

2m11.2616.3

Université de Montréal

Études des barrières de réplication dans les cellules de mammifères

par

Manon de Ladurantaye

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M.Sc.)
en biologie moléculaire

Mars, 1998

©Manon de Ladurantaye, 1998



QH
506
U54
1998
V.011

Université de Montréal

Étude des formes de réplication dans les cellules de mammifères

par

Martin G. Labèque

Département de biologie cellulaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

1998

Université de Montréal



Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Études des barrières de réplication dans les cellules de mammifères

présenté par:

Manon de Ladurantaye

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Anne-Marie Mes-Masson

Dr Maria Zannis-Hadjopoulos

Dr Pierre Chartrand

Mémoire accepté le: 25 juin 1998

SOMMAIRE

Nos connaissances actuelles nous portent à croire que le génome des cellules de mammifères est organisé dans le noyau sous forme de domaine et que la réplication y est discontinue. Il a aussi été proposé que ces domaines soient des unités de transcription et de réplication. En ce sens, il serait normal de penser que s'il existe plusieurs "domaines" séparés, il existe aussi plusieurs origines de réplication et par conséquent plusieurs terminaisons de réplication pour délimiter ces domaines et ainsi éviter le chevauchement. Cette séparation permettrait entre autre la réplication de gènes à différents moments.

Certaines séquences ont déjà été isolées et celles-ci paraissent correspondre à des frontières de domaine et plus précisément à des barrières de réplication. Chez certaines bactéries, par exemple *E. coli*, on a trouvé une protéine de terminaison qui se lie spécifiquement à une séquence de terminaison et qui empêche le déroulement de l'ADN double brin. D'autres structures similaires ont également été identifiées chez certaines levures, dans le génome du virus Epstein-Barr, dans l'ADN ribosomal de la souris et de l'humain, et dans le gène de l' α -globine du poulet.

Dans une cellule normale de mammifère on peut difficilement suivre la progression des fourches de réplication puisque le ratio d'ADN répliqué vis-à-vis l'ADN non répliqué n'est que de deux pour un. Afin de pallier à cet inconvénient, nous avons utilisé des clones cellulaires qui consistent en un génome du virus polyome thermosensible intégré dans le génome de fibroblastes de rat. La présence du virus polyome nous sert d'outil d'analyse de la réplication puisque son origine de réplication est bien déterminée et

est inductible. De plus, ces séquences virales peuvent se répliquer plusieurs fois par cycle cellulaire, augmentant ainsi le ratio entre l'ADN répliqué et l'ADN non répliqué.

L'étude visait à déterminer s'il y a vraiment des structures qui jouent le rôle de barrières de réplication dans l'ADN génomique des mammifères et si ce rôle est lié au contexte génomique ou est intrinsèque. Lors d'études antérieures faites sur ces mêmes clones, on avait identifié la présence d'ADN courbe de chaque côté du site d'insertion du virus polyome. Compte tenu des rôles potentiels de ce type d'ADN et de ce que l'on connaît sur les barrières de réplication chez les procaryotes et certains eucaryotes, nous avons formulé l'hypothèse que les barrières de réplication chez les mammifères pourraient correspondre à des structures d'ADN courbe.

L'analyse s'est d'abord faite par digestions enzymatiques, électrophorèse et hybridation avec des sondes spécifiques. Ces expériences ont démontré que l'ADN cellulaire adjacent au virus est amplifié par les rondes de réplication multiples de ce dernier, ce qui confirme que les clones utilisés peuvent être de bons outils d'analyse de la réplication chez les mammifères. De plus amples analyses nous ont ensuite démontré un arrêt de la majorité des fourches de réplication à l'intérieur de 10,5 kb de chaque côté du site d'intégration du virus. Cet arrêt en un point déterminé de l'ADN cellulaire constitue donc une forme de barrière et se situe dans la région de l'ADN courbe.

Par la suite, nous avons vérifié si le rôle de barrière de réplication de cette séquence lui était intrinsèque ou était lié au contexte génomique. Pour

ce faire, nous avons introduit la séquence en question dans un plasmide puis nous avons observé sa réplication. Cette analyse a été réalisée par gel en deux dimensions et les résultats ont montré des évidences de barrières de réplication. Tous ces résultats demandent à être confirmés mais constituent tout de même de nouvelles données en vue de la meilleure compréhension du processus de la réplication chez les mammifères. Les barrières pourraient aussi être fort utiles dans la compréhension de certaines maladies où elles pourraient être impliquées.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS	xii
I. INTRODUCTION	1
I.1 Origines de réplication	1
I.2 Organisation des domaines de réplication	2
I.3 Arrêt des fourches de réplication	4
I.4 Exemples de barrières de réplication	4
I.5 Approche expérimentale	9
I.6 But	13
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	14
II.1 Culture cellulaire	14
II.2 Induction	14
II.3 Extraction d'ADN génomique	15
II.4 Digestions enzymatiques	15
II.5 Transfert du matériel génomique ou plasmidique	15
II.6 Marquage des sondes	16
II.7 Hybridation	17
II.8 Transfection	18
II.9 Extraction d'ADN plasmidique	18
II.10 Gel d'agarose en deux dimensions	19
III. RÉSULTATS	20
III.1 Description du système utilisé	20
III.2 Analyse de l'induction de la réplication des génomes du virus polyomes intégrés dans les clones W98.12, W98.14 et 11.6 ...	26
III.3 Analyse du ratio d'ADN exclusivement cellulaire	37

III.4 Analyse plus précise de la propagation de l'amplification de l'ADN cellulaire	48
III.5 Essai extra-chromosomique	61
IV. DISCUSSION	78
V. BIBLIOGRAPHIE	91

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Représentation schématique du modèle de la répllication en “pelures d’oignon” du virus polyome.	11
Figure 2:	Carte physique de la structure du plasmide RM1 linéarisé ainsi que les jonctions RM1-ADN cellulaire clonées pour les clones W98.12, W98.14 et 11.6.	22
Figure 3:	Schéma général représentatif des digestions enzymatiques effectuées sur les clones W98.12, W98.14 et 11.6.	28
Figure 4:	Analyse de Southern des clones W98.12, W98.14 et 11.6 en utilisant la sonde S9.	31
Figure 5:	Analyse de Southern des clones W98.12, W98.14 et 11.6 en utilisant la sonde S10.	33
Figure 6:	Schéma de la cartographie de restriction du clone W98.14 de manière à connaître le ratio d’ADN avant et après l’ADN courbe.	39
Figure 7:	Analyse de Southern du clone W98.14 en utilisant la sonde cellulaire S3.	42
Figure 8:	Analyse de Southern du clone W98.14 en utilisant la sonde cellulaire S4.	44
Figure 9:	Schéma de la cartographie de restriction du clone W98.14 de manière à cerner la zone d’arrêt de l’amplification.	49
Figure 10:	Analyse de Southern plus précise du clone W98.14 en utilisant la sonde cellulaire S3.	52
Figure 11:	Analyse de Southern plus précise du clone W98.14 en utilisant la sonde cellulaire S4.	54

Figure 12:	Courbe schématique représentative de l'amplification de l'ADN cellulaire relatif à la distance de la jonction 5' du virus polyome.	57
Figure 13:	Courbe schématique représentative de l'amplification de l'ADN cellulaire relatif à la distance de la jonction 3' du virus polyome.	59
Figure 14:	Carte physique de la structure du plasmide p14L.	62
Figure 15:	Analyse de Southern du plasmide p14L digéré par <i>DpnI</i> en utilisant la sonde cellulaire S3.	66
Figure 16:	Exemples schématisés de résultats possibles selon la méthode de gel en deux dimensions de Brewer et Fangman.	69
Figure 17:	Analyse de Southern du plasmide p14L recueilli 8 h après transfection en cellules MOP-8, obtenu par la méthode de gel en deux dimensions et en utilisant la sonde S3.	72
Figure 18:	Analyse de Southern du plasmide p14L recueilli 48 h après transfection en cellules MOP-8, obtenu par la méthode de gel en deux dimensions et en utilisant la sonde S3.	74

LISTE DES ABRÉVIATIONS

%	pourcentage
°C	degré(s) Celsius
μCi	micro Curie
μg	microgramme(s)
μL	microlitre(s)
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
cm	centimètre(s)
cm ²	centimètre(s) carré
dCTP	désoxycytidine 5'-triphosphates
DEAE	diethylaminoethyl
EDTA	éthylène diamine tétraacétate
g	gramme(s)
h	heure(s)
kb	kilopaire(s) de base
L	litre(s)
M	molaire(s)
mg	milligramme(s)
min	minute(s)
mJ	millijoule(s)
mL	millilitre(s)
mm	millimètre(s)
mM	millimolaire(s)
mmol	millimole(s)
ng	nanogramme(s)
nm	nanomètre(s)
pb	paire(s) de base
SDS	sodium dodecyl sulfate
SET	tampon sodium tris-EDTA
SSC	tampon sodium, sodium citrate
TBE	tampon tris, acide borique, EDTA
TCA	acide trichloroacétique
TE	tris-EDTA
U	unité(s)
U.V.	ultraviolet(s)
Ci	Curie
V	volt(s)

**À ma famille,
mes parents
et à Denis**

REMERCIEMENTS

Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr Pierre Chartrand, sans qui ce mémoire n'aurait pas vu le jour, pour le temps qu'il a su m'accorder, sa supervision éclairée, ses encouragements incessant et la confiance qu'il m'a témoignée. Je tiens aussi à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont collaboré à mon apprentissage.

Sincères remerciements à tous les membres du laboratoire pour leurs encouragements, leurs conseils, leur support, leur bonne humeur et les bons moments passés ensemble. Plus particulièrement à Marie-Josée, Roxanne, Benoit, Ivan, Nathalie, Annie et Nadine pour leur soutien et leur aide tout au long de mon séjour parmi eux. Merci aussi, à tous les gens de l'Institut du cancer pour leur accueil chaleureux et leur précieux conseils.

Merci et au revoir

I. INTRODUCTION

De nos jours, on comprend de mieux en mieux le processus de la réplication de l'ADN chez les mammifères. Ce processus hautement régulé assure la pérennité du matériel génétique. Durant la phase S du cycle cellulaire, l'hélice double brin d'ADN s'ouvre au niveau d'une origine de réplication puis une copie complémentaire de chaque brin est synthétisée. La réplication est bidirectionnelle et semi-conservative¹⁰⁸. Ce processus fait intervenir des interactions protéines-ADN et protéines-protéines.

I.1 Origines de réplication

La nature de l'interaction protéines-ADN au niveau de l'origine de réplication dans les cellules de mammifère est encore mal définie. À ce jour, aucune séquence d'origine de réplication n'a été identifiée comme tel (les essais de réplication chez les mammifères n'ont pas révélé l'existence, hors de tous doutes, d'un site spécifique d'initiation de la réplication^{18,28,36,37,47,60,61} (pour un résumé voir Hamlin *et al.*⁴¹ et DePamphilis *et al.*²⁶). Il se pourrait que cela implique des protéines spécifiques à des endroits spécifiques ou encore que cela implique des structures particulières, des conformations d'ADN particulières. Certains résultats tendent vers cette dernière hypothèse (plusieurs exemples sont résumés dans les articles de Pearson *et al.*⁹⁰, T. Boulikas *et al.*¹¹ et Lapidot *et al.*⁶⁴).

Par exemple, les éléments répétés inversés, les "stem-loops" et les structures cruciformes sont présents aux origines de réplication de plusieurs

organismes tels que les plasmides, les virus eucaryotes et les cellules de mammifères. Des expériences ont mené à penser que ces éléments, plus particulièrement les structures cruciformes, pourraient jouer un rôle dans l'initiation de la réplication^{109,110,111}. Des protéines interagissant avec ces structures ont été identifiées et elles reconnaissent des éléments tels que les "crossovers", les jonctions à quatre brins et l'ADN courbe. Toutes ces structures influencent l'interaction des protéines⁹⁰.

Certaines régions plus spécifiques ont été identifiées comme étant des origines de réplication, comme par exemple les séquences répliquatives autonomes chez les levures^{14,30,112} (les "ARS"), ou encore une région spécifique du gène de la réductase dihydrofolate^{45,46} (le "DHFR"). Certains patrons de méthylation pourraient aussi jouer un rôle dans l'initiation de la réplication⁹⁴. Les éléments structuraux tels que les structures secondaires de l'ADN, les dommages à l'ADN et les sites de liaison occupés par des protéines pourraient aussi modifier le rythme de progression des fourches⁷.

I.2 Organisation des domaines de réplication

En ce qui concerne la réplication, le génome des cellules de mammifères est organisé dans le noyau sous forme de domaines, c'est-à-dire, en unités de réplication quasi-indépendantes^{44,46,54,84}. Les premières évidences ayant d'abord mené à cette hypothèse sont, premièrement, que la longueur totale de l'ADN dans les chromosomes des organismes supérieurs est si grande qu'elle suggère en elle-même plusieurs unités de réplication. En effet, la vitesse de réplication des polymérase, même les plus rapides, est telle qu'un seul complexe de réplication ne pourrait pas répliquer l'ADN

total dans l'intervalle des temps de réplication connus de plusieurs organismes. Le deuxième point est que, lors d'essais d'incorporation de thymidine tritiée, celle-ci s'incorpore en plusieurs endroits différents d'un même chromosome et cela en un temps très court⁵⁴. Il y aurait donc plusieurs origines de réplication (au moins une par domaine), ce qui a d'ailleurs maintenant été démontré^{22,29}.

Il est maintenant aussi connu que les origines ne sont pas toutes activées au même moment²². Si certaines fourches semblent être arrêtées pendant un moment puis repartir⁶³, dans d'autres cas il est clair qu'il s'agit d'une nouvelle initiation^{22,44}.

On estime que chaque domaine de réplication chez les mammifères aurait entre 50 et 300 kb⁴⁰. De plus, il y aurait plusieurs milliers de domaines de réplication par chromosome qui seraient tous activés à un temps déterminé dans la phase S du cycle de la cellule⁴⁶ (environ entre 10^3 et 10^5 chez les eucaryotes⁴³). Ainsi, il y a des gènes répliqués de façon précoce et d'autres de façon tardive. Un fait intéressant cependant, est que les deux types de gènes peuvent être intercalés¹⁰. C'est pourquoi, il est normal de penser qu'il existe un processus, qui délimite les domaines de réplication pour empêcher leur chevauchement et permettre à certaines régions d'être répliquées avant d'autres.

I.3 Arrêt des fourches de réplication

Malgré qu'il y ait eu beaucoup de travaux sur les origines de réplication^{ex.14,28,45}, on connaît très peu les processus d'élongation et d'arrêt des fourches. Or, pour bien comprendre le processus de réplication de l'ADN dans les cellules de mammifères, la caractérisation des unités de réplication ainsi que de tous ses éléments de contrôle est très importante. L'arrêt de la réplication est important non seulement parce qu'il peut constituer une étape de régulation supplémentaire de la réplication des chromosomes mais aussi parce qu'il est probable qu'il ait un rôle dans la coordination de la réplication de l'ADN avec la division cellulaire. En effet, la coordination précise entre l'activation de sites multiples d'initiation de la réplication, la progression des fourches et l'arrêt de celles-ci a des implications importantes pour ordonner la division cellulaire¹⁰. La capacité d'un complexe ADN-protéines à arrêter la réplication en empêchant la progression des fourches peut servir de moyen de régulation du synchronisme de la réplication durant la phase S, de la grandeur du réplicon, de l'activation d'une origine voisine sur le chromosome²⁷, de la stabilité de l'ADN⁷ pour faciliter la recombinaison^{7,68} et pour empêcher la formation de multimères³.

I.4 Exemples de barrières de réplication

En ce sens, il y a déjà des évidences de l'existence de séquences pouvant bloquer la progression des fourches de réplication. Chez les procaryotes comme *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et le plasmide *R6K*,

l'arrêt des fourches de réplication se fait à des séquences déterminées d'ADN^{27,71}.

Chez *E. coli*, on a trouvé une protéine de terminaison^{3,55,57,62} (*ter* codée par le gène *Tus*) qui se lie à une séquence spécifique d'ADN et qui empêche l'ouverture de l'hélice double brin⁸⁵. On a identifié jusqu'ici au moins quatre séquences de terminaison de la réplication soit *ter* C1, *ter* C2, *ter* C3 et *ter* C4⁶². Elles se situent à 180° de l'origine de réplication. L'arrêt est polaire, c'est-à-dire qu'une séquence de terminaison liée par la protéine *ter* arrête les fourches de réplication provenant d'un seul côté^{49,50}. Cependant, les séquences de terminaison sont disposées en deux groupes opposés de façon à former une "trappe" qui arrête donc les fourches provenant des deux côtés. Il a été démontré que l'arrêt est vraiment causé par la liaison de la protéine à l'ADN⁵⁷. Cette protéine est une contra-hélicase qui lie une séquence d'ADN spécifique⁵⁶. Elle empêche le déroulement ATP-dépendant d'un double brin d'ADN lorsqu'elle est liée à sa séquence de liaison^{3,95}. La polarité de l'arrêt est déterminée par l'orientation de la séquence de liaison présente dans le substrat d'ADN de l'hélicase. Ceci s'explique par le fait que, lors du déroulement, *ter* semble s'associer à un brin spécifique de la séquence seulement^{56,74}.

Chez *B. subtilis*, on a aussi trouvé une protéine de liaison (RTP: "replication terminator protein") et des séquences de terminaison disposées en deux groupes opposés^{62,66,89}. Le complexe d'arrêt est très semblable à celui de *E. coli*^{50,98} excepté que la protéine de liaison se lie sous forme de deux homodimères par séquence alors que *ter* de *E. coli* se lie sous forme de monomère^{19,55,59,75,96}.

Pour le plasmide *R6K*, l'arrêt des fourches *in vitro* aux sites de terminaison a d'abord été démontré par Germino et Bastia⁶. Ces séquences se sont montrées hautement homologues aux séquences correspondantes de *E. coli*⁴⁹. Ainsi, la protéine *ter* montre une affinité spécifique aux séquences de terminaison du plasmide *R6K* et l'interaction entre cette protéine et les séquences est essentielle à l'arrêt⁵⁷.

On a également trouvé ce genre de séquences chez les levures. Dans l'ADN ribosomal de *Sacharomyces cerevisiae*^{16,67,72}, plus particulièrement, on a démontré qu'elles causent un arrêt polaire des fourches de réplication et cela même lorsqu'elles sont intégrées dans un plasmide. On a aussi démontré que cet arrêt n'est pas dû à la rencontre de la fourche de réplication avec celle de la transcription puisqu'entre autre la barrière persiste même lorsque la polymérase ARN est non fonctionnelle¹⁷. Une protéine y est probablement aussi impliquée puisque l'arrêt ne persiste pas lorsque le plasmide contenant la "séquence de terminaison" est introduite dans des cellules de *E. coli* mais cette protéine n'a pas encore été identifiée.

Des structures similaires pouvant jouer le rôle de barrière de réplication ont d'ailleurs été identifiées chez le virus *Epstein-Barr* (EBV). Le génome de ce virus contient une ou deux copies de l'origine de réplication lytique (*oriLyt*) et une copie de *oriP* qui permet à l'ADN viral de se répliquer de façon autonome. *OriP* est donc l'origine de réplication fonctionnelle au stade latent de l'infection⁹². Cette origine de réplication est formée de deux éléments, un élément à motifs symétriques et un élément de répétition directe. On a identifié le site de l'initiation de la réplication à

l'intérieur ou très près de l'élément à motifs symétriques alors que l'élément de répétition directe contient une barrière de réplication et un site de terminaison de la transcription. Ceci implique que la réplication provenant de cette origine est unidirectionnelle puisqu'une des deux fourches est bloquée dès son départ³³. On a identifié une protéine virale (EBNA-1) qui lie les séquences répétitives en tandem localisées au site d'arrêt. Il y aurait environ 20 séquences répétitives de 30 pb et chacune d'elles contiendrait deux sites d'arrêt. Cependant, six séquences répétitives seraient suffisantes pour effectuer l'arrêt. Comme chez les procaryotes et les levures, l'arrêt est polaire. De plus, un arrêt efficace dépend vraiment de la liaison de EBNA-1 puisque l'arrêt est empêché par l'ajout d'un compétiteur contenant les séquences répétitives EBV mais demeure inchangé avec l'ajout d'un compétiteur non-spécifique²⁷. Ces séquences répétitives en tandem seraient, selon Hill⁵¹, très importantes pour le maintien du génome viral et elles formeraient aussi un "enhancer" de la transcription⁶⁹.

Dans l'ADN ribosomal de souris³⁵ et de l'humain⁶⁸, on a identifié des unités répétées près du site de terminaison de la transcription. Dans l'ADN ribosomal de souris, cette barrière force la réplication bidirectionnelle à suivre la même direction que la transcription. La barrière est polaire et organisée en plusieurs éléments dont la boîte *Sal*, un élément reconnu par le facteur de terminaison de la transcription, et des séquences flanquantes spécifiques. Plusieurs délétions ou mutations du domaine de terminaison de la transcription abolissent l'activité de la barrière de réplication. De ce fait, le même facteur bloquant l'élongation de l'ARN polymérase I prévient la collision entre le complexe de réplication et de

transcription³⁵. Dans l'ADN ribosomal humain, les fourches de réplication provenant des deux côtés sont bloquées dans la région des unités répétées. Cette région contient des sites de liaison à des protéines qui pourraient être impliquées dans l'arrêt de la réplication. Ces dernières jouent déjà un rôle dans l'arrêt de la transcription ribosomal chez la souris, le rat et l'humain⁶⁸. Il s'agirait donc aussi d'un arrêt de la réplication à un site spécifique dans une région de terminaison de la transcription.

D'autre part, un site d'arrêt de la réplication a été identifié à une extrémité du domaine des gènes de la α -globine des cellules érythroïdes du poulet¹⁰⁴. Une origine de réplication a d'abord été identifiée entre 2,5 et 8,5 kb en amont du gène π , le premier gène du domaine⁹³. Tout le domaine est répliqué à partir de cette origine dans la même direction que la transcription. La barrière de réplication, quant à elle, a été identifiée tout juste en aval du dernier gène du domaine (gène α^A), à environ 12 kb de l'origine. Selon des études antérieures, les sites d'arrêt de l'ARN polymérase I pourraient servir de sites de barrières de réplication^{35,58,68}. Avec ces nouvelles données chez le poulet, il est maintenant possible que ce soit aussi le cas pour l'ARN polymérase II¹⁰⁴.

Les résultats obtenus à ce jour pour les organismes supérieurs suggèrent que les sites de terminaison de la transcription, du moins dans certains cas, pourraient être impliqués dans l'arrêt de la réplication. Cependant, il n'est pas clair que ceci soit un phénomène particulier ou général. De fait, les liens entre les unités génomiques de transcription, de réplication et les unités organisationnelles physiques sont encore indéterminés.

I.5 Approche expérimentale

L'analyse de la réplication chez les mammifères est en soi rendue très difficile par le fait qu'on connaît très peu de choses sur l'emplacement spécifique des origines de réplication et que, de plus, l'ADN est répliqué une seule fois par cycle cellulaire. Ces deux facteurs imposent de grandes limites à notre capacité de suivre le devenir d'une fourche de réplication. Pour contourner ce problème on a souvent eu recours à des virus tels que le virus polyome^{4,5} et SV40^{35,83}. Ces procédés peuvent s'avérer très avantageux pour l'étude de la réplication. Par exemple, le virus polyome possède une origine de réplication bien déterminée et peut, lorsqu'il est intégré au génome de la cellule hôte, se répliquer jusqu'à dix fois par cycle cellulaire. Ceci est très avantageux puisque dans une cellule eucaryote normale, le ratio ADN répliqué et non-répliqué n'est que de deux pour un, ce qui est très difficile à détecter avec les techniques actuelles. L'utilisation du virus polyome permet donc de différencier l'ADN répliqué de l'ADN non répliqué⁵. De plus, il demeure beaucoup de questions sur les origines de réplication chez les mammifères alors que celle du virus polyome est beaucoup mieux connue⁸¹.

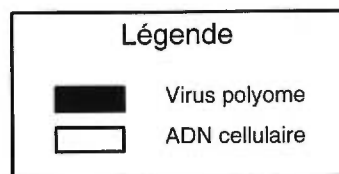
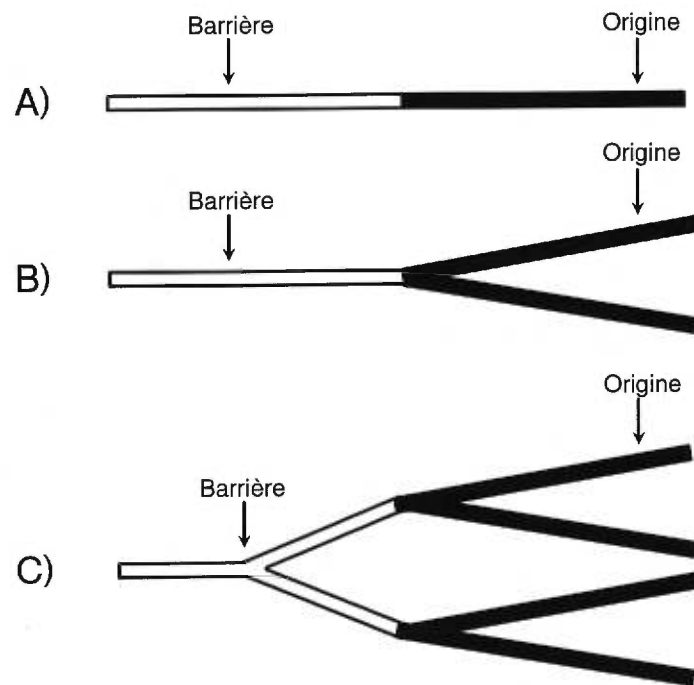
Ainsi, les virus sont de bons outils pour l'étude de la réplication chez les eucaryotes d'autant plus qu'ils utilisent les protéines de leur hôte. En fait, le virus polyome doit se répliquer de façon très comparable à celle des mammifères puisqu'il utilise le même système à l'exception de l'antigène Grand T¹. Le virus polyome, lorsqu'il est intégré dans un génome, se réplique selon le modèle de pelures d'oignon proposé par Botchan *et al.*⁸ (voir la figure 1). Selon ce modèle, des rondes de réplication

bidirectionnelle multiples sont initiées à l'origine virale et les fourches de réplication se déplacent dans des directions opposées dans l'ADN cellulaire flanquant.

Le virus polyome est un très petit virus de seulement 5 kb à ADN circulaire bicaténaire. Il fait partie de la famille des papovavirus et peut se multiplier dans un grand nombre de cellules de rongeurs³⁸. Le virus polyome utilise tout l'appareil cellulaire pour se répliquer à l'exception de son antigène Grand T qui lui sert de protéine d'initiation de la réplication et d'ADN hélicase. Cela permet d'éviter le blocage normal de la réplication de l'ADN et de se répliquer plus rapidement que la cellule. L'antigène Grand T, en multiple copies, se lie spécifiquement à l'origine du virus polyome et agit comme protéine d'initiation et comme ADN hélicase pour ouvrir l'hélice d'ADN. Un complexe d'ADN polymérase et d'ADN primase, fourni par la cellule hôte, se lie ensuite à un seul brin de l'ADN exposé au niveau de l'origine pour démarrer la synthèse d'ADN.

Figure 1: Représentation schématique du modèle de la réplication en “pelures d'oignon” du virus polyome.

Exemple illustrant le mode de réplication d'un virus polyome intégré dans le génome d'une cellule selon le modèle de Botchan⁸. La figure représente ce processus à partir d'un fragment comportant de l'ADN cellulaire flanquant la jonction d'intégration, qui contiendrait une barrière de réplication, et une partie du virus portant l'origine de réplication. Seule la progression du côté 5' est représentée (la réplication étant bidirectionnelle, ce phénomène se produit des deux côtés de l'origine). En A, on peut voir la représentation du fragment avant réplication. En B, on voit une première fourche de réplication qui est amorcée et qui progresse vers l'ADN cellulaire. En C, cette première fourche atteint la barrière de réplication et s'y arrête alors qu'une deuxième fourche a été amorcée. Cette deuxième fourche atteindra aussi la barrière où elle sera arrêtée alors qu'une troisième, une quatrième etc. fourches seront amorcées et se rendront aussi à la barrière. L'arrêt des fourches de chaque côté de l'origine cause une accumulation de brins d'ADN qui forme une structure en “pelures d'oignon” d'où le nom du modèle. Cette figure a été adaptée de l'article de Baran *et al.*⁴.

Figure 1

I.6 But

Toutes les évidences de l'existence des barrières de réplication chez les procaryotes et certains eucaryotes, combinées à tout ce que l'on connaît sur la réplication chez les mammifères, suggèrent qu'il y aurait aussi des barrières dans les cellules de mammifères. De plus, les travaux antérieurs de notre laboratoire^{86,107} suggèrent que la réplication d'un virus polyome intégré permettrait de suivre les fourches de réplication ainsi que les arrêts potentiels de celles-ci. Le but du projet dont il est question ici est donc précisément de savoir s'il existe des barrières de réplication dans les cellules de mammifères et de déterminer la nature de ces dernières.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1 Culture cellulaire

Les clones W98.12, W98.14¹⁰⁷ et 11.6⁸⁶ sont maintenus en culture à 39°C dans du milieu DMEM/F-12 (“Dulbecco’s modified Eagle’s medium : Nutrient Mixture F-12 (Ham)(1:1)”) avec 4,5 g/L de glucose et on y ajoute 10% de sérum fœtal de veau décomplémenté (Multicell) ainsi que 50 µg/mL de gentamycine et 0,29 mg/mL de L-glutamine.

Les cellules MOP-8⁸² (ATCC No.:CRL 1709) ont été maintenues en culture à 37° C dans du milieu DMEM (“Dulbecco’s modified Eagle’s medium”) avec 4,5 g/L de glucose, 10% de sérum fœtal de veau décomplémenté (Multicell) ainsi que 50 µg/mL de gentamycine et 0,29 mg/mL de L-glutamine.

II.2 Induction

Les clones W98.12, W98.14 et 11.6 ont été ensemencés à raison de $1,5 \times 10^6$ cellules par pétri de 60 mm. Le milieu est remplacé, 24 heures plus tard, par du milieu contenant de la mitomycine C (Boehringer Mannheim, 1 µg/mL) et les cellules sont placées à 33°C. Le milieu est remplacé, une heure plus tard, par du milieu sans mitomycine C et les cellules sont gardées à 33° C pendant 72 heures.

II.3 Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique des cellules a été extrait en utilisant la méthode de digestion à la protéinase K suivit par une extraction avec phénol saturé puis phénol-chloroforme-isoamylalcool (25:24:1) et une fois avec du chloroforme-isoamylalcool (24:1) tel que décrit précédemment¹⁰⁵.

II.4 Digestions enzymatiques

Lors des digestions de l'ADN cellulaire ou plasmidique avec des enzymes de restriction, la formule de 5U d'enzyme/ μ g d'ADN a été utilisée (sauf dans le cas de *DpnI* où l'on a utilisé 1U d'enzyme/ μ g d'ADN seulement). Les enzymes *BamHI*, *BglIII*, *DpnI*, *EcoRI*, *HincII*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI* et *PvuII* ont été utilisées selon les conditions recommandées par les manufacturiers (NEB, Amersham, Pharmacia ou Gibco BRL, selon le cas).

II.5 Transfert du matériel génomique ou plasmidique

L'ADN a été digéré par les différentes enzymes de restriction et fractionné sur la base de la longueur des fragments par électrophorèse selon Chartrand *et al.*²⁰, puis l'ADN a été transféré sur membrane de nylon (Hybond-N+ de Amersham) selon la technique de Southern¹⁰¹. Un pré-traitement est fait afin de dénaturer l'ADN et ainsi augmenter l'efficacité de transfert. Le gel est trempé 20 min dans une solution alcaline (0,4M NaOH,

1,5M NaCl). Par la suite, le transfert doit s'effectuer de 4 à 24 heures dans la même solution. L'ADN est ensuite lié à la membrane de façon irréversible par irradiation aux U.V. 254 nm à l'aide d'une dose de 120 mJ/cm² et d'un appareil Stratalinker (Stratagene). La membrane Hybond-N+ étant chargée, l'ADN s'y fixe de façon irréversible.

II.6 Marquage des sondes

L'ADN (environ 20 ng) est marqué à l'aide de 25 µCi du radio-isotope (α -P32) dCTP (3000 Ci/mmol)(Amersham, reedivue) par la réaction d'amorçage à l'aide d'hexamères. Le fragment "Klenow" de la polymérase I est utilisé à cette fin⁷³. La sonde est ensuite passée sur colonne de Sephadex G-50 Nick (Pharmacia) pour séparer les radio-isotopes et les fragments marqués. Le pourcentage de récupération est calculé par la méthode au TCA 10%⁷³.

Les fragments d'ADN utilisés pour faire ces sondes étaient préalablement purifiés sur gel d'agarose et extraient selon la technique de "phenol crush". La méthode consiste à découper la bande d'ADN désirée sur le gel, la découper en morceaux fins et lui ajouter un volume de phénol puis vortexer. Ensuite, on congèle le tube à -80°C, on le laisse dégeler à 37°C et on centrifuge 10 min à la température de la pièce. Le surnageant est ensuite extrait une fois avec phénol-chloroforme-isoamylalcool (25:24:1) et une fois avec du chloroforme-isoamylalcool (24:1) avant d'être précipité à l'éthanol⁷³ et resuspendu dans 30 µL de TE.

II.7 Hybridation

Afin d'éliminer les sites libres de la membrane de nylon sur lesquels la sonde pourrait se fixer et créer un bruit de fond, les membranes sont préhybridées avec la solution de préhybridation (4X SET, 0,1% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, 0,5% SDS, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'héparine) ou la solution "skim milk" (4% SSC, 7% formamide, 0,7% SDS, 1,5 mM EDTA, 0,7% lait écrémé, 7,5% sulfate dextran) pendant environ 4 heures. La préhybridation tout comme l'hybridation est effectuée à 65° C en bouteille dans un appareil HYBAID (InterScience). Une fois la membrane préhybridée, elle est ensuite mise en présence d'une sonde radioactive. La solution d'hybridation utilisée est la solution d'hybridation avec sulfate dextran (4X SET, 0,1% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, 0,5% SDS, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'héparine et 10% de sulfate dextran) ou encore avec la solution "skim milk". Pour l'hybridation en HYBAID, 15 mL de solution de préhybridation ou d'hybridation avec sulfate dextran ou 27 mL de solution "skim milk" sont utilisés par bouteille de grandeur moyenne.

La concentration des sondes utilisées est de 1-2 ng/mL de solution pour 1 ou 2 membranes. La séquence de la sonde, ayant été préalablement dénaturée à 100° C pendant 5 min puis mise sur glace 3 min pour empêcher la renaturation, peut alors s'apparier avec son homologue génomique ou plasmidique sur la membrane pour une période de 12 à 24 heures. Ensuite, on procède à des lavages pour éliminer le surplus de sonde: trois fois pendant 20 min avec la solution 1X SSC, 0,1% SDS et trois fois 20 min avec la solution 0,3X SSC, 0,1% SDS toujours à 65° C. Le degré de

stringence de la solution est inversement proportionnel à sa concentration en sels et proportionnel à la température utilisée.

Ensuite un rinçage avec une solution peu stringente de 2X SSC est faite pour éliminer les traces de SDS. On scelle alors les membranes humides dans un sac pour les exposer à -80°C sur un film radiographique (Fuji Medical X-Ray film) et on expose de 2 à 96 heures en présence d'écrans intensifiants.

II.8 Transfection

Les cellules ont étéensemencées à raison de 5×10^5 cellules par pétri de 60 mm, 24 heures avant la transfection. La transfection a été faite selon le protocole au DEAE-Dextran²³ avec 1 μg d'ADN plasmidique.

II.9 Extraction d'ADN plasmidique

Ces extractions ont été effectuées selon la méthode de Hirt⁵³. Par la suite l'ADN est purifié par phénol-chloroforme-isoamylalcool (25:24:1) et chloroforme-isoamylalcool (24:1) avant d'être précipité à l'éthanol⁷³ et resuspendu dans 100 μL d' H_2O .

II.10 Gel d'agarose en deux dimensions

Des fragments de restriction de 5 à 25 kb ont été mis sur gel en deux dimensions selon la méthode de Brewer et Fangman^{14,16} avec des modifications basées sur celles apportées par le groupe de Little⁶⁸ pour de grands fragments. Les fragments sont d'abord séparés sur gel d'agarose de 0,28% (Bio-Rad high-strength analytical grade) dans du tampon TBE (89 mM Tris-HCl [pH 8], 89 mM acide borique, 2 mM EDTA) à température de la pièce. La migration a été effectuée à environ 0,84 V/cm de 96 à 120 h. Ensuite les gels ont été colorés au bromure d'éthidium (environ 0,3 µg/mL de TBE pour 15 min) et le puit contenant le marqueur de poids moléculaire a été photographié. Le puit de l'échantillon a été découpé, sans être exposé aux U.V., tourné de 90° et placé au haut d'un autre support à gel d'électrophorèse. Ensuite, on verse de l'agarose 0,58% contenant 0,3 µg de bromure d'éthidium par mL dans du TBE. Les conditions pour la deuxième dimension ont été de 0,89 V/cm de 48 à 72 h à température de la pièce dans du TBE.

III. RÉSULTATS

III.1 Description du système utilisé

Pour procéder à l'analyse de la progression des fourches de réplication et éventuellement des barrières de réplication dans le génome d'une cellule de mammifère, il nous fallait pouvoir vraiment suivre ces fourches. Pour cela nous devons avoir une origine de réplication inductible à un emplacement déterminé. Il nous fallait aussi multiplier les événements de réplication pour obtenir un ratio ADN répliqué/ADN non répliqué assez grand pour que la différence soit facilement détectable. C'est en ce sens que nous avons utilisé un génome du virus polyome puisque celui-ci possède effectivement une origine de réplication à emplacement déterminé et que celle-ci peut être inductible. De plus, un génome de virus polyome intégré dans le génome de la cellule hôte peut, sous certaines conditions, faire des rondes de réplication multiples³².

Pour contrôler l'activation de l'origine du virus polyome, nous avons utilisé un génome du virus polyome encodant une protéine antigène Grand T thermosensible¹² (tsp 155). Donc, à 39°C son antigène Grand T est non fonctionnel alors qu'à 33°C il est fonctionnel. Ceci implique qu'à 39°C, le virus polyome ne peut se répliquer par lui-même tandis qu'à 33°C, il peut se répliquer plusieurs fois par cycle cellulaire. Cela nous permet donc de choisir quand et pendant combien de temps l'origine du virus polyome intégré dans un génome de cellule de mammifère sera active. Des cellules de mammifères contenant une copie du génome du virus polyome intégré

dans leur propre génome nous permettraient ainsi de bien suivre les fourches de réplication (ce système a déjà été utilisé entre autre par Baran *et al.*⁴). Or, de tels clones avaient été construits dans notre laboratoire pour des études antérieures^{86,107}. Cependant, nous tenons à préciser que le génome du virus polyome sert seulement d'outil d'analyse pour mieux suivre les fourches de réplication mais les barrières de réplication, elles, sont recherchées dans l'ADN cellulaire.

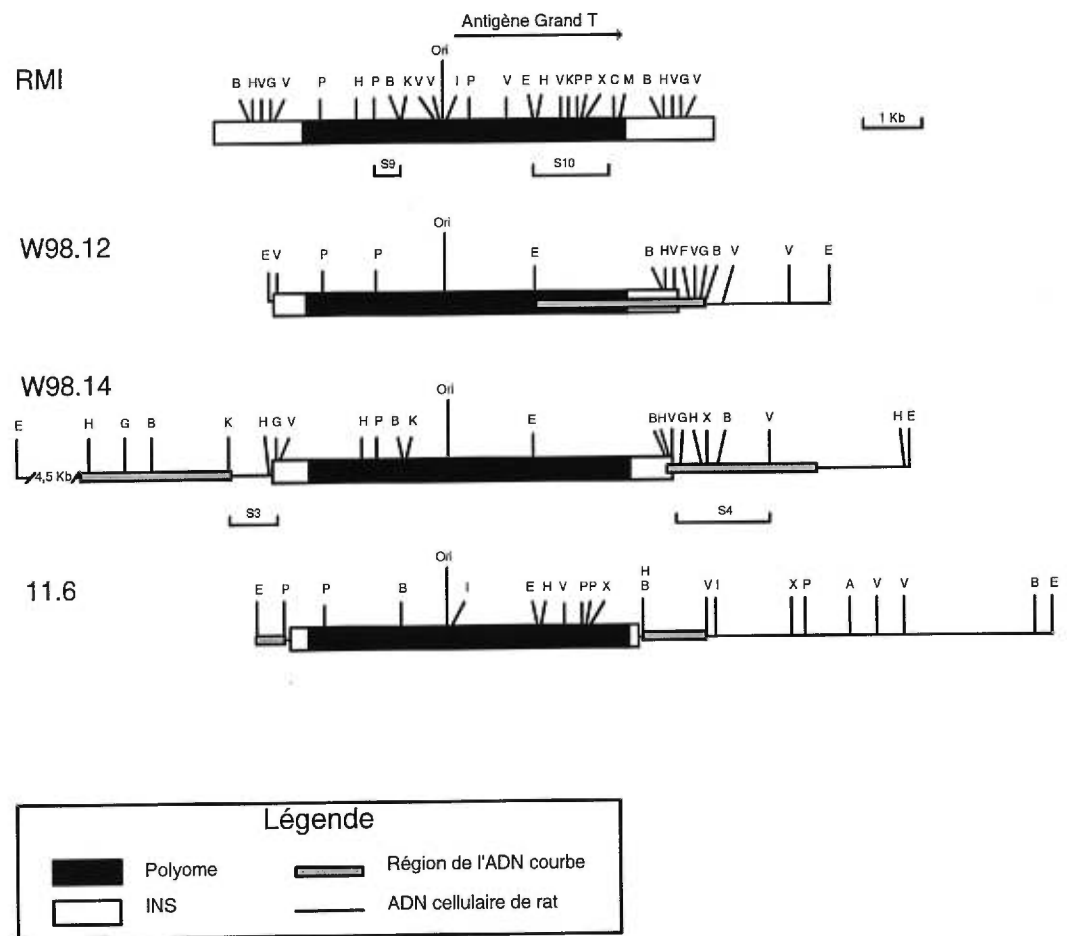
Des clones de fibroblastes de rats (FR3T3) comportant une seule copie du génome viral intégré ont été générés^{86,107}. Ce génome viral, baptisé RM1, est lui-même un produit circulaire d'excision obtenu suite à l'infection de cellules de souris par un virus polyome thermosensible¹³ (tsp 155) (voir la figure 2). De tels produits d'excision peuvent être obtenus lorsque, spontanément ou suite à une induction, des copies du génome viral se libèrent et se circularisent, en faisant intervenir des mécanismes de recombinaison homologue ou illégitime^{21,91,102}. Dans la plupart des cas, il y a des produits d'excision qui comportent des séquences d'ADN cellulaire flanquant le site d'intégration du génome viral^{13,21,77} (l'excision du virus crée souvent des molécules hybrides contenant au moins l'origine de réplication du virus et des proportions variables d'ADN cellulaire flanquant^{8,9,21}). Ainsi, on retrouve dans la molécule RM1 les séquences INS correspondant à de l'ADN génomique de souris^{13,103} (environ 1,6 kb, voir la figure 2).

Les trois clones utilisés pour cette étude (W98.12 et W98.14 produits par John Wallenburg¹⁰⁵, et le clone 11.6 produit par Alain Nepveu⁸⁶) et ayant intégré le génome viral RM1 sont illustrés à la figure 2. Chacun de

Figure 2: Carte physique de la structure du plasmide RM1 linéarisé ainsi que les jonctions RM1-ADN cellulaire clonées pour les clones W98.12, W98.14 et 11.6.

Les clones W98.12, W98.14¹⁰⁵ et 11.6⁸⁶ sont des cellules de rats (FR3T3) dans lesquelles une copie du plasmide RM1¹³ a été intégrée. “Ori” représente l’origine de réplication du virus polyome, “Polyome” indique la séquence du virus polyome thermosensible (tsp 155), “INS” est une insertion d’ADN cellulaire de souris (le INS est dupliqué dans la représentation du RM1 pour les besoins du schéma mais il n’en existe qu’une copie dans la molécule circulaire RM1), “Région de l’ADN courbe” représente une zone dans laquelle une structure d’ADN courbe a été identifiée mais dont l’emplacement exact dans cette région n’est pas déterminé. S3, S4, S9 et S10 sont les sondes utilisées pour ce projet. Enzymes de restriction utilisées: A; *HpaI*, B; *BamHI*, C; *HincII*, E; *EcoRI*, G; *BglII*, H; *HindIII*, I; *BglI*, K; *KpnI*, M; *SmaI*, P; *PstI*, V; *PvuII*, X; *XbaI*. La figure est adaptée d’un article de Wallenburg *et al.*¹⁰⁶.

Figure 2



ces clones porte une copie du génome du virus polyome flanqué de séquences INS de grandeurs variables.

Lors d'études faites à partir de ces trois clones^{86,107}, il a été observé que leurs produits d'excision comportaient peu ou pas d'ADN cellulaire flanquant. C'est-à-dire que dans nos clones l'ADN cellulaire est sous représenté dans les formes excisées du virus. Ce phénomène de faible représentation de l'ADN cellulaire flanquant le virus polyome dans les formes excisées a mené à penser qu'il pourrait y avoir un mécanisme qui bloque la progression des fourches de réplication provenant du virus dans l'ADN cellulaire de rat¹⁰⁷.

Lors d'études subséquentes faites par Milot *et al.*⁷⁸, celui-ci a observé la présence d'ADN courbe en bordure des sites d'intégration du génome du virus polyome. L'ADN courbe est de l'ADN normal mais dans lequel l'assemblage de certaines bases donne une courbure à son axe central. Il est reconnu sur gel électrophorèse puisque cette courbure cause une migration différente d'un fragment linéaire⁷⁸ et réf. citées. Ce genre de structure d'ADN a plusieurs rôles potentiels et a été identifié tant chez les procaryotes que les eucaryotes⁹⁹. Il pourrait, entre autre, précéder certains promoteurs et y être requis pour une transcription efficace⁵². En plus, la force du promoteur pourrait en dépendre^{42,88}. La transcription serait aussi affectée par la conformation de l'ADN courbe à l'intérieur et dans les environs des "enhancers"⁸⁷. L'ADN courbe pourrait aussi avoir un rôle dans le processus de la réplication, notamment celle des virus⁹⁷, puisqu'il a été retrouvé dans les origines de réplication de lambda et SV40⁹⁹. Il est probable qu'il soit aussi impliqué chez d'autres organismes puisque de

l'ADN courbe a été retrouvé dans les séquences répliquatives autonomes ("ARS") des levures² et dans l'ADN ribosomal des pois⁴⁸. Puisque l'ADN courbe peut avoir un rôle dans la réplication, il pourrait aussi être impliqué dans l'arrêt de celle-ci. Or, dans les clones W98.14, W98.12 et 11.6, quelque chose semble bloquer les fourches de réplication provenant du virus. D'où l'hypothèse qu'il y aurait des barrières de réplication près du site d'intégration du virus polyome dans ces clones et qu'elles pourraient correspondre à de l'ADN courbe.

Pour procéder à l'induction des origines de réplication des génomes du virus polyome intégrés dans ces trois clones, il faut d'abord transférer les cellules de la température restrictive (39°C) à la température permissive (33°C) pour rendre l'antigène Grand T du virus polyome thermosensible fonctionnel. Pour maximiser l'induction, nous utilisons aussi la mitomycine C qui est, dans un tel système, l'agent inducteur le plus efficace³¹. Les cellules de rats sont, pour le virus polyome, des cellules semi-permissives ce qui implique que le virus exécute son cycle lytique complet que dans très peu de cellules. Cela permet la viabilité de la majorité des cellules, par contre le virus s'y réplique beaucoup moins. Cette drogue sert donc à améliorer le rendement de réplication du virus polyome.

La mitomycine C introduit des brisures dans l'ADN ce qui augmente la fréquence des événements de recombinaison^{31,65} qui conduisent à l'excision de formes libres. On croit aussi que les brisures induisent les systèmes de réparation, ainsi, des brisures au site d'intégration virale y augmenteraient la disponibilité des polymérases. C'est pourquoi la mitomycine C causerait des rondes de réplication multiples dans ces

cellules⁴. Par conséquent, l'utilisation de la mitomycine C permet d'étudier des phénomènes dont la fréquence est trop faible pour se prêter facilement à l'analyse. Ici, la mitomycine C permet d'amplifier un phénomène relativement rare dans des cellules semi-permissives et nous permet donc d'étudier plus facilement l'amplification des régions flanquantes du virus polyome.

La mitomycine C est ajoutée au milieu de culture pendant une heure puis elle est retirée. Nous incubons ensuite les cellules 72 heures sans cette drogue pour être certain que toutes les rondes de réplication, qui ont débuté pendant l'induction à la mitomycine C, aient eu le temps d'être complétées. Une fois les 72 heures écoulées, nous procédons à l'extraction de l'ADN génomique.

III.2 Analyse de l'induction de la réplication des génomes du virus polyome intégré dans les clones W98.12, W98.14 et 11.6

Les clones W98.12, W98.14 et 11.6 ont été induits par passage de 39° à 33°C et traitement à la mitomycine C, puis nous avons procédé à l'extraction de l'ADN de haut poids moléculaire. Par la suite, l'ADN a été digéré de manière à comparer l'amplification de l'ADN viral versus l'ADN cellulaire flanquant présent au-delà des régions d'ADN courbe. Les fragments correspondant à une séquence virale, donc situés avant les barrières présumées, correspondent aux segments a et a' de la figure 3. Ces fragments sont identiques pour les trois clones et sont obtenus après digestion par *KpnI* et *PstI* (environ 468 pb) en 5' (a) et de *EcoRI* à *HincII*

(environ 1,4 kb) en 3' du site d'intégration du virus polyome (a') (voir la figure 3). Ces fragments correspondent aussi aux fragments utilisés pour les sondes virales S9 et S10 (voir la figure 2).

Pour ce qui est des fragments se prolongeant au-delà de l'ADN courbe, b et b', ils ont été choisis de manière à comprendre le fragment plus court correspondant au même côté, a ou a' selon le cas. Ceci permet l'utilisation des mêmes sondes: S9 pour les fragments a et b, et S10 pour a' et b'. Il est ensuite possible de comparer les signaux obtenus des deux fragments du même côté du site d'intégration du virus polyome sans risquer que la différence soit due à une différence d'efficacité des sondes. Pour obtenir le fragment b, le clone W98.14 a été digéré par *EcoRI* (fragment d'environ 12.8 kb) tandis que W98.12 et 11.6 ont été digérés par *KpnI* (fragment d'environ 11.3 kb pour le clone W98.12 et d'environ 4.7 kb pour le clone 11.6). Pour obtenir le fragment b', les trois clones ont été digérés par *EcoRI* (fragments d'environ 5.2 kb pour les clones W98.12 et W98.14, et d'environ 8.8 kb pour le clone 11.6) (voir la figure 3).

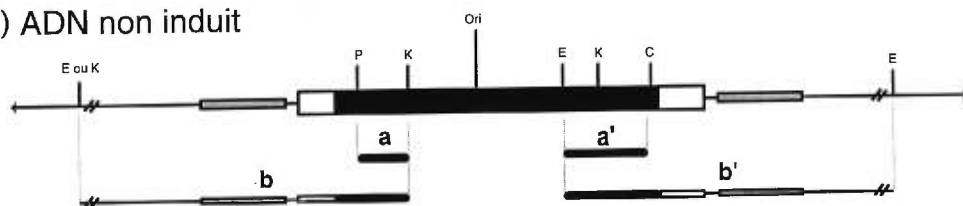
Suite à l'induction, l'origine de répllication du virus polyome intégré initie des rondes de répllication multiples. Ceci amplifie le nombre de copies d'ADN répliqué par le virus (B de la figure 3) par rapport à l'ADN répliqué à partir des origines de répllication cellulaires (A de la figure 3). En effet, ce dernier ne peut être qu'en une ou deux copies, selon que la cellule soit en cours de répllication ou non puisque la répllication de l'ADN cellulaire ne se fait qu'une fois par cycle. Ainsi les fragments pouvant être amplifiés, c'est-à-dire pouvant se retrouver en plus de deux copies, sont uniquement les

Figure 3: Schéma général représentatif des digestions enzymatiques effectuées sur les clones W98.12, W98.14 et 11.6.

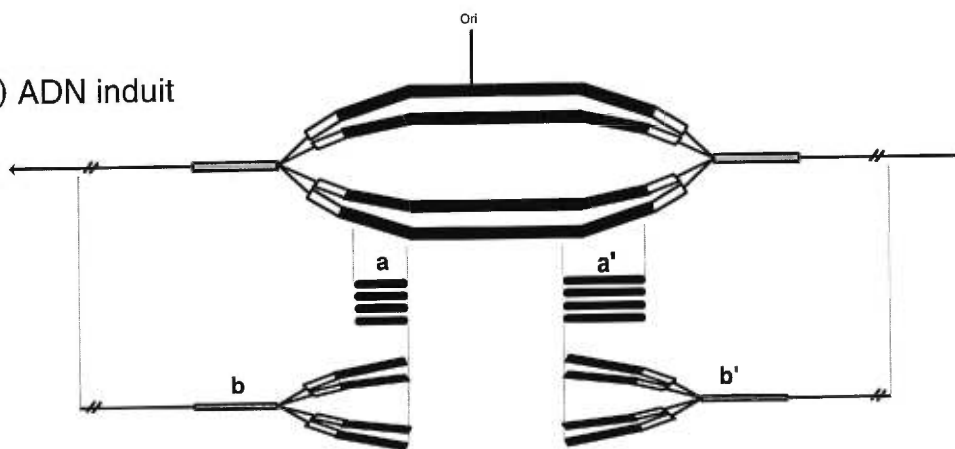
En A, on peut voir un schéma général des clones W98.12, W98.14 et 11.6 dans lesquels l'origine de réplication du virus polyome intégré n'a pas été induite à se répliquer. En B, on voit ce qui se produit lorsque l'origine de réplication du virus est induite et fait des rondes de réplication multiples. La figure illustre l'hypothèse que l'amplification produite par le virus polyome est arrêtée par les structures d'ADN courbe flanquant le virus. Les deux types d'ADN (A et B) ont été digérés de manière à comparer un fragment qui se termine avant la barrière présumée; a et a' (ici une séquence du génome du virus polyome), et un autre fragment qui va au delà de cette barrière présumée; b et b'. Pour obtenir les fragments a, les trois clones sont digérés par *KpnI* et *PstI* ce qui génère un fragment de 468 pb correspondant à la séquence de la sonde S9 (voir la figure 2). Pour a', les clones sont digérés par *EcoRI* et *HincII* pour engendrer ici un fragment de 1,4 kb correspondant à la séquence de la sonde S10 (voir la figure 2). Pour obtenir les fragments b, W98.14 est digéré par *EcoRI* (fragment d'environ 12.8 kb) tandis que W98.12 et 11.6 sont digérés par *KpnI* (fragment d'environ 11.3 kb pour le clone W98.12 et d'environ 4.7 kb pour le clone 11.6). Pour b', les clones sont tous digérés par *EcoRI* (fragments d'environ 5.2 kb pour les clones W98.14 et W98.12, et d'environ 8.8 kb pour le clone 11.6). "Ori" représente l'origine de réplication du virus polyome. Enzymes de restriction utilisées: C; *HincII*, E; *EcoRI*, K; *KpnI*, P; *PstI*. Les distances ne sont pas à l'échelle puisqu'il s'agit d'un schéma général représentatif des trois différents clones.

Figure 3

A) ADN non induit



B) ADN induit



Légende

<p> Polyome</p> <p> INS</p>	<p> Région de l'ADN courbe</p> <p> ADN cellulaire de rat</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

fragments répliqués en entier par les complexes de réplication s'amorçant à l'origine du virus polyome intégré. L'ADN non induit lui (A de la fig 3), représente le nombre de copies sans amplification donc, une ou deux copies tout au plus puisque le virus polyome, sans antigène Grand T fonctionnel, se réplique au même rythme que la cellule. Ce témoin d'ADN non induit est très utile car les fragments courts (a et a') ne se transfèrent pas sur membranes de nylon nécessairement avec la même efficacité que les fragments longs (b et b') alors, la comparaison de l'intensité des signaux doit se faire entre l'ADN induit et l'ADN non induit d'un même fragment de façon à comparer des fragments de même longueur.

L'intensité des bandes obtenues sur l'autoradiogramme, nous indiquera s'il y a eu induction de l'origine du virus polyome et nous donnera une idée du nombre de copies des fragments avant et après l'ADN courbe. Ceci permettra de voir si les fragments b et b' sont amplifiés par les rondes de réplication multiples du virus polyome donc de vérifier si l'amplification peut se faire au-delà de l'ADN courbe.

Après digestion (selon la figure 3), l'ADN est mis sur gel d'agarose 0,7%, le gel est transféré sur membrane de nylon selon la méthode de Southern¹⁰¹ et hybridé avec les sondes S9 et S10 (voir la figure 2).

Aux figures 4 et 5, on remarque d'abord qu'on ne détecte pas le signal attendu dans les pistes contenant l'ADN non induit. Nous ne sommes pas arrivés à les visualiser même si la quantité d'ADN sur le gel est la même que celle de l'ADN induit (résultats de la coloration au bromure d'éthidium non montrés). Ces résultats indiquent que la sensibilité de cette

Figure 4: Analyse de Southern des clones W98.12, W98.14 et 11.6 en utilisant la sonde S9.

Les clones W98.14, W98.12 et 11.6 ont été cultivés à la température restrictive (39°C) ou induit par transfert à la température permissive (33°C), traitement à la mitomycine C et croissance à 33°C pendant 72 h. L'ADN génomique a par la suite été extrait puis digéré par les enzymes de restriction mentionnées au haut de la figure et selon la figure 3. Par la suite, l'ADN a été transféré sur membrane et hybridé avec la sonde S9 (fig 2). À la gauche de la figure se trouve des marqueurs de poids moléculaire (le bactériophage *lambda* digéré par *HindIII*) représentés en kb. Chez les trois clones, on obtient le fragment a attendu de 468 pb (fragment a de la figure 3). Les puits contenant l'ADN non induit ne présentent aucun signal. Il y a trois bandes supplémentaires dans les puits de l'ADN induit digéré par *KpnI* et *PstI* qui ont hybridé avec la sonde, mais leur nature exacte est indéterminée. Enzymes de restriction utilisées: E; *EcoRI*, K; *KpnI*, P; *PstI*.

Figure 4

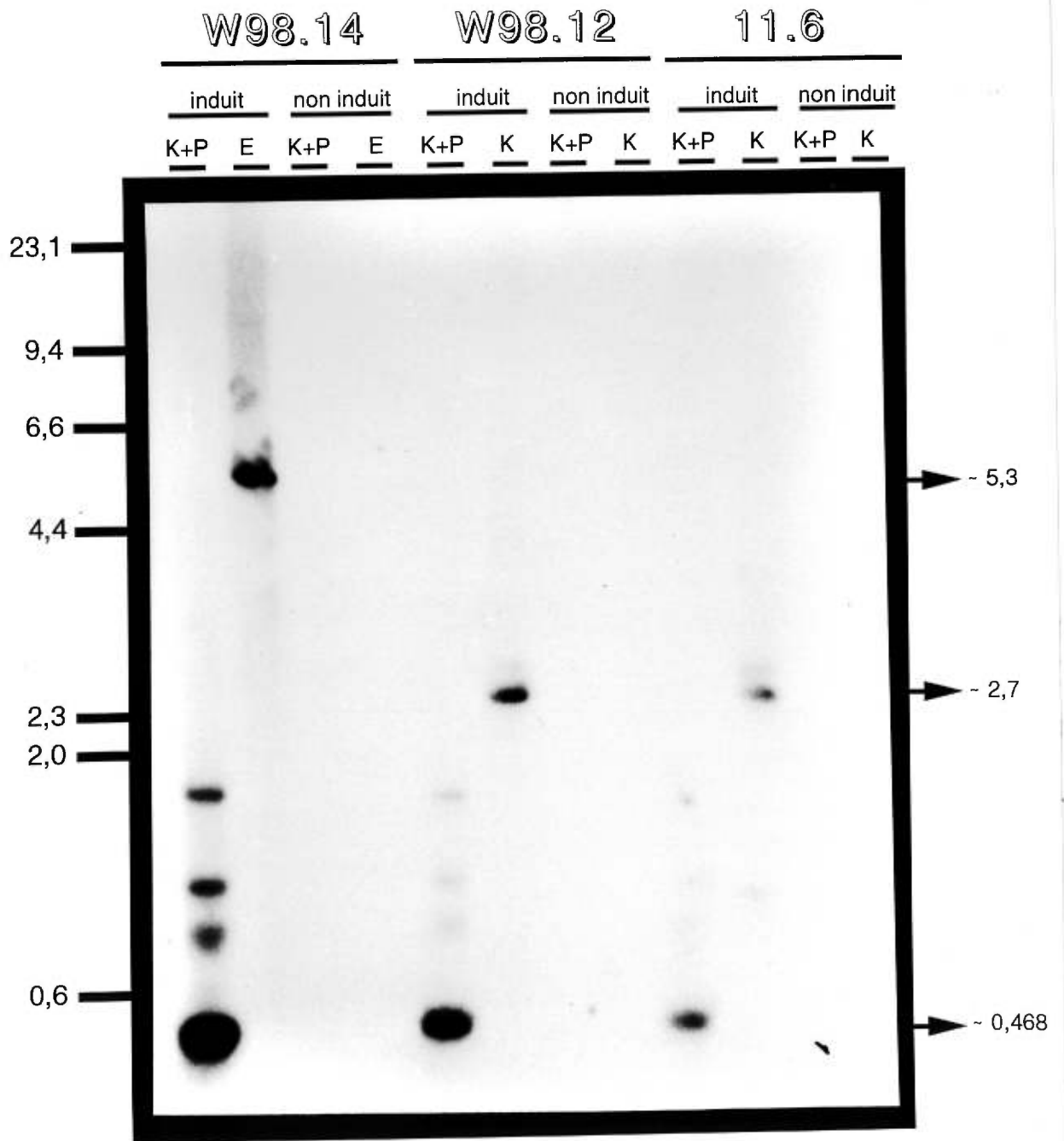
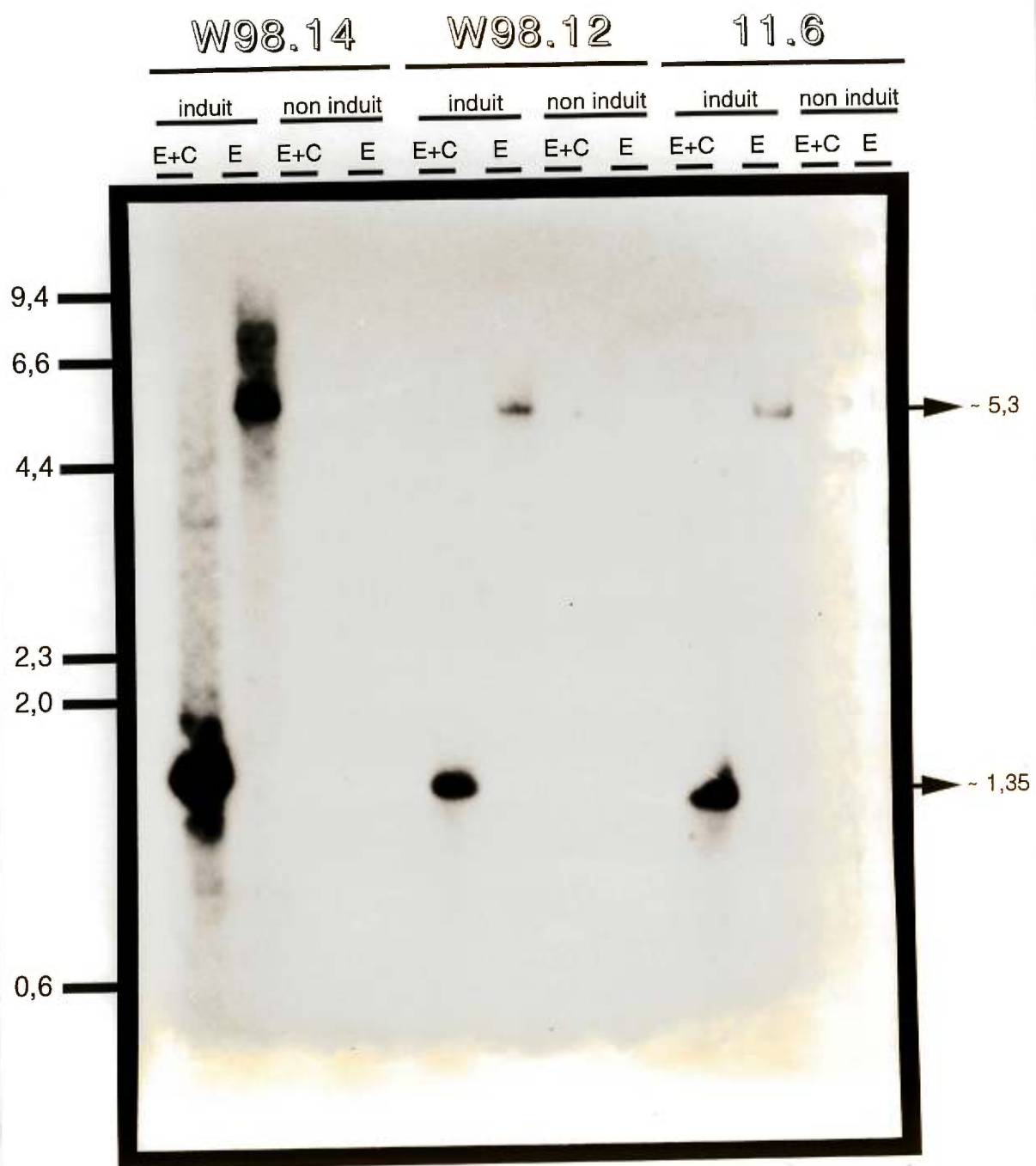


Figure 5: Analyse de Southern des clones W98.12, W98.14 et 11.6 en utilisant la sonde S10.

Les clones W98.14, W98.12 et 11.6 ont été cultivés à la température restrictive (39°C) ou induit par transfert à la température permissive (33°C), traitement à la mitomycine C et croissance à 33°C pendant 72 h. L'ADN génomique a par la suite été extrait puis digéré par les enzymes de restriction mentionnées au haut de la figure et selon la figure 3. Par la suite, l'ADN a été transféré sur membrane et hybridé avec la sonde S10 (fig 2). À la gauche de la figure se trouve des marqueurs de poids moléculaire (le bactériophage *lambda* digéré par *HindIII*) représentés en kb. Chez les trois clones, on obtient le fragment a' attendu de 1,4 kb (fragment a de la figure 3). Les puits contenant l'ADN non induit ne présentent aucun signal. Enzymes de restriction utilisées: E; *EcoRI*, C; *HincII*.

Figure 5



expérience n'était pas assez élevée pour détecter des séquences présentes en une ou deux copies par génome. Le fait que l'ADN non induit ne produit pas de signaux visibles alors que la quantité d'ADN est la même dans tous les puits, indique que les séquences virales y sont en un nombre de copies moindre et par ailleurs peu ou pas amplifiées. Il n'y aurait donc qu'une ou deux copies de ces fragments. On peut toutefois conclure qu'il y a quand même eu amplification de l'ADN par l'induction de la réplication dépendante du virus polyome puisqu'il y a seulement des bandes visibles dans les pistes de l'ADN induit.

Dans le cas de l'ADN induit, nous avons obtenu des signaux très intenses (voir les figures 4 et 5). À la figure 4, nous avons obtenu, pour les trois clones, les fragments a (voir la figure 3) au poids attendu c'est-à-dire à 468 pb. Leur intensité varie mais on doit remarquer que cette variation est due en partie à un transfert inégal (le transfert a été plus efficace à la gauche qu'à la droite de la membrane de nylon compte tenu de la coloration au bromure d'éthidium et que les marqueurs de poids moléculaire placés de part et d'autre du gel, ont une intensité très différente sur l'autoradiogramme). À la figure 5, nous avons aussi obtenu, pour les trois clones, les fragments a' (voir la figure 3) au poids attendu c'est-à-dire à environ 1,4 kb.

En plus des fragments a et a' attendus, les sondes utilisées reconnaissent également des fragments de plus haut poids moléculaire qui ne correspondent toutefois pas aux fragments b (c'est-à-dire environ 12,8 kb pour le clone W98.14, 11,3 kb pour le clone W98.12, et 4,7 kb pour le clone 11.6) et b' (c'est-à-dire environ 5,2 kb pour le clone W98.14, 5,1 kb

pour le clone W98.12, et 8,8 kb pour le clone 11.6) de la figure 3, attendus lors des digestions appropriées. Par exemple, la sonde S9 reconnaît un fragment *EcoRI* de 5,3 kb pour le clone W98.14 (voir la figure 4) et la sonde S10 reconnaît le même fragment pour les trois clones cellulaires (voir la figure 5). Pour ces quatre cas, il s'agit de formes libres du virus, le poids du virus polyome étant justement de 5,3 kb (l'ADN extrachromosomique est toujours copurifié dans une certaine proportion lors de l'extraction de l'ADN génomique de haut poids moléculaire). La digestion par *KpnI* de l'ADN des clones W98.12 et 11.6 permet aussi à la sonde S9 (voir la figure 4) de détecter la forme circulaire. Puisqu'il existe deux sites *KpnI* dans la forme circulaire (voir la figure 2), l'utilisation de cette enzyme génère un fragment de 2,7 kb. Ainsi, pour tous ces signaux de plus haut poids moléculaire que les fragments a et a', il s'agirait donc de fragments ou de génomes complets du virus polyome sous forme libre, recircularisés, comme il a déjà été observé par plusieurs auteurs y compris notre laboratoire qui a cloné ces formes libres antérieurement^{86,107}. Ces fragments ont été hybridés puisque les sondes S9 et S10 correspondent à des séquences virales donc à des séquences présentes dans les formes libres.

Les signaux de 5,3 et 2,7 kb constituent tout de même un indice de l'apport des formes libres à l'intensité des signaux des fragments a et a'. Il n'en reste pas moins que les signaux des fragments a et a' demeurent plusieurs fois plus intenses que ceux des fragments b et b' puisque ces derniers n'apparaissent pas sur les autoradiogrammes représentés aux figures 4 et 5. De plus, la présence de bandes de haute intensité montre qu'il y a eu induction. Par contre, on ne peut pas évaluer le nombre de copie puisqu'on ne peut distinguer le signal d'une seule copie d'ADN.

On remarque donc une grande différence d'intensité entre les fragments a et b et entre les fragments a' et b'. Toutefois, compte tenu de la digestion effectuée et que les sondes utilisées sont virales, on ne peut pas vraiment distinguer les proportions des signaux des fragments a et a' provenant de l'amplification *in situ* et de l'amplification des formes libres du virus. Pour confirmer ces résultats, on doit donc regarder des fragments exclusivement cellulaires avec des sondes exclusivement cellulaires.

Pour ce qui est des bandes additionnelles apparaissant à la figure 4 dans les trois puits de l'ADN induit digéré par *KpnI* et *PstI*, leurs poids sont respectivement d'environ 1,1, 1,3 et 1,8 kb (sur cette figure elles ne sont pas visibles pour le clone 11,6 mais avec une exposition plus longue elles étaient très visibles et du même poids chez les trois clones). Or, l'obtention de trois poids identiques, pour trois clones de structure différente, pourrait porter à croire qu'il s'agit de digestions partielles. Cependant leurs poids ne correspondent à aucune digestion partielle selon la cartographie des clones. Étant donné que l'analyse visait seulement à déterminer s'il y avait induction de l'origine du virus polyome, nous n'avons pas poursuivi plus loin l'analyse de ces bandes.

III.3 Analyse du ratio d'ADN exclusivement cellulaire

L'expérience a donc été reprise de manière à éviter de détecter les formes libres. En utilisant des fragments cellulaires et des sondes cellulaires on peut mesurer l'amplification de l'ADN cellulaire. Compte tenu de la présence de plusieurs régions d'ADN répété de chaque côté du site

d'intégration du virus polyome, l'expérience n'a été réalisée que pour le clone W98.14. Celui-ci a été choisi en raison de la présence d'une duplication d'environ 10,5 kb de l'ADN génomique flanquant la molécule exogène intégrée dans le clone W98.14, observée par Milot *et al.*⁷⁹ (se reporter à la figure 6). Il est probable que cette duplication soit le résultat d'un réarrangement génomique illégitime créé par l'intégration du virus.

La structure du génome au site d'intégration de ce clone a été comparée avant et après les réarrangements suite à l'intégration⁷⁹. Aucune perte de séquences d'ADN de la cellule hôte n'a été observée, ni aucun réarrangement près du site d'intégration. Cette duplication permet de cribler deux fragments avec une seule sonde lorsque cette dernière correspond à une séquence à l'intérieur de la duplication. Ceci réduit donc le nombre de sondes requises et nous permet ici de cribler quatre fragments avec seulement deux sondes (S3 et S4 de la figure 6) en évitant les très nombreuses séquences d'ADN répété.

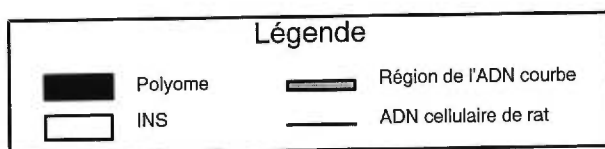
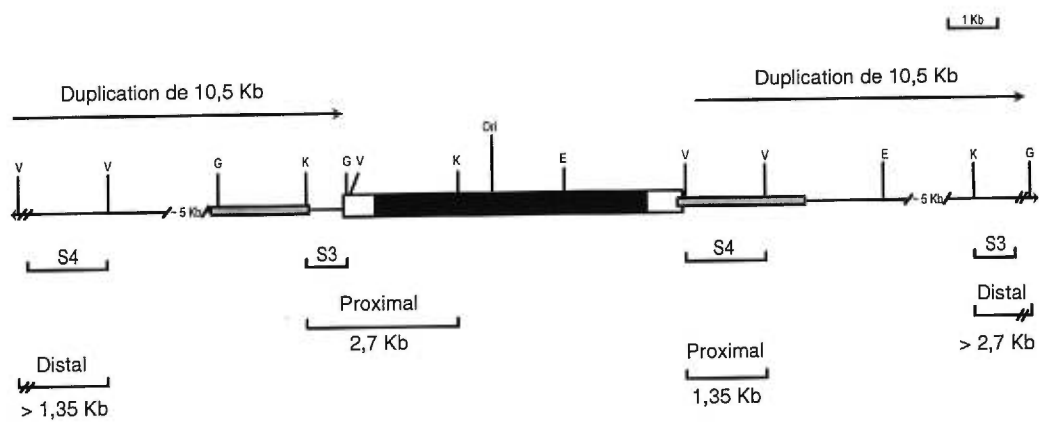
Les digestions ont été effectuées de manière à différencier un fragment comprenant la séquence de la sonde S3 ou S4 proximale du virus polyome d'un autre comprenant la séquence de la même sonde mais à environ 10,5 kb du site d'intégration du virus du côté opposé (distale à l'intégration (voir la figure 6)). Cette différenciation est possible en utilisant les sites de restriction *Bgl*III pour les fragments détectés par la sonde S3 et *Pvu*II pour ceux détectés par la sonde S4 (voir la figure 6). De cette façon, le fragment distal aura un poids différent puisqu'il n'est pas adjacent à un génome du virus polyome.

Figure 6: Schéma de la cartographie de restriction du clone W98.14 de manière à connaître le ratio d'ADN avant et après l'ADN courbe.

Le clone W98.14 possède une duplication d'environ 10,5 kb de l'ADN cellulaire flanquant le site d'intégration du génome du virus polyome. Les sondes utilisées, S3 (environ 700 pb) et S4 (environ 1,35 kb) (voir la figure 2), sont cellulaires et dupliquées d'un côté et de l'autre du site d'intégration du virus polyome. Cette duplication permet de sonder des fragments avant et après l'ADN courbe puisque une même sonde reconnaît un fragment adjacent au site d'intégration du virus polyome (proximal) et un à environ 10,5 kb du côté opposé (distal). Pour obtenir les fragments, l'ADN a été digéré par *KpnI* dans le cas des fragments reconnus par S3 et *PvuII* pour S4. Ori représente l'origine de réplication du virus polyome. Enzymes de restriction utilisées: E; *EcoRI*, K; *KpnI*, G; *BglIII*, V; *PvuII* (les sites de restriction ne sont pas tous illustrés). La figure est adaptée de la thèse d'Eric Milot⁷⁹.

Figure 6

W98.14



On a donc utilisé l'enzyme de restriction *KpnI* pour obtenir un fragment proximal et un distal reconnu par la sonde S3 (voir la figure 6) de longueur différente. De cette manière le fragment proximal sera de 2,7 kb tandis que le distal aura un poids inconnu mais supérieur à 2,7 kb (les poids attendus ont été déterminés suite à des études antérieures¹⁰⁷). De la même façon, on a utilisé l'enzyme de restriction *PvuII* pour les fragments reconnus par la sonde S4 (voir la figure 6). Le fragment proximal aura donc un poids de 1,35 kb et celui du fragment distal sera supérieur à 1,35 kb.

Après digestion, l'ADN est mis sur gel d'agarose 0,7%, le gel est transféré sur membrane de nylon selon la méthode de Southern¹⁰¹ et hybridé avec les sondes S3 ou S4 selon le cas (voir la figure 6).

À la figure 7, le signal du fragment proximal hybridé par la sonde S3 a le poids attendu c'est-à-dire environ 2,7 kb. La figure montre aussi une nette différence d'intensité entre les signaux de ce fragment selon que l'ADN ait été induit ou non. Le signal de l'ADN induit est au moins dix fois plus intense que celui du non induit. Il y aurait donc au moins dix fois plus de copies de ce fragment lorsque l'origine du virus polyome est induite à se répliquer. Pour ce qui est du fragment distal reconnu par la sonde S3 (voir figure 6), il est d'environ 6,5 kb et à la même intensité que l'ADN ait été induit ou non. Nous pouvons savoir que les fragments d'environ 6,5 kb sont bien les fragments distaux grâce au témoin FR3T3. Les cellules FR3T3 sont les cellules parentales qui ont servis à la production des clones. Dans ces cellules, il n'y a pas de virus polyome intégré alors la digestion suivie du criblage avec la sonde S3 donne nécessairement le poids du fragment

Figure 7: Analyse de Southern du clone W98.14 en utilisant la sonde cellulaire S3.

L'ADN du clone W98.14 avant et après induction de la réplication virale (voir matériel et méthodes) ainsi que l'ADN de la lignée parentale FR3T3 (sans intégration virale) ont été digérés par *KpnI*, migrés sur gel d'agarose 0,7% et transférés sur membrane de nylon. La membrane a par la suite été hybridée par la sonde S3 (voir la figure 6). Les poids moléculaires de gauche sont ceux des marqueurs *lambda* digéré par *HindIII*. Les signaux attendus de 6,5 et 2,7 kb sont indiqués.

Figure 7

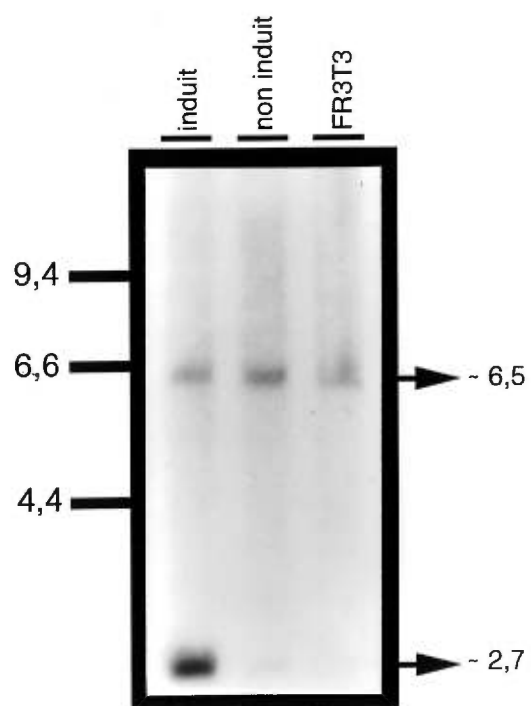
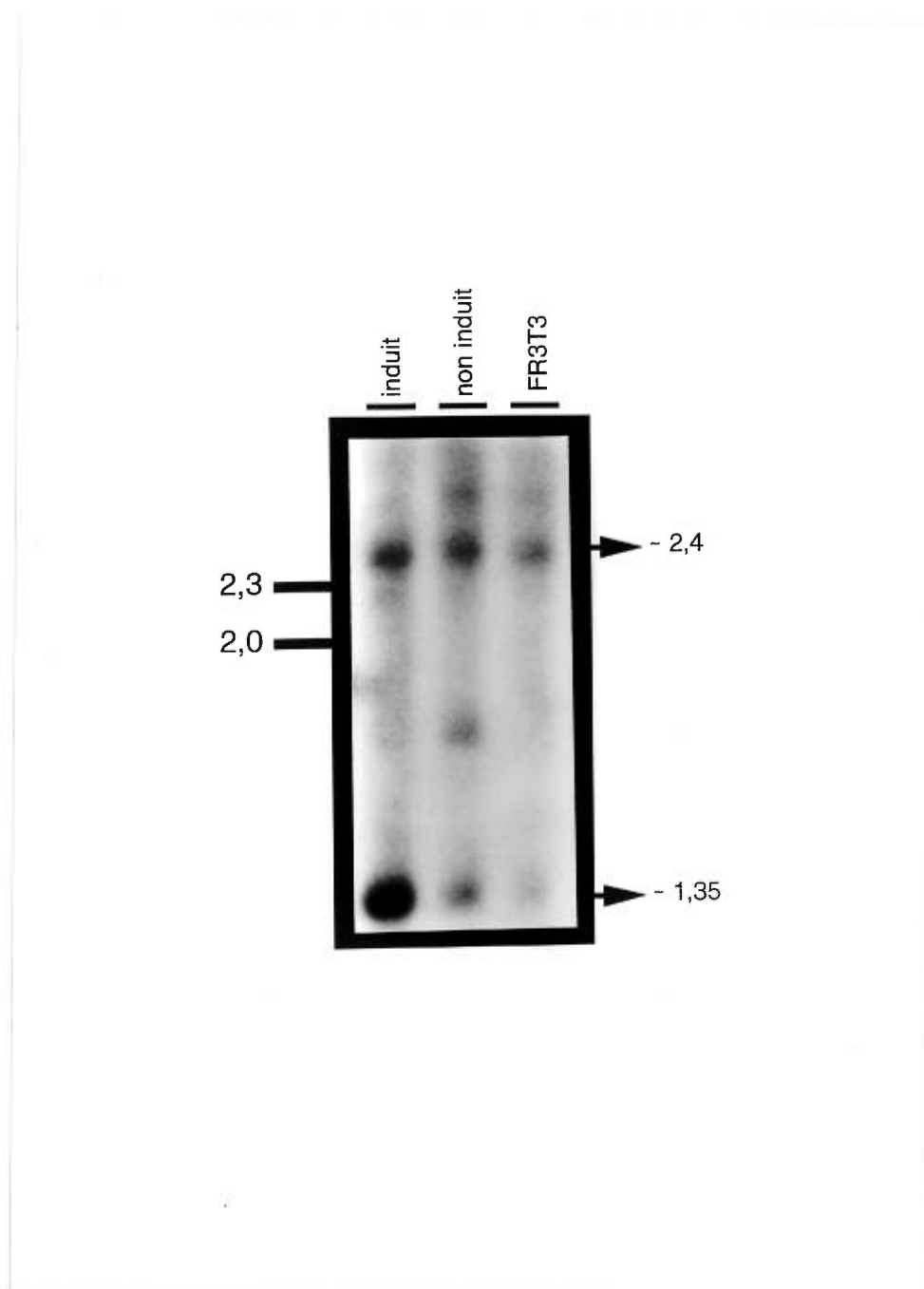


Figure 8: Analyse de Southern du clone W98.14 en utilisant la sonde cellulaire S4.

L'ADN du clone W98.14 avant et après induction de la réplication virale (voir matériel et méthodes) ainsi que l'ADN de la lignée parentale FR3T3 (sans intégration virale) ont été digérés par *PvuII*, migrés sur gel d'agarose 0,7% et transférés sur membrane de nylon. La membrane a par la suite été hybridée par la sonde S4 (voir la figure 6). Les poids moléculaires de gauche sont ceux des marqueurs *lambda* digéré par *HindIII*. Les signaux attendus de 2,4 et 1,35 kb sont indiqués.

Figure 8



non adjacent au virus (fragment distal de la figure 6). La figure 7 montre donc une forte amplification du fragment proximal et aucune amplification du fragment distal.

À la figure 8, le signal du fragment proximal hybridé par la sonde S4 a aussi le poids attendu c'est-à-dire environ 1,35 kb. La figure montre aussi une nette différence d'intensité entre les signaux de ce fragment lorsque l'ADN est induit ou non. Le signal de l'ADN induit semble aussi au moins dix fois plus intense que celui du non induit. Comme à la figure 7, il semble donc y avoir au moins dix fois plus de copies de ce fragment lorsque l'origine du virus polyome est induite à se répliquer. Pour ce qui est du fragment distal reconnu par la sonde S4 (voir la figure 6), il est d'environ 2,4 kb et de même intensité que l'ADN ait été induit ou non. Ici encore, nous connaissons le poids de ce fragment grâce au témoin FR3T3. Cependant, le témoin FR3T3 nous donne dans ce cas-ci deux signaux. Un signal à environ 1.35 kb, qui correspond au poids du fragment proximal et un à environ 2,4 kb. Ce témoin ne devrait pas contenir la séquence exacte du fragment proximal puisqu'il n'y a pas de virus polyome intégré dans les cellules FR3T3 sauvages. Il est donc possible qu'il s'agisse d'une séquence très semblable qui se retrouve ailleurs dans la cellule. Quelque soit l'origine de ce fragment, il ne peut pas être amplifié dans l'ADN induit puisqu'il n'y a qu'un génome du virus polyome intégré au génome de la cellule. Il n'y aurait donc aucune origine de répllication pouvant faire des rondes de répllication multiples dans les environs de ce fragment. Le signal de ce fragment ne pourrait donc pas non plus contribuer de façon importante à l'intensité du signal proximal de l'ADN induit. De plus, sa contribution au signal se ferait autant pour l'ADN induit que le non induit alors la

différence d'intensité entre ces deux signaux demeure. Toutefois, la nature même de ce fragment ayant le même poids que le fragment proximal et étant hybridé par la sonde S4, demeure inconnue. L'origine du troisième signal dans le puits de l'ADN non induit (signal à environ 1,8 kb) demeure aussi inconnue mais pourrait peut-être s'expliquer par une digestion partielle. Donc, tout comme pour la sonde S3, l'utilisation de la sonde S4 permet de constater qu'il y a amplification du fragment proximal et aucune amplification du fragment distal.

L'existence de signaux de différentes intensités semble indiquer qu'il y a vraiment eu induction de l'origine du virus polyome dans l'ADN dit induit. On peut aussi conclure qu'il y a eu amplification des fragments proximaux d'autant plus qu'ici, le signal ne devrait pas contenir de copies sous forme excisées puisque les sondes utilisées sont cellulaires. Il arrive cependant que des génomes du virus polyome, en s'excisant, prennent avec eux des séquences d'ADN cellulaire ce qui contribuerait faussement à l'amplification du signal. Il faut par contre se rappeler que les études antérieures ont démontré que ce phénomène est très rare dans le cas de ce clone (voir p.24).

Il semble donc vraiment y avoir quelque chose qui bloque les fourches de réplication provenant du virus avant qu'elles n'atteignent les fragments distaux et cela des deux côtés du site d'intégration du virus (figures 7 et 8). Les résultats obtenus indiquent donc que les polymérases ADN qui amorcent leur synthèse à l'origine de réplication du virus polyome s'arrêtent avant d'avoir répliqué 10,5 kb d'ADN cellulaire. Or, le virus polyome utilise les polymérases ADN cellulaires et ces dernières peuvent

normalement répliquer des centaines de kilopaires de bases sans problème (d'ailleurs on estime que les domaines de réplication chez les mammifères ont entre 50 et 300 kb⁴⁰). Alors, il y aurait une forme de barrière de réplication, quelle qu'elle soit, à l'intérieur des 10,5 kb adjacent des jonctions du site d'intégration du virus polyome.

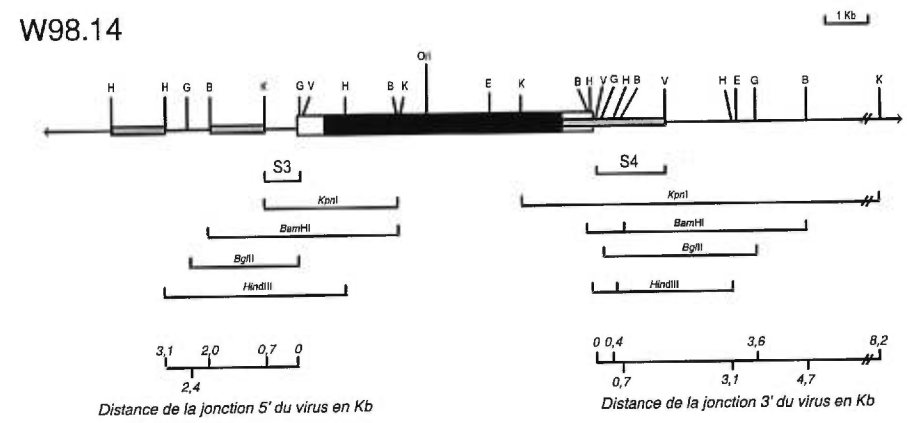
III.4 Analyse plus précise de la propagation de l'amplification de l'ADN cellulaire

Afin de mieux cerner l'endroit où l'amplification causée par le virus polyome s'arrête dans l'ADN cellulaire, nous avons analysé plusieurs fragments de restriction contenant les fragments proximaux et se prolongeant dans l'ADN cellulaire à des endroits intermédiaires entre les fragments proximaux et les distaux (se reporter aux figures 6 et 9). Cela permet aussi de savoir si l'amplification diminue progressivement au cours des 10,5 kb ou est arrêtée en un endroit précis. En 5' du virus intégré, le fragment *KpnI* attendu est d'environ 2,9 kb et son extrémité la plus éloignée du virus est à environ 0,7 kb de la jonction, le fragment *BamHI* est d'environ 4,3 kb et à environ 2,0 kb de la jonction, le fragment *BglII* est d'environ 2,5 kb et à environ 2,4 kb de la jonction et le fragment *HindIII* est d'environ 3,1 kb et à environ 3,1 kb de la jonction. En 3' du virus intégré, les fragments *HindIII* sont d'environ 0,5 kb à environ 0,4 kb de la jonction et 2,7 kb à environ 3,1 kb de la jonction, les fragments *BamHI* sont d'environ 0,9 kb à environ 0,7 kb de la jonction et 4,0 kb à environ 4,7 kb de la jonction, le fragment *BglII* est d'environ 3,6 kb et son extrémité la plus éloignée du virus est à environ 3,6 kb de la jonction et le fragment





Figure 9: Schéma de la cartographie de restriction du clone W98.14 de manière à cerner la zone d'arrêt de l'amplification.

La position des sites *KpnI*, *BamHI*, *BglIII* et *HindIII* pour le clone W98.14 est indiquée. Ces enzymes, selon la cartographie de ce clone donnent respectivement des fragments de 2,9 , 4,3 , 2,5 et 3,1 kb en 5' de l'intégration et de 12,8 , 0,9 et 4,0 , 3,6 , 0,5 et 2,7 kb en 3'. Ori représente l'origine de réplication du virus polyome. Enzymes de restriction utilisées: B; *BamHI*, E; *EcoRI*, G; *BglIII*, H; *HindIII*, K; *KpnI*, V; *PvuII* (les sites de restriction ne sont pas tous illustrés). Les précisions apportées sur les régions de l'ADN courbe, comparativement aux figures précédentes sont tirées de Milot *et al.*⁷⁸.

Figure 9



Légende

	Polyome		Région de l'ADN courbe
	INS		ADN cellulaire de rat

KpnI est d'environ 12,8 kb et à environ 8,2 kb de la jonction.

W98.14 a été induit puis l'ADN génomique a été extrait. Les digestions ont été effectuées telle que décrite à la figure 9. Par la suite, l'ADN est mis sur gel d'agarose 0,7%, le gel est transféré sur membrane de nylon selon la méthode de Southern¹⁰¹ et hybridé avec les sondes S3 ou S4 selon le cas.

Ce que l'on peut d'abord observer aux figures 10 et 11, c'est que le signal de l'ADN induit est toujours beaucoup plus intense que le non induit. Il y a donc encore vraiment eu induction de l'origine du virus polyome dans l'ADN dit induit. Ici encore, les sondes utilisées sont cellulaires alors les signaux ne devraient pas contenir de copies provenant des formes libres du virus. Par ailleurs, à la figure 10, si l'on considère l'intensité des signaux (ratio ADN induit/ADN non induit) en fonction de la distance avec le virus (voir la figure 9), celle-ci semble diminuer progressivement (le signal obtenu de la digestion par *KpnI* est plus intense que celui par *BamHI*, qui est lui-même plus intense que celui par *BglIII* et qui est lui aussi plus intense que celui obtenu par digestion *HindIII*). Les marqueurs de poids moléculaire radioactifs mis de part et d'autre du gel ont la même intensité ce qui exclut la possibilité que cette diminution soit uniquement due à un transfert inégal.

À la figure 11, la différence est moins prononcée mais l'intensité relative semble tout de même diminuer avec l'augmentation de la distance avec le virus (voir la figure 9)(le signal obtenu de la digestion par *HindIII* est plus intense que celui de la digestion par *BamHI*, qui est lui-même semblable à celui fait par *BglIII*, qui est un peu plus intense que

Figure 10: Analyse de Southern plus précise du clone W98.14 en utilisant la sonde cellulaire S3.

Le clone W98.14 a été cultivé à la température restrictive (39°C) ou induit par transfert à la température permissive (33°C), traité à la mitomycine C et cultivé à 33°C pendant 72 h. L'ADN génomique a par la suite été extrait puis a été digéré par plusieurs enzymes de restriction selon la figure 9 et ici mentionnées au haut de la figure. Par la suite l'ADN a été transféré sur membrane et hybridé avec la sonde S3 (voir la figure 9). Cela permet de voir l'intensité des signaux correspondant à des fragments se prolongeant de plus en plus loin en 5' du site d'intégration du virus polyome. À la gauche de la figure se trouve un marqueur de poids moléculaire (le bactériophage *lambda* digéré par *HindIII*) représenté en kb. L'intensité des signaux de l'ADN non induit est ici très faible mais avec une exposition plus longue ils sont visibles.

Figure 10

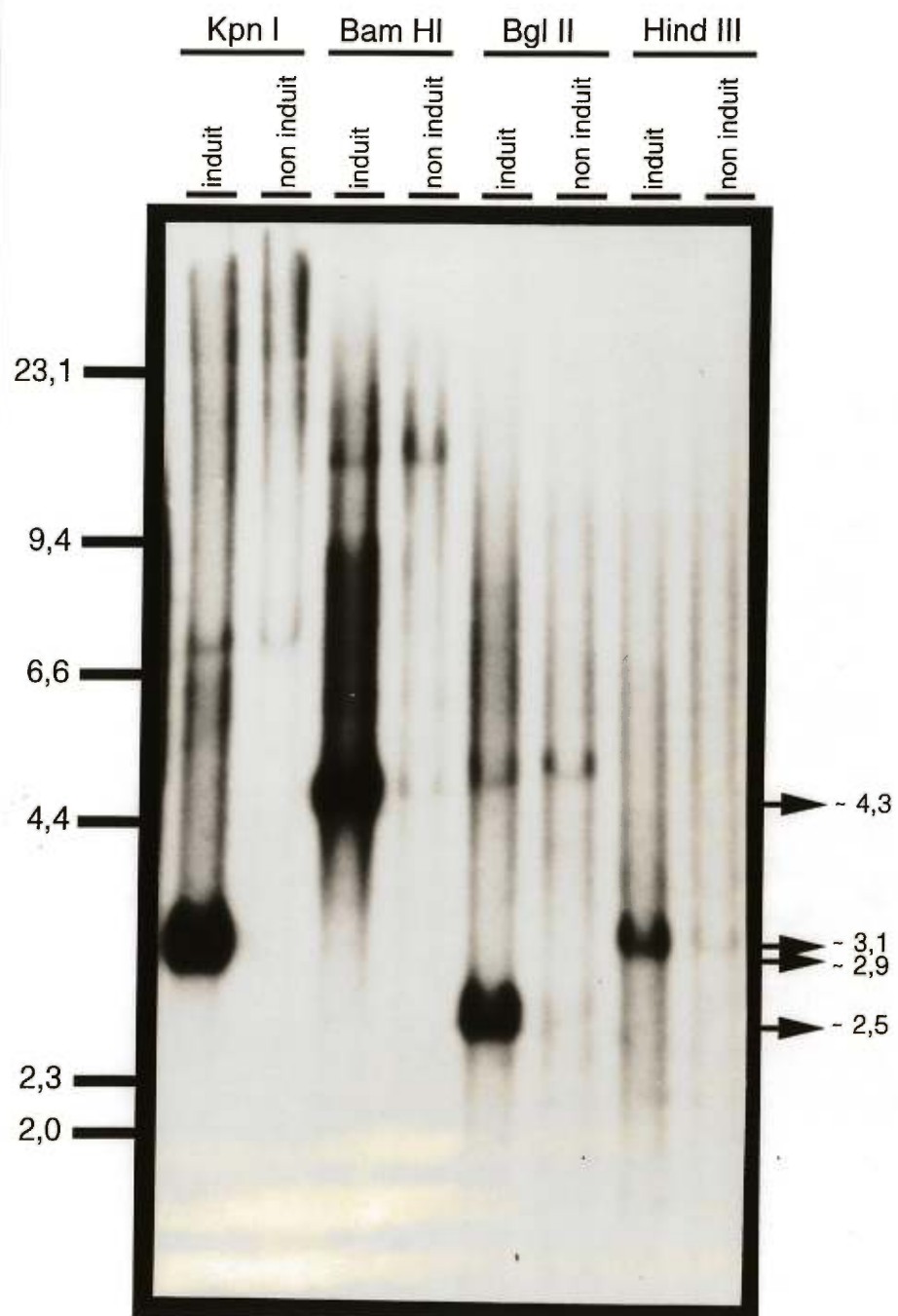
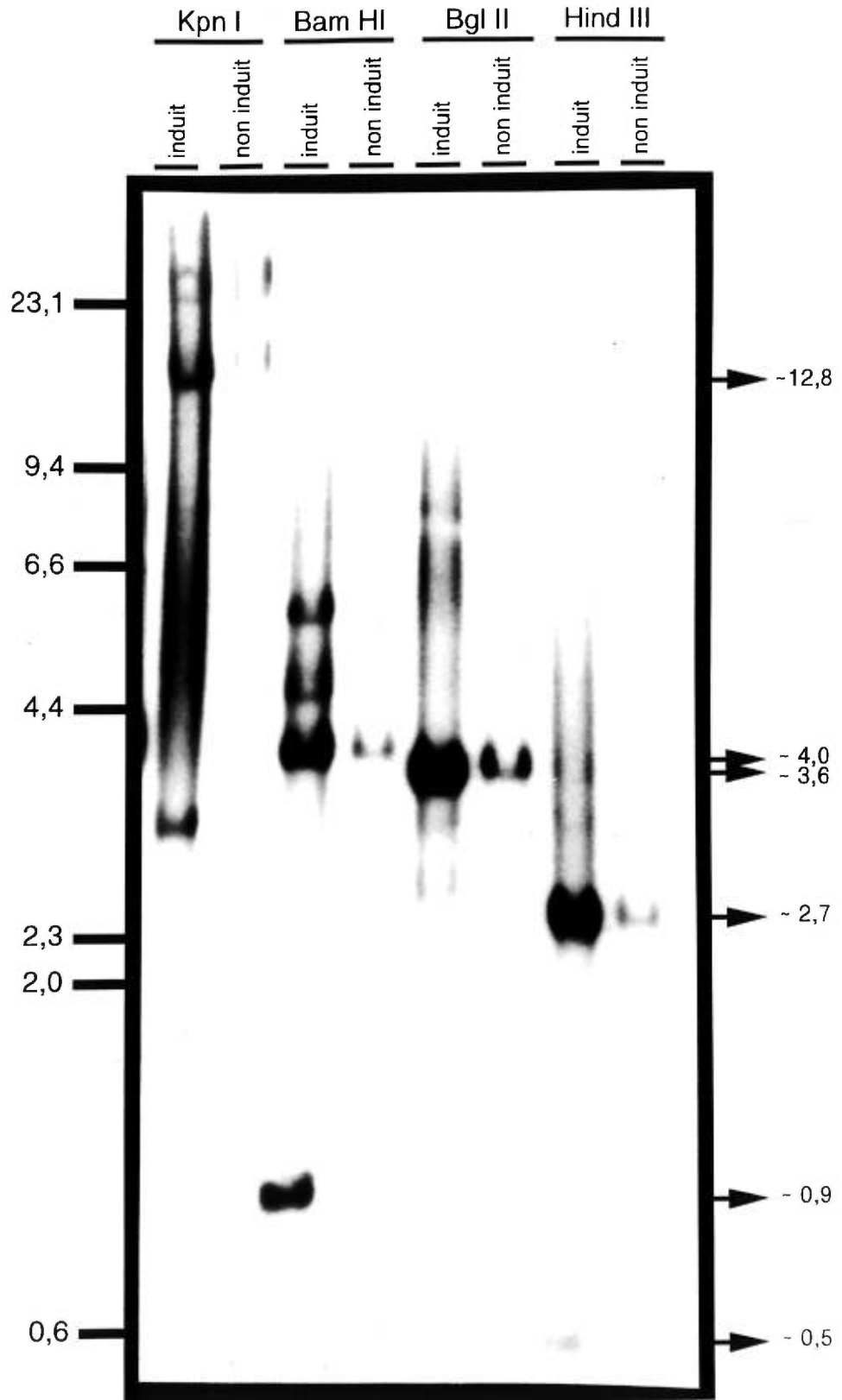


Figure 11: Analyse de Southern plus précise du clone W98.14 en utilisant la sonde cellulaire S4.

Le clone W98.14 a été cultivé à la température restrictive (39°C) ou induit par transfert à la température permissive (33°C), traité à la mitomycine C et cultivé à 33°C pendant 72 h. L'ADN génomique a par la suite été extrait puis a été digéré par plusieurs enzymes de restriction selon la figure 9 et ici mentionnées au haut de la figure. Par la suite l'ADN a été transféré sur membrane et hybridé avec la sonde S4 (voir la figure 9). Cela permet de voir l'intensité des signaux correspondant à des fragments se prolongeant de plus en plus loin en 3' du site d'intégration du virus polyome. À la gauche de la figure se trouve un marqueur de poids moléculaire (le bactériophage *lambda* digéré par *HindIII*) représenté en kb. L'intensité des signaux de l'ADN non induit est ici très faible mais avec une exposition plus longue ils sont visibles.

Figure 11



celui obtenu par la digestion *KpnI*). Ici aussi, les marqueurs n'indiquent pas qu'il y a eu un transfert inégal de l'ADN sur le gel.

Pour mieux visualiser la diminution d'intensité des signaux par rapport à la distance entre l'extrémité cellulaire du fragment et le virus, nous avons tracé des courbes (voir les figures 12 et 13). Chaque courbe est tracée en fonction de la distance entre l'extrémité la plus éloignée du virus et la jonction entre l'ADN cellulaire et le virus (en ordonné) par rapport à la différence d'intensité du signal d'un même fragment de l'ADN induit et non induit (en abcisse). La différence d'intensité a été déterminée avec une caméra vidéo digitale couplée à un logiciel informatique d'analyse (AlphaImager).

Les deux courbes ont été tracées jusqu'à environ 10,5 kb de la jonction en se basant sur les résultats des figures 7 et 8. En effet, lors de ces expériences, on avait déterminé que les fragments distaux (à environ 10,5 kb du virus) avaient un signal de même intensité autant pour l'ADN induit que non induit. Le rapport de l'ADN induit sur le non induit est donc de un et ces données ont été combinées aux résultats des figures 10 et 11 pour tracer les courbes aux figures 12 et 13.

À la figure 12, la courbe représentant la jonction 5' du virus, démontre une forte chute de l'amplification entre les sites de restriction *BamHI* et *BglII* qui correspondent à environ 2,1 et 2,4 kb de distance de la jonction 5' du génome du virus polyome intégré. Du site *HindIII*, environ à 3 kb de la jonction avec le virus, à 10,5 kb dans l'ADN cellulaire

Figure 12: Courbe schématique représentative de l'amplification de l'ADN cellulaire relatif à la distance de la jonction 5' du virus polyome.

Cette courbe a été tracée à partir des résultats de la figure 10. L'ordonnée représente l'amplification du signal telle que définie par l'intensité du signal induit divisé par l'intensité du signal non induit (différents temps d'exposition ont été utilisés pour évaluer les signaux faibles et éviter de saturer les signaux forts). Le non induit représentant le nombre de copie normal c'est-à-dire sans amplification provenant de l'induction de l'origine du virus polyome. L'abscisse représente la distance entre la jonction du virus avec l'ADN cellulaire et l'extrémité la plus éloignée du fragment en question (selon la figure 9). La courbe représente donc la baisse d'amplification en 5' du virus polyome à mesure que l'on s'éloigne du site d'intégration du virus. Les points identifiés sur la courbe indiquent l'enzyme de restriction utilisée et l'amplification du fragment en question.

Figure 12

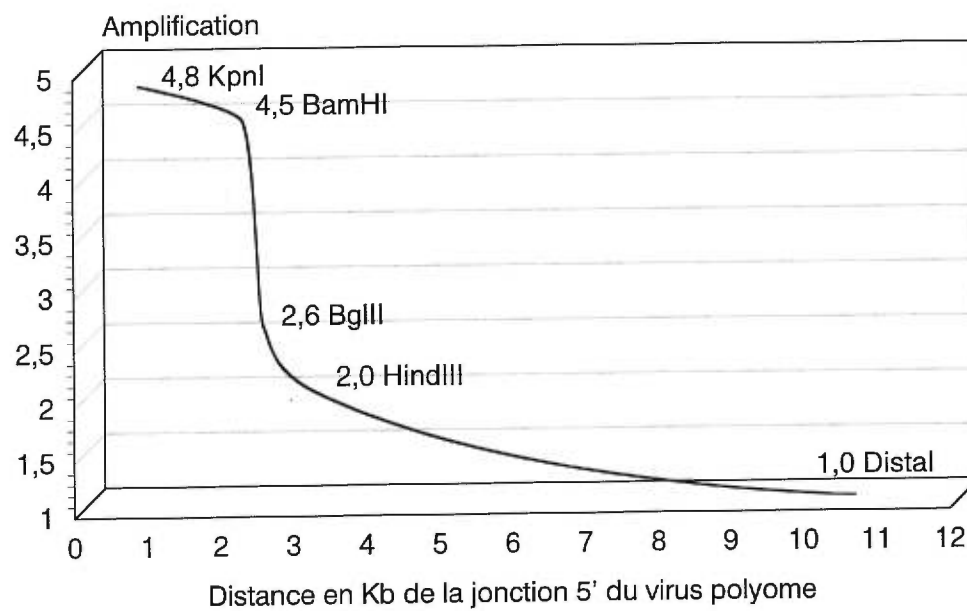
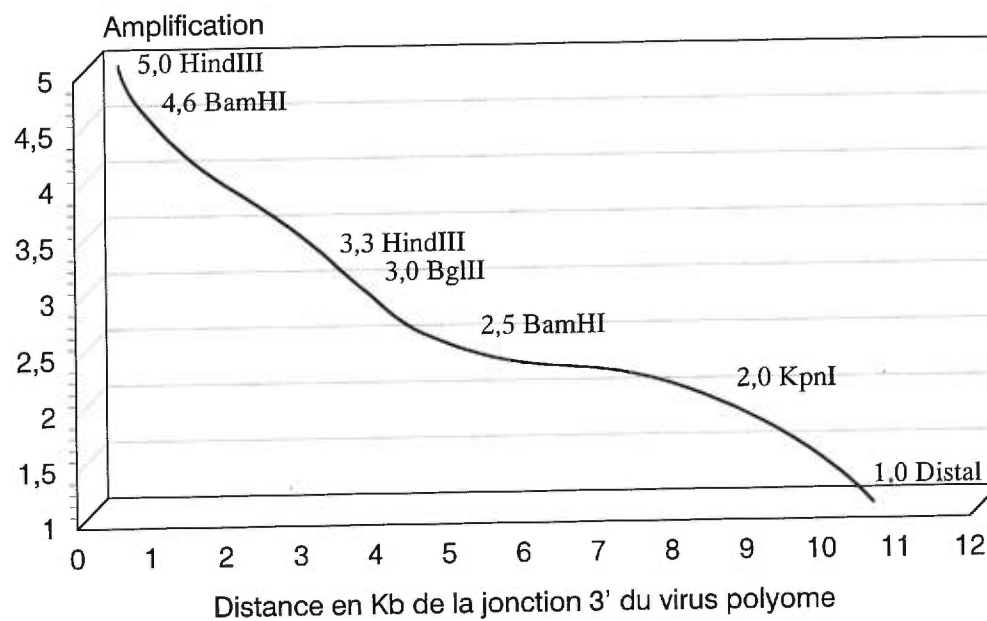


Figure 13: Courbe schématique représentative de l'amplification de l'ADN cellulaire relatif à la distance de la jonction 3' du virus polyome.

Cette courbe a été tracée à partir des résultats de la figure 11. L'ordonnée représente l'amplification du signal telle que définie par l'intensité du signal induit divisé par l'intensité du signal non induit (différents temps d'exposition ont été utilisés pour évaluer les signaux faibles et éviter de saturer les signaux forts). Le non induit représente le nombre de copie normal c'est-à-dire sans amplification provenant de l'induction de l'origine du virus polyome. L'abscisse représente la distance entre la jonction du virus avec l'ADN cellulaire et l'extrémité la plus éloignée du fragment en question (selon la figure 9). La courbe représente donc la baisse d'amplification en 3' du virus polyome à mesure que l'on s'éloigne du site d'intégration du virus. Les points identifiés sur la courbe indiquent l'enzyme de restriction utilisée et l'amplification du fragment en question.

Figure 13



adjacent du virus, l'amplification est faible. Du côté droit (figure 13), la chute semble progressive et nécessiterait une analyse plus détaillée.

Il semblerait donc, du moins en 5', que l'amplification est non linéaire et qu'elle soit bloquée entre 2 et 2,4 kb. Or, lors des études antérieures⁷⁸, la zone de l'ADN courbe avait été localisé environ entre 1 et 2 kb, c'est-à-dire de *KpnI* à *BamHI*, et aussi environ entre 3 et 5 kb, de *HindIII* à *HindIII* en 5' du site d'intégration du virus polyome (voir la figure 9). Les fourches de réplication sembleraient donc arrêter tout de suite après une région d'ADN courbe ou encore au contact d'une de celle-ci puisque l'on ne sait pas exactement où se situe l'ADN courbe dans ces régions. En 3', l'ADN courbe avait été localisée dans la région du INS et aussi de la fin du INS à environ 1 kb dans l'ADN cellulaire (voir la figure 9). Or, à la figure 13, il est possible que la chute d'amplification la plus importante soit justement dans le INS. Une analyse plus approfondie de cette région serait donc très intéressante.

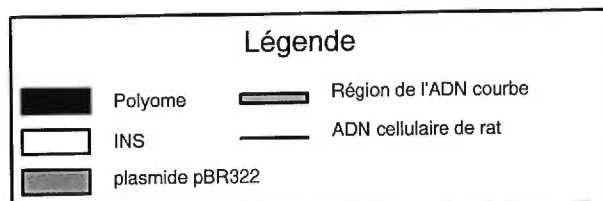
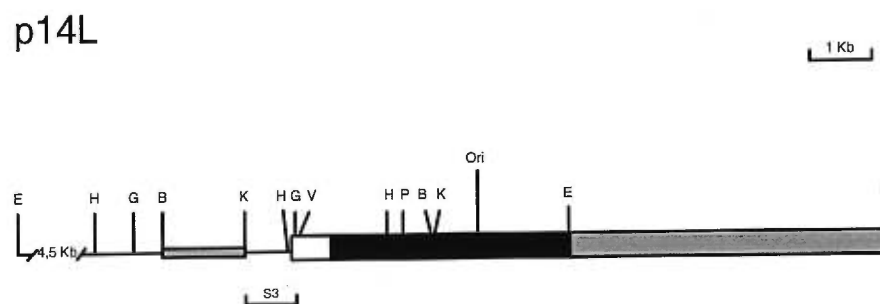
III.5 ESSAI EXTRA-CHROMOSOMIQUE

Pour déterminer si ce rôle de barrière de réplication est intrinsèque à la structure ou s'il est lié au contexte génomique de la cellule, nous avons utilisé un plasmide contenant la barrière présumée. Le plasmide a été créé par John Wallenburg¹⁰⁷ et est constitué du plasmide pBR322 dans lequel on a inséré, aux sites *EcoRI*, une séquence du clone W98.14. Cette séquence s'étend du site de restriction *EcoRI* du virus jusqu'au site *EcoRI* dans l'ADN cellulaire flanquant en 5' à environ 8,4 kb de la jonction

Figure 14: Carte physique de la structure du plasmide p14L.

Il s'agit de l'intégration d'une séquence d'ADN du clone W98.14 aux sites *EcoRI* du plasmide pBR322. La séquence comprend le virus polyome intégré de son site *EcoRI* jusqu'à son extrémité 5' (fragment contenant son origine), le INS adjacent ainsi qu'environ 8,4 kb de l'ADN cellulaire adjacent en 5' du site d'intégration du virus (voir la figure 9). Le plasmide est représenté linéairement pour les besoins de la figure mais il est normalement circulaire. Ori représente l'origine de réplication du virus polyome. Enzymes de restriction utilisées: B; *Bam*HI, E; *Eco*RI, G; *Bgl*II, H; *Hind*III, K; *Kpn*I, P; *Pst*I, V; *Pvu*II (les sites de restriction ne sont pas tous illustrés).

Figure 14



avec le virus (voir la figure 14). Le plasmide est donc constitué du plasmide pBR322, d'une partie du virus polyome (contenant l'origine de réplication mais ne contenant pas toute la séquence codant pour l'antigène Grand T), d'une partie du INS et d'environ 8,4 kb d'ADN cellulaire adjacent au virus dans le clone W98.14. Ce plasmide se nomme p14L et a un poids approximatif de 17,2 kb.

Le plasmide p14L a été transfecté, selon la méthode de DEAE-Dextran, dans les cellules MOP-8. Ces cellules sont des cellules de souris NIH 3T3 comportant une copie intégrée de la région précoce du génome du virus polyome (dont fait partie l'antigène Grand T) ce qui permet aux molécules d'ADN exogènes avec l'origine de réplication du virus polyome de se répliquer⁸². Ces cellules sont permissives pour le virus polyome et puisqu'elles comportent une copie de l'antigène Grand T intégrée dans leur génome, p14L peut s'y répliquer.

L'ADN plasmidique a été recueilli 8 et 48 h après la transfection. En théorie, après seulement 8 h, le plasmide ne s'est pas encore répliqué. L'ADN récolté 8 h après transfection constitue donc un témoin sans réplication. Après 48 h, par contre, le plasmide a pu se répliquer plusieurs fois.

Dans un premier temps, nous avons vérifié s'il y avait vraiment réplication du plasmide p14L après 48 h dans les cellules MOP-8. Pour différencier l'ADN répliqué de l'ADN non-répliqué, nous avons fait des tests Dpn I^{24,82}. Cette enzyme fait la distinction entre l'ADN répliqué dans les cellules eucaryotes et celui répliqué dans les cellules procaryotes grâce à

la différence existant dans la méthylation des nucléotides adénines. L'endonucléase *DpnI* peut seulement digérer l'ADN méthylé aux adénines dans les deux brins⁷⁶. Or, la réplication dans les cellules de mammifères ne présente pas cette méthylation alors que celle dans les cellules bactériennes la présente. L'enzyme de restriction *DpnI* digère donc l'ADN plasmidique initial utilisé pour la transfection mais ne digère pas l'ADN qui est répliqué dans les cellules de mammifères²⁴. La sonde S3 a été utilisée pour le criblage des bandes après Southern¹⁰¹ (voir la figure 14).

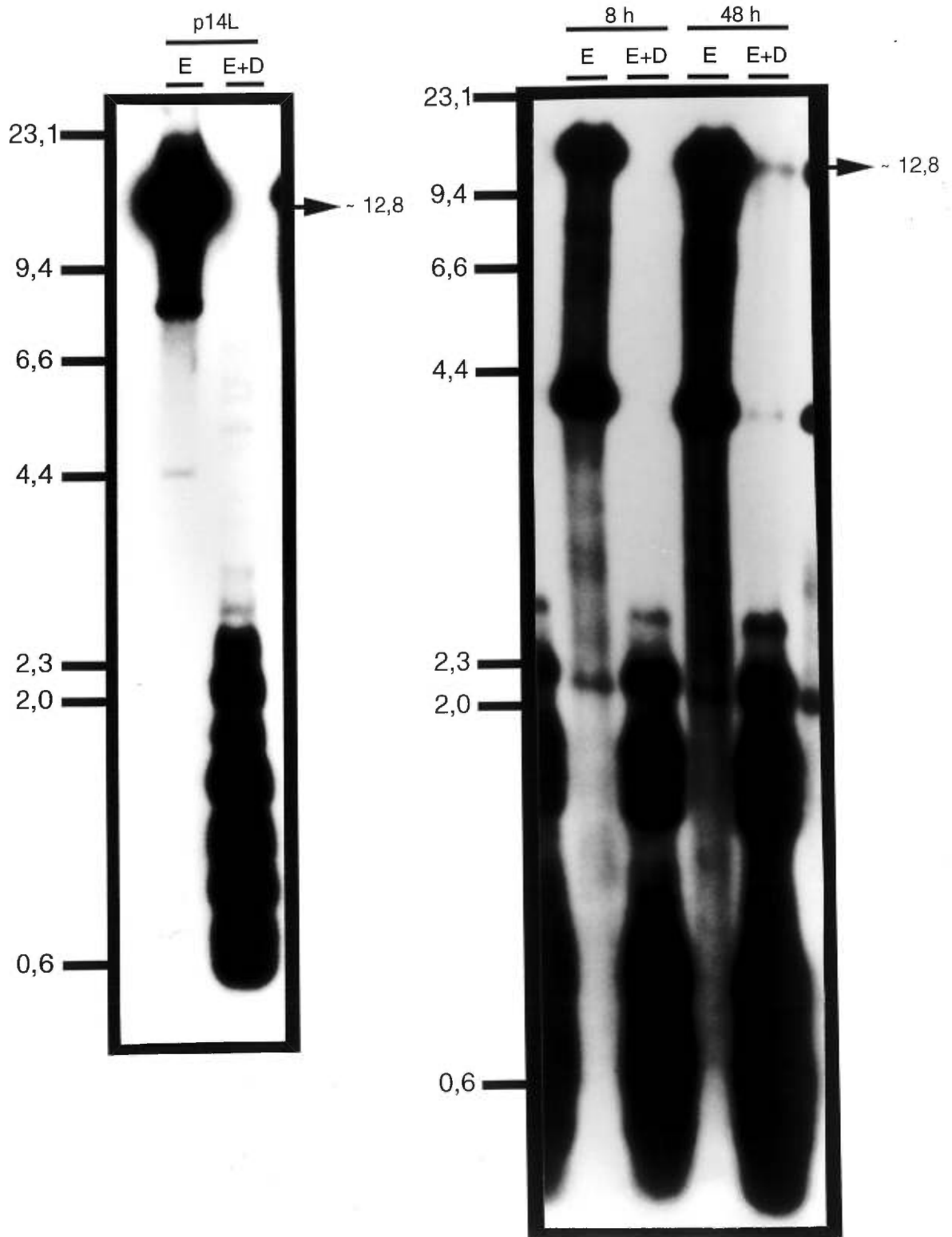
À la figure 15, on remarque d'abord que le témoin p14L, le plasmide de départ non transfecté, une fois digéré par *EcoRI*, montre la bande attendue au poids de 12,8 kb, le poids du fragment inséré dans pBR322 en entier. Par contre, lorsqu'il est digéré à la fois par *EcoRI* et *DpnI*, cette bande disparaît complètement et fait place à une traînée de plus faible poids moléculaire. Ceci est normal puisque ce témoin n'a jamais été transfecté dans les cellules eucaryotes, les nucléotides adénines y sont donc méthylés et la traînée est due aux nombreux fragments *DpnI* de longueur variable⁸¹. C'est pourquoi aucune copie du fragment de 12,8 kb ne résiste à la digestion par *DpnI*.

Dans l'ADN plasmidique recueilli 8 h après la transfection, les digestions donnent le même patron de bandes que pour le témoin (les bandes additionnelles après digestion par *EcoRI* sont dues à de l'activité "star" dont l'analyse et les résultats ne sont pas montrés). Cet ADN ne s'est donc pas répliqué dans les cellules MOP-8. Pour ce qui est de l'ADN plasmidique recueilli 48 h après la transfection, la digestion par *EcoRI* montre bien la bande à 12,8 kb tout comme pour les deux types d'ADN précédents. Dans le puit de la digestion par *EcoRI* et *DpnI* par contre, cette

Figure 15: Analyse de Southern du plasmide p14L digéré par *DpnI* en utilisant la sonde cellulaire S3.

Le plasmide p14L a d'abord été transfecté dans des cellules MOP-8, puis l'ADN plasmidique a été récolté 8 et 48 h après la transfection. Cet ADN a ensuite été digéré par *EcoRI* et une partie de cet ADN a aussi été digérée par *DpnI*. Par la suite, l'ADN a été transféré sur membrane et hybridé avec la sonde S3 (voir la figure 9). p14L représente le témoin de l'ADN initial non transfecté. Enzymes de restriction utilisées: E; *EcoRI*, D; *DpnI*.

Figure 15



bande, bien que plus faible, est encore présente (bien que la quantité d'ADN soit légèrement supérieure dans ce puit, cette bande est significative puisque dans le cas de l'ADN témoin et celui recueilli 8 h après transfection, nous ne pouvons distinguer de bande résistante à *DpnI* même avec une très longue exposition du film radiographique). Cela signifie qu'une partie de l'ADN plasmidique recueilli 48 h après transfection s'est répliquée dans les cellules MOP-8.

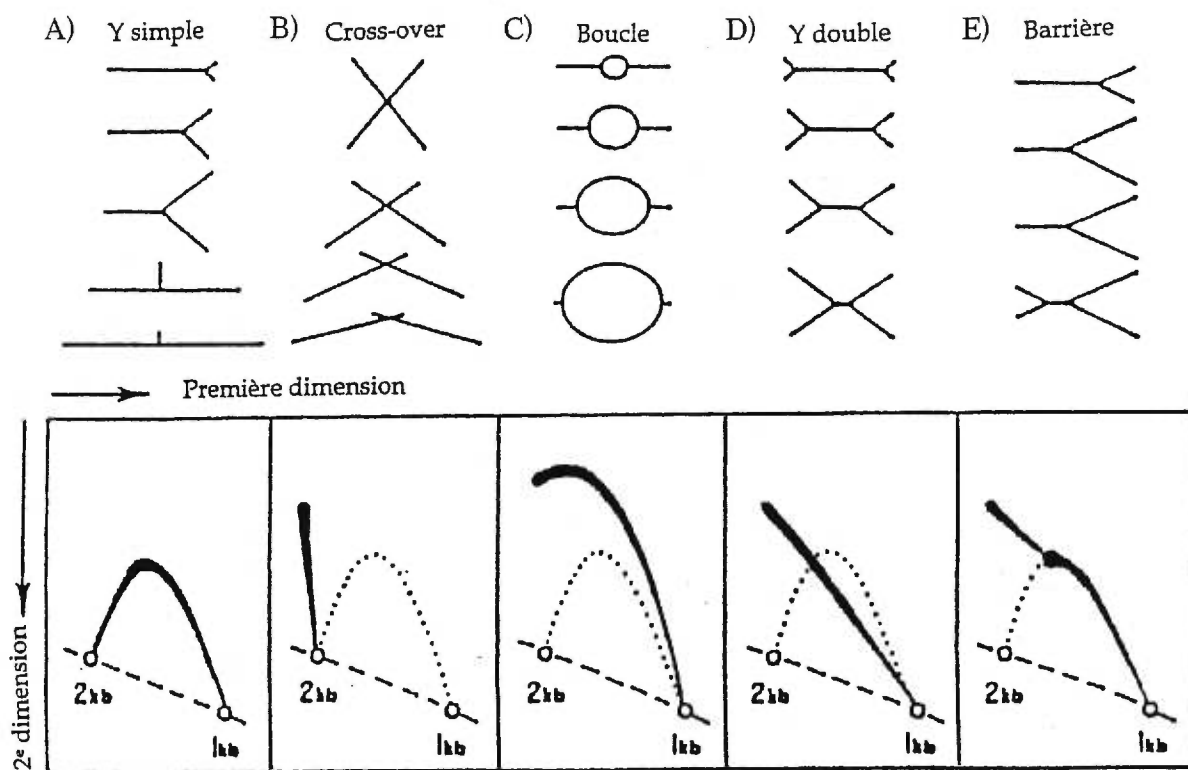
Une fois la réplication du plasmide vérifiée, nous avons utilisé la méthode de gel en deux dimensions de Brewer et Fangman^{14,16} pour suivre les fourches qui traverseront (répliqueront) la séquence cellulaire adjacente au virus. La méthode de gel en deux dimensions consiste en la séparation de fragments d'ADN qui proviennent de cellules non synchrones donc qui représentent tous les intermédiaires de réplication. La méthode permet alors de suivre le déplacement des fourches de réplication dans ce fragment.

Dans notre cas, l'origine de réplication du virus polyome est près d'une des extrémités du fragment de 12,8 kb (digestion par *EcoRI*, voir la figure 14). Selon la méthode de gel en deux dimensions, nous devrions donc, en premier lieu, voir la forme de la courbe représentant une boucle (C de la figure 16) puisque la réplication est bidirectionnelle et que le fragment étudié contient cette origine. Par la suite, la courbe devrait indiquer un Y simple (A de la figure 16) puisque l'origine est près d'une extrémité de l'ADN digéré (site *EcoRI* du virus polyome à environ 1,5 kb de l'origine). Une fois que la boucle s'ouvre à cette extrémité, nous ne suivons alors que la progression de la fourche qui se déplace du virus vers l'ADN cellulaire adjacent. Normalement, en allant vers l'extrémité cellulaire du fragment nous devrions rencontrer la forme de Y double (D de la figure 16) puisque

Figure 16: Exemples schématisés de résultats possibles selon la méthode de gel en 2 dimensions de Brewer et Fangman.

Les exemples ont été créés en variant l'emplacement de l'origine sur un fragment de restriction arbitraire de 1 kb. La partie du bas montre la migration attendue sur gel en deux dimensions de quatre types de fourches de réplication montrés plus haut. La première dimension, de gauche à droite, sépare les molécules selon la proportion de leur masse; la deuxième dimension, de haut en bas, exagère la contribution de la forme tridimensionnelle de la molécule. Les lignes pointillées indiquent l'emplacement des molécules linéaires de différentes tailles. Les intermédiaires de réplication sont représentés au-dessus de chaque courbe et sont placés de haut en bas avec l'accroissement de leur masse. Le patron des intermédiaires de réplication dans ce type de gel est unique pour chaque classe d'intermédiaires. C'est pourquoi, le patron spécifique d'un fragment révèle son mode de réplication. Les intermédiaires de recombinaison peuvent aussi être observés sur ce type de gel (B). Dans cet exemple, la masse est constante à deux kb mais la position du "cross-over" varie. Dans la deuxième dimension la molécule possédant quatre bras de longueur identique est celle qui migre le plus lentement. La figure est tirée de Brewer et Fangman¹⁶.

Figure 16



la séquence opposée à l'origine se trouve sur ce fragment à environ 8,6 kb de l'origine du virus (voir figure 14). A cet endroit, les fourches devraient se rencontrer, c'est pourquoi il y aurait un Y double.

Dans le cas, où le fragment du clone W98.14 intégré au plasmide p14L contiendrait une barrière de réplication, l'arrêt des fourches pourrait se produire à un autre endroit. En effet, si l'ADN courbe présent sur le fragment du clone W98.14 agit comme une barrière de réplication, la fourche qui se dirige vers l'ADN cellulaire arrivera à cette séquence la première et s'y arrêtera. Pendant ce temps, l'autre fourche de réplication parcourra le plasmide pBR322, rejoindra ensuite l'ADN cellulaire et poursuivra sa progression jusqu'à la rencontre de l'autre fourche. Nous aurions alors un point sur la courbe comme à la figure 16 (E). Ce point représente l'accumulation de plusieurs intermédiaires de réplication tous arrêtés au même endroit sur le fragment.

On a donc procédé à la digestion par *EcoRI* de l'ADN plasmidique recueilli 8 et 48 h après transfection du plasmide p14L dans les cellules MOP-8 (le même ADN que pour le test *DpnI*). Ensuite, on a mis ces fragments de restriction sur gel d'électrophorèse selon la méthode de Brewer et Fangman^{14,16} avec des modifications basées sur celles apportées par le groupe de Little⁶⁸ pour de grands fragments. Les gels ont ensuite été transférés sur des membranes de nylon selon la méthode de Southern¹⁰¹ et hybridés avec la sonde S3 (se reporter à la figure 14).

La figure 17 représente les résultats obtenus avec l'ADN extrait 8 h après la transfection, donc avant la réplication. On aperçoit un signal très intense correspondant, selon l'échelle de poids moléculaire utilisée dans la

Fig 17: Analyse de Southern du plasmide p14L recueilli 8 h après transfection en cellule MOP-8, obtenu par la méthode de gel en deux dimensions et en utilisant la sonde S3.

Le clone W98.14 a d'abord été transfecté dans des cellules MOP-8, puis l'ADN plasmidique a été récolté 8 h après la transfection. Par la suite, cet ADN a été digéré par *EcoRI* puis on a mis ces fragments de restriction sur gel d'électrophorèse selon la méthode de Brewer et Fangman^{14,16} avec des modifications basées sur celles apportées par le groupe de Little⁶⁸ pour de grands fragments. Les fragments sont d'abord séparés sur gel d'agarose de 0,28% pendant 96 à 120 h. Ensuite le puits contenant l'échantillon a été découpé, tourné de 90°, et placé au haut d'un nouveau support à gel d'électrophorèse. Par la suite, on y verse de l'agarose 0,58% et on procède à nouveau à une migration, cette fois-ci de 48 à 72 h. Le gel a ensuite été transféré sur membrane de nylon selon la méthode de Southern¹⁰¹ et hybridé avec la sonde S3 (se reporter à la figure 2 ou 14).

Figure 17

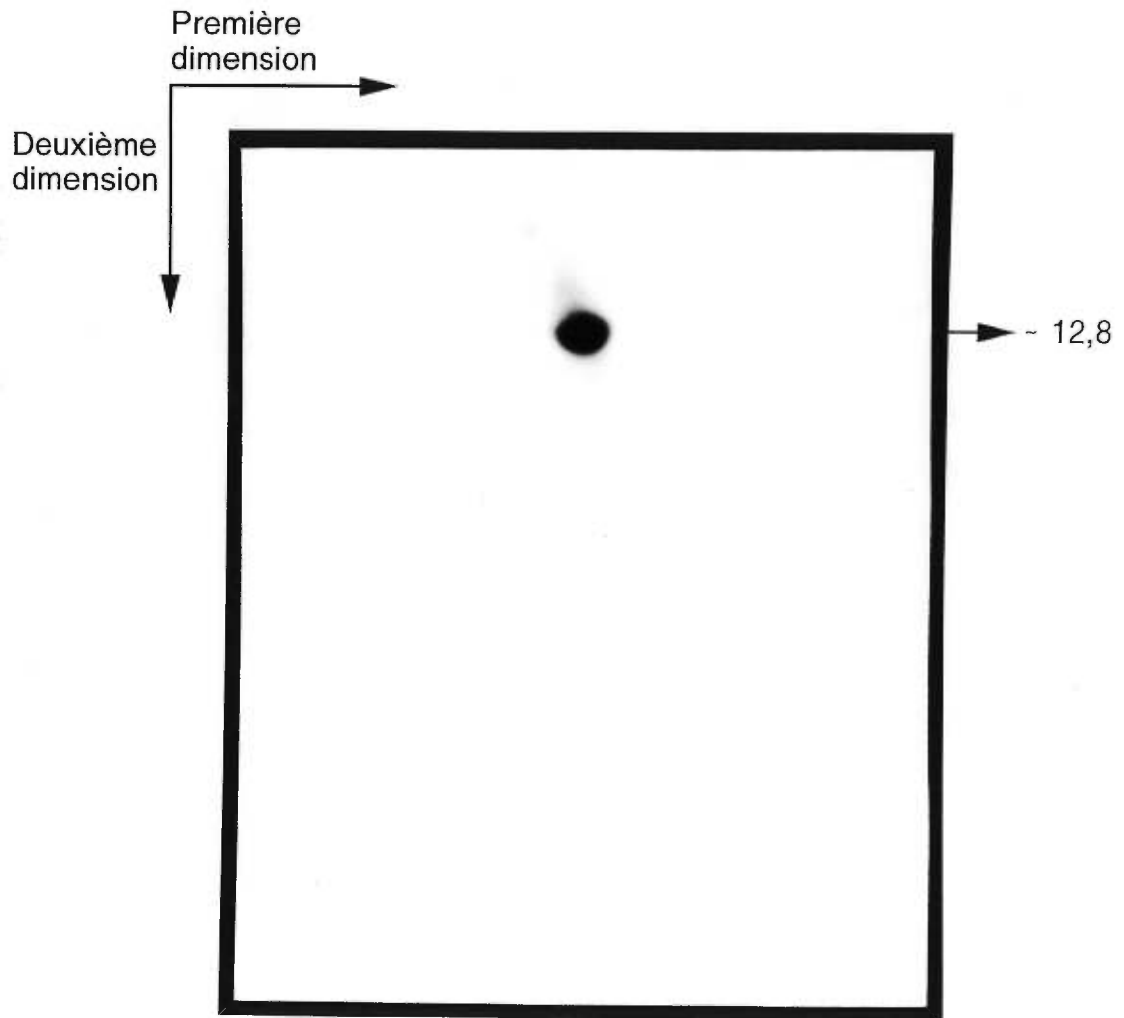
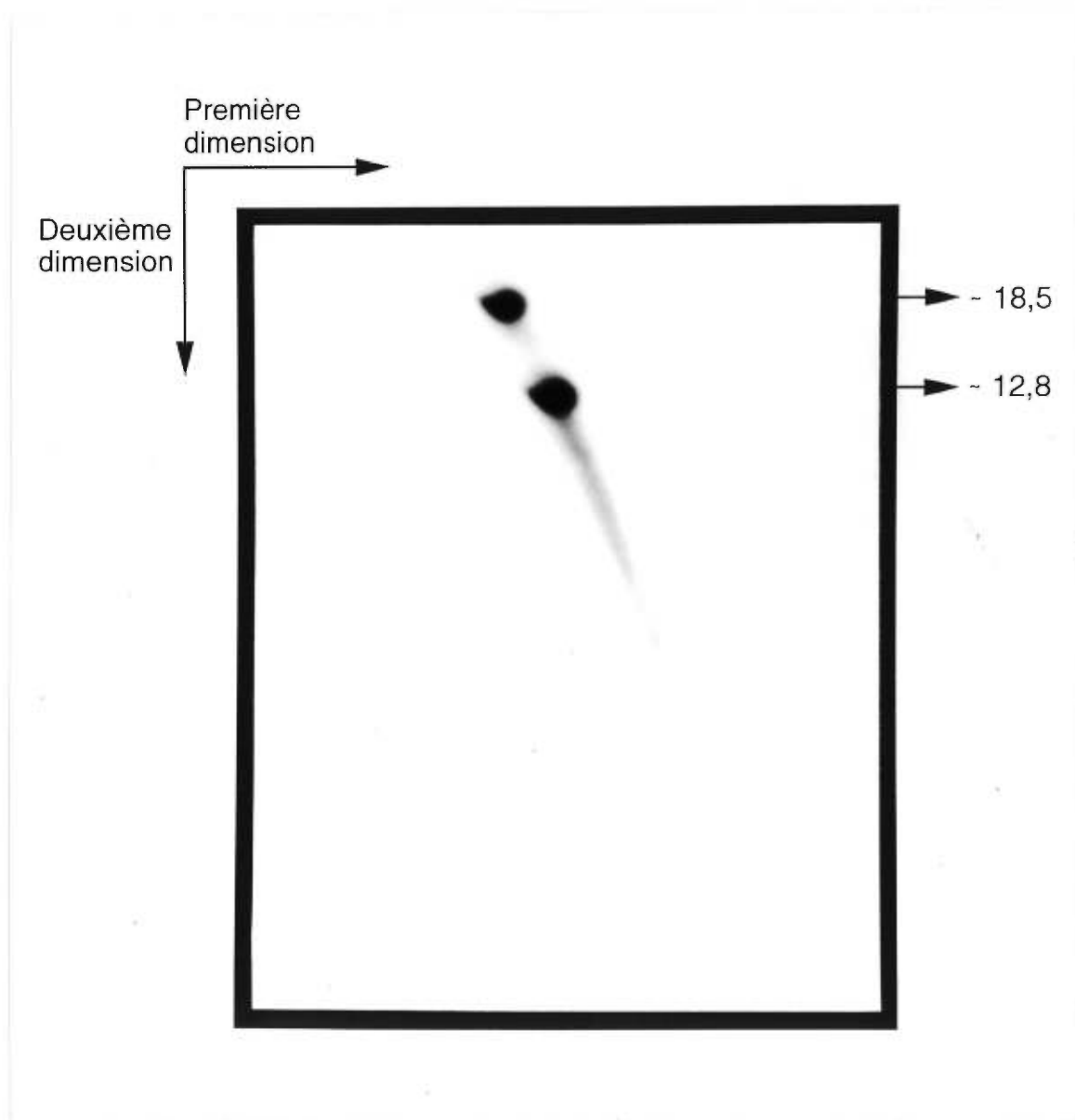


Figure 18: Analyse de Southern du plasmide p14L recueilli 48 h après transfection en cellule MOP-8, obtenu par la méthode de gel en deux dimensions et en utilisant la sonde S3.

Le clone W98.14 a d'abord été transfecté dans des cellules MOP-8, puis l'ADN plasmidique a été récolté 48 h après la transfection. Par la suite, cet ADN a été digéré par *EcoRI* puis on a mis ces fragments de restriction sur gel d'électrophorèse selon la méthode de Brewer et Fangman^{14,16} avec des modifications basées sur celles apportées par le groupe de Little⁶⁸ pour de grands fragments. Les fragments sont d'abord séparés sur gel d'agarose de 0,28% pendant 96 à 120 h. Ensuite le puits contenant l'échantillon a été découpé, tourné de 90°, et placé au haut d'un nouveau support à gel d'électrophorèse. Par la suite, on y verse de l'agarose 0,58% et on procède à nouveau à une migration, cette fois-ci de 48 à 72 h. Le gel a ensuite été transféré sur membrane de nylon selon la méthode de Southern¹⁰¹ et hybridé avec la sonde S3 (se reporter à la figure 2 ou 14).

Figure 18



première dimension à environ 12,8 kb. Ce signal représente donc toutes les copies du fragment linéaire mis sur gel. L'ADN forme ici un seul point puisqu'il n'y a eu aucune répllication 8 h après transfection.

La situation est toutefois différente pour l'ADN extrait 48 h après la transfection. À la figure 18, on peut apercevoir deux signaux très intenses. Le signal le plus bas correspond tout à fait à celui de la figure 17 d'environ 12,8 kb. Il s'agit donc aussi de fragments non répliqués ou complètement répliqué (la traînée d'ADN partant de ce point est le résultat d'un peu d'activité "star"). La présence d'un deuxième point montre tout d'abord qu'il y a une différence entre l'ADN s'étant répliqué et celui qui ne s'est pas répliqué. Grâce à l'échelle de poids moléculaire on peut évaluer approximativement le poids de ce signal à 18,5 kb. Le poids n'est qu'approximatif puisque l'ADN est probablement non linéaire. Cela voudrait dire que ce fragment de 18,5 kb comporte plusieurs fourches arrêtées. Comme ce fragment n'est pas de 25,6 kb (le double de la molécule de départ de 12,8 kb), ce n'est pas le fragment répliqué en entier. En supposant que l'arrêt se produise au site *KpnI* à environ 6,2 kb du site *EcoRI* viral (selon les résultats de la figure 12), le poids du fragment serait d'environ 19 kb sous la forme d'un Y simple (voir la discussion p.87). Ceci confirmerait les résultats précédents mais ici nous ne pouvons pas déterminer la masse au niveau du deuxième point assez précisément pour en être certain. Des tests supplémentaires devraient être faits pour vraiment confirmer ce résultat. Tout de même, selon la figure 16, nous serions donc en présence d'une barrière puisqu'il s'est formé un point représentatif de plusieurs intermédiaires de répllication rendus au même stade de la répllication du fragment analysé.

Il n'en demeure pas moins que nous observons une différence entre les figures 17 et 18 ce qui démontre l'efficacité de la technique à représenter la réplication. De plus, la présence d'un deuxième point à la figure 18 nous montre qu'il y a des intermédiaires de réplication et puisqu'il s'agit d'un point intense, que le fragment étudié contiendrait une barrière de réplication selon le modèle de la figure 16.

IV. DISCUSSION

Les progrès effectués, en vue d'une meilleure compréhension du processus de la réplication de l'ADN, ont permis d'émettre l'hypothèse de l'existence des barrières de réplication. Ces hypothèses se sont avérées exactes chez plusieurs organismes autant procaryotes qu'eucaryotes (voir l'introduction pp. 4-8). Cependant, la question demeurerait en ce qui concerne l'ADN génomique des cellules de mammifères. Toutefois, la connaissance de plus en plus approfondie du processus de réplication dans ces cellules a apporté des éléments de réponse à cette question, entre autre par le fait que les chromosomes des cellules de mammifères sont subdivisés en domaines quasi-indépendants.

Nous connaissons maintenant de plus en plus de choses sur les origines de réplication. Nous savons, entre autre, qu'il y en a plusieurs (probablement une par domaine) et qu'elles ne sont pas toutes activées au même moment (voir l'introduction p. 3). Ces données tendent à confirmer par elles-mêmes l'hypothèse de l'existence des barrières de réplication puisqu'il est normal de penser qu'il doit y avoir quelque chose pour séparer les domaines et empêcher une origine précoce de répliquer des gènes tardifs.

Le but du travail décrit ici était donc de confirmer qu'il y avait des barrières de réplication dans des fibroblastes de rats. Les clones utilisés sont dérivés de cellules FR3T3 dans lesquelles une copie du génome du virus polyome est intégrée. Ce génome viral nous a fourni une origine de

réplication déterminée et inductible, et nous permet d'amplifier le ratio ADN répliqué/ADN non répliqué.

Nous avons d'abord vérifié qu'il y avait bien induction de l'origine de réplication du virus polyome de nos clones. Pour ce faire, nous avons comparé l'amplification d'un fragment viral et d'un fragment d'ADN cellulaire adjacent de chaque côté du site d'intégration du virus. Aux figures 4 et 5, on remarque que même si la sensibilité de l'expérience n'était pas suffisante pour détecter les fragments viraux avant l'induction, il est facile de détecter les fragments viraux a et a' après induction de la réplication du virus, ce qui permet de conclure qu'il y a effectivement eu amplification de l'ADN viral. L'absence de signal pour l'ADN non-induit ne nous permet toutefois pas de quantifier cette amplification. De plus, les sondes utilisées étant des séquences virales, on ne peut faire la distinction entre l'amplification de l'ADN viral intégré et celui des formes libres du virus. Tout de même, les signaux de 5,3 et 2,7 kb correspondant à ces formes libres suggèrent de par leur intensité inférieure à celle des fragments a et a', que les virus demeurés intégrés ont aussi été amplifiés. Les fragments de différentes longueurs pouvant se transférer avec une efficacité différente, nous comptons sur les témoins une copie pour faire la comparaison entre des fragments de même longueur mais ces témoins n'ont pas été visibles.

Le fait que les signaux des formes libres de 5,3 et 2,7 kb soient très intenses remet par contre notre hypothèse de départ en question. En effet, malgré une recherche exhaustive, il a été impossible d'isoler des formes excisées comportant des séquences cellulaires de rat^{86,107}. Ces résultats nous avaient mené à émettre l'hypothèse que le faible taux d'ADN cellulaire

dans les formes libres de ces clones pouvait être dû à la présence de barrières de réplication à proximité du site d'intégration dans l'ADN cellulaire. Or, d'après les résultats, la majorité des formes libres est constituée exclusivement de l'ADN viral. Ces formes excisées ne contiennent même pas l'ADN cellulaire de souris, le INS. Il y a donc un autre mécanisme permettant au virus de s'exciser seul. Ceci s'explique par la présence de deux sites de recombinaison homologue de 182 pb flanquant le virus dans le plasmide RM1^{13,103}. Une telle recombinaison donne donc un fragment d'une longueur bien définie et c'est ce qui nous donne les signaux à 5,3 et 2,7 kb selon la digestion enzymatique effectuée. Les virus qui s'excisent par recombinaison illégitime, eux, donnent des formes libres de différentes longueurs et ne forment donc pas de signal bien défini. Ils forment une traînée qui n'est pas visible ici probablement à cause du fait que la sensibilité de la technique n'est pas assez grande.

En résumé, les résultats des figures 4 et 5 démontrent qu'il y a eu induction de l'origine de réplication virale et que la majorité des formes excisées contiennent seulement le génome viral. Ces résultats n'excluent toutefois pas la possibilité qu'il y ait des barrières de réplication dans l'ADN cellulaire flanquant la molécule RM1 puisque même lorsque le virus s'excise par recombinaison illégitime, les études antérieures^{86,107} n'ont pu y identifier de l'ADN cellulaire de rat. Nous avons donc poursuivi l'analyse de l'amplification de l'ADN cellulaire par le virus pour tenter d'expliquer ce phénomène.

Pour mieux quantifier l'amplification de l'ADN cellulaire adjacent au site d'intégration du virus polyome, l'expérience a été reprise à l'aide de

sondes cellulaires. Les résultats (voir les figures 7 et 8) ont montré une nette différence d'intensité entre les signaux obtenus pour l'ADN induit et non induit. On possède alors une évidence directe que l'origine de réplication du virus est véritablement induite et que le virus intégré procède à des rondes de réplication multiples. Cela nous donne aussi des évidences que l'ADN cellulaire flanquant le virus est lui aussi amplifié par ces rondes de réplication multiples. Ces résultats sont encore plus convaincants que les précédents puisqu'ici les sondes utilisées sont cellulaires et n'hybrident donc pas avec les formes libres détectables dans ces clones. Les résultats montrent aussi clairement que les fragments situés à environ 10,5 kb du virus ne sont pas amplifiés. Ils ont la même intensité de signal que l'ADN ait été induit ou non. L'amplification de l'ADN cellulaire semblerait donc arrêter des deux côtés du site d'intégration du virus quelque part entre l'extrémité la plus éloignée du virus, du fragment proximal, et celle du fragment distal (voir la figure 6).

Que le complexe de réplication ne puisse franchir plus de 10,5 kb d'un côté comme de l'autre du virus est à prime abord surprenant, d'autant plus que tous les éléments, à l'exception de l'antigène Grand T, utilisés par le virus pour la réplication sont cellulaires. Or, ces complexes peuvent normalement répliquer des centaines de kb (voir les résultats p.48). Il est possible que les activités hélicase et primase de l'antigène Grand T ne soient pas aussi performantes que celles des enzymes cellulaires et que de ce fait, la réplication ne se fasse que sur une courte distance, mais aucune donnée n'a été rapportée à ce sujet jusqu'à présent. Par conséquent, nos résultats suggèrent donc que l'arrêt de la réplication est dû à un effet d'une séquence particulière, donc à la présence d'une barrière de réplication.

Une fois l'induction vérifiée et deux barrières potentielles identifiées, nous avons voulu mieux cerner où s'arrête l'amplification et voir si cet arrêt est fait de façon progressive ou à un endroit déterminé. Une baisse progressive du nombre de copies pourrait indiquer qu'il s'agit d'une atténuation plutôt que d'un véritable arrêt à une barrière de réplication. Pour vérifier cela, nous avons donc procédé à plusieurs digestions enzymatiques qui donnent des fragments de différentes longueurs et à différentes distances du virus.

Les résultats (figures 10 et 11) ont d'abord reconfirmé que l'induction du virus était efficace puisqu'ici encore tous les signaux de l'ADN induit sont plus intenses que ceux de l'ADN non induit. Pour mieux évaluer la baisse de l'amplification, des courbes de ces résultats ont été tracées. Elles illustrent le ratio entre l'ADN induit et non induit d'un même fragment par rapport à la distance de leur extrémité la plus éloignée du virus avec celui-ci.

À la figure 12, on peut voir une nette chute de l'amplification entre 2 et 2,4 kb de distance de la jonction ADN cellulaire et ADN viral. Après 2,4 kb, l'amplification n'est que d'un facteur de deux alors qu'au départ l'ADN est amplifié près de cinq fois. Le fait que le ratio ne tombe pas à un pourrait s'expliquer par le fait qu'une barrière de réplication ne bloque pas nécessairement toutes les fourches qui la rencontre et que si elle est unidirectionnelle, une fourche provenant de l'autre côté, donc d'une origine de réplication cellulaire, a pu la traverser. Il resterait donc deux copies de cet ADN pendant un moment, c'est-à-dire jusqu'à la division cellulaire. De plus, les barrières servent peut-être seulement à ralentir les fourches de

réplication pour permettre un “check point”. De toute façon une barrière doit laisser passer au moins une fourche de réplication à un moment donné puisqu’elle doit elle-même être répliquée.

De part ces données, on peut conclure que nous sommes donc en présence d’une barrière de réplication, quelle qu’elle soit, puisque plus de la moitié des fourches de réplication y sont arrêtées et que cet arrêt se fait en un point déterminé. Un fait très intéressant est qu’une structure d’ADN courbe a été identifiée dans cette région c’est-à-dire entre 1 et 2 kb (de *KpnI* à *BamHI*) en 5’ du plasmide intégré⁷⁸. Or, la chute d’amplification se fait justement tout de suite à partir de la fin de cette région. Des études plus approfondies seraient nécessaires pour confirmer que la structure d’ADN courbe joue vraiment un rôle de barrière de réplication, mais pour le moment leur emplacement coïncident.

En 3’ de l’intégration (voir la figure 13), la baisse de l’amplification semble progressive. Toutefois, l’emplacement de la région de l’ADN courbe de ce côté du virus se trouve en partie dans le INS (voir la figure 9). Il est donc possible que la plus forte chute du nombre de copies se produise dans le INS et c’est pourquoi la chute serait progressive dans l’ADN cellulaire flanquant. Malgré tout, la différence entre la baisse de l’amplification de chaque côté du virus tend à confirmer qu’il existe vraiment un élément dans l’ADN cellulaire en 5’ du virus qui peut arrêter des fourches de réplication.

Par la suite, nous avons cherché à savoir si le rôle de barrière de réplication est intrinsèque à la séquence d’arrêt identifiée ou s’il est lié au

contexte génomique. Pour procéder à cette analyse, nous avons utilisé le plasmide p14L contenant une partie du virus dont son origine et une séquence d'ADN cellulaire contenant la barrière présumée, insérées dans le plasmide pBR322.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que ce plasmide pouvait se répliquer suite à une transfection dans les cellules MOP-8⁸². Pour se faire, nous avons procédé à un test *DpnI*^{24,82}. Les résultats de ce test (voir la figure 15) démontrent une résistance à *DpnI* de l'ADN recueilli 48 h après la transfection alors que l'ADN recueilli après 8 h et le témoin non transfecté sont complètement digérés par cette enzyme. Ces résultats confirment donc la théorie à savoir que le plasmide ne s'est pas encore répliqué après 8 h mais qu'il peut le faire par la suite puisque les cellules MOP-8 lui fournissent l'antigène Grand T. Il est normal que seule une fraction de l'ADN plasmidique recueilli 48 h après transfection puisse s'y répliquer parce que l'efficacité de transfection n'est pas de 100%. De plus, la quantité d'ADN initiale ayant été transfectée est importante et celle-ci présente la méthylation adénine. Il est aussi possible que l'efficacité de l'origine de répllication ou la quantité d'antigène Grand T fournie par la cellule soit telle que seule une partie des plasmides réussisse à se répliquer.

Une fois la répllication du plasmide vérifiée, nous avons procédé à l'analyse des intermédiaires de cette répllication sur gel en deux dimensions. Cette méthode permet de suivre les fourches de répllication à travers un fragment choisi. Dans un premier temps, il faut souligner que nous n'avons pas obtenu de courbes comme au modèle de Brewer et Fangman¹⁶ (voir la figure 16). Des essais avec d'autres plasmides (résultats non montrés) nous

suggèrent qu'aux figures 17 et 18, il y avait une quantité d'ADN insuffisante pour que la courbe soit visible. Lors de l'extraction de l'ADN plasmidique après transfection du plasmide p14L, nous ne sommes pas arrivés à obtenir des quantités d'ADN suffisantes et cela, après plusieurs tentatives. Ainsi, pour ces quantités limitantes d'ADN, il est facile de détecter les fourches de réplication qui se sont accumulées en grand nombre à la barrière après 48 h de réplication. Par contre, la quantité des intermédiaires de réplication qui ne sont pas encore arrivés à la barrière, semble insuffisante pour que la courbe soit visible.

Une autre explication pourrait être que la quantité d'antigène Grand T fournie par les cellules MOP-8 soit insuffisante pour permettre au plasmide de se répliquer en grande quantité ou encore que l'efficacité de transfection soit faible et ainsi, très peu de plasmides pourraient se répliquer. Cependant, ces deux dernières hypothèses sont contradictoires au fait qu'il y ait un signal, à environ 18,5 kb, très intense à la figure 18. Ce signal, de par son intensité, indique qu'il y a eu une quantité importante de plasmide s'étant répliquée.

Cette grande quantité d'ADN répliqué pourrait sembler contredire les résultats du test *DpnI* (voir la figure 15). Cependant, par la méthode de gel en deux dimensions nous détectons toutes les formes intermédiaires s'étant arrêtées au même point alors qu'avec le test *DpnI* seules les formes ayant effectuées la réplication complète du fragment de 12,8 kb paraissent être résistantes à l'enzyme.

Grâce à des tests effectués avec d'autres plasmides nous nous sommes, toutefois, assurés que la méthode fonctionnait (résultats non montrés). De plus, les résultats obtenus à 8 et 48 h après transfection démontrent une différence entre l'ADN s'étant répliqué et celui qui ne s'est pas répliqué (voir la figure 17 et 18). La méthode serait donc efficace à représenter les intermédiaires de réplication.

Le point très intense d'environ 12,8 kb présent sur les deux figures représente sans aucun doute le fragment linéaire de l'ADN non répliqué (voir les figures 17 et 18). Il est possible de tirer cette conclusion par le fait que la figure 17 représente seulement de l'ADN non répliqué à 8 h post-transfection et que le fragment analysé a justement un poids de 12,8 kb (à la figure 18, ce point peut aussi contenir les fragments dont la réplication est complétée). Il faut dire que l'estimation du poids des fragments obtenus est très approximative de par le fait que les marqueurs de poids moléculaire ne peuvent être utilisés que dans la première dimension du gel et que les fragments dont ils sont constitués sont linéaires. La migration d'un fragment non linéaire est différente et ne peut alors être vraiment déterminée grâce aux marqueurs. Cependant, pour ce qui est de l'ADN non répliqué, il devrait être assez linéaire alors ce facteur n'interviendrait pas dans ce cas. L'approximation de la masse devrait donc être relativement correcte. Dans le cas du deuxième point de la figure 19 par contre, ce facteur entre en jeu, c'est pourquoi le poids de 18,5 kb reste approximatif.

Il est intéressant de noter que le fragment d'ADN répliqué ne semble pas avoir une masse assez grande pour représenter les deux copies entières du fragment de 12,8 kb. Il s'agirait donc de plusieurs intermédiaires de

réplication, tous arrêtés au même site sur le fragment. Selon le modèle de Brewer et Fangman¹⁶, ce point représenterait donc l'emplacement d'une barrière de réplication.

Ces résultats indiqueraient aussi que le rôle de barrière est intrinsèque à la structure et non lié au contexte génomique puisqu'ici la barrière a été sortie de son contexte normal. De plus, de par notre approximation de son poids (18,5 kb), cet arrêt des fourches coïnciderait avec les résultats de la figure 12 et de l'emplacement de la zone d'ADN courbe. En effet, l'emplacement de l'arrêt précédemment identifié (au site *Bam*HI) est à 6,2 kb du site *Eco*RI viral. Un intermédiaire de réplication arrêté à cet endroit devrait donc être sous forme d'un Y simple et avoir une masse d'environ 19 kb puisqu'il serait composé de deux branches jusqu'à 6,2 kb et une seule branche pour le reste du fragment c'est-à-dire environ 6,6 kb, ce qui fait un poids total de 19 kb. Une analyse plus approfondie serait nécessaire pour confirmer que la barrière de réplication identifiée correspond vraiment à cette structure d'ADN courbe mais jusqu'à maintenant tout semble indiquer que tel est le cas.

Le fait d'avoir obtenu une barrière fonctionnelle sur un plasmide ouvre tout de même plusieurs perspectives. Tout d'abord, il est maintenant possible de définir spécifiquement la nature de la barrière de réplication par mutagénèse dirigée. Après avoir défini la séquence de cette barrière, on pourra procéder à des expériences sur gel de retardement pour voir si une protéine s'y lie. Si oui, ce fragment serait alors un bon outil pour identifier cette protéine.

Une chose qui ne doit cependant pas être oubliée est que notre système permettant de suivre les fourches de réplication implique un virus et cela ne représente peut être pas exactement ce qui se passe normalement dans les cellules de mammifères. Si la barrière est similaire à celle des bactéries et des levures dans le sens où il s'agit d'une séquence reconnue par une protéine dite contra-hélicase, il est possible qu'elle n'agisse pas de façon identique avec l'antigène Grand T du virus polyome et les ADN hélicases de cellules de mammifères. À notre connaissance, aucune évidence concernant la différence entre les hélicases de mammifères et l'antigène Grand T n'a été identifiée mais cela demeure une possibilité. Il se pourrait aussi que le virus possède un mécanisme pour inhiber ou ralentir la réplication de l'ADN de la cellule hôte. Là encore, aucune étude n'a mis en évidence un tel système. De plus, une telle hypothèse serait peu compatible avec des intermédiaires de réplication tous arrêtés exactement aux mêmes séquences cellulaires. Nous nous attendrions plutôt à une atténuation progressive de l'amplification de l'ADN cellulaire.

Doit-on s'étonner que le virus polyome soit intégré près de barrières de réplication? Il est possible qu'il ne s'agisse pas de hasard puisque l'intégration du virus est accompagnée de réarrangements des séquences génomiques¹⁰⁶. Or ces réarrangements sont peut-être nécessaires pour isoler le virus polyome des domaines chromosomiques l'entourant. Un fait notable à ce sujet est que dans le clone W98.14, l'intégration du virus semble avoir eu lieu à l'intérieur d'une boucle de réplication puisque cette intégration a mené à une duplication⁷⁹.

Même si des doutes persistent quant à la ressemblance entre le complexe de réplication initié par l'antigène Grand T et les complexes naturels de la cellule, il reste que nous avons identifié une forme de barrière de réplication. Elle ne se retrouve peut-être pas dans le contexte normal de ces cellules mais elle demeure une nouvelle donnée dans la quête vers une meilleure compréhension de la réplication chez les mammifères.

Dans l'avenir, il sera très intéressant de poursuivre ces recherches puisque les barrières de réplication ont potentiellement une implication dans plusieurs maladies. Par exemple, dans les cellules cancéreuses, on conçoit que les barrières de réplication puissent être modifiées et que cette modification accroît la dérégulation du génome. Les origines de réplication peuvent aussi y être impliquées³⁹, c'est pourquoi une meilleure compréhension de tout le processus de réplication est si importante.

Une autre voie d'étude qui sera aussi très intéressante, est la recherche de similarités entre les barrières de réplication et les sites de terminaison de la transcription. Il pourrait s'agir de deux structures ayant évolué d'une même structure^{34,100}, d'une régulation commune aux deux structures^{25,26,80} ou encore d'une structure unique jouant les deux rôles. Les barrières de réplication pourraient aussi être un moyen d'éviter les collisions entre les deux complexes^{4,5,15,70,80}.

En conclusion, nous avons déterminé que le système utilisé fonctionne et permet de suivre les fourches de réplication dans les cellules de mammifères. Nous avons aussi montré que les rondes de réplication multiples effectuées par l'origine de réplication d'un virus polyome intégré

peuvent amplifier l'ADN cellulaire adjacent. De plus, nous avons identifié un site d'arrêt de plusieurs fourches de réplication en un point assez précis de l'ADN cellulaire. Des confirmations restent à venir en ce qui concerne le fait que l'ADN courbe serait une structure ayant un rôle de barrière de réplication mais pour le moment, rien n'indique le contraire.

V. BIBLIOGRAPHIE

1. **Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson,** (1989), *Biologie moléculaire de la cellule*, 2^e édition, Medecine-Sciences Flammarion, Paris, 1219 p.
2. **Anderson, J.N.,** (1986), Detection, sequence patterns and function of unusual DNA structure, *Nucleic Acids Res.*, **14**: 8513-33.
3. **Baker, T.A.,** (1995), Replication arrest, *Cell*, **80**: 521-4.
4. **Baran, N., A. Neer, H. Manor,** (1983), "Onion skin" replication of integrated sequences in polyoma-transformed rat cells: termination within a specific cellular DNA segment, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**: 105-109.
5. **Baran, N., A. Lapidot, H. Manor,** (1987), Unusual sequence element found at the end of an amplicon, *Mol. Cell. Biol.*, **7**: 2636-40.
6. **Bastia, D., J. Germino, J.H. Crosa, J. Ram,** (1981), The nucleotide sequence surrounding the replication terminus of *R6K*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 2095-9.
7. **Bierne, H., B. Michel,** (1994), When replication fork stop, *Mol. Micro.*, **13**: 17-23.
8. **Botchan, M., W. Topp, J. Sambrook,** (1978), Studies on Simian Virus 40 excision from cellular chromosome, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**: 709-19.
9. **Botchan, M., J. Stringer, T. Mitchison, J. Sambrook,** (1980), Integration and excision of SV40 DNA from the chromosome of a transformed cell, *Cell*, **20**: 143-152.
10. **Botchan, M.,** (1996), Coordinating DNA replication with cell division: Current status of the licensing concept, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 10189-94.

11. **Boulikas, T.**, (1996), Common features of replication origins in all life forms, *J.Cell. Biochem.*, 60: 297-316.
12. **Bourgaux P., L. Delbecchi, K.K.Y. Yu, E. Herring, D. Bourgaux-Ramoisy**, (1978), A mouse embryo cell line carrying an inductible, temperature-sensitive, polyoma virus genome, *Virology*, 88: 348-60.
13. **Bourgaux P., B.S. Sylla, P. Chartrand**, (1982), Excision of polyoma virus DNA from that of a transformed mouse cell: identification of a hybrid molecule with direct inverted repeat, *Virology*, 122: 84-97.
14. **Brewer, B.J., W.L. Fangman**, (1987), The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*, *Cell*, 51: 463-71.
15. **Brewer, B.J.**, (1988), When polymerases collide: replication and the transcriptional organization of the *E. coli* chromosome, *Cell*, 53: 679-86.
16. **Brewer, B.J., W.L. Fangman**, (1988), A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes, *Cell*, 55: 637-43.
17. **Brewer, B.J., D. Lockshon, W.L. Fangman**, (1992), The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription, *Cell*, 71: 267-76.
18. **Burhans, W.C., L.T. Vassilev, M.S. Caddle, N.H. Heintz, M.L. DePamphilis**, (1990), Identification of an origin of bidirectional DNA replication in mammalian chromosomes, *Cell*, 62: 955-65.
19. **Bussiere, D.E., D. Bastia, S.W. White**, (1995), Crystal structure of the replication terminator protein from *B. subtilis* at 2.6Å, *Cell*, 80: 651-60.
20. **Chartrand, P., N. Gusew-Chartrand, P. Bourgaux**, (1981), Integrated polyoma genomes in inducible permissive transformed cells, *J. Virol.*, 39: 185-95.

21. **Colantuoni, V., L. Dailey, G. Della Valle, C. Basilico**, (1982), Requirements for excision and amplification of integrated viral DNA molecules in polyoma virus-transformed cells, *J. Virol.*, **43**: 617-28.
22. **Coverley, D., R.A. Laskey**, (1994), Regulation of eukaryotic DNA replication, *Annu. Rev. Biochem.*, **63**: 745-76.
23. Current protocols in molecular biology, (1996), John Wiley Sons, Inc., pp. 3.5.3,9.2.1.
24. **DeLange, A.M., G. McFadden**, (1986), Sequence-nonspecific replication of transfected plasmid DNA in poxvirus-infected cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 614-8.
25. **DePamphilis, M.L.**, (1988), Transcriptional elements as components of eukaryotic origin of DNA replication, *Cell*, **52**: 635-8.
26. **DePamphilis, M.L.**, (1993), Origins of DNA replication in metazoan of chromosomes, *J. Biol. Chem*, **268**: 1-4.
27. **Dhar, V., C.L. Schildkraut**, (1991), Role of EBNA-1 in arresting replication forks at the Epstein-Barr virus *oriP* family of tandem repeats, *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 6268-78.
28. **Donovan, D., J.F.X. Diffley**, (1996), Replication origins in eukaryotes, *Current Opin. Gen. Dev.*, **6**: 203-7.
29. **Edenberg, H.J., J.A. Huberman**, (1975), Eucaryotic chromosome replication, *Annu. Rev. Genet.*, **9**: 245-84.
30. **Frappier, L., M. Zannis-Hadjopoulos**, (1987), Autonomous replication of plasmids bearing monkey DNA origin-enriched sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 6668-72.
31. **Fogel, M., L. Sachs**, (1970), Induction of virus synthesis in polyoma transformed cells by ultraviolet light and mitomycin C, *Virology.*, **40**: 174-7.

32. **Folk, W.R., J.E. Bancuk**, (1976), Polyoma genome in hamster BHK-21-C13 cells: integration into cellular DNA and induction of the viral replicon, *J. Virol.*, 20: 133-41.
33. **Gahn, T.A., C.L. Schildkraut**, (1989), The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication, *Cell*, 58: 527-35.
34. **Gao, G., M. Orlova, M.M. Georgiadis, W.A. Hendrickson, S.P. Goff**, (1997), Confering RNA polymerase activity to a DNA polymerase: A single residue in reverse transcriptase controls substrate selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 407-11.
35. **Gerber, J.-K., E. Gogel, C. Berger**, (1997), Termination of mammalian rDNA replication: polar arrest of replication fork movement by transcription termination factor TTF-I, *Cell*, 90: 559-67.
36. **Giacca, M., L. Zentilin, P. Norio, S. Diviacco, D. Dimitrova, G. Contreas, G. Biamonti, G. Perini, F. Weighardt, S. Riva, A. Falaschi**, (1994), Fine mapping of a replication origin of human DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7119-23.
37. **Gilbert, D., S.N. Cohen**, (1989), Autonomous replication in mouse cells: a correction [letter; comment], *Cell*, 56: 143-4.
38. **Girard, M., L. Hirth, G. Lebeurier, J. Witz**, (1989), *Virologie moléculaire*, Doin éditeurs-Paris, 617 p.
39. **Grossgebauer, K.**, (1986), Cancer: involvement of replicative origins?, *Med. Hyp.*, 21: 127-40.
40. **Haaf, T.**, (1996), High-resolution analysis of DNA replication in released chromatin fibers containing 5-bromodeoxyuridine, *Biotechniques*, 21: 1050-4.
41. **Hamlin, J.L.**, (1992), Mammalian origins of replication, *Bioessays*, 14: 651-9.
42. **Hangerman, P.J.**, (1990), Sequence-directed curvature of DNA, *Annu. Rev. Biochem.*, 59: 755-81.

43. **Hand, R.**, (1978), Eucaryotic DNA: organisation of the genome for replication, *Cell*, 15: 317-25.
44. **Hand, R., J.R. Gautschi**, (1979), Replication of mammalian DNA *in vitro*. Evidence for initiation from fiber autoradiography, *J. Cell Biol.*, 82: 485-93.
45. **Handeli, S., A. Klar, M. Meuth, H. Cedar**, (1989), Mapping replication units in animal cells, *Cell*, 57: 909-20.
46. **Heintz, N.H., J.D. Milbrandt, K.S. Greisen, J.L. Hamlin**, (1983), Cloning of the initiation region of a mammalian chromosomal replicon, *Nature*, 302: 439-41.
47. **Heinzel, S.S., P.J. Krysan, C.T. Tran, M.P. Calos**, (1991), Autonomous DNA replication in human cells is affected by the size and the source of the DNA, *Mol. Cell. Biol.*, 11: 2263-72.
48. **Hernandez, P., L. Martin-Parras, M.L. Martinez-Robles, J.B. Schwartzman**, (1993), Conserved features in the mode of replication of eukaryotic ribosomal RNA genes, *EMBO J.*, 12: 1475-85.
49. **Hidaka, M., M. Akiyama, T. Horiuchi**, (1988), A consensus sequence of three DNA replication terminus sites on the *E. coli* chromosome is highly homologous to the *terR* sites of the *R6K* plasmid, *Cell*, 55: 467-75.
50. **Hill, T.M., A.J. Pelletier, M.L. Tecklenburg, P.L. Kuempel**, (1988), Identification of the DNA sequence from the *E. coli* terminus region that halts replication forks, *Cell*, 55: 459-66.
51. **Hill, T.M.**, (1992), Arrest of bacterial DNA replication, *Ann. Rev. Micro.*, 46: 603-33.
52. **Hirota, Y., T. Ohshima**, (1992), DNA conformation of the region preceding the beta-lactamase promoter of pUC19 which is required for efficient transcription, *Nucl. Acids Symp. Series*, 27: 151-2.

53. **Hirt, B.**, (1967), Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures, *J. Mol. Biol.*, 26: 365-8.
54. **Huberman, J.A., A.D. Riggs**, (1966), Autoradiography of chromosomal DNA fibers from chinese hamster cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 55: 599-606.
55. **Kamada, K., T. Horiuchi, K. Ohsumi, N. Shimamoto, K. Morikawa**, (1996), Structure of a replication-terminator protein complexed with DNA [see comments], *Nature*, 383:598-603.
56. **Khatri, G.S., T. MacAllister, P.R. Sista, D. Bastia**, (1989), The replication terminator protein of *E. coli* is a DNA sequence-specific contra-helicase, *Cell*, 59: 667-74.
57. **Kobayashi, T., M. Hidaka, T. Horiuchi**, (1989), Evidence of *ter* specific binding protein essential for the termination reaction of DNA replication in Escherichia coli, *EMBO J.*, 8: 2435-41.
58. **Kobayashi, T., M. Hidaka, M. Nishizawa, T. Horiuchi**, (1992), Identification of a site required for DNA replication fork blocking activity in the rRNA gene cluster of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.*, 223: 355-62.
59. **Kralicek, A.V., P.K. Wilson, G.B. Ralston, R.G. Wake, G.F. King**, (1997), Reorganization of terminator DNA upon binding replication terminator protein: implications for the functional replication fork arrest complex, *Nucl. Acids Res.*, 25: 590-6.
60. **Krysan, P.J., S.B. Haase, M.P. Calos**, (1989), Isolation of human sequences that replicate autonomously in human cells, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1026-33.
61. **Krysan, P.J., M.P. Calos**, (1991), Replication initiates at multiple locations on an autonomously replicating plasmid in human cells, *Mol. Cell. Biol.*, 11: 1464-72.
62. **Kuempel, P.L., A.J. Pelletier, T.M. Hill**, (1989), *Tus* and the terminators: the arrest of replication in procaryotes, *Cell*, 59: 581-3.

63. **Kuzminov, A., E. Schabtach, F.W. Stahl**, (1997), Study of plasmid replication in *Escherichia coli* with a combination of 2D gel electrophoresis and electron microscopy, *J. Mol. Biol.*, 268: 1-7.
64. **Lapidot, A., N. Baran, H. Manor**, (1989), (dT-dC)_n and (dG-dA)_n tracts arrest single stranded DNA replication *in vitro*, *Nucl. Acids Res.*, 17: 883-900.
65. **Levine, M.**, (1961), Effect of mitomycin C on interactions between temperate phages and bacteria, *Virology*, 13: 493-9.
66. **Lewis, P.J., G.B. Ralston, R.I. Christopherson, R.G. Wake**, (1990), Identification of the replication terminator protein binding sites in the terminus region of the *Bacillus subtilis* chromosome and stoichiometry of the binding, *J. Mol. Biol.*, 214: 73-84.
67. **Linskens, M.H.K., J.A. Huberman**, (1988), Organization of replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 4927-35.
68. **Little, R.D., T.H.K. Platt, C.L. Schildkraut**, (1993), Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes, *Mol. Cell. Biol.*, 13: 6600-6613.
69. **Little, R.D., C.L. Schildkraut**, (1995), Initiation of latent DNA replication in the Epstein-Barr virus genome can occur at sites other than the genetically defined origin, *Mol. Cell. Biol.*, 15: 2893-2903.
70. **Liu B., B.M. Alberts**, (1995), Head-on collision between a DNA replication apparatus and RNA polymerase transcription complex, *Science*, 267: 1131-7.
71. **Louarn, J., J. Patte, J.-M. Louarn**, (1977), Evidence for a fixed termination site of chromosome replication in *Escherichia coli* K12, *J. Mol. Biol.*, 115: 295-314.
72. **Lucchini, R., J.M. Sogo**, (1994), Chromatin structure and transcriptional activity around the replication forks arrested at the 3' end of the yeast rRNA genes, *Mol. Cell. Biol.*, 14: 318-26.

73. **Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook**, (1982), Molecular cloning, *Cold Spring Harbor Laboratory*, p.458-9.
74. **Manna, A.C., K.S. Pai, D.E. Bussiere, C. Davies, S.W. White, D. Bastia**, (1996), Helicase-contrahelicase interaction and the mechanism of termination of DNA replication, *Cell*, 87: 881-91.
75. **Manna, A.C., K.S. Pai, D.E. Bussiere, S.W. White, D. Bastia**, (1996), The dimer-dimer interaction surface of the replication terminator protein of *Bacillus subtilis* and termination of DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 3253-8.
76. **McClelland, M., L.G. Kessler, M. Bittner**, (1984), Site-specific cleavage of DNA at 8- and 10-base-pair sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 983-7.
77. **Mendelsohn, E., N. Baran, A. Neer, H. Manor**, (1982), Integration site of polyoma virus DNA in the inducible LPT line of polyoma-transformed rat cells, *J. Virol.*, 41: 192-209.
78. **Milot, E., A. Belmaaza, J.C. Wallenburg, N. Gusew, W.E.C. Bradley, P. Chartrand**, (1992), Chromosomal illegitimate recombination in mammalian cells is associated with intrinsically bent DNA elements, *EMBO J.*, 11:5063-70.
79. **Milot, E.**, (1994) Étude de la relation entre les structures de l'ADN et les réarrangements génomiques dans les cellules de mammifères, Thèse de doctorat, Université de Montréal.
80. **Mohanty, B.K., T. Sahoo, D. Bastia**, (1996), The relationship between sequence-specific termination of DNA replication and transcription, *EMBO J.*, 15: 2530-9.
81. **Muller, W.J., C.R. Mueller, A.-M. Mes, J.A. Hassell**, (1983), Polyomavirus origin for DNA replication comprises multiple genetic elements, *J. Virol.*, 47: 586-99.
82. **Muller, W.J., M.A. Naujokas, J.A. Hassell**, (1984), Isolation of large T antigen-producing mouse cell lines capable of supporting replication of polyomavirus-plasmid recombinants, *Mol. Cell. Biol.*, 4: 2406-12.

83. **Murakami, Y., J. Hurwitz**, (1993), Fonctional interactions between SV40 T antigen and other replication proteins at the replication fork, *J. Biol. Chem.*, 268: 11008-17.
84. **Nakamura, H., T. Morita, C. Sato**, (1986), Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus, *Exp. Cell Res.*, 165: 291-7.
85. **Nedved, M.L., P.A. Gottlieb, G.R. Moe**, (1994), CD and DNA binding studies of a proline repeat-containing segment of the replication arrest protein *Tus*, *Nucl. Acids Res.*, 22: 5024-30.
86. **Nepveu, A.**, (1985) L'intégration d'une molécule d'ADN, contenant des séquences hautement répétitives, dans le génome de cellules de rat., Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke.
87. **Ohyama, T., M. Nagumo, S. Sakuma**, (1989), Study of the function of the bent DNA within adenovirus type 2 E1A enhancer: analysis using an *in vitro* transcription system, *Nucl. Acids Res.*, 21: 15-6.
88. **Ohyama, T., M. Nagumo, Y. Hirota, S. Sakuma**, (1992), Alteration of the curved helical structure located in the upstream region of the beta-lactamase promoter of plasmid pUC19 and its effect on transcription, *Nucl. Acids Res.*, 20: 1617-22.
89. **Pai, K.S., D.E. Bussiere, F. Wang, S.W. White, D. Bastia**, (1996), Structure of the replication terminus-terminator protein complex as probed by affinity cleavage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 10647-52.
90. **Pearson, C.E., H. Zorbas, G.B. Price, M. Zannis-Hadjopoulos**, (1996), Inverted repeats, stem-loops, and cruciforms: significance for initiation of DNA replication, *J. Cell. Biol.*, 63: 1-22.
91. **Pellegrini, S., L. Dailey, C. Basilico**, (1984), Amplification and excision of integrated polyoma DNA sequences require a functional origin of replication, *Cell*, 36: 943-9.

92. **Platt, T.H.K., I.Y. Tcherepanova, C.L. Schildkraut, (1993),** Effect of number and position of EBNA-1 binding sites in *Epstein-Barr* virus *oriP* on the sites of initiation, barrier formation, and termination of replication, *J. Virol.*, 67: 1739-45.
93. **Razin, S.V., M.G. Kekelidze, E.M. Lukanidin, K. Scherrer, G.P. Georgiev, (1986),** Replication origins are attached to the nuclear matrix, *Nucl. Acids Res.*, 14: 8189-207.
94. **Rein, T., H. Zorbas, M.L. DePamphilis, (1997),** Active mammalian origins are associated with a high-density cluster of mCpG dinucleotides, *Mol. Cell. Biol.*, 17: 416-26.
95. **Sahoo, T., B.K. Mohanty, M. Lobert, A.C. Manna, D. Bastia, (1995),** The contrahelicase activities of the replication terminator proteins of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* are helicase-specific and impede both helicase translocation and authentic DNA unwinding, *J. Biol. Chem.*, 270: 29138-44.
96. **Sahoo, T., B.K. Mohanty, I. Patel, D. Bastia, (1995),** Termination of replication *in vitro*: requirement for stereospecific interaction between two dimers of the replication terminator protein of *Bacillus subtilis* and with the terminator site to elicit polar contrahelicase and fork impedance, *EMBO J.*, 14: 619-28.
97. **Schroth, G.P., J.S. Siino, C.A. Cooney, J.P. Th'ng, P.S. Ho, E.M. Bradbury, (1992),** Intrinsically bent DNA flanks both sides of an RNA polymerase I transcription start site. Both regions display novel electrophoretic mobility, *J. Biol. Chem.*, 267: 9958-64.
98. **Smith, M.T., C.J. de Vries, D.B. Langley, G.F. King, R.G. Wake, (1996),** The *Bacillus subtilis* DNA replication terminator, *J. Mol. Biol.*, 260: 54-69.
99. **Snyder M., A.R. Buchman, R.W. Davis, (1986),** Bent DNA at yeast autonomously replicating sequence, *Nature*, 324: 87-9.
100. **Sousa, R., R. Padilla, (1995),** A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase, *EMBO J.*, 14: 4609-21.

101. **Southern, E.M.**, (1975), Detection of specific sequences among DNA fragments, *J. Mol. Biol.*, 98: 503-17.
102. **Sylla, B.S., D. Huberdeau, D. Bourgaux-Ramoisy, P. Bourgaux**, (1984), Site-specific excision of integrated polyoma DNA, *Cell*, 37: 661-7.
103. **Sylla, B.S., D. Allard, G. Roy, D. Bourgaux-Ramoisy, P. Bourgaux**, (1984), A mouse sequence that mediates integration and excision of polyoma virus DNA, *Gene*, 29: 343-50.
104. **Verbovaia, L., S.V. Razin**, (1995), Analysis of the replication direction through the domain of α -globin-encoding chicken genes, *Gene*, 166: 255-9.
105. **Wallenburg, J.C., A. Nepveu, P. Chartrand**, (1984), Random and nonrandom integration of polyomavirus DNA molecule containing highly repetitive cellular sequence, *J. Virol.*, 50: 678-83.
106. **Wallenburg, J.C., A. Nepveu, P. Chartrand**, (1987), Integration of a vector containing rodent elements in the rat genome, *Nucl. Acids. Res.*, 15: 7849-63.
107. **Wallenburg, J.C.**, (1989), Integration of a polyoma recombinant containing highly repetitive sequences. Analysis of the junctions and the genome rearrangements, Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke.
108. **Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski, M. Zoller**, (1993), Recombinant DNA, 2^e édition, Scientific american books, p. 23.
109. **Zannis-Hadjopoulos, M., G. Kaufmann, R.G. Martin**, (1984), Mammalian DNA enriched for replication origins is enriched for snap-back sequence, *J. Mol. Biol.*, 179: 577-86.
110. **Zannis-Hadjopoulos, M., L. Frappier, M. Khoury, G.B. Price**, (1988), Effect of anti-cruciform DNA monoclonal antibodies on DNA replication, *EMBO J.*, 7: 1837-44.

111. **Zannis-Hadjopoulos, M., T.O. Nielsen, A. Todd, G.B. Price,** (1994), Autonomous replication *in vivo* and *in vitro* of clones spanning the region of the DHFR origin of bidirectional replication, *Gene*, 151: 273-7.
112. **Zhu, J., C.S. Newlon, J.A. Huberman,** (1992), Localization of a DNA replication origin and termination zone on chromosome III of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.*, 12: 4733-41.