un ADN épisomique, dans les cellules de mammifères.

Nous avons établi que RmI était capable de générer de façon relativement efficace, par recombinaison intramoléculaire, un ADN de taille génomique infectieux, celui de ts-P155. Ces résultats ainsi que plusieurs autres sont résumés dans le tableau V. Par rapport à ce qui avait été observé plus tôt avec des constructions analogues à RmI, dans le cas de Py ou SV40, l'événement de recombinaison que nous avons analysé semble présenter plusieurs caractéristiques distinctes qui en font un système très particulier.

Mécanisme de recombinaison

Le réarrangement de séquences d'ADN se produit selon trois mécanismes distincts (si l'on considère la transposition comme une sous-classe de la recombinaison site-spécifique), dont les propriétés varient selon qu'il s'agit de recombinaison homologue, illégitime ou site-spécifique. Donc, expérimentalement, il est possible de distinguer entre les trois processus et, éventuellement, de déterminer lequel est responsable de la conversion de RmI en P155.

Plusieurs résultats montrent qu'il ne s'agit pas de recombinaison illégitime. D'abord on ne détecte aucune plage de lyse si on transfecte des cellules de souris avec le recombinant pR-P155 sans aucun traitement préalable (tableau III), ce qui indique que la fréquence de recombinaison non-homologue qui permettrait de générer précisément une molécule de taille génomique se produit à trop faible fréquence dans notre système pour être détectable. Le même raisonnement s'applique à la molécule pB₁-20 non traitée pour laquelle on ne détecte aucune plage de lyse également.

De plus, comme le montre la figure 7, les produits de recombinaison dans des cellules 3T6 transfectées par RmI_C ou pI-1 sont très homogènes en termes de poids moléculaire; l'on n'observe que les bandes attendues pour P155. Même dans les cas où l'hétérogénéité des produits de recombinaison est la plus grande, nous ne détectons qu'un nombre limité de bandes discrètes (voir figure 10). Ce n'est pas ce que l'on attend d'un événement de recombinaison non-homologue qui, par définition, doit produire une population de molécules de toutes les tailles (Botchan et al., 1974).

Enfin si l'on élimine une des répétitions virales de 182 pb de pI-1, par digestion à la Bal 31 à partir du site SmaI de ts-P155 (figure 5) on abolit complètement la recombinaison, comme l'indique l'absence de bandes correspondant à P155 après transfection de ce plasmide modifié dans des cellules 3T6 (résultats non montrés).

Subramani et Berg (1983), utilisant des tandems partiels du génome de SV40, de longueur variable et clonés dans pBR322, ont mesuré l'infectivité relative de ces constructions par leur capacité à produire

des plages de lyse. Pour une homologie de 237 pb, ils ont déterminé une fréquence de recombinaison de 0,3%. Rubnitz et Subramani (1984), en reprenant le même type d'expérience, ont montré que 200 pb d'homologie constitue un seuil au-delà duquel la fréquence de recombinaison diminue rapidement en fonction de l'homologie. Tel que mentionné déjà dans les Résultats, pour une homologie de 182 pb, on s'attend alors à trouver une infectivité relative d'environ 0,06%, soit 100 à 800 fois inférieure à l'infectivité relative de RmI_c et pI-1 (voir tableau III). Comme les expériences citées ont été effectuées dans des cellules de singe, on peut prévoir une certaine variation dans l'infectivité relative puisque, dans notre cas, il s'agit de cellules de souris. Toutefois une augmentation de 100 à 800 fois est difficilement explicable de cette façon. De plus, Kovar et Wintersberger (1985) ont mesuré, en utilisant comme substrat une molécule contenant un tandem tête-à-queue complet de Py, une fréquence de recombinaison intramoléculaire homologue comprise entre 20% et 50%, après transfection dans des cellules de souris. A l'égard de ces résultats, la fréquence de recombinaison dans RmI est très élevée, puisqu'elle la répétition n'est que de 182 pb. Ces différences peuvent être aisément expliquées si l'on considère que la résolution de RmI a lieu selon un mécanisme de recombinaison site-spécifique plutôt que par recombinaison homologue. Cette hypothèse est d'ailleurs étayée par deux autres observations.

D'abord il est bien établi maintenant que dans des constructions similaires aux nôtres, une coupure double-brin entre les deux régions d'homologie stimule la recombinaison homologue de 10 à 100 fois (Lin et al., 1984). En effet les molécules linéaires semblent être de meilleurs substrats pour ce type de recombinaison que des molécules circulaires

(Wake et al., 1985). Or, dans notre système, nous avons observé qu'une coupure analogue avait l'effet plutôt inverse: quand on linéarise la molécule, on diminue en général son infectivité relative (tableau III). Bien que d'autres interprétations soient possibles, cette observation renforce l'idée qu'il s'agit d'un mécanisme différent de la recombinaison homologue, et pourrait même refléter l'importance que présente la structure du substrat dans l'efficacité de recombinaison comme c'est le cas notamment pour l'intégration du phage lambda: lorsque le substrat est sous forme linéaire, la recombinaison a lieu quand même, mais la vitesse de réaction augmente sensiblement si l'ADN est circulaire et enroulé en superhélice (Mizuuchi et al., 1978).

Deuxièmement, les deux produits de recombinaison réciproques ont pu être mis en évidence dans des cellules permettant leur amplification. P155 est facilement détecté après transfection de RmI_c ou pI-1 dans des cellules de souris, et son partenaire, SV-IR, a pu être mis en évidence dans des cellules COS après transfection de SV- RmI_c (figure 9). Ces deux observations suggèrent fortement que la recombinaison est réciproque, même si les deux produits n'ont pu être isolés dans les mêmes cellules. La réciprocité est une des caractéristiques de la recombinaison site-spécifique. Par contre, il semble que la recombinaison homologue, chez des molécules d'ADN transfectées dans des cellules de mammifères, soit un processus non-réciproque (Folger et al., 1985; Wake et al., 1985).

Pris ensemble, tous ces résultats indiquent que la conversion de RmI en P155 se fait par recombinaison site-spécifique plutôt que par recombinaison homologue ou illégitime. Il faut mentionner cependant que

toutes les évidences présentées ici sont indirectes et de ce fait ne doivent pas être considérées comme une démonstration absolue. Pour déterminer d'une façon plus directe la spécificité du site de la recombinaison, nous effectuons présentement la construction et l'analyse des mutants de délétion produits par digestion à la Bal 31 à partir du site SmaI de pI-1. En délétant graduellement la répétition de 182 pb qui est à cet endroit, nous espérons pouvoir ainsi délimiter la séquence importante pour la recombinaison à l'intérieur de la région d'homologie.

Fonction(s) nécessaire(s) à la résolution de RmI

Si l'on prend pour acquis que la résolution de RmI se fait selon un processus de recombinaison site-spécifique impliquant des séquences de la répétition virale, on peut s'attendre par le fait même à ce que la ou les fonctions nécessaires à la recombinaison soient codées par le génome viral. Cette supposition est renforcée par les considérations qui suivent.

Tel que démontré dans la section Résultats, SV-RmI_c ne se réplique ni ne se recombine dans les cellules de souris 3T6. L'absence de réplication vient probablement du fait que la présence d'une origine de SV40 dans SV-RmI_c diminue sensiblement le taux de transcription des gènes précoces de ts-P155 (fig. 12). Pour ajouter à cet effet, il est aussi possible qu'une fraction de la quantité déjà faible du grand T de Py se fixe sur l'origine de SV40, ne pouvant ainsi initier un nouveau cycle réplcatif. Quoiqu'étonnant, il ne s'agit pas d'un cas isolé dans la littérature; un effet similaire a été rapporté chez les procaryotes à la suite de l'introduction d'une seconde origine dans une structure

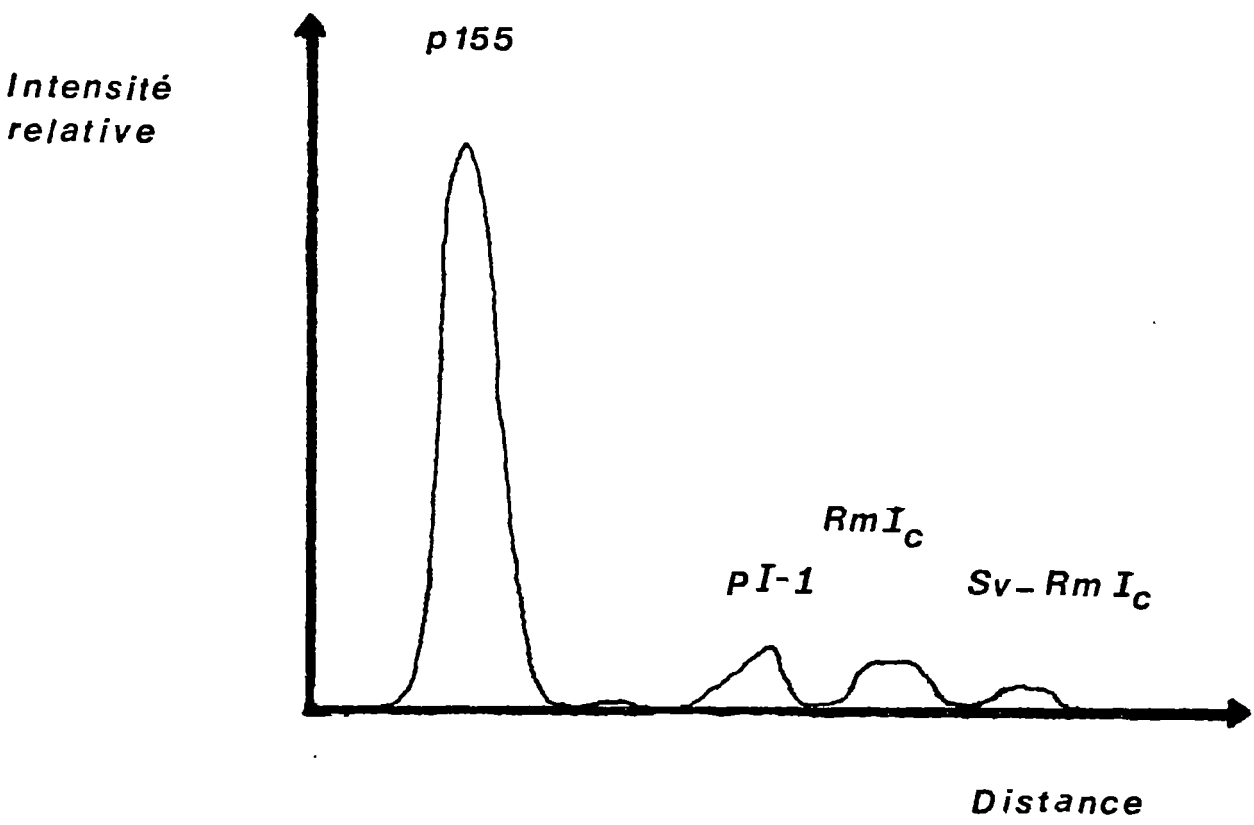
cointégrée (Bernardi et Bernardi, 1986). L'inhibition de la réplication de SV-RmI_C n'explique cependant pas pourquoi P155 n'est pas formé et amplifié dans les 3T6 car pI-1, qui se réplique aussi très peu dans ces cellules, se recombine très efficacement. Si la résolution était sous le contrôle d'une fonction cellulaire, la recombinaison intramoléculaire de SV-RmI_C pourrait s'effectuer normalement, le produit du gène cellulaire n'étant présumément pas soumis à l'action de l'origine de SV40, et le produit de recombinaison, P155, débarrassé de toute séquence inhibitrice, pourrait s'amplifier librement. Par contre, les résultats sont facilement interprétables si l'on suppose que la résolution de SV-RmI_C est sous le contrôle d'une fonction codée par ts-P155 lui-même. Comme les gènes viraux précoces sont peu exprimés après transfection de SV-RmI_C dans les 3T6, la quantité de protéines précoces produites est faible et ne permet ni la recombinaison ni la réplication des molécules d'ADN. Inversement, lorsqu'on fournit ces protéines en trans, comme dans les cellules SCOP-T ou COS, la recombinaison se produit efficacement (voir tableau V). Cette interprétation concorde aussi avec le fait que lorsqu'on introduit SV-RmI_C dans les cellules R1-4 ou ORI-1, la recombinaison demeure toujours aussi efficace, bien qu'elle semble avoir perdu sa spécificité. Cette non-spécificité n'est pas liée au caractère transformé des cellules en question puisque les produits de recombinaison sont parfaitement homogènes dans les COS et les SCOP-T.

Bien qu'indirectes, toutes ces observations indiquent fortement que la résolution de RmI dépend d'une fonction virale précoce qui peut être fournie soit par le génome de Py soit par celui de SV40 (dans les cellules COS).

Figure 12. Transcription relative de RmI_c , pI-1 et SV- RmI_c dans les cellules 3T6.

pI-1, RmI_c et SV- RmI_c ont été transfectés dans des cellules 3T6 maintenues à 33°C. 24 heures plus tard l'ARN a été extrait et déposé sur filtre de nitrocellulose ("dot-blot"; White et Bancroft, 1982), et hybridé avec une sonde Py. La hauteur des pics correspond à l'intensité relative des taches obtenues après autoradiographie, par rapport à un témoin négatif (ARN extrait de cellules non transfectées). Le témoin positif (P155) représente la quantité d'ARN extrait de cellules 3T6 infectées à 33°C par ts-P155.

FIGURE 12



Protéine virale précoce responsable de la résolution

Nous proposons que la protéine précoce grand T est responsable de la résolution de RmI. Son rôle indispensable dans l'initiation de la réplication et sa participation à la recombinaison permettraient d'expliquer la compétition qu'on observe dans les 3T6 entre ces deux phénomènes. Lewis et Manley (1985) et, indépendamment, Lebkowski et al. (1985), ont montré que la transcription précoce de SV40 était fortement inhibée par la réplication de l'ADN viral, mais que cette inhibition était levée par une mutation rendant l'ADN viral incapable de se répliquer. D'une façon similaire on peut envisager que la transcription précoce de RmI_C soit peu élevée dans les 3T6 car celui-ci s'y réplique abondamment. Toutes les protéines grand T produites alors seraient mises à contribution pour initier la réplication virale, laissant peu de molécules disponibles pour la recombinaison. On conçoit facilement que l'attachement du grand T aux séquences d'ADN qui se trouvent près de l'origine de réplication possède une constante d'association supérieure à la fixation aux séquences responsables de la recombinaison. pI-1 se répliquant peu, quant à lui, laisse une quantité suffisante de protéine grand T pour permettre la recombinaison. Il est fort probable d'ailleurs que l'attachement de la protéine grand T aux répétitions est stochiométrique; le rapport protéine:ADN doit être supérieur à une valeur donnée en deçà de laquelle la fixation au site de recombinaison est négligeable, comme c'est le cas notamment pour la protéine int du phage λ (Nash et Robertson, 1981). De ce fait, une faible réplication accroît le rapport protéine:ADN et favorise donc un événement de recombinaison.

Nous avons observé une recombinaison efficace et précise après transfection de SV-RmI_c dans les cellules COS (fig. 9) en dépit de l'absence prévue de transcription virale précoce chez SV-RmI_c, les cellules COS étant non-permissives pour le Py. Ceci démontre qu'une des fonctions virales précoces exprimées à partir du génome de SV40 intégré dans ces cellules est suffisante pour permettre la recombinaison. Le grand T de SV40 et celui de Py ont des propriétés très semblables et leurs séquences en acides aminés possèdent plus de 55% d'homologie (Tooze, 1980).

Une des propriétés communes à toutes les recombinases est leur capacité à se fixer sur l'ADN près du site de recombinaison. Comme on pouvait s'y attendre, le grand T de Py et celui de SV40 sont deux protéines capables de se fixer sur l'ADN. Les seuls sites de fixation connus, au nombre de 3, sont situés près de l'origine de répllication (Dilworth et al., 1984; voir Introduction). Ceci n'est pas tellement étonnant, cependant, puisque les expériences de fixation ont été surtout limitées à la région virale non-codante. Il n'est donc pas exclu que les protéines en question puissent se fixer à d'autres régions du génome viral, comme par exemple les répétitions virales de 182 pb présentes dans RmI. De plus ces deux protéines ont des besoins semblables en ce qui a trait à leur spécificité de fixation; Scheller et Prives (1985) et Pomerantz et Hassell (1984) ont montré que le grand T de Py était capable de se fixer aux trois sites normalement reconnus par le grand T de SV40, et vice versa.

Si la protéine grand T intervient directement dans le processus de recombinaison, elle doit posséder une activité comparable à celle des topoisomérases, en l'occurrence promouvoir le bris transitoire d'un ou

des deux brins d'ADN et leur réunion subséquente. Giacherio et Hager (1980) ont montré, à partir d'une préparation purifiée de protéine, qu'une activité gyrasique était associée avec la protéine grand T de SV40. A notre connaissance, aucune expérience du même type n'a été faite avec le grand T de Py mais, à la lumière des résultats présentés ici, celle-ci devient impérative. Grand T agirait comme une topoisomérase spécifique de site capable d'initier la réplication virale et de stimuler la recombinaison entre les répétitions de 182 pb. L'un ou l'autre de ces processus pourrait être dépendant de l'hydrolyse d'ATP, comme c'est le cas pour certaines topoisomérases et recombinaisons (Rec A notamment), le grand T de Py possédant in vitro une activité ATPasique (Gaudray et al., 1980).

Expériences futures

Ce travail nous a permis de réaliser à quel point RmI représente un substrat de choix pour l'étude de la recombinaison dans les cellules de mammifères. Plus important encore peut-être, l'élucidation de son mécanisme de recombinaison, bien que très incomplète ouvre la porte à toute une série d'expériences qui sont maintenant devenues nécessaires:

- 1° Spécifier la ou les régions importantes pour la recombinaison dans les répétitions virales de 182 pb, à l'aide de délétions à la Bal 31 ou grâce à la technique de "DNase foot printing" (Galas et Schmitz, 1978), avec des préparations de protéine grand T purifiée.
- 2° Etablir un système de recombinaison in vitro fonctionnant en présence de protéine grand T purifiée.

- 3° Procéder à des délétions spécifiques dans le gène de la protéine grand T pour déterminer le domaine essentiel à la recombinaison.
- 4° Etablir que le grand T de Py est bien capable d'agir comme une topoisomerase.
- 5° Analyser les produits de recombinaison hétérogènes obtenus dans les R1-4 et les ORI-1, pour déterminer les séquences des joints créés lors des événements de recombinaison et les comparer ensuite à la séquence des répétitions virales de 182 pb.

REFERENCES

- 1) Ariga, H. (1984). Replication of cloned DNA containing the Alu family sequence during cell extract-promoting simian virus 40 DNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1476-1482.
- 2) Ariga, H., Tsuchinashi, Z., Naruto, M. and Yamada, M. (1985). Cloned mouse DNA fragments can replicate in a simian virus 40 T antigen dependant system in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 563-568.
- 3) Asselin, C., Gélinas, C., Branton, P.E. and Bastin, M. (1984). Polyoma middle T antigen requires cooperation from another gene to express the malignant phenotype in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 755-760.
- 4) Bauer, W. and Vinograd, J. (1968). The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. I. The superhelix density of SV-40 DNA in the presence and absence of dyes. *J. Mol. Biol.*, 33, 141-171.
- 5) Bernardi, F. and Bernardi, A. (1986). Intramolecular transposition of Is 102. *Gene*, 42, 11-19.
- 6) Birnboim, N.C. and Doly, J. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology*, 100, 243-248.

- 7) Botchan, M., Topp, W. and Sambrook, J. (1979). Studies on simian virus 40 excision from cellular chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 709-719.
- 8) Bourgaux, P., Delbecchi, L., Yu, K.K.Y., Herring, E. and Bourgaux-Ramoisy, D. (1978). A mouse embryo cell line carrying an inducible, temperature-sensitive, polyoma virus genome. Virology, 88, 348-360.
- 9) Bourgaux, P., Sylla, B.S. and Chartrand, P. (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.
- 10) Bradley, M.K., Griffin, J.D. and Livingston, D.M. (1982). Relationship of oligomerization to enzymatic and DNA-binding properties of the SV-40 large T antigen. Cell, 28, 125-134.
- 11) Broach, J.R., Guarascio, V.R. and Jayaram, M. (1982). Recombination within the yeast plasmid 2u circle is site-specific. Cell, 29, 227-234.
- 12) Carlos, M. and Miller, J.H. (1980). Transposable elements. Cell, 20, 579-595.
- 13) Chartrand, P., Gusew-Chartrand, N. and Bourgaux, P. (1981). Integrated polyoma in inducible permissive transformed cells. J. Virol., 39, 185-195.

- 14) Chen, S., Grass, D.S., Blanck, G., Hoganson, N., Manley, J.L. and Pollark, R.E. (1983). A functional simian virus 40 origin of replication is required for the generation of a super T antigen with a molecular weight of 100,000 in transformed mouse cells. *J. Virol.*, 48, 492-502.
- 15) Chen, Y., Maxwell, A. and Westerhoff, H.V. (1986). Co-operativity and enzymatic activity in polymer-activated enzymes. A one-dimensionnal piggy-back binding model and its application to the DNA-dependant ATPase of DNA gyrase. *J. Mol. Biol.*, 190, 201-214.
- 16) Chouick, Y., Volovitch, M. and Yot, P. (1979). A simple and fast electrophoretic method for elution of nucleic acids from cells. *Mol. Biol. Rep.*, 5, 237-239.
- 17) Colantuoni, V., Dailey, L., Della Valle, G. and Basilico, C. (1982). Requirements for excision and amplification of integrated viral DNA molecules in polyoma virus-transformed cells. *J. Virol.*, 43, 617-628.
- 18) Crawford, L.V. (1962). The adsorption of polyoma virus. *Virology*, 18, 177-181.
- 19) Dailey, L. and Basilico, C. (1985). Sequences in the polyomavirus DNA regulatory region involved in viral DNA replication and early gene expression. *J. Virol.*, 54, 739-749.

- 20) Dandolo, L., Blangy, D. and Kamen, R. (1983). Regulation of polyoma virus transcription in murine embryonal carcinoma cells. *J. Virol.*, 47, 55-64.
- 21) Delbecchi, L., Gendron, D. and Bourgaux, P. (1981). Inducible permissive cells transformed by a temperature-sensitive polyoma virus: superinfection does not allow excision of the resident viral genome. *J. Virol.*, 39, 196-206.
- 22) Della Valle, G., Fenton, R. and Basilico, C. (1981). Polyoma large T antigen regulates the integration of viral DNA sequences into the genome of transformed cells. *Cell*, 23, 347-355.
- 23) Dilworth, S.M., Cowie, A., Kamen, R. and Griffin, B.E. (1984). DNA binding activity of polyoma virus large tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1941-1945.
- 24) Dulbecco, R. and Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8, 396-397.
- 25) Eckhart, W. (1969). Complementation and transformation by temperature-sensitive mutants of polyoma virus. *Virology*, 38, 120-125.
- 26) Eckhart, W. (1974). Properties of temperature-sensitive mutants of polyoma virus. *Cold Spring Harbor Symp.*, 39, 37-40.

- 27) Fiers, W., Contreras, R., Haegeman, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuver Swyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaeri, G. and Ysebgert, M. (1978). Complete nucleotide sequence of SV-40 DNA. *Nature (London)*, 273, 119.
- 28) Folger, K.R., Thomas, K. and Capecchi, M.R. (1985). Nonreciprocal exchanges of information between DNA duplexes coinjected into mammalian cell nuclei. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 59-69.
- 29) Freifelder, D. (1983). *Molecular biology. A comprehensive introduction to prokaryotes and eucaryotes.* Jones and Bartlett Publishers, Inc., Boston.
- 30) Fried, M. (1965). Cell transforming ability of a temperature-sensitive mutant of polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 53, 486-491.
- 31) Fried, M. (1970). Characterisation of a temperature-sensitive mutant of polyoma virus. *Virology*, 40, 605-617.
- 32) Galas, D.J. and Schmitz, A. (1978). DNAase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* 5, 3157-3170.
- 33) Galup, C., Herring-Gillam, E., Sylla, B.S. and Bourgaux, P. (1984). The temperature-sensitive defect in polyoma virus P155 mutant. *Virus Res.* 1, 469-476.

- 34) Garcea, R.L., Raptis, L., Liang, J. and Benjamin, T. (1984). Separating the functions of polyoma's transforming genes. Tumor virus meeting on SV40, Polyoma and Adenoviruses, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 170.
- 35) Gaudray, P., Clertant, P. and Cuzin, F. (1980). ATP phosphohydrolase (ATPase) activity of a polyoma virus T antigen. *Eur. J. Biochem.*, 109, 553-560.
- 36) Giacherio, D. and Hager, L.P. (1980). A specific DNA unwinding activity associated with SV-40 large T antigen. *J. Biol. Chem.*, 255, 8963-8966.
- 37) Gluzman, Y. (1981). SV-40 transformed simian cells support the replication of early SV-40 mutants. *Cell*, 23, 175-182.
- 38) Griffin, B.E. and Dilworth, S.M. (1983). Polyomavirus: an overview of its unique properties. *Adv. Can. Res.*, 39, 183-268.
- 39) Gross, L. (1953). A filterable agent, recovered from AK leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 83, 414-421.
- 40) Gross, L. (1970). *Oncogenic viruses*, 2nd Ed. Pergamon Press, New York.
- 41) Guerry, P., Le Blanc, D.J. and Falkow, S. (1973). General methods for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 116, 1064-1066.

- 42) Hanahan, B. (1983). Studies on transformation of *Escheria coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166, 557-580.
- 43) Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.*, 26, 365-369.
- 44) Howard-Flanders, P., West, S.C. and Stasiak, A. (1984). Role of Rec A protein spiral filaments in genetic recombination. *Nature (London)*, 309, 215-219.
- 45) Hsieh, P., Meyn, M.S. and Camerini-Otero, R.D. (1986). Partial purification and characterization of a recombinase from human cells. *Cell*, 44, 885-894.
- 46) Ito, Y., Brocklehurst, J.R. and Dulbecco, R. (1977). Virus-specific proteins in the plasma membrane of cells lytically infected or transformed by polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 4666-4670.
- 47) Jessel, D., Landau, T., Hudson, J., Lalor, T., Tenen, D. and Livingston, D.M. (1976). Identification of regions of the SV-40 genome which contain preferred SV-40 T antigen binding sites. *Cell*, 8, 535-545.
- 48) Katinka, M. and Yaniv, M. (1983). DNA replication origin of polyoma virus: early proximal boundary. *J. Virol.*, 47, 244-248.
- 49) Kovar, H. and Wintersberger, E. (1985). Homologous recombination of polyoma virus DNA in mouse cells. *Mol. Gen. Genet.*, 199, 146-151.

- 50) Lania, L., Sharon, B. and Fried, M. (1982). Excision of polyoma virus genomes from chromosomal DNA by homologous recombination. *Nature (London)*, 295, 349-350.
- 51) Lebkowski, J.S., Clancy, S. and Calos, M.P. (1985). Simian virus 40 replication in adenovirus-transformed human cells antagonizes gene expression. *Nature (London)*, 317, 169-171.
- 52) Lewis, E.D. and Manley, J.L. (1985). Repression of simian virus 40 early transcription by viral DNA replication in human 293 cells. *Nature*, 317, 172-175.
- 53) Lin, F.L., Sperle, K. and Sternberg, N. (1984). Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role of DNA ends in the recombination process. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1020-1034.
- 54) Lusky, M. and Botchan, M. (1981). Inhibition of SV-40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences. *Nature (London)*, 293, 79-81.
- 55) Magnusson, G., Nilsson, S. and Sandberg, G. (1984). Activities of polyoma virus T antigens in lytic infection. Tumor virus meeting on SV40, Polyoma and Adenoviruses Meeting, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 211.
- 56) Mandel, M. and Higa, A. (1970). Calcium-dependant bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, 53, 154.

- 57) Maniatis, T., Jeffrey, A. and Kleid, D.G. (1975). Nucleotide sequence of the rightward operator of phage λ . Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1184-1188.
- 58) McGhee, J.D. and Von Hippel, P.H. (1974). Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. J. Mol. Biol., 86, 469-489.
- 59) Mertz, J.E. and Davis, R.W. (1972). Cleavage of DNA by R1 restriction endonuclease generates cohesive ends. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 3370-3374.
- 60) Miller, J., Bullock, P. and Botchan, M. (1984). Simian virus 40 T antigen is required for viral excision from chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7534-7538.
- 61) Miller, L.K. and Fried, M. (1976). Construction of a genetic map of the polyoma genome. J. Virol., 18, 824-832.
- 62) Miller, C.K. and Temin, H.M. (1983). High-efficiency ligation and recombination of DNA fragments by vertebrate cells. Science, 220, 606-609.
- 63) Mizuuchi, K., Gilbert, M. and Nash, H. (1978). Involvement of super-twisted DNA in integrative recombination of bacteriophage lambda. J. Mol. Biol., 121, 375-392.

- 64) Muller, W.J., Mueller, C.R., Mes, A.-M. and Hassell, J.A. (1983). Polyomavirus origin of DNA replication comprises multiple genetic elements. *J. Virol.*, 47, 586-599.
- 65) Nash, H.A. (1981). Integration and excision of bacteriophage λ : The mechanism of conservative site specific recombination. *Ann. Rev. Genet.*, 15, 143-167.
- 66) Nash, H.A. and Robertson, C.A. (1981). Purification and properties of the *Escherichia coli* protein factor required for λ integrative recombination. *J. Biol. Chem.*, 256, 9246-9253.
- 67) Peden, K.W.C., Pipas, J.M., Pearson-White, S. and Nathans, D. (1980). Isolation of mutants of an animal virus in bacteria. *Science*, 209, 1392-1396.
- 68) Pomerantz, B.J. and Hassell, J.A. (1984). Polyomavirus and simian virus 40 large T antigens bind to common DNA sequences. *J. Virol.*, 49, 925-937.
- 69) Prives, C., Beck, Y. and Shure, H. (1980). DNA binding properties of simian virus 40 T antigens synthesized in vivo and in vitro. *J. Virol.*, 33, 689-696.
- 70) Rassoulzadegan, M., Naghasfar, Z., Cowie, A., Carr, A., Grisoni, M., Kamen, K. and Cuzin, F. (1983). Expression of the 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.

- 71) Rautman, E., Glaichenhaus, N., Nangashfar, Z., Breathnach, R. and Rassoulzadegan, M. (1982). Complementation of tsa mutant and replication of a recombinant DNA carrying the viral ori region in mouse cells transformed by polyoma virus. *Virology*, 122, 306-317.
- 72) Redy, V.B., Thimmappaya, B., Dhar, R., Subramanian, K.N., Zain, B.S., Pan, J., Ghosh, P.K., Celma, M.L. and Weissman, S.M. (1978). The genome of simian virus 40. *Science*, 200, 494.
- 73) Roth, D.B. and Wilson, J.H. (1985). Relative rates of homologous and non-homologous recombination in transfected DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3355-3359.
- 74) Rubnitz, J. and Subramani, S. (1984). The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 2253-2258.
- 75) Sassone-Corsi, P., Wilderman, A. and Chambon, P. (1985). A trans-acting factor is responsible for the simian virus 40 enhancer activity in vitro. *Nature (London)*, 313, 458-463.
- 76) Scheller, A. and Prives, C. (1985). Simian virus 40 and polyomavirus large tumor antigens have different requirements for high-affinity sequence specific DNA binding. *J. Virol.*, 54, 532-545.
- 77) Schöler, H.R. and Gruss, P. (1985). Cell type-specific transcription enhancement in vitro requires the presence of trans-acting factors. *EMBO J.*, 4, 3005-3013.

- 78) Schürmann, C., Montenarh, M., Kohler, M. and Henning, R. (1985). Oligomerization of simian virus 40 tumor antigen may be involved in viral DNA replication. *Virology*, 146, 1-11.
- 79) Singer, B.S., Gold, L., Gauss, P. and Doherty, D.H. (1982). Determination of the amount of homology required for recombination in bacteriophage T4. *Cell*, 31, 25-33.
- 80) Sleight, M.J. and Lockett, T.J. (1985). SV-40 enhancer activation during retinoic acid-induced differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *EMBO J.*, 4, 3831-3837.
- 81) Soeda, E., Arrand, J.R., Smolar, N., Walsh, J. and Griffin, B.E. (1980). Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome. *Nature (London)*, 283, 445.
- 82) Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.
- 83) Sternberg, N. and Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between lox sites. *J. Mol. Biol.* 150, 467-486.
- 84) Subramani, R. and Berg, P. (1983). Homologous and non-homologous recombination in monkeys. *Mol. Cell. Biol.*, 3, 1040-1052.

- 85) Sussman, P.J. and Milman, G. (1984). Short-term, high-efficiency expression of transfected DNA. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1641-1643.
- 86) Sylla, B.S., Bourgaux-Ramoisy, D. and Bourgaux, P. (1980). Induction of viral DNA synthesis in clonal derivatives of a permissive cell line transformed by a temperature-sensitive polyoma virus. *Virology*, 100, 357-369.
- 87) Sylla, B.S., Allard, D., Roy, G., Bourgaux-Ramoisy, D. and Bourgaux, P. (1984). A mouse DNA sequence that mediates integration and excision of polyoma virus DNA. *Gene*, 29, 343-350.
- 88) Sylla, B.S., Huberdeau, D., Bourgaux-Ramoisy, D. and Bourgaux, P. (1984). Site-specific excision of integrated polyoma DNA. *Cell*, 37, 661-667.
- 89) Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L. and Rothstein, R.J. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, 33, 25-35.
- 90) Treisman, R., Novak, U., Favalaro, J. and Kamen, R. (1981). Transformation of rat cells by an altered polyomavirus genome expressing only the middle-T protein. *Nature (London)*, 292, 595-600.

- 91) Tyndall, C., La Mantia, G., Thacker, C.M., Favaloro, J. and Kamen, R. (1981). A region of the polyoma virus genome between the replication origin and the late protein coding sequences is required in cis for both early gene expression and viral DNA replication. *Nucl. Acids Res.*, 9, 6231-6250.
- 92) van der Ploeg, L.H.T. and Flavell, R.A. (1980). DNA methylation in the human globin locus in erythroid and nonerythroid tissues. *Cell*, 19, 947-957.
- 93) Veldman, G.M., Lupton, S. and Kamen, R. (1985). Polyomavirus enhancer contains multiple redundant sequence elements that activate both DNA replication and gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 649-658.
- 94) Villarreal, L.P. and Berg, P. (1977). Hybridization in situ of SV-40 plaques: Detection of recombinant SV-40 virus carrying specific sequences of nonviral DNA. *Science*, 196, 183-185.
- 95) Wachter, M., Riedle, G. and Henning, R. (1985). Functional implications of oligomerization of simian virus 40 large T antigen during lytic virus infection. *J. Virol.*, 56, 520-526.
- 96) Wake, C.T., Vernaleone, F. and Wilson, J.H. (1985). Topological requirements for homologous recombination among DNA molecules transfected into mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 2080-2089.

- 97) Wang, J.C. (1985). DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.*, 54, 665-697.
- 98) Watt, V.M., Ingles, C.J., Urdea, M.S. and Rutter, W.J. (1985). Homology requirements for recombination in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 4768-4772.
- 99) White, B.A. and Bancroft, F.C. (1982). Cytoplasmic dot hybridization. *J. Biol. Chem.*, 257, 8569-8572.