

50376  
1979  
203

50376  
1979  
203

N° d'ordre: 450

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

MÉMOIRE

présenté à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille,  
pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences Naturelles.  
(option biochimie)

par

**Alain SERGEANT**

**ETUDE DU SYSTEME DE TRANSCRIPTION  
DES GENES DE L'ADENOVIRUS 2**



**1 - LES RNA POLYMERASES DES CELLULES KB INFECTEES OU NON  
PAR L'ADENOVIRUS 2**

**2 - ORGANISATION FONCTIONNELLE DU GENOME DE L'ADENOVIRUS  
2 IN VIVO**

Présenté le 20 juin 1979

JURY: Président: Monsieur J. Montreuil  
Examineur: Monsieur M. Errera  
Rapporteurs: Monsieur P. Fromageot  
Monsieur J. Krembel  
Monsieur V. Krsmanovic  
Monsieur R. Marusyk

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit  
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique

M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

#### PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNAL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M.	AL FAKIR Sabah	Algèbre
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
Mme	BATTIAU Yvonne	Géographie
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BOBE Bernard	Sciences Economiques
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie
M.	CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M.	COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
M.	COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M.	COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DEGAUQUE Pierre	Electronique
M.	DELORME Pierre	Physiologie Animale
M.	DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M.	DHAINAUT André	Biologie Animale
M.	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M.	DUBOIS Henri	Physique
M.	DUBRULLE Alain	Physique
M.	DUEE Gérard	Géologie
M.	DYMENT Arthur	Mécanique
M.	ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M.	FLANME Jean-Marie	Technologie de Construction
M.	FONTAINE Hubert	Physique
M.	GAMBLIN André	Géographie
M.	GOBLOT Rémi	Algèbre
M.	GREVET Patrick	Sciences Economiques
M.	JACOB Gérard	Informatique
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
M <sup>le</sup>	LEGRAND Denise	Algèbre
M <sup>le</sup>	LEGRAND Solange	Algèbre
M.	LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M.	LOSFELD Joseph	Informatique
M.	MACKE Bruno	Physique
M.	MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M.	N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M.	PARSY Fernand	Mécanique
M <sup>le</sup>	PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M.	PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M.	PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M.	PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M.	POVY Lucien	Automatique
M.	RICHARD Alain	Biologie
M.	RIETSCH François	Chimie
M.	ROGALSKI Marc	Analyse
M.	ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M.	SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme	SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M.	SIMON Michel	Sociologie
M.	SOMME Jean	Géographie

M<sup>lle</sup> SPIK Geneviève  
M. STERBOUL François  
M. TAILLIEZ Roger  
M. TOULOTTE Jean-Marc  
M. TREANTON Jean-René  
M. VANDORPE Bernard  
M. WALLART Francis  
M<sup>me</sup> ZINN-JUSTIN Nicole

Biochimie  
Informatique  
Biologie  
Automatique  
Sociologie  
Chimie Minérale  
Chimie  
Algèbre

Je remercie le Professeur SAMAILLE et le Professeur H.J. RASKAS de m'avoir fourni les moyens de réaliser ces travaux dans leurs laboratoires.

Je tiens à remercier plus particulièrement Messieurs V. KRSMANOVIC et H.J. RASKAS pour la part qui leur revient dans la conception de ces travaux.

J'exprime ma gratitude aux membres du jury qui ont accepté de juger ce mémoire. Qu'ils soient assurés de ma reconnaissance.

Enfin, que ceux qui ont participé à ces travaux sachent que cette thèse est aussi la leur.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés à l'U 102 de Virologie de LILLE (Directeur : Professeur SAMAILLE) et à Washington University, St Louis, U.S.A., dans le laboratoire du Professeur H.J. RASKAS.

	Page
AVANT PROPOS.....	1
GENERALITES.....	7
TRAVAUX PERSONNELS.....	21
1ère PARTIE : LES RNA POLYMERASES DES CELLULES KB INFECTEES OU NON PAR L'ADENOVIRUS 2.....	22
MATERIEL ET METHODES.....	23
RESULTATS.....	34
A - Mise en évidence de trois activités RNA polymérasiques dans le noyau des cellules KB.....	35
B - Propriétés chromatographiques des RNA polymérasés des cellules non infectées.....	44
1 - Fraction nucléaire.....	44
2 - Fraction cytoplasmique.....	57
C - RNA Polymérasés des cellules infectées.....	70
D - Effet de la force ionique et des cations divalents sur la transcription du DNA d'Adénovirus 2 par les RNA polymérasés I, II et III des cellules KB infectées ou non par l'Adénovirus 2.....	73
1 - Cellules non infectées.....	73
2 - Cellules infectées.....	81
3 - Cas particulier des enzymes I.....	81
2ème PARTIE : ORGANISATION FONCTIONNELLE DU GENOME DE L'ADENOVIRUS 2.....	92
MATERIEL ET METHODES.....	93
RESULTATS.....	106
1er CHAPITRE : Le DNA parental viral intranucléaire a-t-il une organisation semblable à la chromatine cellulaire.....	107
2ème CHAPITRE : Les génomes parentaux viraux intranucléaires possèdent-ils les protéines terminales 55K.....	149
DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	169
RESUME.....	179
BIBLIOGRAPHIE.....	181



Les travaux dont les résultats sont décrits dans ce mémoire ont fait l'objet des publications suivantes :

- 1 - A. SERGEANT and V. KRSMANOVIC  
KB cell RNA polymerases : occurrence of nucleoplasmic enzyme III, (1973) F.E.B.S. Letters, 35, p 331.
- 2 - A. SERGEANT, J.C. D'HALLUIN, A.P. VERBERT and V. KRSMANOVIC  
Effect of Ionic Strength on Adenovirus 2 DNA transcription by KB cell DNA-dependent RNA polymerases I, II and III, (1974), Arch. Virusforsch., 45, p 294.
- 3 - A. SERGEANT and V. KRSMANOVIC  
On thermal sensitivities of KB cell DNA-dependent RNA polymerases (1974), Biochimie, 56, p 1293.
- 4 - A. SERGEANT and H.J. RASKAS  
"Chromatine-like" organization of the Adenovirus 2 genome early in lytic cycle, (1977), Tumor Virus Meeting on SV 40, Polyome and Adenovirus, Cold Spring Harbor Laboratory.
- 5 - S.E. STRAUS, A. SERGEANT, M.A. TIGGES and H.J. RASKAS  
The infecting parental Adenovirus 2 genome is recovered from early or late nuclei as "circular" DNA-protein complexes, (1978) Tumor Virus Meeting on SV 40, Polyoma and Adenovirus, Cold Spring Harbor Laboratory.
- 6 - A. SERGEANT, M.A. TIGGES and H.J. RASKAS  
Nucleosome-like structural subunits of intranuclear parental Adenovirus 2 DNA, (1979), J. Virol.
- 7 - S.E. STRAUS, A. SERGEANT, M.A. TIGGES and H.J. RASKAS  
Parental Adenovirus 2 genomes recovered early or late in infection possess terminal proteins (1979), J. Virology.

A V A N T   P R O P O S

---

Au moment où nous commençons les travaux dont les résultats sont décrits dans ce mémoire, les connaissances acquises sur le système de transcription des gènes eucaryotes faisaient ressortir sa complexité. D'une part, deux RNA polymérases I (A) et II (B), ayant des propriétés catalytiques différentes et localisées dans des compartiments nucléaires laissant entrevoir une spécialisation quant aux gènes qu'elles transcrivent, avaient été décrites (ROEDER et RUTTER, 1969 (92) CHAMBON et al., 1970 (14)). Ces enzymes semblaient contenir plus de cinq polypeptides de poids moléculaire différent. D'autre part, l'organisation des gènes dans la chromatine (PAUL et GILMOUR, 1968 (81)) laissait supposer que l'activation de certains gènes ou groupes de gènes se faisait par des modifications structurales du complexe désoxyribonucléoprotéique régulant l'accessibilité des gènes à transcrire. Enfin, on pouvait imaginer d'autres contrôles, impliquant l'existence de facteurs analogues aux facteurs d'E. Coli (BURGESS et al., 1969 (12) et ROBERTS, 1969 (90)) dont l'action pourrait se faire par interaction avec l'enzyme ou la matrice DNA (STEIN et HAUSEN, 1970 (111)) SUGDEN et KELLER, 1972 (114)). Afin d'étudier les mécanismes de la transcription et de sa régulation il est nécessaire de les reconstruire in vitro, à partir des éléments isolés plus ou moins purifiés mais bien caractérisés. Dans ce but, une série importante de travaux a eu pour objet l'isolement des RNA polymérases, l'étude de leurs propriétés catalytiques et de leur structure dans différents systèmes eucaryotes. Faisant écho à ces travaux, des études sur l'organisation de la chromatine et sa transcription in vitro par les RNA polymérases ont été poursuivies dans de nombreux laboratoires (voir revue générale d'O'MALLEY et al., 1977 (78)). Enfin parallèlement et par analogie au système bactérien, d'autres groupes s'attachent à étudier comme modèle simplifié la transcription in vitro de différents DNA déprotéinés.

Les méthodes d'approche et les systèmes utilisés ont été très divers.

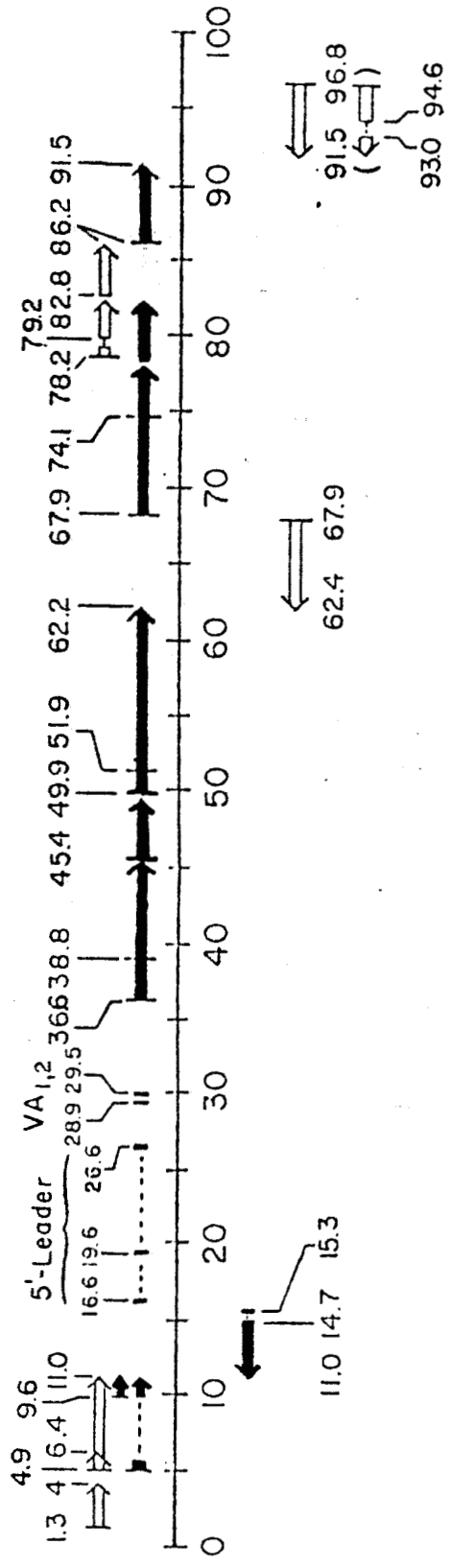
Parmi tous les systèmes étudiés, il en est un qui a eu la faveur de nombreux groupes, les cellules humaines (KB, HeLa) infectées par l'adénovirus 2. D'abord, puisque la particule virale ne contient pas de RNA polymérase, les gènes précoces doivent être transcrits par les RNA polymérases de la cellule hôte. Ensuite, il a été montré que les gènes viraux tardifs étaient transcrits

dans le noyau de la cellule hôte par des RNA polymérases similaires, sinon identiques aux RNA polymérases de la cellule hôte (PRICE et PENMAN, 1972 (86), WALLACE et KATES, 1972 (123) et PRICE et PENMAN, 1972 (87)). Enfin, comme les Hn RNA (RNA nucléaires hétérogènes) des cellules eucaryotes, les RNA intranucléaires viraux semblent servir de précurseurs aux mRNA viraux cytoplasmiques qui sont traduits dans les polysomes de la cellule hôte (GREEN et al., 1970 (41) et PARSONS et al., 1971 (80)). Un contrôle négatif de la transcription existe pour l'adénovirus 2 puisque durant le cycle lytique, les gènes viraux exprimés sont différents. Durant la phase précoce, définie par les événements qui précèdent la réplication du DNA viral, une fraction mineure du génome est transcrite, représentant 20% à 30% de la capacité codante du DNA viral (fig. 1 p. 4). La réplication du DNA viral commence 6 à 8 heures après le début de l'infection et correspond au début de la période tardive du cycle infectieux, caractérisée par un changement qualitatif et quantitatif des RNA spécifiques viraux transcrits (fig. 1 p. 4). En plus des mRNA viraux, des RNA de petite taille (5.5 S VA-RNA) sont synthétisés en grande quantité (OHE et WEISSMAN, 1971 (77) et OHE, 1972 (148)). Ce qui rend ce système attractif c'est la possibilité d'extraire le DNA viral en grande quantité sous forme linéaire bicaténaire intacte ce qui diminue la possibilité d'initiations non spécifiques sur les régions partiellement dénaturées ou les coupures (GNIAZDOWSKI et al., 1970 (37)); c'est encore le fait que beaucoup de génomes viraux étant transcrits simultanément dans chaque cellule au stade tardif du cycle infectieux, les composés impliqués dans la transcription des gènes viraux tardifs peuvent être plus facilement identifiés dans le système complexe de la cellule hôte.

Puisque les travaux sur les systèmes procaryotes ont montré qu'il est possible d'étudier les mécanismes de la régulation de la transcription in vitro en utilisant des DNA spécifiques et des RNA polymérases purifiées (CHAMBERLIN, 1974 (143), LOSIK et CHAMBERLIN, 1976 (64)), il était tentant de suivre les mêmes schémas expérimentaux pour le système modèle de l'adénovirus 2.

Les premiers résultats de l'étude de la transcription du DNA d'adénovirus in vitro ont montré que le DNA natif n'était pratiquement pas transcrit par les RNA polymérases II (B) purifiées ou partiellement purifiées du Thymus de veau. Il n'était pas mieux

Figure N° 1



RNA synthétisés au stade précoce ⇨  
RNA synthétisés au stade tardif →



transcrit par les RNA polymérasés II (B) purifiées du foie de rat en omettant la chromatographie sur phosphocellulose afin d'éviter la perte éventuelle de facteurs comme il avait été décrit pour l'enzyme bactérien (CHAMBON et al., 1970 (14)). On pouvait se demander si le DNA viral pouvait être mieux transcrit par les enzymes isolées des cellules permissives. SUGDEN et KELLER, 1973 (114) ont publié que le DNA viral natif était faiblement transcrit par les RNA polymérasés II (B) isolées de cellules KB ou HeLa non infectées.

La transcription est bloquée au niveau du démarrage des chaînes de RNA, puisque le DNA viral dénaturé ou le DNA viral contenant des coupures monocaténares sont transcrits in vitro par les enzymes II (CHAMBON et al., 1970 (14)).

Ces résultats préliminaires permettaient de poser plusieurs questions :

- 1 - Les RNA polymérasés eucaryotes utilisées lors de ces expériences ont perdu un facteur semblable au facteur d'initiation procaryote  $\bar{O}$  et l'étude de la transcription du DNA viral par des enzymes à différents degrés de purification est intéressante.
- 2 - Les conditions ioniques pour la transcription optimale du DNA d'adénovirus 2 intact sont différentes de celles requises pour la transcription du DNA cellulaire.
- 3 - Les RNA polymérasés transcrivant les gènes tardifs in vivo sont formées par l'association de sous-unités des enzymes de la cellule hôte et de sous-unités codées par les gènes viraux précoces. De telles enzymes peuvent avoir des propriétés différentes des enzymes de la cellule hôte ce qui justifie à priori une étude comparative des enzymes isolées des cellules infectées et non infectées.
- 4 - Une RNA polymérase codée par les gènes viraux précoces et ayant une spécificité absolue pour le DNA viral, transcrit les gènes tardifs.
- 5 - Les enzymes eucaryotes ne peuvent amorcer la synthèse des RNA sur un DNA bicaténaire intact et c'est l'organisation du génome viral dans le noyau de la cellule hôte qui crée des signaux de reconnaissance spécifiques pour les RNA polymérasés de la cellule hôte.

BUT DES TRAVAUX DONT LES RESULTATS SONT DECRITS DANS CE MEMOIRE

Dans le but de tenter de répondre à ces questions, nous avons :

- 1 - partiellement purifié et caractérisé les RNA polymérases des cellules KB, une cellule permissive pour l'adénovirus 2, afin de les comparer aux enzymes isolées des cellules infectées. D'autre part, nous avons utilisé le DNA viral pour aborder l'étude de la transcription in vitro d'un DNA bicaténaire intact par les RNA polymérases homologues extraites de cellules infectées ou non par l'adénovirus. Nos résultats concernant ces études seront exposés dans la première partie de ce mémoire.
- 2 - abordé l'étude de l'organisation des gènes de l'adénovirus 2 in vivo sachant que chez les eucaryotes le DNA est associé in vivo à des protéines basiques formant la chromatine. Nos résultats concernant cet aspect du problème de la transcription des gènes viraux seront exposés dans la deuxième partie de ce mémoire.

Avant d'aborder l'exposé de nos résultats, nous présentons un court chapitre général sur les RNA polymérases des cellules eucaryotes et l'organisation des gènes afin que nos travaux puissent être situés dans le contexte général, au moment où nous les avons réalisés.

GENERALITES

---



L'information génétique contenue dans la séquence ordonnée des bases du DNA est transcrite par des enzymes appelées RNA polymérasés. Ces enzymes découvertes par WEISS et GLADSTONE, 1959 (132), STEVENS, 1961 (112) et CHAMBERLIN et BERG, 1962 (13) dans différents systèmes cellulaires, polymérisent de manière séquentielle les ribonucléoside-5'-triphosphates en molécules de RNA dont la séquence est complémentaire de celle du brin de DNA transcrit (WATSON et CRICK, 1963 (124)).

#### A - MULTIPLICITE DES RNA POLYMERASES NUCLEAIRES

Suivant la découverte par WEISS et GLADSTONE, 1959 (132) d'une activité RNA polymérasique dans un lysat de noyaux d'hépatocytes de rat, des études sur l'activité RNA polymérasique des noyaux isolés, ont montré que des changements des conditions ioniques de synthèse in vitro affectaient quantitativement et qualitativement les RNA synthétisés, (WIDNELL et TATA, 1964 (133), WIDNELL et TATA, 1966 (134), MAUL et HAMILTON, 1967 (69) et POGO et al., 1967 (84)). Les résultats de ces différents groupes suggéraient l'existence de plusieurs RNA polymérasés responsables de la synthèse de différentes classes de RNA cellulaires. Il fallut attendre les travaux de ROEDER et RUTTER, 1969 (92) et 1970 (93) pour que cette hypothèse soit confirmée. Ces auteurs ont publié une méthode permettant de solubiliser les RNA polymérasés nucléaires et ensuite de séparer les activités RNA polymérasiques par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex. Dans l'ordre d'élution, trois activités RNA polymérasiques I, II et III furent détectées et différenciées par leurs propriétés catalytiques et leur localisation cellulaire. KEDINGER et al., 1970 (54) ont confirmé ces résultats, bien que seules deux activités RNA polymérasiques A et B furent détectées après chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose. La parenté RNA polymérase I = A, RNA polymérase II = B a été définitivement établie lorsque fut démontrée l'inhibition spécifique des enzymes II et B par l'alpha-amanitine (KEDINGER et al., 1970 (54) et LINDELL et al., 1970 (63)). Les groupes travaillant sur les RNA polymérasés de levures ont obtenu des résultats similaires. PONTA et al., 1971 (85) décrivaient trois activités RNA polymérasiques I, II et III séparées par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex et DEZELEE et al., 1972 (24) décrivaient deux activités RNA polymérasiques A et B séparées après chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, apparentées

aux enzymes I et II décrits par PONTA et al., 1971 (85) et ADMAN et al., 1972 (1). Dès lors, le problème du nombre de RNA polymérase nucléaires était posé. En effet, comment concevoir que dans des laboratoires différents, en utilisant des échangeurs ayant le même groupement fonctionnel -DEAE- pour analyser des extraits enzymatiques préparés par des méthodes fondées sur le même principe, on puisse trouver des résultats aussi contradictoires. On en était arrivé à considérer l'activité RNA polymérase III comme artéfactuelle, ou engendrée par l'action dissociante du DEAE-Sephadex sur les enzymes I puisque cette activité avait été classée comme de type A (AIII) par KEDINGER et al., 1971 (55). Le problème de l'existence de l'activité RNA polymérase III a été en partie clarifié lorsque cette activité fut mise en évidence dans les cellules humaines (KB) et que l'on montra son comportement différent après chromatographie sur DEAE-Sephadex et DEAE-cellulose (SERGEANT et KRSMANOVIC, 1973 (104) et ce mémoire). Il le fut tout à fait grâce aux travaux de SCHWARTZ et al., 1974 (100) montrant l'inhibition différentielle des enzymes I, II et III de MOPC 315 par l'alpha-amanitine, et de AUSTOKER et al., 1974 (4) montrant que les enzymes III s'éluèrent de la colonne de DEAE-cellulose en même temps que les enzymes I.

Une progression identique fut suivie par les groupes étudiant les RNA polymérase de levures (SCHULTZ et HALL, 1976 (99) et VALENZUELA et al., 1976 (119)).

La possibilité d'inhiber différentiellement les enzymes II et III par l'alpha-amanitine permet de définir sans ambiguïté la fonction des enzymes III, en étudiant la synthèse des RNA in vitro dans les noyaux isolés. C'est WEINMANN et ROEDER, 1974 (127) qui confirmèrent ce que PRICE et PENMAN, 1972 (86) avaient suggéré : la transcription par les RNA polymérase III des gènes des tRNA 4S et des rRNA 5S dans les cellules eucaryotes. Enfin, la première étude comparative de la structure des enzymes I, II et III fut publiée par SKLAR et al., 1975 (107) montrant clairement que les trois RNA polymérase étaient différentes.

Après ce résumé des développements expérimentaux qui ont abouti à la réconciliation des résultats de différents groupes et établi clairement l'existence de trois RNA polymérase pouvant être distinguées par leur comportement chromatographique, leurs propriétés, leur structure et leur fonction, nous allons voir plus en détail les propriétés de ces enzymes.

## B - HETEROGENEITE CHROMATOGRAPHIQUE DES RNA POLYMERASES NUCLEAIRES

Outre les trois activités majeures I, II et III séparées par chromatographie sur DEAE-Sephadex (ROEDER et RUTTER, 1969 (92), PONTA et al., 1971 (85), ADMAN et al., 1972 (1) et SERGEANT et KRSMANOVIC, 1973 (104)), d'autres pics d'activités apparentés aux enzymes I, II et III ont, et ce principalement par leur sensibilité à l'alpha-amanitine, été décrits.

### 1 - RNA POLYMERASES I (A)

Deux activités apparentées à la RNA polymérase I ont été décrites après chromatographie

- sur DEAE-Sephadex des extraits enzymatiques d'oursin de mer (ROEDER et RUTTER, 1970 (93)), de drosophile (PHILIPS et FOREST, 1973 (82)), de levure (ROEDER, 1969 (92) ADMAN et al., 1972 (1)), de souris (VERSTEEGH et WERNER, 1975 (121)) et d'amphibiens (ROEDER, 1974 (94));
- sur CM Sephadex des RNA polymérases I d'amphibiens (ROEDER, 1974 (94) (149)) et de thymus de veau (GISSINGER et CHAMBON, 1975 (36));
- sur phosphocellulose des RNA polymérases I d'hépatocytes de rat (CHESTERTON et BUTTER WORTH, 1971 (17) et MURAMATSU et al., 1974 (147)) et de levures (HUET et al., 1975 (48)).

### 2 - RNA POLYMERASES II (B)

Deux activités de type RNA polymérase II ont été décrites dans le thymus de veau (KEDINGER et CHAMBON, 1972 (56)), les tissus d'amphibiens (ROEDER, 1974 (94) (149)) et chez la drosophile (PHILIPS et FOREST, 1973 (82)), après chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex ou DEAE-cellulose.

### 3 - RNA POLYMERASES III

Deux activités apparentées à la RNA polymérase III ont été décrites dans les tissus de souris (SCHWARTZ et al., 1974 (100) SKLAR et ROEDER, 1975 (107) et 1976 (108)), dans le thymus de veau (SCHWARTZ et al., 1974 (100)), dans le foie de rat (SEIFART et BENEKE, 1975 (103)) et dans les cellules humaines en culture

(WEINMAN et al., 1975 (129) JAEHNING et al., 1977 (53) WEINMAN et al., 1976 (108) et WEIL et BLATTI, 1976 (126)) après chromatographie sur DEAE-Sephadex. Quatre activités ont été décrites par HOSSENLOP et al., 1975 (46) dans les cellules HeLa.

On peut poser le problème de la signification biologique de ces activités en considérant qu'elles ne sont pas produites artificiellement. Un élément de réponse a été apporté par les résultats de HUET et al., 1975 (48). Ces auteurs ont montré que la phosphocellulose permettait de séparer deux formes A et A\* de l'enzyme A (I de levure. Ces deux formes diffèrent structuralement par deux polypeptides.

D'autres auteurs ont complété la réponse en montrant que seule l'une des deux formes de l'enzyme I pourrait être active in vivo (MATSUI et al., 1976 (68) KELLAS et al., 1977 (59)).

#### C - STRUCTURE DES RNA POLYMERASES NUCLEAIRES

Les travaux du groupe de CHAMBON (CHAMBON et al., 1970 (14) GISSINGER et CHAMBON, 1972 (34)) ont montré que les RNA polymérase A (I) et B (II) sont composées de sous-unités polypeptidiques distinctes. Depuis, de nombreux travaux ont permis de comparer la structure des enzymes appartenant aux classes I, II et III (tableau 1 p. 12). La structure des RNA polymérase est remarquablement homogène. Chaque enzyme est composée de deux polypeptides dont le poids moléculaire est supérieur à 100 000 plus une série de polypeptides dont le poids moléculaire varie entre 15 000 et 90 000.

L'ensemble de ces études permet une généralisation : les enzymes I, II et III diffèrent par leur structure, principalement au niveau des grosses sous-unités. Cependant le groupe de FROMAGEOT (BUHLER et al., 1976 (11)) a établi une parenté immunologique entre certaines petites sous-unités des enzymes A (I) et B (II) de levure suggérant que certaines sous-unités de faible poids moléculaire pourraient être communes aux enzymes I, II. Il serait possible d'étendre cette notion à d'autres systèmes cellulaires (voir tableau 1 p. 12), et de conclure avec BUHLER et al., 1976 (11), que les RNA polymérase eucaryotes bien que codées par des gènes distincts partagent une série de petits polypeptides. Ceux-ci pourraient être responsables d'une fonction commune et essentielle

Tableau N° 1

SOUS-UNITES COMPOSANT LES RNA POLYMERASES EUCARYOTES

Levure					Foie de Rat			Thymus de Veau				MOPC 315			Xenopus	E. coli
A	B	I	II	III	C	II	C <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> b	A <sub>1</sub> d	B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> d <sub>1</sub> b	I	II	III		
190	185	185					220(1)	197	197	214		195	240(1)			
135	150	137	170	160	175	150	214(0,4)	126	126	140	140	117	205(1)	155	155	155 β
			145	128	140		180(0,3)						140	138	138	
				82			165(0,1)	51				61		89	92	90 α
49		48		53			140(1)	44	44			52		70	68	
43	44,5	44												52	52	
40		41	41	41									41	41	42	39 α
34,5		36		37		35										
				34			34(12)				34(12)	34(12)		34	33	
	32		33									29	29	29	29	
27	27	28	28	28		25		25(2)	25(2)	25(2)	25(2)	25(2)	27			
23	23	24	24	24				20,5		20	20	19		22		
19		20		20				16,5(3,4)	16,5(2)	16,5(2)	16,5(3,4)	16,5(3,4)	16	19	19	19
14,5	16,5	14,5	14,5	14,5												
14	14,5															
12	12	12	12	11												
<10	410															
a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q

- a - BUHLER et al., 1974 (10)
- b - DEZEELE et SENTENAC, 1973 (145)
- c - VALENZUELA et al., 1976 (120)
- d - HAGER et al., 1977 (44)
- e - VALENZUELA et al., 1976 (119)
- f - SEIFART et al., 1975 (103)
- g - WEAVER et al., 1971 (125)
- h - KEDINGER et al., 1974 (57)
- i - j - GISSINGER et CHAMBON, 1975 (36)
- k - l - KEDINGER et al., 1974 (57)
- m - SCHWARTZ et ROEDER, 1974 (57)
- n - SCHWARTZ et ROEDER, 1975 (100)
- o - SKLAR et ROEDER, 1976 (108)
- p - SKLAR et al., 1975 (107)
- q - BURGESS, 1969 (12)



dans le processus de polymérisation. Cette hypothèse est compatible avec les résultats de ce même groupe montrant l'association réversible de certains polypeptides avec l'enzyme A, l'un de ces polypeptides ayant un poids moléculaire proche de celui de la RNase H<sup>1</sup> (HUET et al., 1976 (49)).

#### D - LOCALISATION CELLULAIRE

Il est admis que les RNA polymérases I sont localisées dans le nucléole (ROEDER et RUTTER, 1970 (92) JACOB et al., 1970 (50)) et que les RNA polymérases II (II<sub>A</sub>, II<sub>B</sub>) sont retrouvées dans le nucléoplasme (ROEDER et RUTTER, 1970 (93)). Une activité nouvelle II<sub>X</sub> est détectée dans les cellules entières (HOSSENLOP et al., 1975 (46)) mais n'est pas retrouvée dans les noyaux purifiés (ROEDER, 1974 (94) et résultats personnels) : elle pourrait donc avoir une localisation cytoplasmique.

Comme les RNA polymérases I et II, l'enzyme III<sub>A</sub> est présente dans des extraits de noyaux purifiés. Après des fractionnements cellulaires plus poussés, il s'est avéré que la RNA polymérase III<sub>A</sub> est localisée dans la fraction nucléoplasmique et la RNA polymérase III<sub>B</sub> est retrouvée dans le cytoplasme (SCHWARTZ et al., 1974 (100) et résultats personnels) : elle pourrait donc avoir une localisation cytoplasmique. Une forme III<sub>X</sub> a été décelée dans les cellules entières (HOSSENLOP et al., 1975 (46)). Elle est mise en évidence dans les surnageants cytoplasmiques après préparation des noyaux non purifiés. Par contre, elle est retrouvée dans les noyaux purifiés (résultats personnels) : elle aurait donc une localisation nucléaire. Le mode de préparation des noyaux est important car les fuites de matériel nucléaire vers le cytoplasme sont inévitables (résultats personnels).

Remarque : Une RNA polymérase C cytoplasmique avait été mise en évidence dans des extraits cytoplasmiques de foie de rat (SEIFART et al., 1972 (102)). Les derniers travaux publiés sur l'enzyme C (SEIFART et BENECKE, 1975 (103)) montrent qu'elle a des propriétés analogues à celles de la RNA polymérase III<sub>B</sub>. Les RNA polymérases C et III<sub>B</sub> pourraient, en fait, être la même enzyme.

## E - INHIBITION PAR L'ALPHA-AMANITINE

Les travaux originaux de FIUME et STIRPE, 1966 (27), STIRPE et FIUME, 1967 (113), NOVELLO et al., 1970 (76), JACOB et al., 1970 (50), KEDINGER et al., 1970 (54) et LINDELL et al., 1970 (63) ont contribué à démontrer que de faibles concentrations en alpha-amanitine (WEILAND, 1968 (135)) inhibent les enzymes II en bloquant le processus d'allongement des chaînes de RNA (COCHET-MEILHAC et CHAMBON, 1974 (20)). Le groupe de ROEDER (SCHWARTZ et al., 1974 (100) et WEINMAN et ROEDER, 1974 (128)) a ensuite publié que des concentrations élevées en alpha-amanitine inhibent l'activité des enzymes III. Il devenait possible de définir les enzymes eucaryotes par la concentration en alpha-amanitine provoquant 50 % d'inhibition de leur activité (tableau 2 p. 15). Cependant, ce paramètre n'est pas invariable. En effet, si pour la plupart des cellules animales, les valeurs obtenues sont homogènes, il n'en est pas de même dans toutes les cellules eucaryotes. Chez, *Bombyx mori*, les enzymes II sont inhibées par des doses d'alpha-amanitine équivalentes à celles trouvées pour les enzymes III (C) des cellules animales (SKLAR et ROEDER, 1975 (107)), et les enzymes III ne sont pas inhibées par l'alpha-amanitine et ceci à des concentrations supérieures à 1mg/ml.

Chez les levures, les enzymes B (II) sont inhibées par des doses d'alpha-amanitine 50 à 100 fois plus élevées que pour les RNA polymérases animales (ADMAN et al., 1972 (1) DEZELEE et al., 1972 (24) BUHLER et al., 1974 (10)). Par contre, les enzymes A (I) sont inhibées à une concentration en alpha-amanitine de 2,4 mg/ml alors qu'à la même concentration l'activité des enzymes III (C) est faiblement inhibée (SCHULTZ et al., 1976 (99)). On peut bien sûr se demander si des concentrations en alpha-amanitine supérieures à 1 mg/ml ont encore une signification biologique.

Il nous semble opportun maintenant de parler des nomenclatures utilisées pour désigner les RNA polymérases. Deux nomenclatures sont utilisées actuellement. L'une, c'est cette nomenclature que nous avons adoptée, fondée sur le comportement chromatographique, nomme les enzymes I, II et III dans l'ordre d'éluion d'une colonne de DEAE-Sephadex (ROEDER et RUTTER, 1969 (92)). L'autre, fondée sur la sensibilité différentielle des RNA polymérases à l'alpha-amanitine nomme les enzymes A, B et C (CHAMBON, 1975 (15)). Les enzymes A ne sont pas inhibées par l'alpha-amanitine, les enzymes B sont inhibées totalement par des concentrations en alpha-amanitine de l'ordre

Tableau N° 2

(d'après ROEDER, 1976 (95))

	Enzyme class		
	I	II	III
General properties of nuclear RNA polymerases			
Chromatographic elution positions (M ammonium sulfate)			
DEAE-Sephadex	~0.1	~0.2	0.2-0.3
DEAE-cellulose	~0.1	~0.2	~0.1
Phosphocellulose	~0.17	~0.11	~0.13
CM-Sephadex	~0.11	<0.05	~0.10
Catalytic properties			
ammonium sulfate optima (M)	~0.05	~0.10	0.05-0.20
Mn <sup>++</sup> /Mg <sup>++</sup> activity ratio	1-2	5-10	2
poly(dA-dT)/DNA activity ratio	1-1.5	0.5-1	5-15
$\alpha$ -Amanitin sensitivities ( $\mu$ g/ml for 50% inhibition)			
animal cells	insensitive	0.01-0.05	10-25
insects	insensitive	0.03-0.06	insensitive
yeast	300-600	~1	insensitive

The elution positions indicated are those for the major forms of RNA polymerases I, II and III. Minor enzyme forms may elute at slightly different positions. Catalytic properties refer to those that are apparent under defined conditions with standard DNA templates in excess.  $\alpha$ -Amanitin insensitivity indicates no inhibition at toxin concentrations up to at least 1 mg/ml. All numerical values are approximate. Some exceptions to these generalizations are known. For further details and references, see text.



de 1 µg/ml et les enzymes C inhibées par des concentrations en alpha-amanitine supérieures à 400 µg/ml. Si la correspondance I = A, II = B et III = C est vraie pour les cellules animales, elle ne peut être étendue à toutes les cellules eucaryotes. Une nomenclature reste à définir.

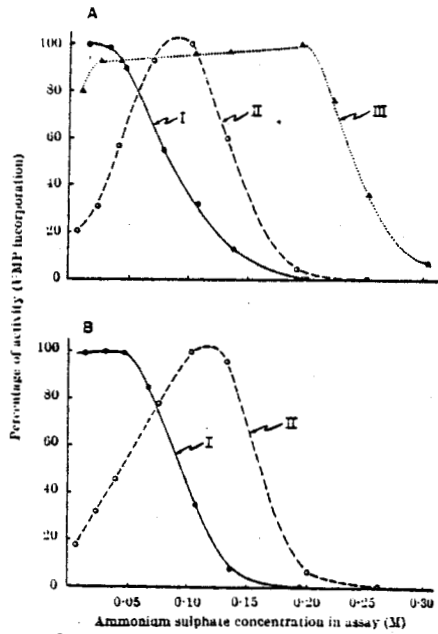
## F - EFFECTEURS DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE IN VITRO

Les effecteurs les plus utilisés dans la réaction de polymérisation in vitro sont le magnésium, le manganèse et les sels  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , KCl et  $\text{NH}_4 \text{Cl}$ . Comme l'ont suggéré WIDNELL et TATA, 1966 (134) et POGO et al., 1967 (84) et montré directement ROEDER et RUTTER, 1969 (92) ; les RNA polymérase I, II et III peuvent être distinguées par leurs courbes d'activité en fonction de concentrations croissantes en  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  et  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , lors de la transcription d'un DNA de thymus de veau commercial (Fig. 2 p. 17). Ces résultats ont été confirmés par d'autres travaux (tableau 2 p. 15). Cependant ces paramètres dépendent de la nature du DNA utilisé et de sa concentration dans le milieu réactionnel (AUSTIN et al., 1973 (2) SERGEANT et al., 1974 (105) GISSINGER et al., 1974 (35) HOSSENLOP et al., 1975 (46) et ce mémoire).

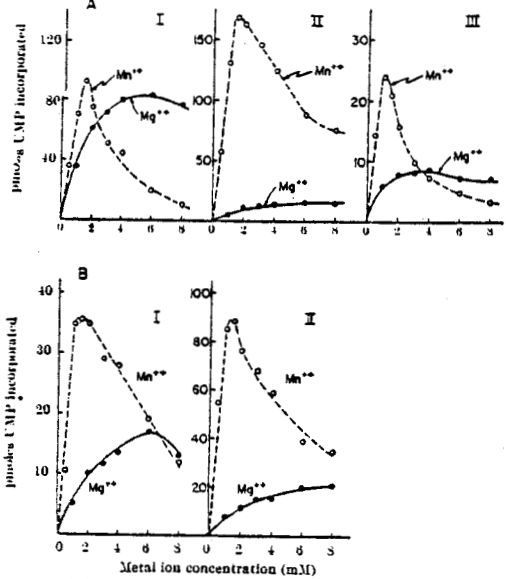
## G - FONCTION DES RNA POLYMERASES NUCLEAIRES

### 1 - TRANSCRIPTION DES GENES CELLULAIRES

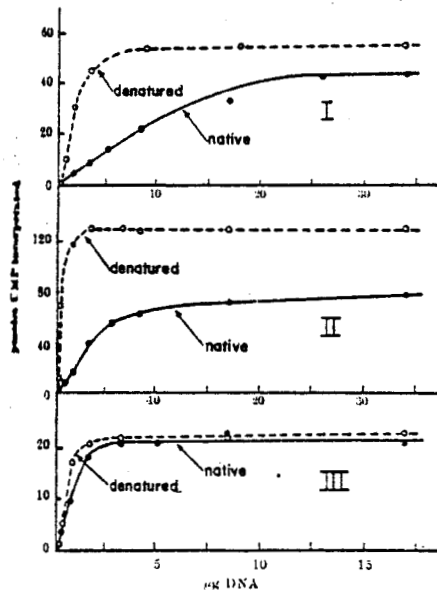
Les travaux de différents groupes ont maintenant plus que suggéré que des enzymes de la classe I transcrivent les gènes des RNA ribosomiques (WEINMAN et ROEDER, 1974 (128)), des enzymes de la classe II sont responsables de la transcription des gènes des RNA nucléaires hétérogènes (HnRNA), probablement précurseurs des RNA messagers cytoplasmiques (BLATTI et al., 1970 (7) ZYLBER et PENMAN, 1971 (142) REEDER et ROEDER, 1972 (88) WEINMAN et ROEDER, 1974 (127) et SUZUKI et GISA, 1976 (116)), et des enzymes de la classe III transcrivent les gènes des RNA ribosomiques 5S et des précurseurs 4.5S des t-RNA (WEINMAN et ROEDER, 1974 (127) WEINMAN, RASKAS et ROEDER, 1974 (129) MARZLUFF et al., 1974 (66) et WEINMAN et al., 1976 (130)).



Effect of ionic strength on RNA polymerases. DEAE-enzyme fractions were partially desalted as described in Fig. 3. Reaction conditions were as described in Fig. 1 for the standard assay, except the ammonium sulphate concentration was varied as indicated. *A*, Sea urchin enzymes. The amounts of enzyme were 17, 5.0 and 7.5  $\mu$ g for I, II and III, respectively. *B*, Rat liver enzymes. The amounts of enzyme protein were 9.0 and 20  $\mu$ g for forms I and II, respectively.



Effect of divalent metal ion concentration on RNA polymerases. For these studies and those described in Fig. 4, aliquots of the concentrated DEAE-enzyme fractions were passed through a 'Sephadex G-25' column equilibrated with 0.05 M *tris*-HCl (pH 7.9), 25 per cent glycerol, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 0.02 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Incubation conditions were as described in Fig. 1 for the standard assay, except for the metal ion concentration. Each reaction mixture contained 0.046 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. *A*, Sea urchin enzymes. The amounts of enzyme protein were 17, 12 and 7.5  $\mu$ g for I, II and III, respectively. *B*, Rat liver enzymes. The amounts of protein were 9.0 and 20  $\mu$ g for I and II, respectively.



Relative transcription of native and heat-denatured DNA by sea urchin RNA polymerases. Cold thymus DNA was denatured by heating at 95°-98° C for 10 min and quick cooling. Reaction conditions were as described in Fig. 1 for the standard assay, except for the primer added. Each reaction mixture contained 0.065 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The amounts of enzyme protein per reaction were 30, 7.4 and 8.4  $\mu$ g for forms I, II and III, respectively.

Figure N° 2

(d'après ROEDER et RUTTER, 1969 (92))



## 2 - TRANSCRIPTION DES GENES DE L'ADENOVIRUS 2

La transcription des gènes de l'adénovirus 2 par des RNA polymérases apparentées aux RNA polymérases de la cellule hôte a été suggérée par PRICE et PENMAN, 1972 (86) et WALLACE et KATES, 1972 (123), et démontrée par les travaux de WEINMAN, RASKAS et ROEDER, 1974 (129) et 1976 (130). C'est en déterminant la sensibilité à l'alpha-amanitine des RNA viraux synthétisés dans les noyaux isolés de cellules infectées que ces différents groupes démontrèrent qu'une activité RNA polymérase III présumée identique à l'enzyme de la cellule hôte, transcrit les gènes codant pour les mRNA viraux ou plus exactement pour leurs précurseurs. De la même façon, ces groupes ont démontré qu'une RNA polymérase III (C), transcrit les gènes codants pour les petits RNA viraux (VA-RNA) dont le mieux caractérisé est le RNA 5.5S (OHE et WEISSMAN, 1971 (77)). Jusqu'à présent il a été impossible de distinguer les enzymes impliquées dans la transcription des gènes viraux des enzymes cellulaires, que ce soit par leur comportement chromatographique et leurs propriétés catalytiques (AUSTIN et al., 1973 (2) WEINMANN et al., 1976 (130) HOSSENLOP et al., 1975 (46) et ce mémoire) ou leur structure (JAEHNING et al., 1977 (53)).

## H - ORGANISATION FONCTIONNELLE DES GENES DANS LES CELLULES EUCARYOTES

La matrice naturelle utilisée par les RNA polymérases in vivo, la chromatine, est une désoxyribonucléoprotéine complexe, organisée en unités structurales répétitives appelées nucléosomes (KORNBERG, 1977 (61)). Certains résultats expérimentaux sont en faveur d'une organisation nucléosomique de toute la chromatine, même des portions transcrites, bien que la structure des nucléosomes présents sur les régions transcrites soit altérée (GOTESFELD, 1975 (38) GAREL et AXEL, 1976 (32) WEINTRAUB et GROUDINE, 1976 (131) KUO et al., 1976 (62) BROWN et al., 1977 (9)). D'autres résultats cependant tendent à démontrer que les régions de la chromatine activement transcrites ont perdu, temporairement, leur organisation nucléosomique (FOE et al., 1976 (29) FRANKE et al. 1976a (30) WOODCOCK et al., 1976b (138) Mc-KNIGHT et al., 1977 (71) et SCHEER, 1978 (97)).

Chaque nucléosome est formé d'un nucléoïde contenant 2 copies de chacune des quatres histones H2A, H2B, H3 et H4, associées à

environ 140 paires de bases du DNA (NOLL et KORNBERG, 1977 (75)), l'ensemble conférant au fragment de DNA une protection partielle contre la digestion par la nucléase de Staphylococcus aureus (nucléase micrococcale) (SOLLNER-WEBB et FELSENFELD, 1975 (110)). Chaque nucléoïde est relié au suivant par un fragment de DNA dont la taille varie de 15 à 100 paires de bases (COMPTON et al., 1976 (21)), probablement associé aux histones HI (MORISS, 1976 (73)) et digéré préférentiellement par la nucléase micrococcale.

La digestion contrôlée des noyaux cellulaires isolés (AXEL, 1975 (5)) ou de la chromatine (AXEL et al., 1974 (6)) par la nucléase micrococcale, permet de préparer des monomères et oligomères de nucléosomes et d'étudier leur composition en protéines et la taille du fragment de DNA protégé par les protéines. Les fragments de DNA peuvent être séparés par électrophorèse sur gel et leur taille estimée en comparant leur migration à celle de standards de taille connue.

L'unité structurale de 140 paires de bases n'est pas la taille limite atteinte par le DNA nucléosomique lors de la digestion par la nucléase micrococcale. L'enzyme peut reconnaître des sites spécifiques à l'intérieur du nucléoïde, probablement démasqués au cours de la digestion, produisant une série de fragments plus petits que 140 paires de bases, se séparant de manière reproductible et caractéristique après électrophorèse. La démonstration de l'organisation nucléosomique du génome de SV40 et du Polyome, aussi bien à l'intérieur de la particule virale purifiée (CREMISI et al., 1976 (23)) que dans la cellule infectée (GRIFFITH, 1975 (42)), a apporté un support précoce à la notion de nucléosome. Il était tentant d'étendre la notion de nucléosome comme unité structurale du génome, à toutes les cellules et aux virus contenant un génome DNA.

## I - ORGANISATION DES GENES DE L'ADENOVIRUS 2 IN VIVO

Le génome de l'adénovirus 2 a été décrit organisé à l'intérieur de la particule virale, en unités structurales répétitives, mais dont l'équivalent protéine était non pas les histones, mais les polypeptides basiques viraux V et VII (CORDEN et al., 1976 (22)).

D'autre part, extrait des virions purifiés par les méthodes classiques faisant intervenir les enzymes protéolytiques, le phénol et le SDS, le DNA de l'adénovirus 2 est une molécule bicaténaire

avec des séquences terminales répétitives inversées (PHILIPSON et LINDBERG, 1974 (83)). Récemment, des méthodes d'isolement fondées sur l'emploi de GuHCl (ROBINSON et al., 1974 (91)), de sarkosyl ou de sulfate d'ammonium (GIRARD et al., 1977 (33)) et évitant l'emploi d'enzymes protéolytiques, ont permis d'isoler le DNA d'adénovirus 2 sous forme de complexes DNA-protéines. Dans ces complexes, des protéines de poids moléculaire 55 000 daltons (55 K) sont associées, et ceci peut être d'une manière covalente, aux extrémités 5' du génome (REKOSH et al., 1977 (89)). La preuve de l'association de protéines avec les extrémités 5' du génome viral extrait des particules est faite de manière très simple : en analysant par électrophorèse sur gel d'agarose les fragments de DNA obtenus après digestion des complexes (HAd2DNA-55K) par différentes enzymes de restriction. Les fragments de DNA portant des protéines n'entrent pas dans le gel. Après traitement des complexes par les enzymes protéolytiques, on retrouve tous les fragments de DNA dans le gel.

La fonction, si tant est qu'elle soit unique des protéines terminales, n'est pas encore connue. Leur présence à proximité des sites d'initiation et de terminaison sur le DNA de l'Adénovirus 2 a naturellement conduit à penser qu'elles pouvaient intervenir lors du processus de réplication (REKOSH et al., 1977 (89)). Elles pourraient encore, par interaction spécifique avec les protéines de la capsidie lors de la maturation des virions, permettre une encapsidation plus efficace (CORDEN et al., 1976 (22)). Enfin, ces protéines pourraient conférer au DNA une résistance accrue vis à vis des exonucléases, de façon à préserver le génome viral dans un milieu intracellulaire hostile (SHARP et al., 1976 (106)).

Jusqu'à présent, il y a eu peu de travaux publiés tentant de donner une signification fonctionnelle à la présence intracellulaire des protéines 55 K. GIRARD et al., 1977 (33) ont montré qu'au moins une partie du DNA viral intranucléaire en réplication et du DNA répliqué porte les protéines terminales. Des résultats semblables ont été obtenus et publiés en utilisant le système simiesque (Simian Adénovirus 7) (ESTES, 1978 (26)).

Il était intéressant de déterminer l'organisation du DNA d'Adénovirus 2 après sa pénétration dans le noyau de la cellule hôte. Nous voulions aussi tenter d'établir une relation entre structure du génome viral, la transcription et la réplication des gènes viraux à différents moments du cycle lytique.

TRAVAUX PERSONNELS

---

1ère PARTIE

LES RNA POLYMERASES DES CELLULES KB INFECTÉES OU  
NON PAR L'ADENOVIRUS 2

ISOLEMENT ET CARACTERISATION PARTIELLE

MATERIEL ET METHODES



A - SOLUTIONS ET TAMPONS

TEBS	Tris-HCl	0,01 M (pH 7,4)
	EDTA	0,001 M (pH 7,4)
	NaCl	0,3 M
	Citrate de sodium	0,03 M
SSC	NaCl	0,15 M
	Citrate de sodium	0,015 M
TMMT	Tris-HCl	0,01 M (pH 8)
	Acétate de Magnésium	0,01 M
	Béta-Mercaptoéthanol	0,01 M
	Triton X-100	0,2 p. 100
TSMD	Tris-HCl	0,01 M (pH 8)
	Saccharose	1 M
	MgCl <sub>2</sub>	0,005 M
	Dithiothréitol (DDT) ou Dithioérythritol (DTE)	0,001 M
TGMED	Tris-HCl	0,05 M (pH 8)
	Glycérol	25 p. 100
	MgCl <sub>2</sub>	0,005 M
	EDTA	0,0001 M
	DDT ou DTE	0,001 M
	(TGMED/40 - TGMED/400... = TGMED 40 ou 400 mM en sulfate d'ammonium (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	
MS	Tris-HCl	0,05 M (pH 8)
	EDTA	0,0001 M
	DTE ou DDT	0,001 M
	Thioglycérol	0,01 M
	(MS (0) - MS (30)... = MS 0 ou 30 p. 100 en glycérol)	
	MS (*)/50 - MS (*)/75 - MS (*)/500... = MS (*) 50-75 ou 500 mM en (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
TESGED	TES-NH <sub>4</sub> OH	0,02 M (pH 6,8)
	(N-Tris (Hydroxyméthyl) méthyl 2 - aminométhane	
	Glycérol	25 p. 100
	EDTA	0,0001M
	DTE	0,001 M
	(TESGED/50 - TEGED/250... = TEGED 50 ou 250 mM en (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ).	

## B - CULTURE DES CELLULES

Les cellules KB ont été cultivées à 37°C en suspension dans le milieu EAGLE modifié par JOKLIK (MEM GIBCO), additionné de 5 % de sérum de cheval.

## C - PREPARATION DES STOCKS D'ADENOVIRUS 2

Les cellules KB en suspension ( $10^7$  cellules /ml) sont infectées par l'adénovirus 2 (15 pfu/cellule). Après une heure d'absorption à 37°C dans du milieu MEM sans sérum, les cellules sont diluées en présence de l'inoculum jusque  $3 \cdot 10^5$  cellules/ml avec du milieu MEM supplémenté de 5 % de sérum de cheval. Puisque la production de particules virales atteint un maximum 30-34 heures après le début de l'infection, sans qu'il y ait de lyse cellulaire importante, les cellules sont recueillies par centrifugation à ce moment du cycle lytique. Toutes les étapes qui suivent sont réalisées à une température de 0-4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans du Tris 0,01 M, pH 8.1 ( $3 \cdot 10^7$  cellules/ml). La suspension cellulaire est congelée-décongelée trois fois et traitée aux ultrasons jusque destruction complète des structures cellulaires, après contrôle en microscopie optique. L'extrait est dilué par du Tris 0,01 M pH 8 afin d'obtenir  $12 \cdot 10^6$  cellules/ml. A des aliquotes de 25 ml, on ajoute 20 ml de GENESOLV-D (fluorocarbone) et le mélange est homogénéisé 20 secondes dans un broyeur ultraturax. Après centrifugation, du broyat 5 minutes à 2000 rpm, la phase aqueuse surnageante est séparée du fluorocarbone et centrifugée par aliquotes de 25 ml au sommet d'un coussin de 5 ml de CsCl ( $\rho = 1,43$  g/cc) pendant une heure à 20 000 rpm dans le rotor SW 25. La bande opalescente se formant au sommet du coussin de CsCl contient le virus. Cette bande est récupérée et ajustée à une densité de 1,34 par du CsCl en poudre (volume final 5 ml). La solution de CsCl contenant le virus est centrifugée 24 heures à 5°C et à 30 000 rpm dans le rotor SW 50. La bande opalescente de virus est purifiée une seconde fois par centrifugation à l'équilibre en CsCl.

Lorsque le virus est utilisé pour préparer du DNA, il peut être conservé à 4°C dans le CsCl. Lorsque l'on veut en faire un stock pour de futures infections, il est immédiatement congelé à -20°C dans le tampon TNBG.

## D - ISOLEMENT DES DNA

Les DNA ont été extraits par une méthode dérivée de celle décrite par YOUNG et SINSHEIMER, 1967 (141).

### 1 - DNA CELLULAIRE

Deux litres de cellules KB sont centrifugés 15 minutes à 500 xg et à 4°C. Le culot cellulaire est lavé deux fois par une solution de NaCl 0,15 M, une fois par le tampon TMMT, et enfin repris dans 30 ml du même tampon. Après homogénéisation au DOUNCE, les noyaux sédimentés à 750 xg pendant 10 minutes à 4°C sont dispersés dans 20 ml de TEBS. La suspension nucléaire est additionnée de sarcosinate de sodium et de pronase (concentrations finales de 0,5 % et de 300 µg/ml respectivement). Après 3 heures à 37°C, la densité du lysat est ajustée à 1,7 par addition de CsCl en cristaux et la solution est centrifugée à l'équilibre de densité dans le rotor SW-50,1 à 40 000 t/mn et 20°C pendant 60 heures. Les fractions du gradient contenant le DNA sont rassemblées, dialysées contre 1 litre de 0,1 SSC pendant 20 heures à 4°C et conservées à la même température.

### 2 - DNA D'ADENOVIRUS 2

La purification du DNA d'Adénovirus 2 est menée selon la procédure décrite par GREEN et PINA, 1963 (40). La suspension virale est dialysée 2 heures contre 2 litres de TEBS et le DNA est extrait des virions et purifié de la même manière que le DNA cellulaire (voir plus haut).

## E - ISOLEMENT DES NOYAUX DE CELLULES KB

Les cellules KB sont centrifugées à 700 xg pendant dix minutes. Le culot cellulaire est ensuite lavé plusieurs fois par une solution de NaCl 9 p. 1000 à 4°C. Toutes les opérations qui suivent sont effectuées à 0-4°C.

### 1 - TAMPON AQUEUX, LE TMMT

Le culot de cellules est resuspendu dans le TMMT ( $10^8$  cellules/ml) et homogénéisé dans un homogénéiseur de DOUNCE. Un culot de

noyaux ( $N_x$ ) est séparé de la fraction cytoplasmique (CYTO) par centrifugation 10 minutes à 2 500 xg.

## 2 - METHODE DERIVEE DE CELLE DE CHAUVEAU et al. 1956 (16)

Le culot cellulaire est resuspendu dans le tampon SM (15 volumes de tampon pour un volume de cellules) et homogénéisé dans un homogénéiseur POTTER-ELVEHJEM. Après centrifugation une heure à 50 000 xg, un culot opalescent de noyaux (NCh) est séparé du surnageant cytoplasmique (CYTch). La fraction cytoplasmique est immédiatement diluée par du TGED et centrifugée une heure à 100 000 xg.

## F - SOLUBILISATION DES RNA POLYMERASES

Plusieurs méthodes de solubilisation ont été utilisées et chacune d'elle est décrite schématiquement (figure 3 p. 28). Les résultats obtenus seront discutés dans la section "résultats et discussion".

## G - CHROMATOGRAPHIE DES EXTRAITS ENZYMATIQUES SUR COLONNES D'ECHANGEURS D'IONS

Les résines sont activées comme indiqué ci-dessous :

### 1 - DEAE-SEPHADEX A-25

L'échangeur d'ion est précyclé selon le schéma suivant :

30 g de DEAE-Sephadex A-25 sont suspendus dans 1 litre de NaOH 0,5 N et agités doucement pendant 30 minutes

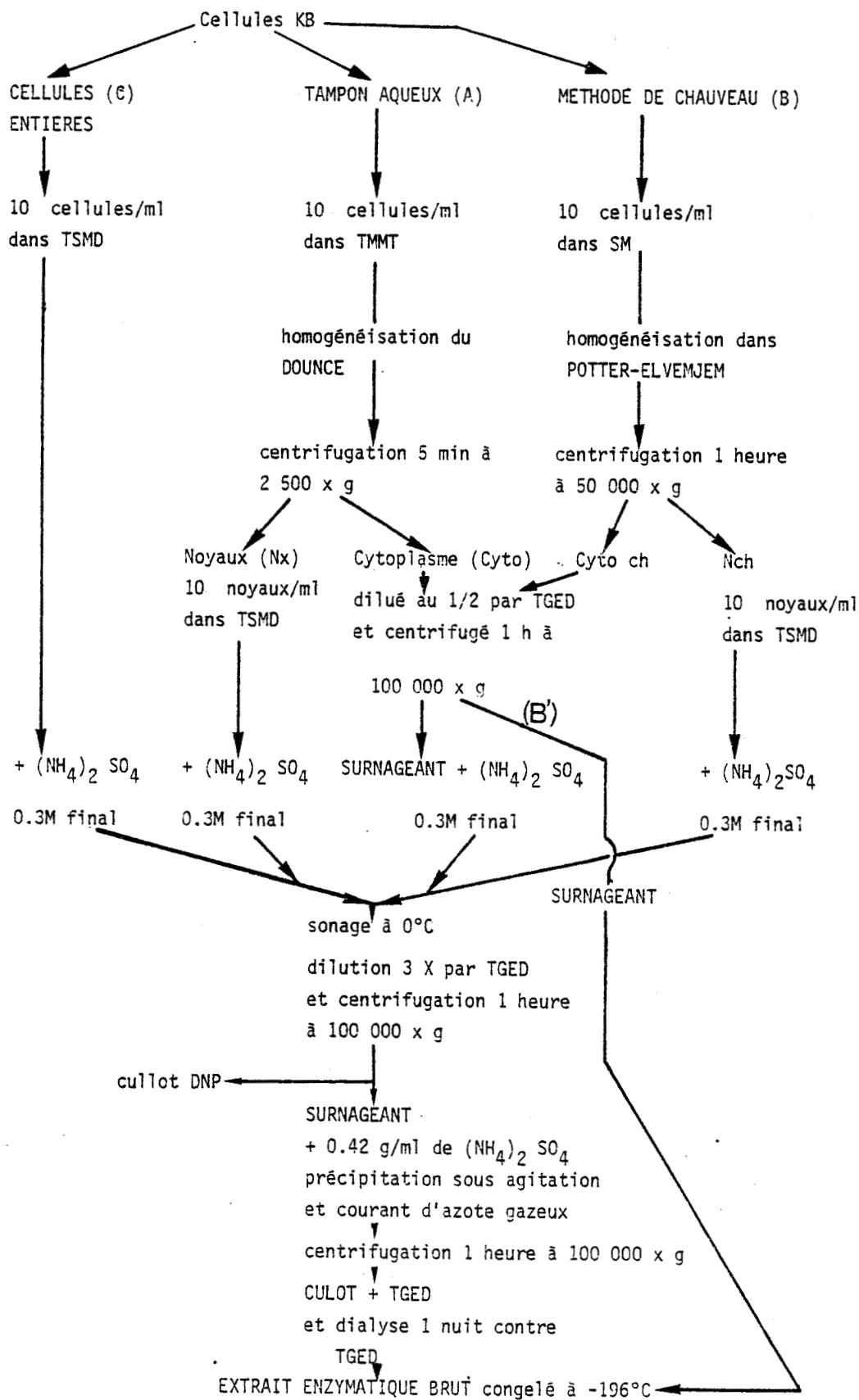
↓  
Rinçage de l'échangeur par l'eau distillée jusque pH 8

↓  
Agitation douce pendant 30 mn dans 1 litre de HCl 0,5 N

↓  
Rinçage de l'échangeur par l'eau distillée jusque pH 6

La bouillie est mélangée à 500 ml de TGME/40 dégazée sous vide et refroidie à 4°C

Figure N° 3



Le pH de la suspension est ajusté à 8 par  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 N. Ainsi précyclé, le DEAE-Sephadex est versé dans une colonne en verre et lavé par du TGME/40 jusqu'à ce que le pH et l'indice de réfraction du tampon de lavage et de l'éluat de colonne soient identiques.

## 2 - DEAE-cellulose DE 52

La DEAE-cellulose DE 52 est mélangée au tampon TGME/1000 (200 ml d'échangeur/litre de tampon). Après une agitation douce à 4°C pendant une heure, la suspension est versée dans une colonne en verre et rincée par du TGME/40 jusqu'à ce que le pH et l'indice de réfraction du tampon de lavage et de l'éluat de colonne soient identiques.

## 3 - PHOSPHOCELLULOSE PI

Le précyclage de cet échangeur est réalisé suivant le protocole décrit par GISSINGER et CHAMBON, 1972 (34).

100 g de phosphocellulose PI sont mélangés doucement pendant 30 minutes à 3 litres de KOH 0,5 N

↓  
Rinçage de l'échangeur par l'eau distillée jusqu'à pH 9

↓  
Agitation douce pendant 30 minutes dans 3 l de HCl 0,5 N

↓  
Décantation et élimination du surnageant

↓  
Agitation douce 20 minutes dans 2 l de HCl 0,5 N

↓  
Rinçage de l'échangeur par l'eau distillée jusqu'à pH 4

La suspension est versée dans une colonne en verre et lavée avec les tampons suivants :

1 litre de Tris-HCl 1 m pH 7,9

5 litres de MS (0)/1000

5 litres de MS (0)/50

L'échangeur est conservé à 4°C dans le tampon MS (0)/50. Avant l'utilisation, la phosphocellulose ainsi précyclée est rincée par le tampon MS (30)/75 à 4°C jusqu'à ce que le pH et l'indice de réfraction du tampon de lavage et de l'éluat de colonne soient identiques.

#### 4 - CM-SEPHADEX C-25

Le CM-Séphadex C-25 est mélangé à du tampon TESGED/500 (10 g d'échangeur sec/100 ml de tampon). Après une heure à 4°C, l'échangeur est lavé par décantations successives avec le tampon TESGED/50. La suspension est versée dans une colonne de verre et rincée par le tampon TESGED/50 jusqu'à ce que le pH et l'indice de réfraction du tampon de lavage et de l'éluat de colonne soient identiques.

Nous avons adopté les règles suivantes pour l'utilisation des différents échangeurs d'ions :

- les opérations de chromatographie sont effectuées à 4°C ;
- le pH des solutions et des tampons est ajusté à 4°C ;
- la quantité de protéines appliquée sur chaque colonne est de 2 mg/ml de gel (compte tenu de la présence de l'albumine de sérum bovin), ce qui représente moins de 1/10 de la capacité des échangeurs utilisés ;
- le rapport  $\frac{\text{diamètre}}{\text{hauteur}}$  de la colonne ne peut être supérieur à 1/10 ;
- les protéines non fixées par l'échangeur d'ions sont éluées par passage d'une quantité de tampon de plus basse force ionique égale ou moins à un volume de la colonne ;
- les protéines fixées sont éluées par un gradient linéaire de force ionique (molarité croissante en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ) dont le volume est compris entre 6 et 10 fois le volume de la colonne ;
- sauf indications contraires, les fractions éluées de la colonne sont recueillies dans une solution d'albumine de sérum bovin pour obtenir une concentration finale de 500 µg à 1000 µg/ml ;
- une aliquote de chaque fraction est soumise à un essai de synthèse de RNA in vitro afin d'établir le profil

d'activité enzymatique. Les fractions possédant une activité RNA polymérasique sont rassemblées et congelées dans l'azote liquide.

#### H - DETECTION DE L'ACTIVITE RNA POLYMERASIQUE IN VITRO

L'activité RNA polymérasique est déterminée in vitro par l'incorporation de  $^3\text{H}$ -UTP dans des molécules de RNA acido-précipitables. Dans le cas de fractions éluées de colonnes, le système de synthèse consiste à mélanger l'aliquote à tester avec une solution contenant les substrats de façon à avoir une concentration en sulfate d'ammonium la plus proche possible de celle donnant l'activité optimale de l'enzyme, en tenant compte de la nature de la matrice DNA utilisée.

La solution finale (aliquote à tester + milieu réactionnel) contient :

Tris-HCl	0,05 M	pH 7,9
MgCl <sub>2</sub>	0,003 M	
MnCl <sub>2</sub>	0,003 M	
DTE	0,004 M	
ATP	0,001 M	
GTP	0,001 M	
CTP	0,001 M	
UTP	0,000015 M	
$^3\text{H}$ -UTP (13-20Ci/mM)	15 $\mu\text{Ci/ml}$	
0,5 mg/ml de BSA et 15 $\mu\text{g/ml}$ de DNA matrice		

On s'assure que pour les fractions aliquotes examinées, la synthèse de RNA in vitro est vraiment dépendante du DNA. Lorsque l'on utilise l'alpha-amanitine, celle-ci est mélangée au milieu réactionnel. Dans ces conditions expérimentales, la concentration en UTP n'est pas limitante. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, la réaction est stoppée par addition de 2 ml de TCA 10 % contenant 0,02 M de pyrophosphate de sodium.

#### I - CENTRIFUGATION DES RNA POLYMERASES EN GRADIENT DE GLYCEROL

Les solutions enzymatiques sont dialysées 2 heures contre le tampon,

Tris-HCl	0,05 M	pH 8
MgCl <sub>2</sub>	0,005 M	



EDTA	0,0001 M
DDT	0,001 M
Thioglycérol	0,01 M
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 M

et déposées sur un gradient de glycérol dans le même tampon.

Nous utilisons deux types de gradients :

- gradient de 10 à 40 p. 100 de glycérol (10 ml) centrifugé 16 heures à 36 000 t/mn, à 4°C dans le rotor SW 41 (Spinco)
- gradient de 10 à 30 p. 100 de glycérol (4,5 ml) centrifugé 4 H 30 à 45 000 t/mn, à 4°C dans le rotor SW 50-I (Spinco).

A la fin de la centrifugation, chaque gradient est divisé en fractions égales. Une aliquote de chaque fraction est soumise à un essai de synthèse de RNA in vitro. Les fractions contenant une activité enzymatique sont rassemblées et congelées dans l'azote liquide.

#### J - DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE DES RNA SYNTHETISES IN VITRO

La synthèse est arrêtée par addition de 2 ml d'ATCA 10 p. 100, 0,02 M, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Après 5 minutes à 0°C, le précipité est recueilli sur filtre Whatman GF 83, lavé 12 fois par 5 ml d'ATCA 2 p. 100 et une fois par l'éthanol absolu. Après séchage (20 minutes à 60°C), les filtres sont placés dans des fioles contenant 5 ml de solution PI :

Toluène	1 litre
PPO	5 g
POPOP	0,3 g

La radioactivité est mesurée dans un spectromètre à scintillation liquide intertechnique SL-30. L'activité enzymatique est exprimée en cpm d' <sup>3</sup>H-UMP incorporé dans les chaînes de RNA (1 pmole d'UMP correspond à environ 10<sup>3</sup> cpm dans les conditions standards).

#### K - DIALYSE DES SOLUTIONS ENZYMATIQUES

Les sacs à dialyse (Union Carbide Corporation) sont traités par trempage pendant 30 minutes dans une solution d'EDTA 20 mM à ébullition. Après refroidissement ils sont conservés à 4°C dans

l'eau bidistillée contenant une goutte de chloroforme.

Les solutions enzymatiques sont dialysées à 4°C contre 100 volumes du tampon de composition désirée. La dialyse est arrêtée lorsque le pH et l'indice de réfraction de la solution enzymatique sont identiques à celles du tampon de dialyse.

#### L - CONCENTRATION DES SOLUTIONS ENZYMATIQUES

Les solutions enzymatiques sont fixées sur des colonnes de DEAE-Sephadex A-25 de volume décroissant (20 ml puis 2 ml). Après rinçage par un volume de tampon TG MED/50, le matériel fixé est élué par le tampon TG MED/400. Le volume des fractions collectées est de 500 µl pour la colonne de 20 ml et de 100 µl pour la colonne de 2 ml. La concentration en albumine de sérum bovin de 500 µg/ml dans chaque fraction.

RESULTATS

A - MISE EN EVIDENCE DE TROIS ACTIVITES RNA POLYMERASIQUES  
DANS LE NOYAU DES CELLULES KB

(Une partie de ces résultats a été publiée dans FEBS LETTERS, 1973 (104))

Nous savions au tout début de ce travail que trois activités RNA polymérasiques I (A), II (B) et III (C) différentes par leurs propriétés catalytiques, leur localisation nucléaire et leur sensibilité à l'alpha-amanitine avaient été séparées par chromatographie sur DEAE-Sephadex (ROEDER et RUTTER, 1969 (92) ROEDER et RUTTER, 1970 (93) LINDELL et al., 1970 (63) et PONTA et al., 1971 (85)).

Deux activités seulement A(I) et B(II) avaient été séparées par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (KEDINGER et al., 1970 (54) KELLER et GOOR, 1970 (60) CHAMBON et al., 1970 (14) STEIN et HAUSEN, 1970 (111) TOCCHINI-VALENTINI et CRIPPA, 1970 (117) KEDINGER et CHAMBON, 1971 (55) KEDINGER et al., 1970 (54) CHESTERTON et BUTTERWORTH, 1971a (17) et 1971b (18)). De l'ensemble des travaux, il ressortait que les activités I et II correspondaient aux activités A et B.

Plus particulièrement, deux activités RNA polymérasiques I (A) et II (B) avaient été identifiées dans le noyau des cellules KB après chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex (KELLER et GOOR, 1970 (60)).

Nous avons utilisé une méthode de solubilisation des enzymes éprouvée et dont les rendements avaient été décrits dans la littérature : la méthode originale de ROEDER et RUTTER, 1970 (93). Cette méthode nous semble adéquate pour préparer un extrait enzymatique représentatif des activités RNA polymérasiques présentes dans les cellules KB. Nous désirons cependant justifier, dès le début de ce travail, l'absence de données relatives aux rendements d'extraction des enzymes. Il nous a semblé difficile de comparer des chiffres représentant une certaine quantité de cpm  $^3\text{H}$ -UMP incorporés par différentes fractions lors de la solubilisation des RNA polymérasiques, fractions dont la composition en protéines varie et peut affecter l'activité relative des enzymes.

D'autre part la présence de BSA dans les fractions collectées lors des chromatographies nous interdisait toute quantification.

Toutefois nous verrons que les enzymes que nous avons caractérisées ont des propriétés identiques à celles des enzymes décrites par d'autres auteurs plus rigoureux dans la quantification. Enfin, notre propos n'était pas de quantifier les RNA polymérase, mais plutôt de les caractériser in vitro pour les raisons que nous avons données dans le paragraphe : BUT DE NOTRE TRAVAIL.

## 1 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DEAE-CELLULOSE

Nous avons d'abord analysé l'extrait nucléaire préparé comme décrit page 28, méthode A, par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (fig. 4 p.37). Nous avons recherché l'activité RNA polymérasique dans les fractions recueillies après élution des protéines fixées sur l'échangeur d'ions.

En utilisant du DNA de thymus de veau natif (Sigma chemical Co) dans le milieu de synthèse in vitro (fig. 4-A), un seul pic d'activité RNA polymérasique apparaît, élué à 0,15 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . Par contre, en utilisant le même DNA préalablement dénaturé par la chaleur, un deuxième pic d'activité apparaît, élué à 0,25 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . Le premier pic d'activité n'est pas inhibé par l'alpha-amanitine, alors que l'activité élue à 0,25 M l'est totalement. Nous avons donc identifié les activités I et II (ou A et B) décrites par d'autres auteurs (KEDINGER et al., 1970 (54) KEDINGER et al., 1971 (55) et SUGDEN et KELLER, 1972 (114)) correspondant aux activités I et II décrites par ROEDER et RUTTER, 1969 (92). Nous nous sommes demandé pourquoi nous n'avons pas détecté l'activité III (AIII) élue peu après l'activité II sur un échangeur d'ions ayant le même groupement réactionnel, le DEAE-Sephadex (ROEDER et RUTTER, 1969 (92) et 1970 (93)). Nous avons décidé de recueillir les fractions collectées après chromatographie dans de la BSA (1 mg/ml concentration finale), afin de protéger l'activité des RNA polymérase (SUMMERS et SIEGEL, 1970 (115)). Nous espérons ainsi pouvoir détecter un pic d'activité III. Nous avons chromatographié une aliquote du même extrait enzymatique sur colonne de DEAE-cellulose et recueilli les fractions éluées dans la BSA (fig. 4-B). ROEDER et RUTTER, 1969 (92) avaient publié que l'enzyme III transcrivait avec la même efficacité le DNA natif ou dénaturé de Thymus de veau. Nous avons alors recherché l'activité RNA polymérasique dans chacune des fractions, en utilisant le DNA de Thymus de veau dénaturé, en présence ou en

Figure N° 4

Séparation des RNA polymérases I et II par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose. 30 mg d'extrait enzymatique préparé par la méthode A, page 28, ont été chromatographiés sur des colonnes de 1,4 x 7 cm.

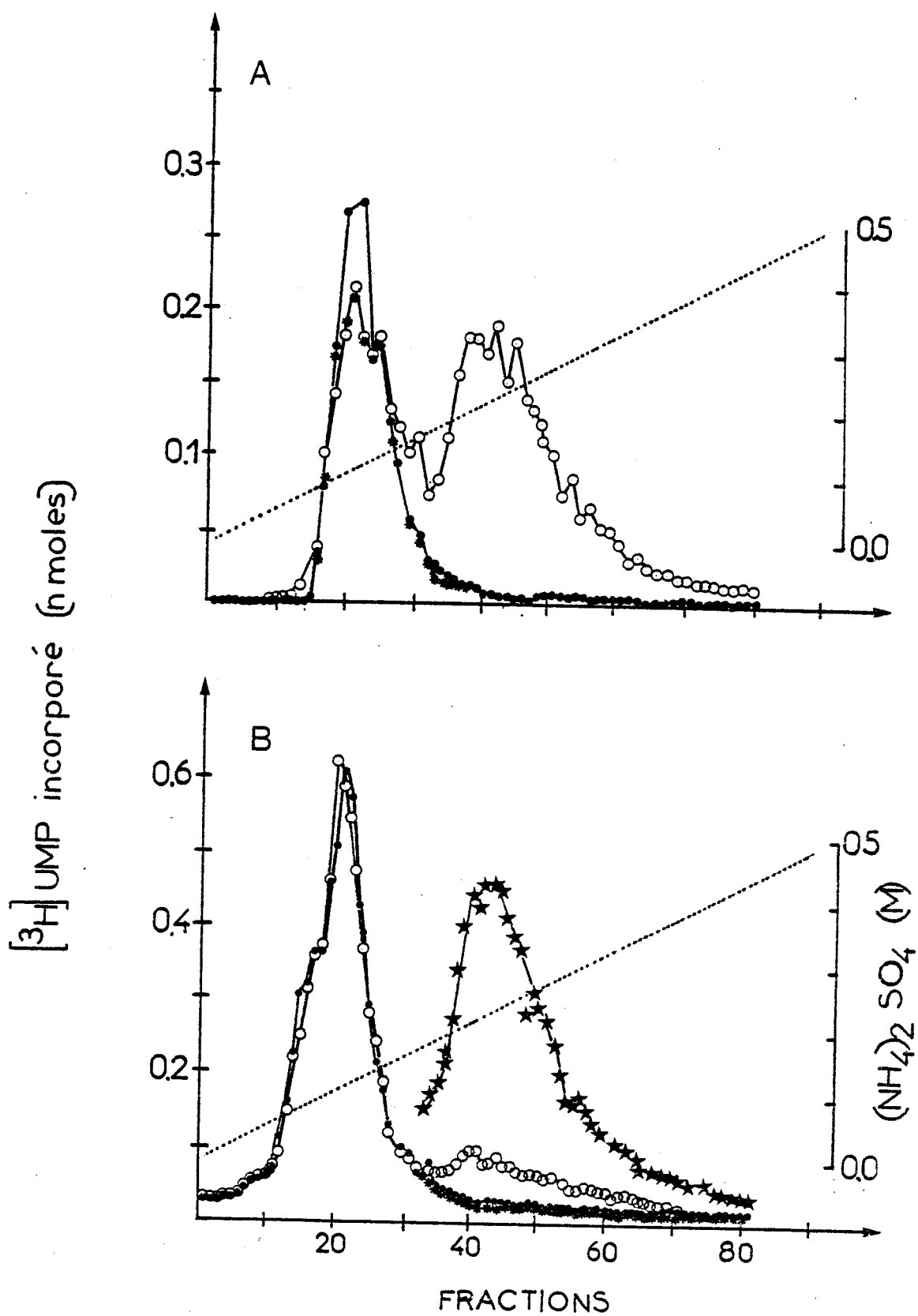
A - Fractions de 1,5 ml recueillies en absence de BSA

- O - O DNA de thymus de veau dénaturé (10 µg/ml)
- - ● DNA de thymus de veau natif (10 µg/ml)
- \* - \* DNA de thymus de veau dénaturé (10 µg/ml) + 0,8 µg/ml d'alpha-amanitine

B - Fractions de 1,5 ml recueillies dans la BSA (1 mg/ml concentration finale)

- ★ - ★ DNA de thymus de veau dénaturé (10 µg/ml)
- \* - \* DNA de thymus de veau dénaturé (10 µg/ml) + 0,8 µg/ml d'alpha-amanitine
- O - O DNA de KB natif (10 µg/ml)
- - ● DNA de KB natif (10 µg/ml) + 0,8 µg/ml d'alpha-amanitine

L'activité des RNA polymérases est exprimée dans ce graphique et les suivants en nMoles d'UMP incorporées par fraction (1pmole = 1 000 cpm ; 1 unité enzymatique = 1pmole d'UMP<sup>3</sup>H incorporée en 30 minutes dans les conditions standards).



BUS  
LILLE

absence d'alpha-amanitine. Comme précédemment deux activités, dont une complètement inhibée par l'alpha-amanitine, sont éluées à 0,15 M et 0,25 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . Par contre, aucune trace d'activité III. Nous avons pensé que les RNA polymérasés des cellules KB transcriraient plus efficacement le DNA homologue. Nous avons recherché l'activité RNA polymérasique dans toutes les fractions en utilisant le DNA de KB natif en présence ou en absence d'alpha-amanitine. Nous avons retrouvé un pic d'activité élué à 0,15 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , non inhibé par l'alpha-amanitine et correspondant aux enzymes I (A). Les enzymes II semblent être incapables de transcrire un DNA double brin. Puisque nous ne pouvions détecter une activité RNA polymérase III (C), il nous a semblé important de savoir si notre extrait de protéines nucléaires contenait ou non une activité de type RNA polymérase III.

## 2 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DEAE-SEPHADEX

La solution la plus simple était d'utiliser le DEAE-Sephadex puisque cet échangeur est celui qu'avaient utilisé ROEDER et RUTTER, 1969 (92). Nous avons chromatographié une aliquote du même extrait sur colonne de DEAE-Sephadex (fig. 5 p. 39). Nous avons caractérisé trois activités RNA polymérasiques, qui d'après leur ordre d'élué et leur sensibilité à l'alpha-amanitine correspondaient aux activités I, II et III décrites par ROEDER et RUTTER, 1969 (92). Il est intéressant de noter que la RNA polymérase II isolée par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex ne transcrit pas le DNA homologue natif plus efficacement que l'enzyme II isolée dans les mêmes conditions par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (tableau 3 p. 40). De plus, nous avons constaté que lorsque les fractions de DEAE-Sephadex sont collectées en absence de BSA, nous pouvions détecter une activité III, (fig. 5-B p. 39) bien que plus faible comparée à la même activité détectée en présence de BSA (tableau 4 p. 40). Cependant, même en présence de BSA, nous ne pouvions détecter une activité III après chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose.

A la suite de ces résultats, nous devons déterminer si dans nos conditions expérimentales, l'activité de type RNA polymérase III isolée par chromatographie sur DEAE-Sephadex était retenue ou non sur colonne de DEAE-cellulose. Les résultats de cette expérience sont décrits (fig. 6 p. 41) et démontrent que l'enzyme III est



Figure N° 5

Séparation des RNA polymérase par chromatographie sur  
colonne de DEAE-Sephadex A 25

30 mg d'extrait enzymatique nucléaire préparé par la  
méthode A, page 28, ont été analysés sur des colonnes de  
1 x 15 cm

A - Les fractions de 1,2 ml ont été recueillies dans  
la BSA (1 mg/ml concentration finale)

- O - O      DNA de KB natif (10 µg/ml)
- - ●      DNA de KB natif (10 µg/ml) + 0,8 µg/ml d'alpha-amanitine
- - □      DNA de thymus de veau dénaturé (10 µg/ml)

B - Les fractions de 1,2 ml ont été recueillies sans BSA

- O - O      DNA de KB natif (10 µg/ml)
- - ●      DNA de KB natif (10 µg/ml) + 0,8 µg/ml d'alpha-amanitine

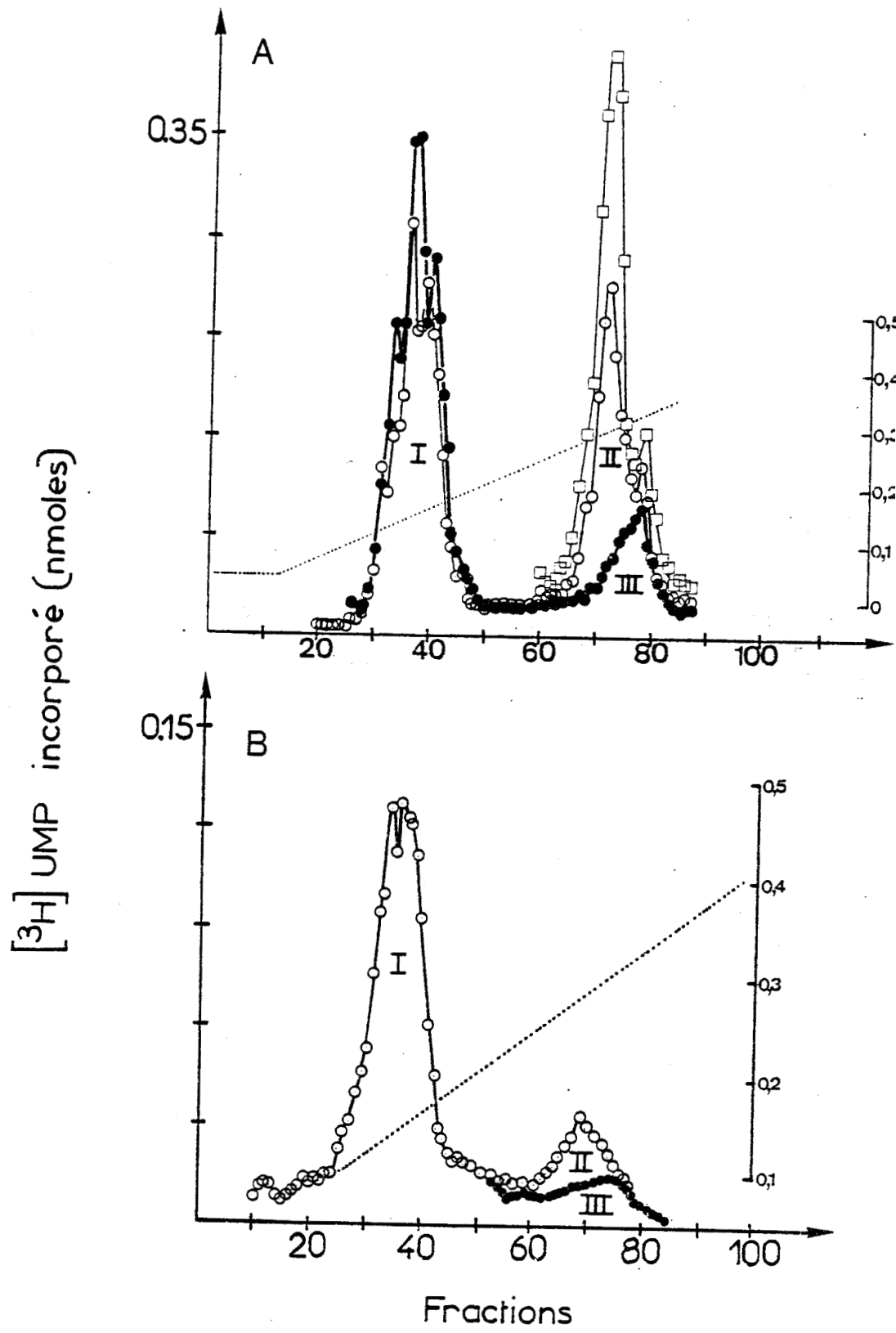


Tableau N° 3

ACTIVITE RELATIVE DES RNA POLYMERASES  
(valeurs calculées à partir de la fig. 4-B  
p. 37 et de la fig. 5-A p. 39)

DEAE-Sephadex (+ BSA) unités enzymatiques				DEAE-cellulose (+ BSA) unités enzymatiques		
I	II	III	$\frac{I + III}{II}$	I + III	II	$\frac{I + III}{II}$
4066	1105.5	1065.5	4.64	7795	1540	5.06

Tableau N° 4

EFFET DE LA BSA SUR L'ACTIVITE DES RNA POLYMERASES  
(valeurs calculées à partir des fig. 5 p. 39)

DEAE-SEPHADEX (Unités enzymatiques)				
	+ BSA		- BSA	
I	4066	(65.3%)	1763.4	(78%)
II	1105	(17.7%)	201.1	(9%)
III	1065	(17%)	290.5	(13%)
I + II + III	6237	(100%)	2255	(100%)



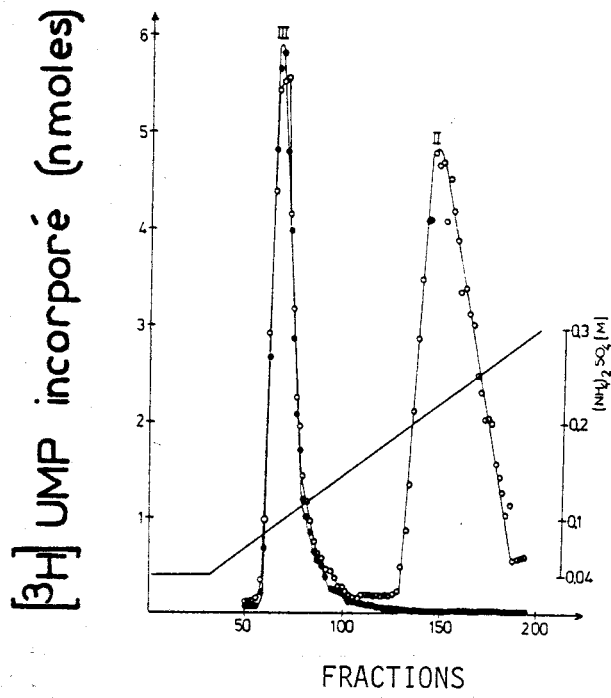
Figure N° 6

Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose des fractions de DEAE-Sephadex contenant les RNA polymérases II + III.

Les fractions de DEAE-Sephadex contenant l'activité des enzymes II + III ont été dialysées contre TGME/40 et chromatographiées sur une colonne de DEAE-cellulose de 180 ml. Des fractions de 5 ml ont été collectées en présence d'albumine de sérum bovin (500 µg/ml final) 100 µl de chaque fraction ont été utilisé pour rechercher l'activité RNA polymérasique.

O - O      DNA de KB "natif" (10 µg/ml)

● - ●      DNA de KB "natif" (10 µg/ml) + 0,8 µg/ml d'alpha-amanitin



éluée de la colonne de DEAE-cellulose à la même force ionique que la RNA polymérase I, ce qui explique en partie pourquoi cette enzyme n'a pas été détectée lorsque cet échangeur d'ions a été utilisé seul.

### 3 - SEPARATION PAR SEDIMENTATION EN GRADIENT DE GLYCEROL

CHAMBON et al., 1970 (14) et CHESTERTON et al., 1972 (19) avaient publié que les enzymes II (B) sédimentaient plus rapidement que les enzymes I (A) et les RNA polymérases I plus rapidement que la RNA polymérase d'E. Coli, suggérant que le poids moléculaire des enzymes I (A) et II (B) était supérieur à 500 000 daltons.

Il était intéressant d'établir approximativement le poids moléculaire des enzymes III.

Nous avons centrifugé le contenu d'une fraction de la colonne de DEAE-Sephadex contenant une quantité suffisante d'enzymes II et III (fig. 7-A p. 43). Dans ces conditions, l'activité RNA polymérase III sédimente plus rapidement que l'activité RNA polymérase II, qui elle-même sédimente moins rapidement que la beta-galactosidase (M.W. 595 000). Nous avons maintenant la possibilité de tester si l'activité RNA polymérase III était présente ou non dans l'extrait enzymatique nucléaire avant la chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex, ce qui excluait la possibilité que ces enzymes soient des artéfacts de chromatographie sur DEAE-Sephadex.

Dans l'affirmative, si l'on centrifuge une aliquote de l'extrait enzymatique nucléaire en gradient linéaire de glycérol, il doit être possible d'identifier trois pics d'activité en utilisant les propriétés caractéristiques des enzymes I, II et III. C'est ce que nous avons obtenu et présenté dans la figure 7-B p. 43.

A basse force ionique (30 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ) et en présence de DNA natif et d'alpha-amanitine (0,8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), deux pics d'activité sont détectés dans le gradient, représentant les enzymes I et III. Pour confirmer la présence de l'enzyme III, nous avons recherché l'activité RNA polymérasique dans chaque fraction à 200 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  (force ionique inhibant complètement l'activité des enzymes I transcrivant un DNA natif) et en présence de DNA de KB natif et de 0,8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'alpha-amanitine (inhibant complètement l'activité des enzymes II). Dans ces conditions, nous avons trouvé

Figure N° 7

A - Sédimentation en gradient de glycérol des fractions de la colonne de DEAE-Sephadex (fig. 5-A p. 39) contenant les RNA polymérases II et III.

O - O DNA de KB "natif" (50 µg/ml)

● - ● DNA de KB "natif" (50 µg/ml) + 0,8 µg/ml d'alpha-amanitine

B - Sédimentation en gradient de glycérol d'un extrait enzymatique nucléaire de cellules KB préparé par la méthode A, page 28.

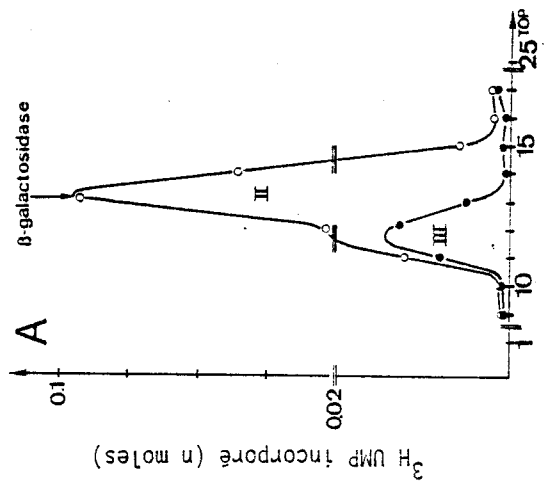
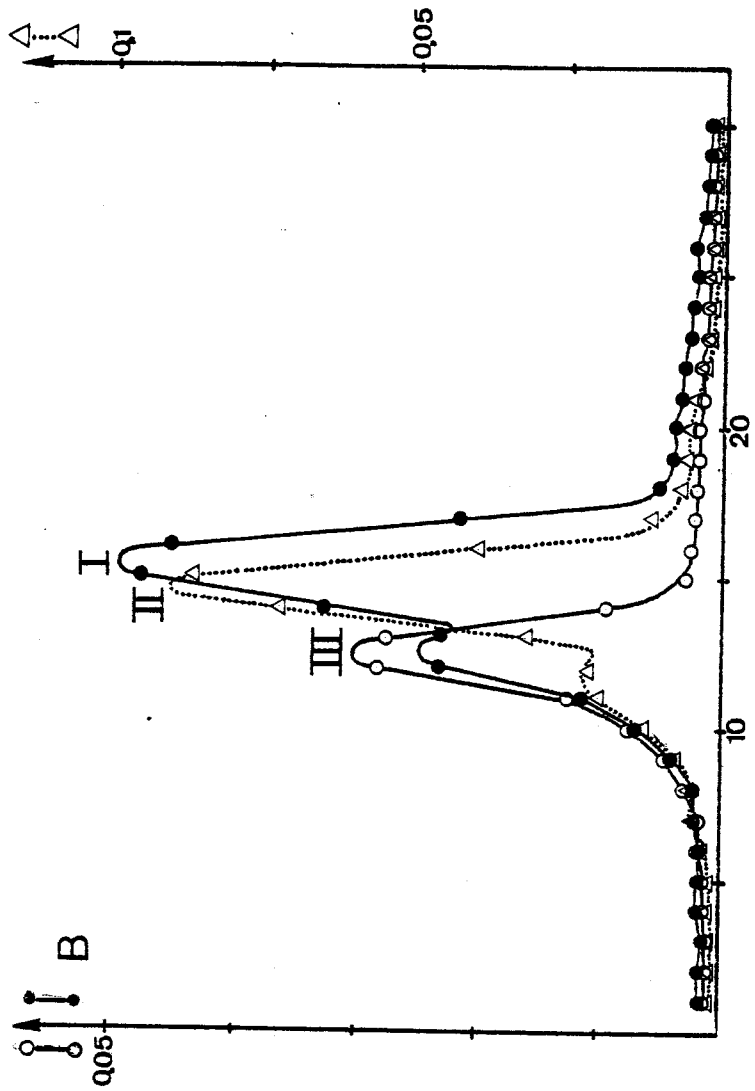
L'activité RNA polymérasique est mesurée en présence de :

● - ● DNA de KB "natif" (10 µg/ml) à 33 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  en présence de 0,8 µg/ml d'alpha-amanitine

△ - △ DNA de KB dénaturé (10 µg/ml à 100 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$

○ - ○ DNA de KB "natif" (10 µg/ml) à 200 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  en présence de 0,8 µg/ml d'alpha-amanitine

L'activité enzymatique est exprimée en nmoles d' $^3\text{H}$ -UMP incorporées par fraction.



Fractions





un seul pic d'activité correspondant aux enzymes III. Nous avons détecté l'activité RNA polymérase II à une force ionique de 100 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , en présence de DNA de KB dénaturé, matrice transcrite préférentiellement par les enzymes II. Une estimation des constantes de sédimentation de chaque activité enzymatique nous a donné les chiffres suivants : I : 14. 5S ; II : 15. 5S et III : 17 S correspondant à des poids moléculaires de 480 000, 550 000 et 650 000 respectivement.

L'ensemble de ces résultats indique qu'il existe trois RNA polymérases dans les cellules eucaryotes ce qui confirme les résultats de ROEDER et RUTTER, 1969 (92) et PONTA et al., 1971 (85). Nous avons caractérisé pour la première fois la RNA polymérase III dans les cellules de mammifères, montré ses propriétés chromatographiques originales sur DEAE-cellulose et déterminé que son poids moléculaire est supérieur à celui des enzymes I et II.

Notre but était de comparer les enzymes isolées des cellules KB infectées et non infectées par l'adénovirus 2. Nous avons cherché à déterminer les conditions chromatographiques optimales permettant de séparer et de détecter les trois activités RNA polymérasiques en utilisant différents échangeurs d'ions. En même temps nous avons établi les propriétés chromatographiques des RNA polymérases III en espérant pouvoir établir un schéma de purification.

## B - PROPRIETES CHROMATOGRAPHIQUES DES RNA POLYMERASES DES CELLULES NON INFECTEES

### 1 - FRACTION NUCLEAIRE

#### 1) Chromatographie sur DEAE-Sephadex

Le DEAE- Sephadex, contrairement à la DEAE-cellulose semblait permettre de détecter et de séparer, bien qu'imparfaitement, les RNA polymérases I, II et III.

Nous avons cherché à améliorer la séparation entre les activités I, II et III en augmentant le nombre de fractions collectées et en faisant varier la force ionique du gradient de 0,05 M à 0,4 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  au lieu de 0,05 M à 0,5 M. En collectant 200 fractions et utilisant l'inhibition différentielle des enzymes I, II et III par l'alpha-amanitine, nous

avons réussi à séparer d'une manière satisfaisante les enzymes II et III (fig. 8 p. 46). Ce qui était inattendu, c'était l'hétérogénéité du pic d'activité I et la présence d'une activité mineure II (IIA) élue juste avant le pic majeur d'activité II (IIB). De plus chaque profil d'élution comportait un pic d'activité discret élué en fin de gradient à environ 0,35 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ .

Nous avons, plus tard, caractérisé cette activité comme étant la forme IIIB décrite par SCHWARTZ et al., 1974 (100). Chaque pic IIA, IIB, IIIA et IIIB garde la même position d'élution et reste homogène après rechromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex (fig. 9 p. 47) et les enzymes IIIA et IIIB sont éluées à 0,1 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  après rechromatographie sur DEAE-cellulose (fig. 10 p. 48).

Le DEAE-Sephadex semblait l'échangeur d'ions ayant le meilleur pouvoir résolutif. Toutefois, les résultats des travaux de CHESTERTON et BUTTERWORTH, 1971 (18) et de FROEHNER et BONNER, 1973 (31) indiquaient que la phosphocellulose permettant de séparer deux activités de type RNA polymérase I. Il fallait donc définir la position d'élution des enzymes I, II et III sur cet échangeur d'ions et comparer son pouvoir résolutif à celui de la DEAE-Sephadex.

## 2) Chromatographie sur colonne de phosphocellulose

### a) RNA polymérase III

Nous avons dilué les fractions correspondant aux pics d'activités IIIA et IIIB obtenus après chromatographie sur DEAE-Sephadex pour obtenir une molarité finale en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  de 0,05 M et passé la solution à travers une colonne de phosphocellulose. Après rinçage de la colonne, le matériel retenu a été élué par un gradient linéaire de 0,07 M à 0,5 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . Dans ces conditions, nous avons détecté un seul pic d'activité RNA polymérasique résistant à l'alpha-amanitine, élué à une molarité de 0,17 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  (fig. 11A p.49).

### b) RNA polymérase I

Nous avons de la même façon rechromatographié le pic d'activité I de DEAE-Sephadex sur colonne de phosphocellulose. Nous avons détecté quatre autres pics d'activité élués à 0,11 M, 0,17 M, 0,21 M

Figure N° 8

Séparation des RNA polymérase nucléaires par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex.

220 mg de protéines contenus dans un extrait nucléaire préparé par la méthode A, page 28 ont été fixées sur une colonne de 2 x 30 cm. Après rinçage de la colonne par 250 ml de TGED/40, les RNA polymérase ont été éluées par un gradient linéaire (2 x 500 ml) de 50 à 400 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  dans le TGED. 238 fractions de 4,2 ml ont été recueillies dans la BSA (1 mg/ml)

L'activité RNA polymérasique est exprimée en nmoles d' $^3\text{H}$ -UMP incorporées par fraction.

○ - ○      DNA de KB natif (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

● - ●      DNA de KB natif (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + 0,8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'alpha-amanitine

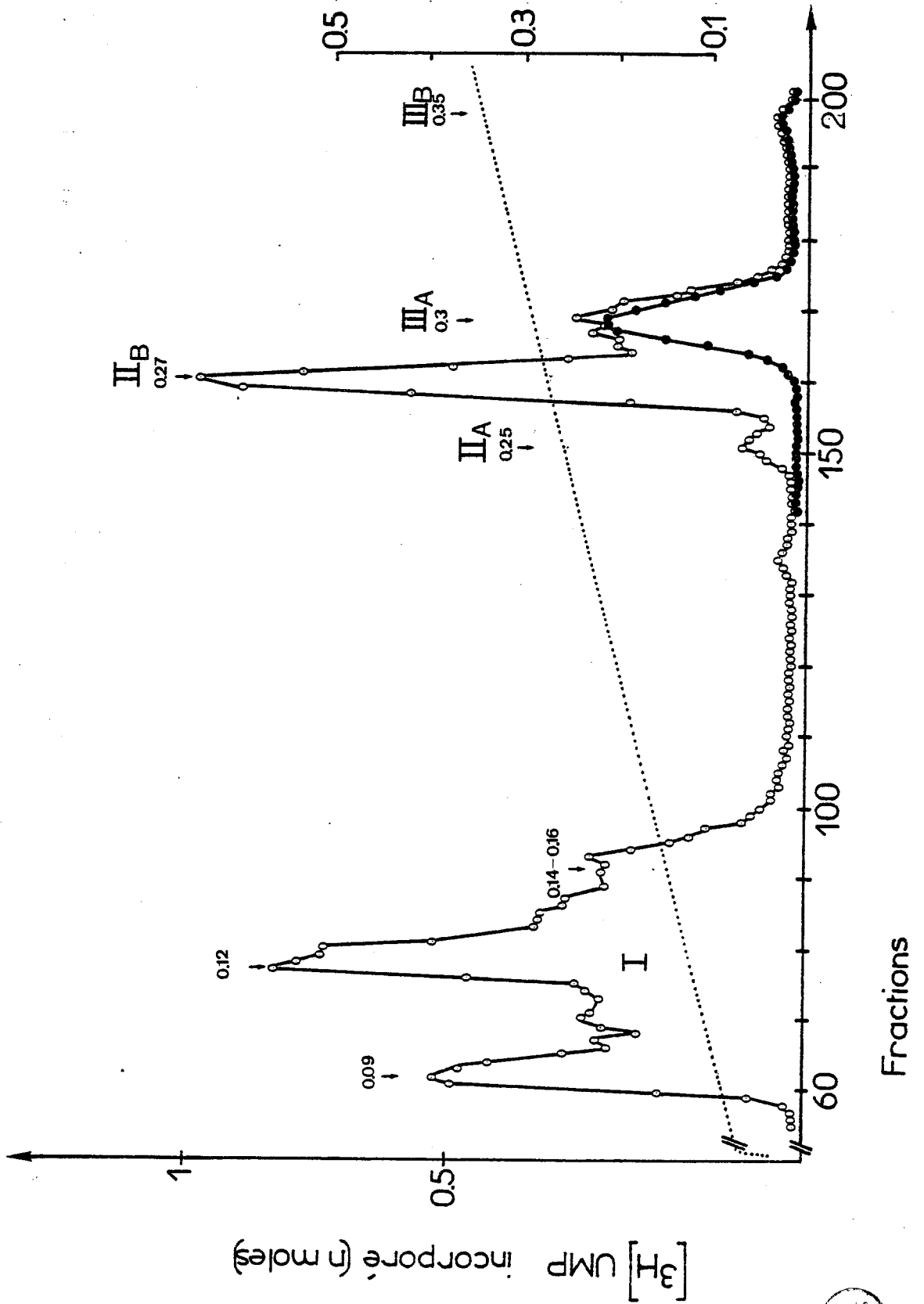


Figure N°9

Rechromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex des RNA polymérasés II<sub>A</sub>, II<sub>B</sub>, III<sub>A</sub> et III<sub>B</sub>.

Respectivement, 200 unités de II<sub>A</sub>, 2 000 unités de II<sub>B</sub>, 1 500 unités de III<sub>A</sub> et 500 unités de III<sub>B</sub> ont été chromatographiées sur des colonnes de 21 x 1,1 cm.

Des fractions de 2 ml ont été recueillies dans la BSA (1 mg/ml) après élution des colonnes par des gradients linéaires (2 x 100 ml) de 40 à 400 mM en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> dans le TGED. L'activité RNA polymérasique est exprimée en nmoles d'<sup>3</sup>H-UMP incorporées par fraction.

● - ●            DNA de KB natif (10 µg/ml)

(1 unité enzymatique = 1 pmole d'<sup>3</sup>H-UMP incorporé en 30' à 37°C dans les conditions standard)

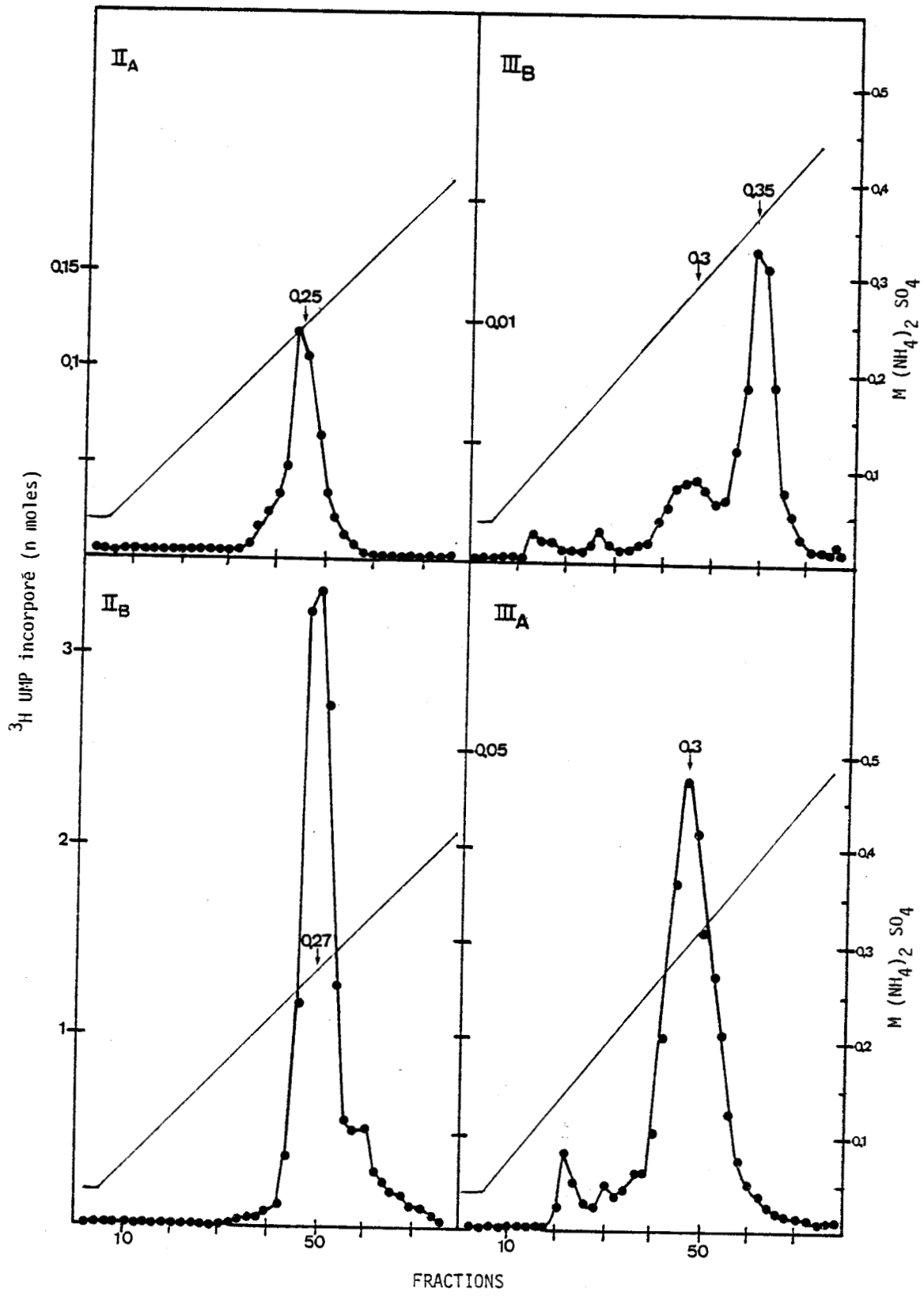


Figure N° 10

Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose des RNA polymérasés III<sub>A</sub> et III<sub>B</sub> séparées par chromatographie sur DEAE-Sephadex.

Respectivement, 2 000 unités de III<sub>A</sub> et 300 unités de III<sub>B</sub> ont été chromatographiées sur des colonnes de 1,1 x 20 cm.

Des fractions de 1,5 ml ont été recueillies dans la BSA (1 mg/ml) après élution des colonnes par des gradients linéaires (2 x 75 ml) de 40 à 400 mM en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>

0 - 0      DNA de KB natif (10 µg/ml)

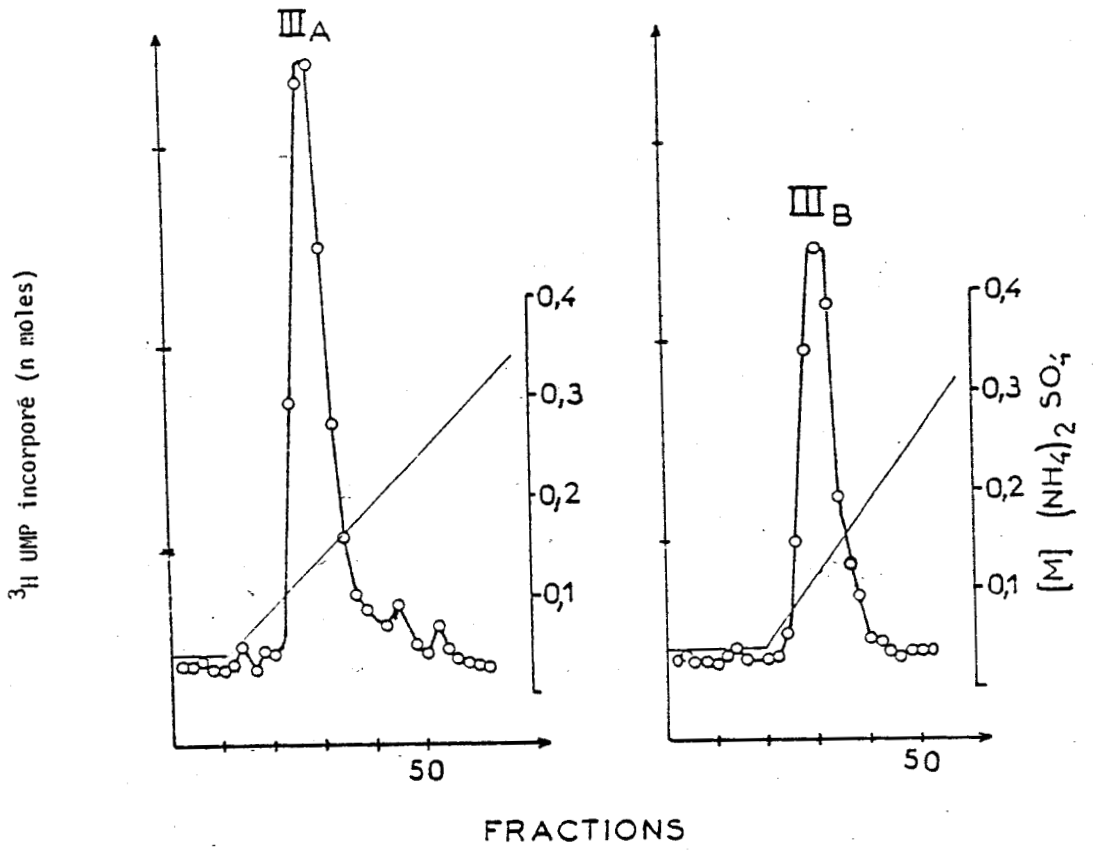




Figure N° 11

A - Chromatographie sur colonne de phosphocellulose des RNA polymérases III<sub>A</sub> et III<sub>B</sub> séparées par chromatographie sur DEAE-Sephadex.

Envrion 1 000 unités de III<sub>A</sub> et 500 unités de III<sub>B</sub> ont été chromatographiées sur une colonne de phosphocellulose de 1,2 x 30 cm. Des fractions de 3 ml ont été recueillies dans la BSA (1 mg/ml) après élution de la colonne par un gradient linéaire (2 x 250 ml) de 70 à 450 mM en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> dans MS (30)

0 - 0 DNA de KB natif (10 µg/ml)

● - ● DNA de KB natif (10 µg/ml) + 0,8 µg/ml d'alpha-amanitine

B - Chromatographie sur colonne de phosphocellulose des RNA polymérases I isolées par chromatographie sur DEAE-Sephadex.

Les fractions actives de DEAE-Sephadex sont rechromatographiées sur une colonne de 1,1 x 20 cm. Les RNA polymérases sont éluées par un gradient linéaire (2 x 100 ml) de 50 à 350 mM en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>. Des fractions de 1,5 ml sont recueillies dans la BSA (1mg/ml)

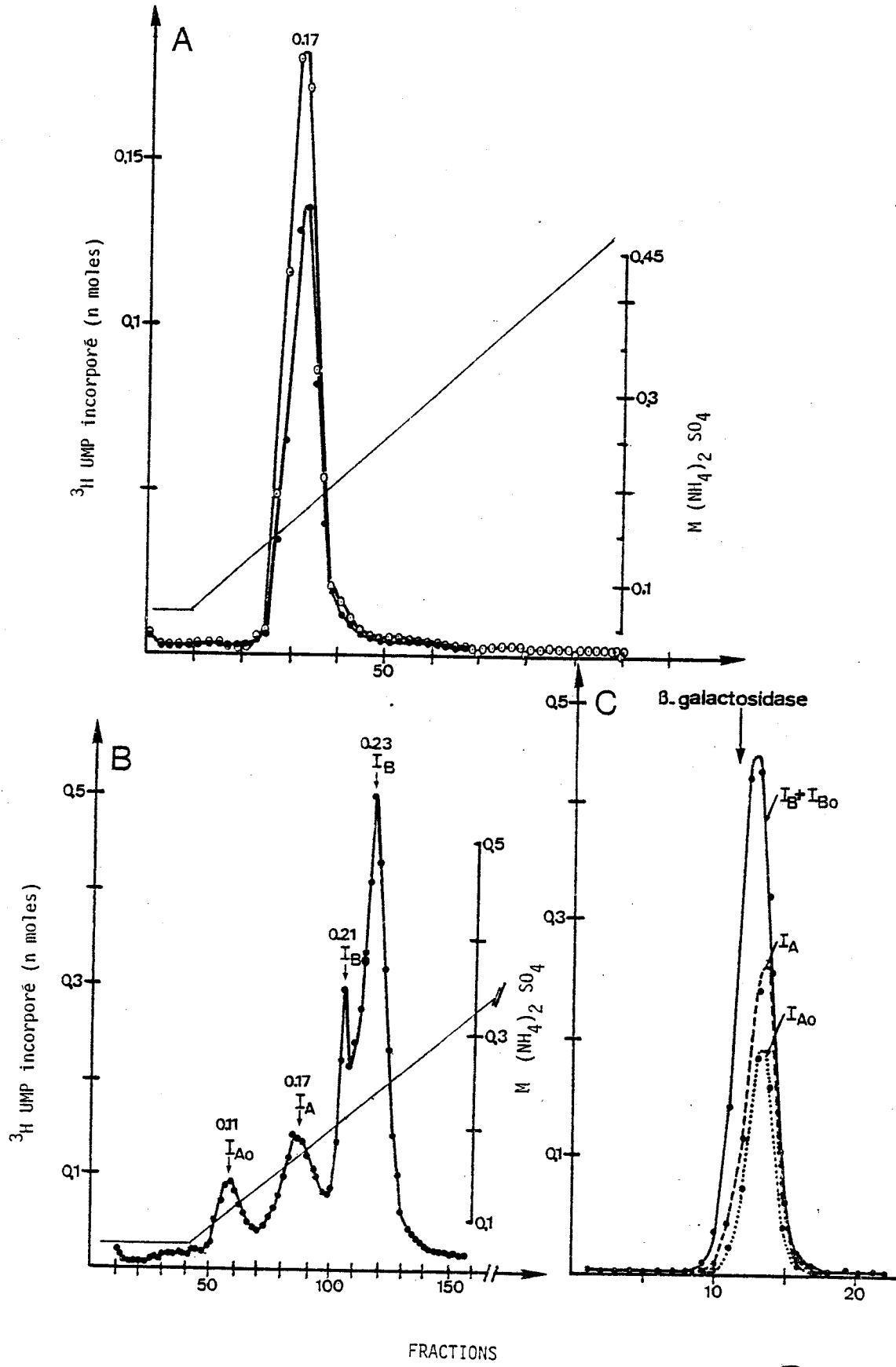
● - ● poly [d(A-T)] 15 µg/ml

C - Sédimentation en gradient de glycérol linéaire des RNA polymérases I<sub>AO</sub>, I<sub>A</sub>, I<sub>BO</sub>, I<sub>B</sub>.

Les conditions de centrifugation sont les suivantes :  
16 heures à 36 000 rpm et à + 4°C dans le rotor SW 41.

Les gradients de glycérol de 15 à 40 p. 100 sont dans le tampon : Tris 50 M pH 8, EDTA 0,1 mM, DTT 2 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 35 mM

● - ● DNA de KB natif (10 µg/ml)



et 0,23 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , que nous appellerons désormais IAO, IA, IBO et IB (fig. 11-B p.49). Ces quatre activités RNA polymérase I restent homogènes et sédimentent à la même place en gradient linéaire de glycérol (fig. 11-C p.49). L'hétérogénéité des enzymes I après chromatographie sur DEAE-Sephadex se confirme après chromatographie sur phosphocellulose. La possibilité de séparer des pics multiples d'activité RNA polymérase I sur phosphocellulose signifiait-elle qu'il existait plusieurs formes enzymatiques ou plus simplement était-elle le reflet dissociant de la résine ou enfin était-elle le résultat d'une activité protéolytique contaminant la préparation ? Nous avons tenté de répondre à ces questions.

D'abord le pic d'activité RNA polymérase I élué de la colonne de DEAE-Sephadex est hétérogène et il reste après rechromatographie sur le même échangeur d'ions (fig. 12-A p.51). Ensuite, par analogie avec les résultats de BUHLER et al., 1974 (10), nous pouvions penser que la forme majeure donnait naissance aux formes mineures, par dissociation spontanée de certains polypeptides, ces formes mineures pouvant être séparées que par chromatographie sur colonne de phosphocellulose. Nous avons vérifié que dans nos conditions, le pic d'activité majeure (IB) restait homogène après rechromatographie sur colonne de phosphocellulose (fig. 12-B p.51). Enfin, nous avons tenté d'identifier chaque pic d'activité séparé sur colonne de phosphocellulose à un pic d'activité obtenu sur colonne de DEAE-Sephadex (fig. 13, p.52), en rechromatographiant sur colonne de DEAE-Sephadex les fractions actives de chaque pic de phosphocellulose.

Nous avons conclu que l'ordre d'élution de la colonne de DEAE-Sephadex est : IBO, IB, IA, IAO et les forces ioniques d'élution correspondantes : 0,09 M, 0,12 M, 0,14 M, et 0,16 M étaient similaires à celles des activités détectées après chromatographie et rechromatographie de l'extrait nucléaire sur colonne de DEAE-Sephadex (fig. 12 p. 51)

### c) RNA polymérase II

Nous savions déjà que les enzymes II devaient être éluées avec les enzymes III de la colonne de phosphocellulose, puisque le pic d'activité RNA polymérase III (IIIA + IIIB) de DEAE-Sephadex rechromatographié sur phosphocellulose était légèrement

Figure N° 12

A - Rechromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex des RNA polymérasés I isolées par chromatographie sur DEAE-Sephadex.

Les fractions actives de DEAE-Sephadex sont rechromatographiées sur une colonne de 1,2 x 20 cm.

Les RNA polymérasés sont élués par un gradient linéaire (2 x 100 ml) de 50 à 300 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  dans le TGED. Des fractions de 1,5 ml sont recueillies dans la BSA (1 mg/ml)

●-● DNA de KB natif (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

B - Rechromatographie sur colonne de phosphocellulose des RNA polymérasés  $\text{I}_{\text{BO}}$  et  $\text{I}_{\text{B}}$  de la colonne de phosphocellulose (fig. 11-B p.49).

Les fractions actives de phosphocellulose sont rechromatographiées sur une colonne de 1,2 x 30 cm.

Les RNA polymérasés sont élués par un gradient linéaire (2 x 100 ml) de 70 à 35 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  dans le TGED. Des fractions de 1,5 ml sont recueillies dans la BSA (1 mg/ml)

●-● DNA de KB natif (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

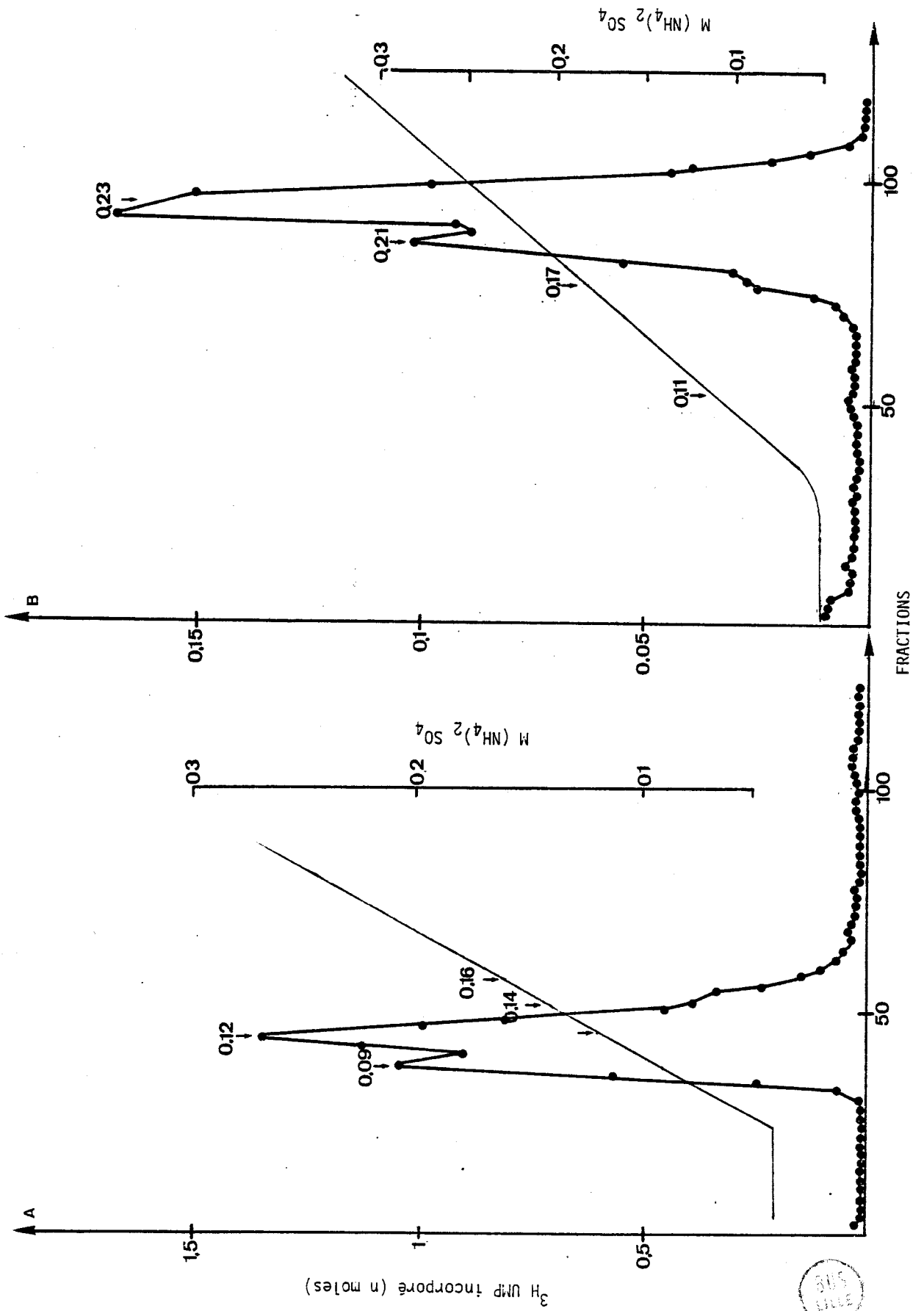


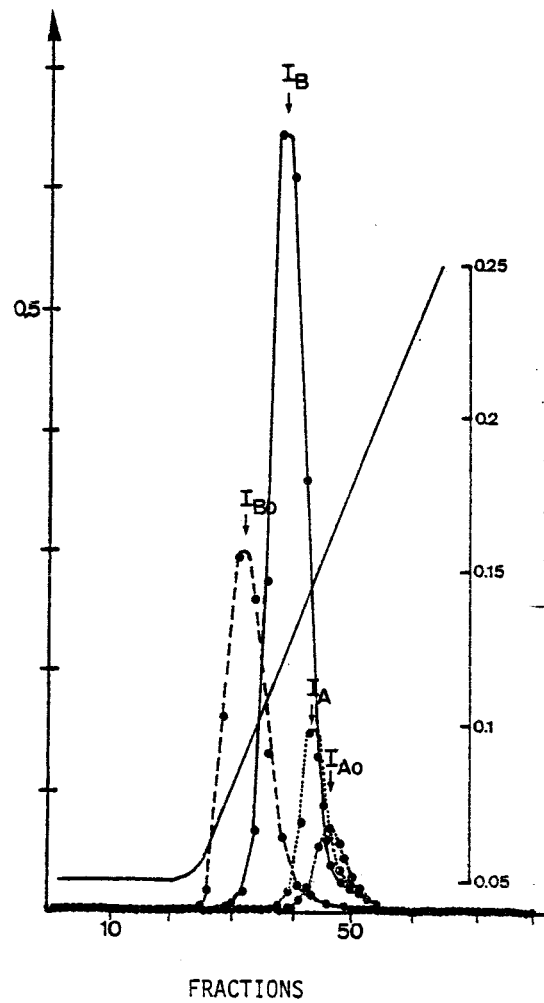
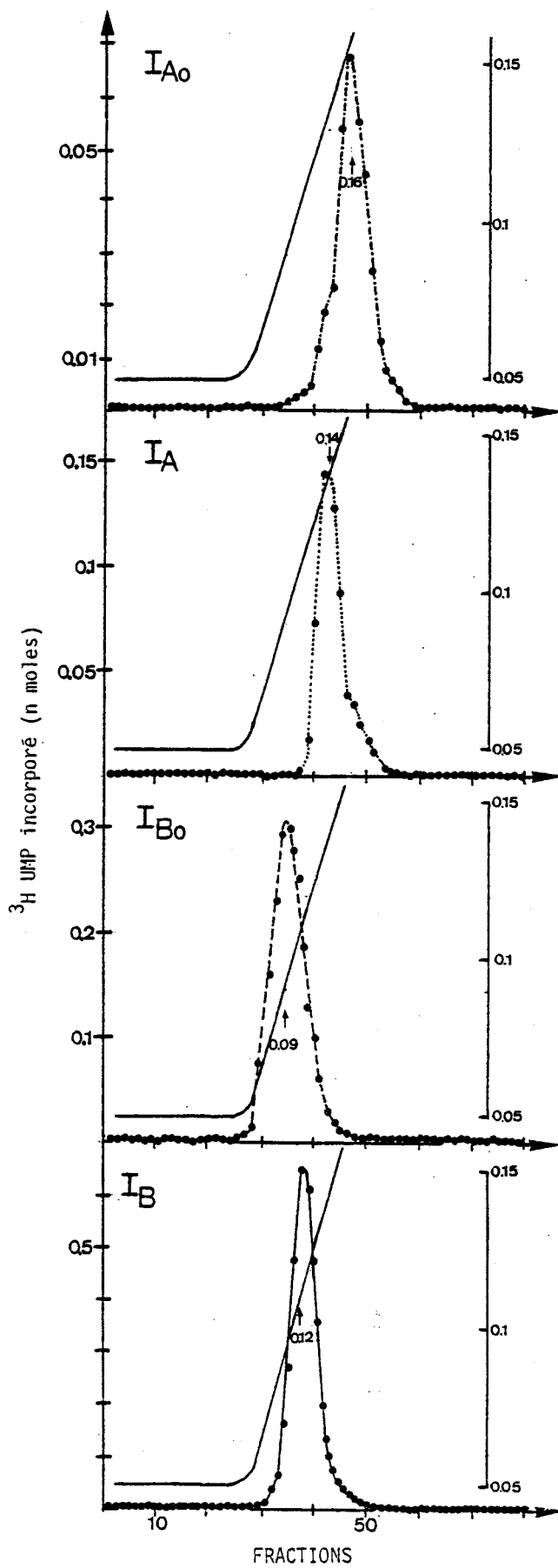
Figure N° 13

Chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex des RNA polymérasés I<sub>AO</sub>, I<sub>A</sub>, I<sub>BO</sub>, et I<sub>B</sub> préalablement séparées par chromatographie sur colonne de phosphocellulose (fig. 11-B p. 49)

Les fractions les plus actives de chaque pic de phosphocellulose ont été rechromatographiées sur des colonnes de 0,7 x 15 cm. Les RNA polymérasés sont élués par un gradient linéaire (2 x 20 ml) de 40 à 500 mM en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> dans le TGED. Des fractions de 350 µl sont collectées dans la BSA (1 mg/ml).

●-● DNA de KB natif (10 µg/ml)

L'activité enzymatique est exprimée en nmoles d'<sup>3</sup>H-U<sup>3</sup>MP incorporées par fraction.



inhibé par l'alpha-amanitine (fig. 11-A p. 49). Nous avons vérifié l'ordre d'éluion des enzymes I, II et III en chromatographiant sur phosphocellulose l'extrait enzymatique nucléaire brut (fig. 14-A p.54). Nous avons dans un premier temps mélangé un volume égal de chaque fraction à un volume égal de milieu réactionnel contenant 10 µg/ml de DNA de KB natif. Dans ces conditions, nous avons détecté un pic d'activité élué à 0,17 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , suivi d'une activité discrète éluee à 0,25 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . Si nos premiers résultats étaient exacts, nous devions retrouver des activités I éluees à 0,11 M, 0,17 M, 0,21 M et 0,23 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  (fig. 11-B p. 49). Cependant l'activité du pic élué à 0,23 M avait en fait été évaluée à la concentration de 0,125 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , force ionique à laquelle les enzymes I ne sont plus actives en présence de DNA natif cellulaire (voir page 73). Nous avons donc recherché l'activité RNA polymérasique en diluant une aliquote de chaque fraction dans cinq volumes de milieu réactionnel. Dans ces conditions, nous avons détecté un deuxième pic d'activité élué à 0,23 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . Ce pic était hétérogène puisqu'il possédait un épaulement élué à 0,21 M. Nous avons la possibilité de différencier les trois activités enzymatiques I, II et III en utilisant deux concentrations en alpha-amanitine, dans les essais enzymatiques in vitro : 0,8 µg/ml inhibant les enzymes II et 400 µg/ml inhibant complètement les enzymes III (SCHWARTZ et al., 1974 (100) (fig. 14-B p. 54). Dans ces conditions, l'activité RNA polymérasique éluee à 0,25 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  (pic hétérogène montrant un épaulement élué de façon reproductible à 0,21 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ), est totalement résistante à l'alpha-amanitine et ceci jusque la concentration de 400 µg/ml. Par contre, les fractions éluees entre 0,1 M et 0,17 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  contiennent une activité enzymatique inhibée par 0,8 µg/ml d'alpha-amanitine et une activité RNA polymérasique inhibée par 400 µg/ml d'alpha-amanitine, correspondant aux enzymes II et III. Enfin, l'activité RNA polymérasique résiduelle, non inhibée par 400 µg/ml d'alpha-amanitine, se répartit en quatre pics éluees à 0,11 M, 0,16 M, 0,21 M et 0,23 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . Ces résultats confirment l'existence de quatre pics d'activité RNA polymérase I éluees de la phosphocellulose. Afin de savoir si les activités II et III éluees à 0,17 M de la colonne de phosphocellulose contenaient en fait deux activités IIA, IIB et IIIA, IIIB, nous avons rechromatographié sur DEAE-Sephadex le contenu des fractions éluees entre 0,1 M et 0,2 M (fig. 14-C p.54).



Figure N°14

A - 1 g d'extrait nucléaire préparé par la méthode A, page 28 a été fixé sur une colonne de 400 ml. Les protéines fixées ont été éluées par un gradient de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  de 70 à 500 mM (2 litres). Des fractions de 10 ml ont été collectées dans l'albumine de sérum bovin (500 ug/ml)

Une aliquote de chaque fraction a été soumise à un essai enzymatique en présence de DNA de KB natif (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) dans les conditions salines optimales pour les enzymes de type II et III 0-0 (1 volume de chaque fraction + 1 volume de milieu réactionnel)

et les conditions salines optimales pour les enzymes de type 1 ●-● (dilution de chaque aliquote par 5 volumes de milieu réactionnel).

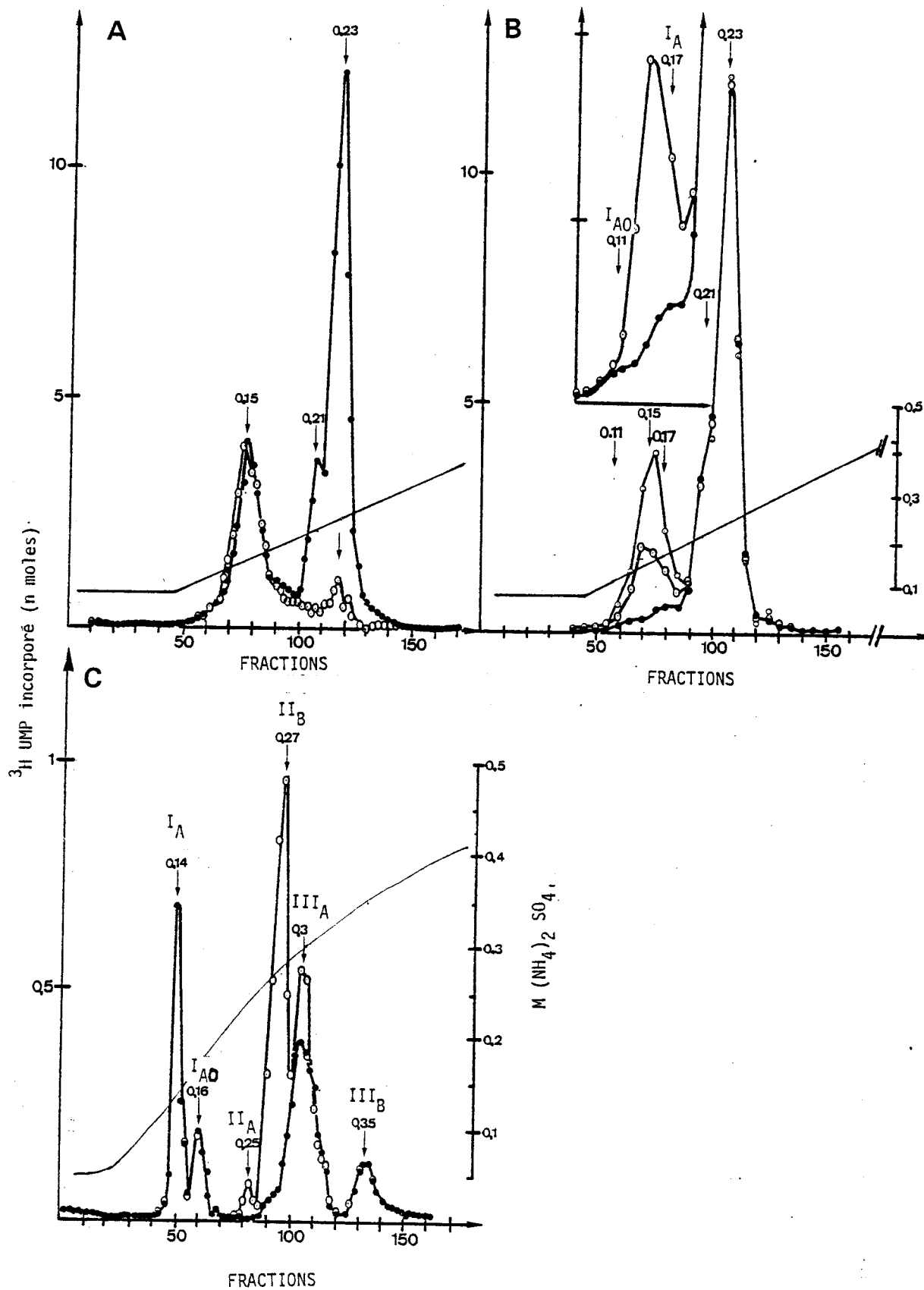
B - Mêmes conditions qu'en A (chaque aliquote diluée 5 fois par le milieu réactionnel)

DNA de KB natif (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	sans alpha-amanitine	o - o
	alpha-amanitine 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0 - 0
	alpha-amanitine 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$	● - ●

C - Chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A-25 des fractions éluées entre 0,1 M et 0,2 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  de la colonne de phosphocellulose. Les fractions éluées entre 0,1 M et 2 M de la colonne de phosphocellulose ont été dialysées contre le tampon TGMED/40, fixées sur une colonne de DEAE-Sephadex A-25 (100 ml) et éluées par un gradient de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  de 40 à 400 mM (800 ml).

Une aliquote des fractions de 4 ml a été soumise à un essai enzymatique en présence de DNA de KB natif (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

sans alpha-amanitine	0 - 0
alpha-amanitine 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	● - ●



Nous avons retrouvé les deux activités IIA et IIB éluées à 0,25 M et 0,27 M, et mis en évidence deux activités RNA polymérase III, IIIA et IIIB, éluées à 0,30 M et 0,35 M, complètement inhibées par des concentrations d'alpha-amanitine supérieures à 400 µg/ml (fig. 15-A p. 56).

### 3) Chromatographie sur colonne de CM SEPHADEX

Nous avons aussi établi le comportement chromatographique des enzymes I, II et III sur colonne de CM-Sephadex. Nous avons choisi les conditions décrites par ROEDER, 1974 (94), car elles nous paraissaient adéquates et permettaient de séparer deux activités RNA polymérase I. Nous avons mélangé des fractions de DEAE-Sephadex contenant l'activité IIB et les fractions de phosphocellulose contenant l'activité majeure IB (éluée à 0,23 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ). Après dialyse d'une nuit contre 1,5 l de TESGED/50, nous avons chromatographié le mélange sur colonne de CM-Sephadex (fig. 15-B p. 56). En utilisant la combinaison de la sensibilité différentielle des deux enzymes à l'alpha-amanitine, nous avons observé que les enzymes I étaient éluées à 0,12 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  et les enzymes II à 0,1 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ .

Quant aux enzymes III (IIIA et IIIB), les fractions de DEAE-Sephadex furent chromatographiées sur CM-Sephadex (fig. 15-B p. 56). Nous avons détecté un pic d'activité élué à 0,1 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  légèrement inhibé par l'alpha-amanitine puisque contaminé par les enzymes II. En conclusion, l'utilisation du CM-Sephadex C-25 ne permet pas de séparer les RNA polymérases IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB (fig. 15-B p. 56). Les quatre enzymes sont éluées de la colonne de CM-Sephadex C-25 à une molarité de environ 0,1 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ .

Nous avons démontré la pluralité des RNA polymérases dans le noyau des cellules KB et conclu que le DEAE-Sephadex est le seul échangeur d'ions permettant de séparer en une étape les RNA polymérases I, II et III. Jusqu'ici nous avons étudié le contenu des noyaux plutôt que les cellules entières car l'isolement des noyaux présente une étape importante de purification permettant d'éliminer les protéines cytoplasmiques. Cependant, il nous fallait savoir si lors de l'isolement des noyaux nous ne perdions pas une fraction des RNA polymérases nucléaires dans la fraction cytoplasmique. D'autre part, nous avons voulu vérifier que notre méthode de préparation des noyaux n'est pas sélective.

Figure N° 15

A - Action de l'alpha-amanitine sur l'activité des RNA polymérasés I, II et III isolées par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex.

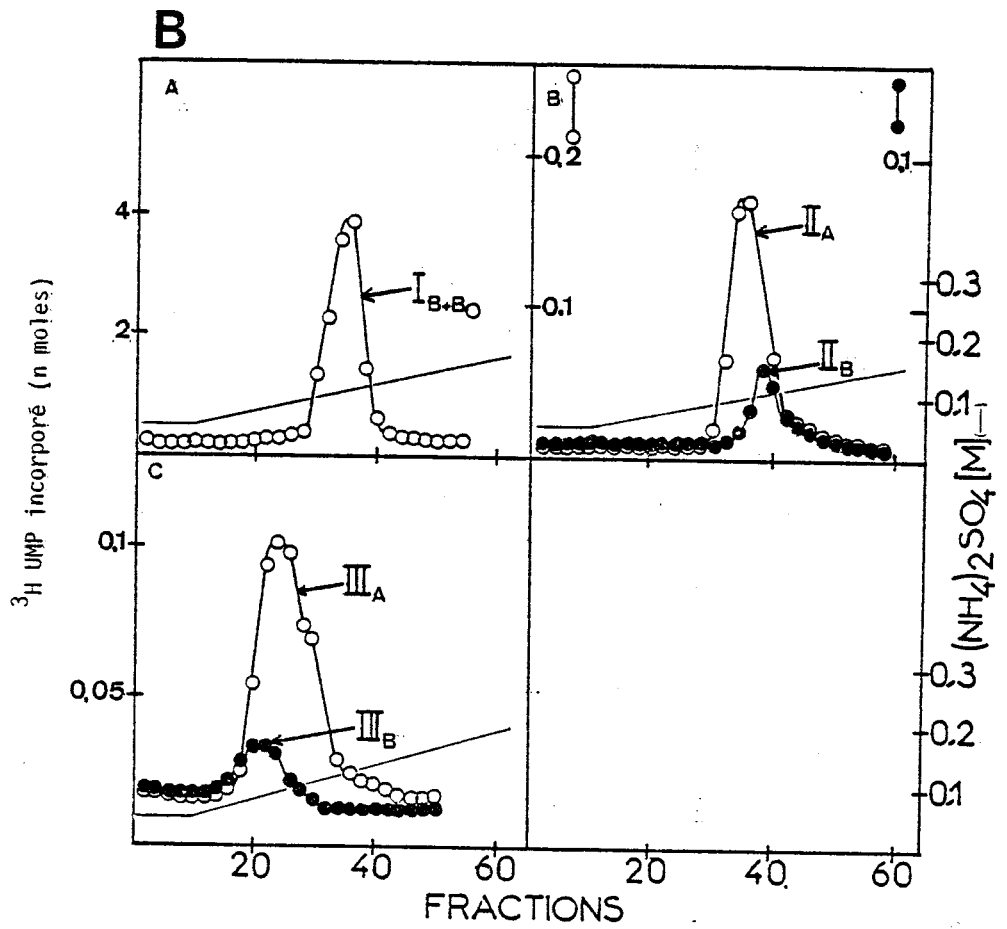
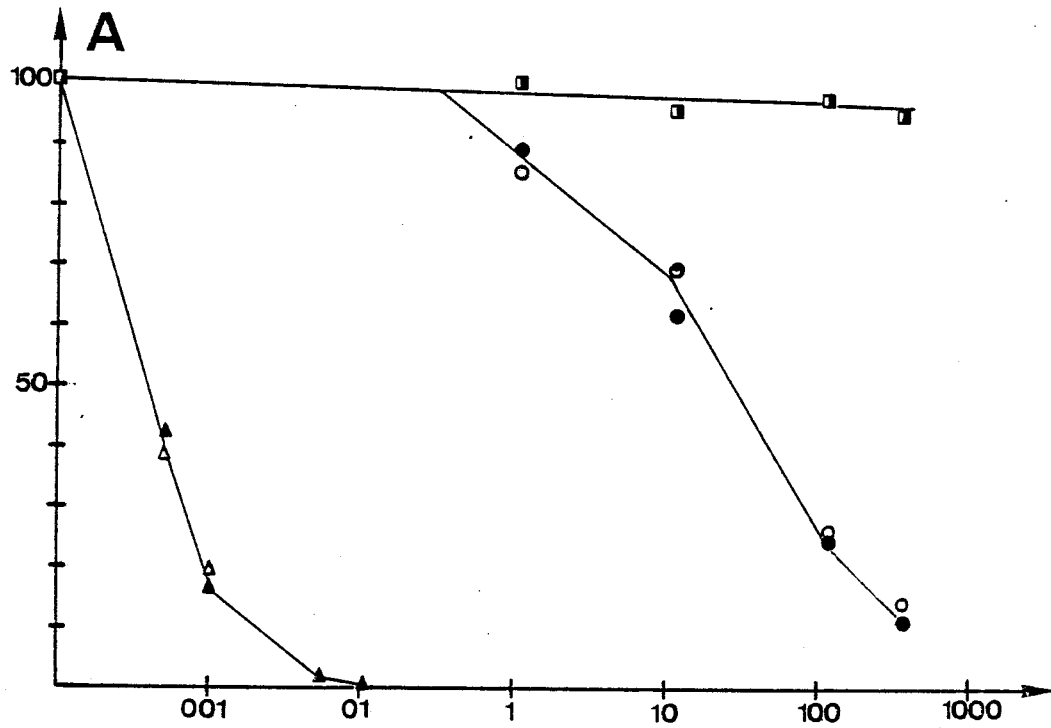
40 µl de la fraction la plus active de chaque pic d'activité séparé par chromatographie sur DEAE-Sephadex (fig. 14-C p. 54) ont été soumis à un essai de synthèse de RNA en présence des concentrations en alpha-amanitine indiquées.

$I_A$	■-■	$II_A$	▲-▲	$III_A$	●-●
$I_{AO}$	□-□	$II_B$	△-△	$III_B$	○-○

100 % d'activité représente pour chaque enzyme la quantité d' $^3H$ -UMP incorporé suivante :

$I_A$	: 3 pmoles	$II_A$	: 1 pmole	$III_A$	: 5,9 pmoles
$I_{AO}$	: 1,5 pmoles	$II_B$	: 11,3 pmoles	$III_B$	: 1,8 pmoles

B - Chromatographie sur colonne de CM-Sephadex des RNA polymérasés nucléaires  $I_B$ ,  $I_{BO}$ ,  $II_A$ ,  $II_B$ ,  $III_A$ , et  $III_B$



## 2 - FRACTION CYTOPLASMIQUE

Nous avons essayé de déterminer si la présence d'activités RNA polymérasiques dans la fraction cytoplasmique (SEIFART et al., 1972 (102) SCHWARTZ et al., 1974 (100)) était oui ou non due à une "fuite" nucléaire ou le reflet de la localisation naturelle d'une fraction des enzymes n'ayant pas encore migré vers le noyau. Nous avons comparé les activités enzymatiques présentes dans les fractions nucléaire et cytoplasmique, en laissant en contact pendant des temps différents les noyaux et la fraction cytoplasmique pendant le fractionnement cellulaire, comme décrit fig. 16 p. 58. Nous avons chromatographié les différents extraits enzymatiques sur des colonnes de DEAE-Sephadex de taille rigoureusement identique car cet échangeur est le seul permettant de séparer en une seule étape toutes les activités RNA polymérasiques. Nous avons aussi recherché l'activité RNA polymérasique dans les fractions éluées des colonnes en utilisant le poly [d(A-T)] puisque cet hétéropolymère synthétique du DNA est transcrit 2 à 3 fois plus efficacement par les enzymes III que le DNA natif de thymus (SCHWARTZ et al., 1974 (100)).

### 1) Répartition des activités RNA polymérasiques dans les fractions nucléaires et cytoplasmiques obtenues à l'aide d'un tampon aqueux

Les profils d'élution des colonnes de DEAE-Sephadex sont décrits fig. 17 p. 59 et fig. 18 p. 60. Les résultats de la quantification sont décrits tableau 5 p. 61.

D'abord, les profils d'élution sont identiques. Dans la fraction nucléaire, le pic d'activité RNA polymérase I est hétérogène composé de façon reproductible de trois activités éluées à 0,09 M, 0,12 M, et 0,14-0,16 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . Le profil d'élution des activités I reste similaire après rechromatographie sur DEAE-Sephadex (fig. 12-A p. 51). Enfin nous avons caractérisé deux activités IIA et IIB éluées à 0,25 M et 0,27 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  et deux activités IIIA et IIIB éluées à 0,3 M et 0,35 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ .

Dans la fraction cytoplasmique, nous avons détecté de façon reproductible huit pics d'activité II-IIX, IIA et IIB, élués à 0,23 M, 0,25 M et 0,27 M, trois pics d'activité III-IIIIX, IIIA et IIIB élués à 0,2 M, 0,30 M et 0,35 M et deux pics d'activité I

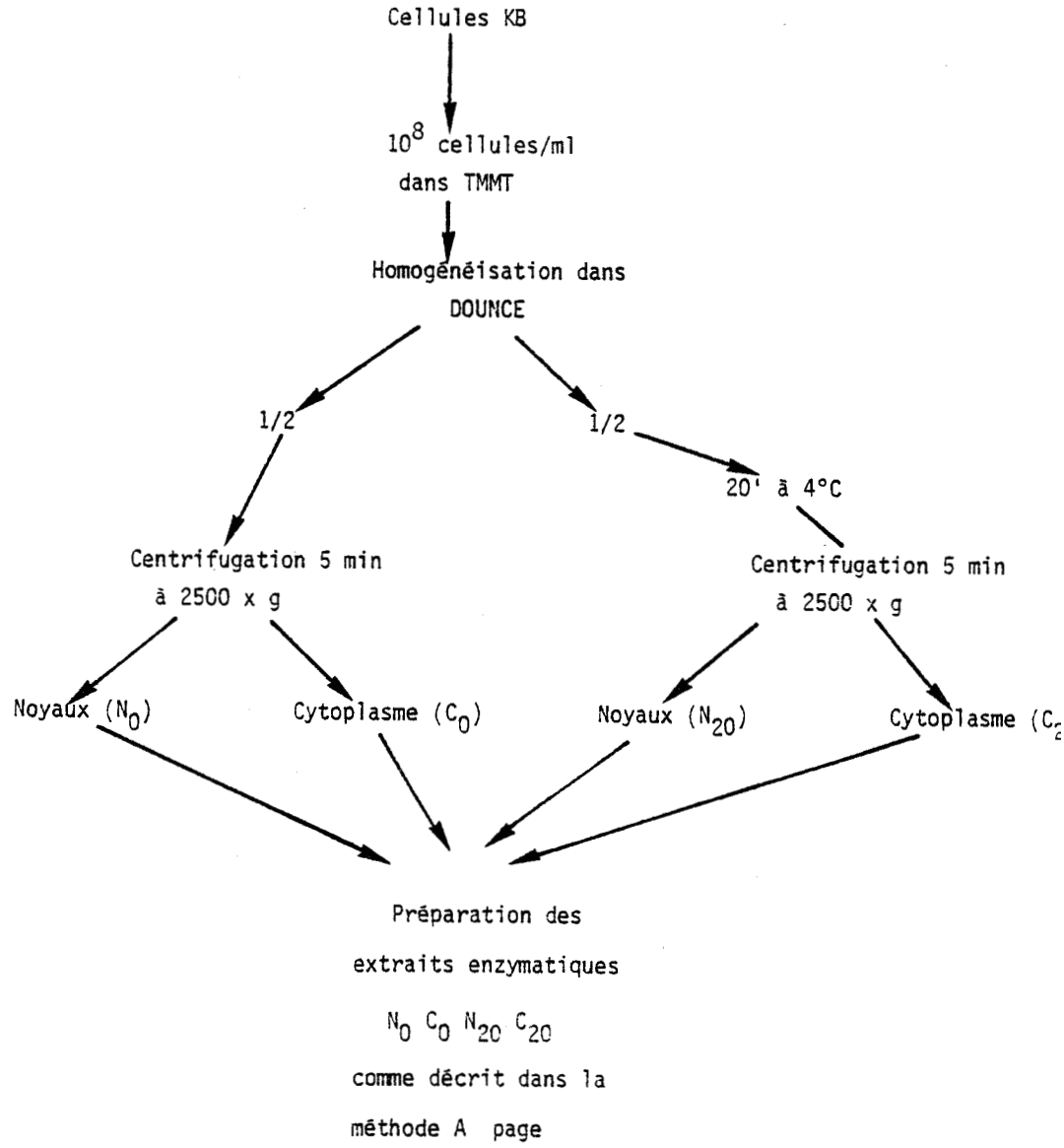


FIGURE N° 16



Figure N° 17

Séparation par chromatographie sur colonne de DEAE-Séphadex des RNA polymérasés nucléaires.

Les extraits enzymatiques nucléaires N<sub>0</sub> et N<sub>20</sub> contenant respectivement 70 et 77 mg de protéines ont été chromatographiés sur des colonnes de 1,5 x 30 cm.

Les RNA polymérasés sont élués par un gradient (2 x 250 ml) linéaire de 40 à 425 mM en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> dans le TGED. Des fractions de 3,75 ml sont recueillies dans la BSA (0,5 mg/ml).

	O --- O	N <sub>0</sub>
DNA de KB natif (10 µg/ml)	● --- ●	N <sub>20</sub>
poly [d(A-T)] (10 µg/ml)	△ ··· △	N <sub>20</sub>



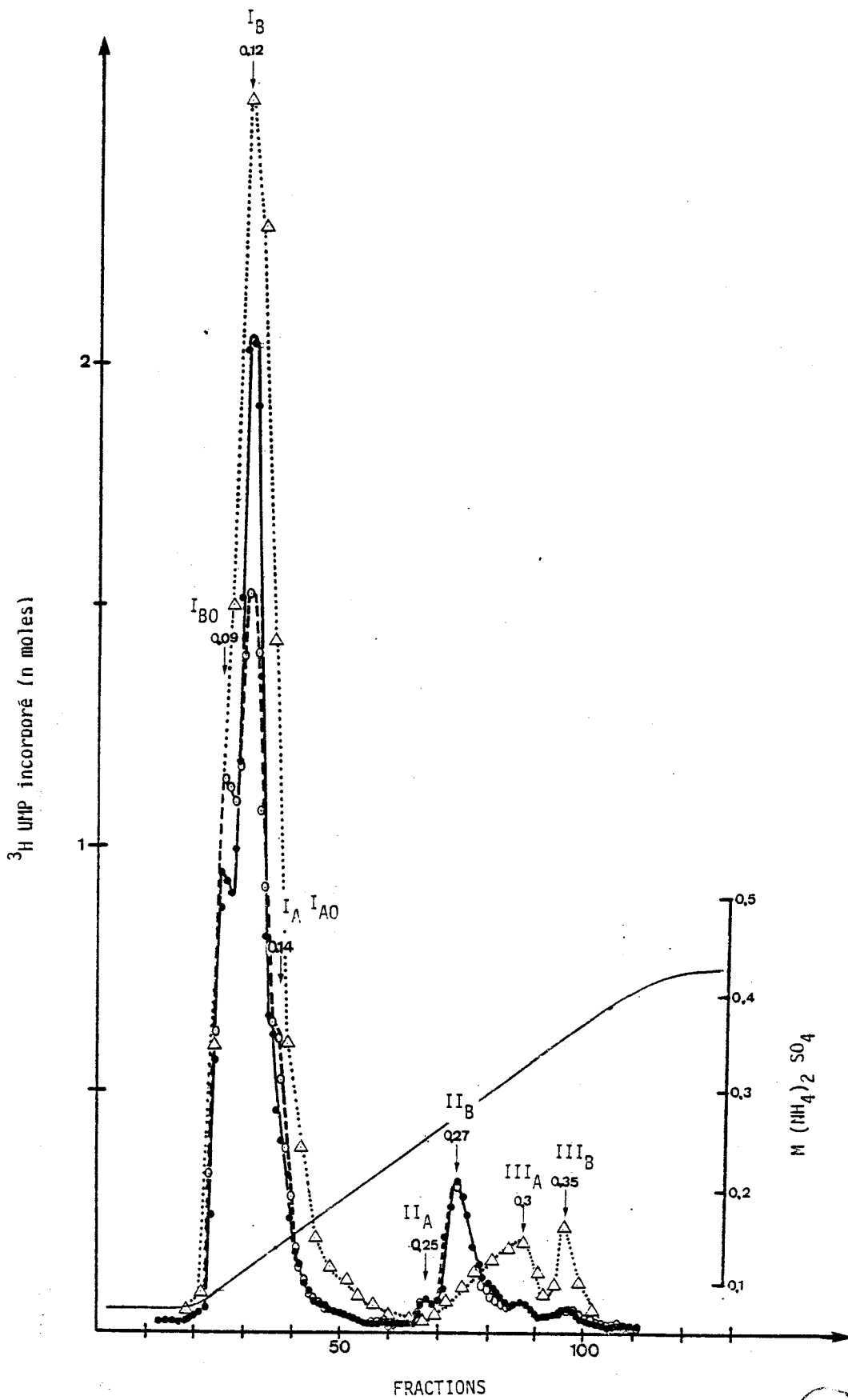


Figure N° 18

A - Chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A-25 des RNA polymérases contenues dans les fractions cytoplasmiques  $C_0$  et  $C_{20}$ .

Les extraits enzymatiques cytoplasmiques  $C_0$  et  $C_{20}$  contenant chacun 35 mg de protéines ont été chromatographiés sur des colonnes de 1,1 x 20 cm. Les RNA polymérases sont éluées par un gradient linéaire (2 x 125 ml) de 40 à 425 mM en  $(NH_4)_2 SO_4$  dans le TGED. Des fractions de 1,25 ml sont recueillies dans la BSA (0,5 mg/ml).

	O---O	$C_0$
DNA de KB natif (10 $\mu$ g/ml)	●---●	$C_{20}$
poly [d(A-T)] (10 $\mu$ g/ml)	△···△	$C_{20}$

B - Courbes d'inactivation par l'alpha-amanitine des RNA polymérases séparés en A.

$I_A$	□—□
$I_{AO}$	■—■
$III_x$	○—○
$III_A$	●—●
$III_B$	●—●
$II_x$	△—△
$II_B$	▲—▲

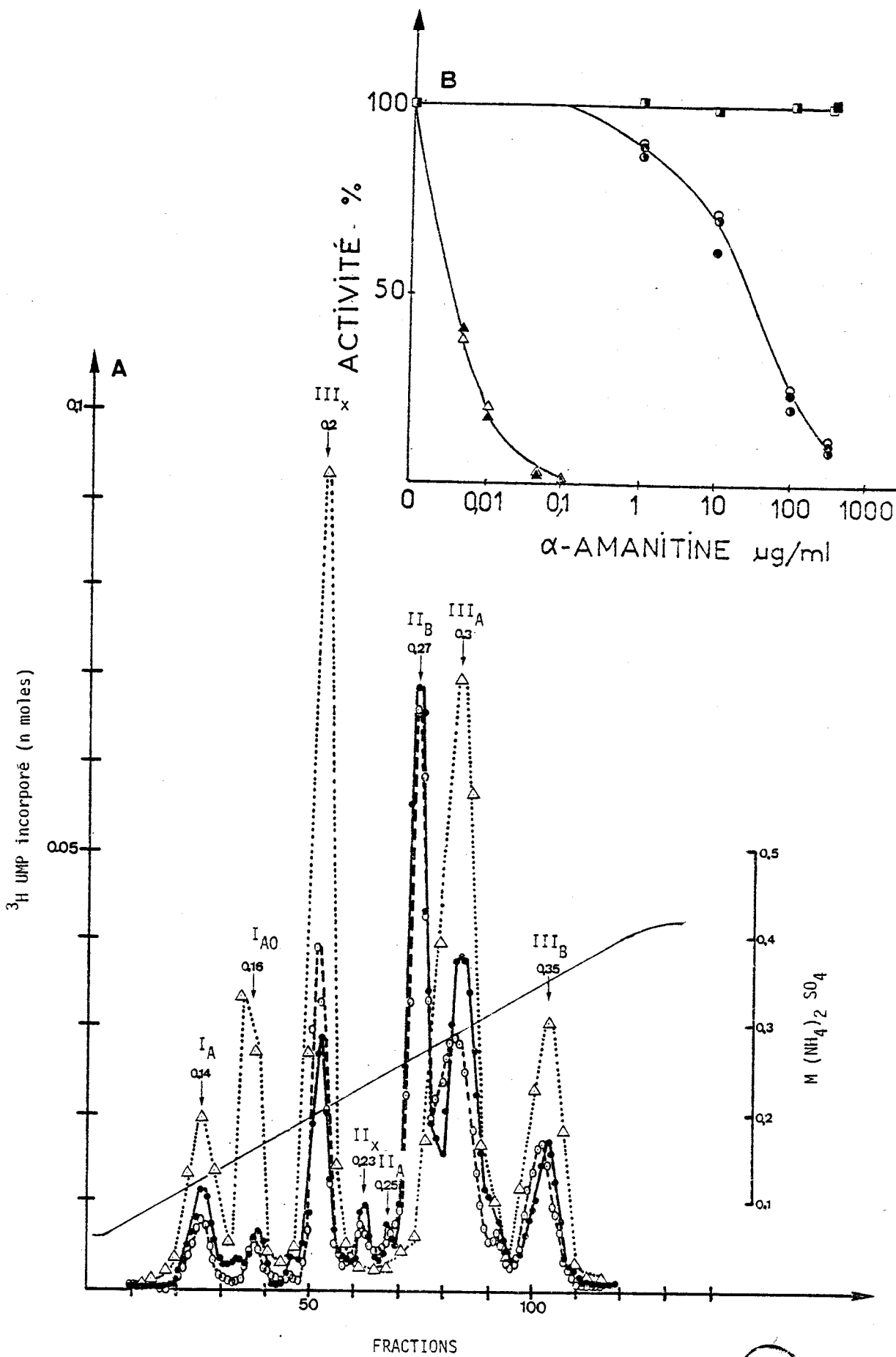


Tableau N° 5

REPARTITION DES ACTIVITES RNA POLYMERASIQUES DANS  
LES FRACTIONS CYTOPLASMIQUE ET NUCLEAIRE PREPAREES  
A L'AIDE D'UN TAMPON AQUEUX (unités enzymatiques)

	Protéines mg	I+II+III	I	II <sub>X</sub>	II <sub>A</sub>	II <sub>B</sub>	III <sub>X</sub>	III <sub>A</sub>	III <sub>B</sub>
N <sub>0</sub>	70	19905	16737	/	90	1750	/	1360	392
N <sub>20</sub>	77	21920	17887	/	272	1927	/	1390	444
C <sub>0</sub>	35	1029	80.5	88.5	20	310	154	250	126
C <sub>20</sub>	35	1074	102	32	23	321	158	318	120
N <sub>0</sub> +C <sub>0</sub>	105	20934	16817	88.5	110	2060	154	1550	518
N <sub>20</sub> +C <sub>20</sub>	112	22994	17989	32	295	2248	158	1708	564



élués à 0,14 M et 0,16 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  (fig. 18-B p. 60).

Les activités I ont été différenciées des activités II, IIIA et IIIB par leurs courbes d'inhibition par l'alpha-amanitine (fig. 18-A p. 60).

Nous avons comparé quantitativement les activités RNA polymérisiques trouvées dans les fractions nucléaires et cytoplasmiques bien que la composition en protéines des deux fractions soit différente et puisse entraîner une différence de stabilité des enzymes et donc une variation dans leur activité relative.

Lorsque l'on analyse les chiffres du tableau 5 p. 61, il apparaît que :

- a) Si la présence d'activités RNA polymérisiques dans la fraction cytoplasmique est le reflet de la fuite de matériel nucléaire durant le fractionnement cellulaire, cette fuite est très rapide et est maximale en 5 minutes, temps nécessaire pour obtenir un culot de noyaux, puisqu'il n'y a pas de différence quantitative entre  $C_0$  et  $C_{20}$ .
- b) Si les pics multiples sont dus à une protéolyse partielle d'une RNA polymérase engendrant des formes enzymatiques altérées, dans ce cas après 20 minutes à 4°C les protéases devraient avoir dégradé les RNA polymérases plus qu'à  $t = 0$  et les fractions  $N_0$  et  $N_{20}$ , et  $C_0$  et  $C_{20}$  devraient être différentes qualitativement et quantitativement. Or, il n'en est rien. On ne peut cependant exclure une activité protéolytique rapide et limitée (spécifique).
- c) Les activités cytoplasmiques ne représentent que 5 % de l'activité totale, mais 23 % des activités II + III et seulement 0,5 % des activités I. Ces résultats s'expliquent par le fait que les enzymes I sont localisées dans le nucléole (SCHWARTZ et al., 1974 (100)) et diffusent moins rapidement vers la fraction cytoplasmique que les enzymes II et III localisées dans la fraction nucléoplasmique.

Il nous est impossible de comparer nos résultats avec ceux obtenus par SCHWARTZ et al., 1974 (100), puisque dans leurs expériences, ils ont utilisé du DNA de thymus de veau (SIGMA) à une concentration trois fois supérieure à celle du DNA de KB que nous

utilisons. En conclusion, il apparaît que la quantité d'enzymes II et III exprimée en activité et non en masse, présente dans la fraction cytoplasmique, est loin d'être négligeable. Nous avons voulu vérifier les résultats publiés par SCHWARTZ et al., 1974 (100) suggérant que les enzymes IIIB étaient localisées dans la fraction cytoplasmique. Nous avons utilisé une méthode de préparation des noyaux dérivée de celle de CHAUVEAU et al., 1956 (16). Dans cette méthode les fuites de matériel nucléaire vers la fraction cytoplasmique semblent être réduites en resuspendant et homogénéisant les cellules dans du tampon hypertonique contenant des concentrations élevées en  $Mg^{++}$ .

2) Répartition des activités RNA polymérasiques dans les fractions nucléaires et cytoplasmiques obtenues par la méthode de CHAUVEAU et al., 1956 (16)

Le schéma de préparation des extraits nucléaire et cytoplasmique est décrit figure 3 page 28.

Après chromatographie de l'extrait nucléaire sur colonne de DEAE-Sephadex (fig. 19-A p. 64), les activités RNA polymérasiques éluées sont similaires à celles décrites page 59, bien que l'activité RNA polymérase IIIB ne soit pratiquement pas détectable. Dans la fraction cytoplasmique (fig. 19-B p. 64), nous avons détecté les activités I, IIIx, IIx, IIA, IIB, IIIA et IIIB. Il était tentant de conclure à la localisation cytoplasmique des enzymes IIx, IIIx et IIIB. Cependant, il fallait être sûr que ces activités étaient absentes dans la fraction nucléaire.

Nous avons poussé plus loin notre investigation et tenté d'identifier les activités enzymatiques nucléaires en utilisant leurs propriétés spécifiques (fig. 20 p. 65). Nous savions que le DNA de KB dénaturé permettrait d'améliorer la détection des enzymes II (voir page 75) et qu'à haute force ionique, en présence de DNA de KB natif et d'alpha-amanitine nous serions dans les conditions optimales de détection des activités de type RNA polymérase III (voir page 74). Des résultats de cette expérience, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- a) La RNA polymérase IIIB n'est pratiquement pas détectable dans les noyaux purifiés quelle que soit la méthode de détection utilisée, pas plus que la RNA polymérase IIx.

Figure N° 19

Séparation par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex des RNA polymérasés contenus dans les fractions nucléaires (A) et cytoplasmiques (B) préparées par la méthode de CHAUVEAU (méthode B, page 28)

Les extraits enzymatiques nucléaires (Nch, (A)) et cytoplasmique (Cch, (B)) contenant respectivement 16 mg et 90 mg de protéines ont été chromatographiés sur des colonnes de 1,1 x 20 cm (Nch) et 1,4 x 30 cm (Cch). Les RNA polymérasés ont été élués par un gradient linéaire (2 x 100 ml pour Nch et 2 x 250 ml pour Cch) de 40 à 425 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . Des fractions de 1,5 ml (Nch) et 3 ml (Cch) ont été collectées dans la BSA (0,5 mg/ml). L'activité RNA polymérasique a été recherchée dans chaque fraction.

- A -     ● -- ●     DNA de KB natif (10 µg/ml)
- B -     0 -- 0     DNA de KB natif (10 µg/ml)
- -- ●     DNA de KB natif (10 µg/ml)
- + 0,8 µg/ml d'alpha-amanitine

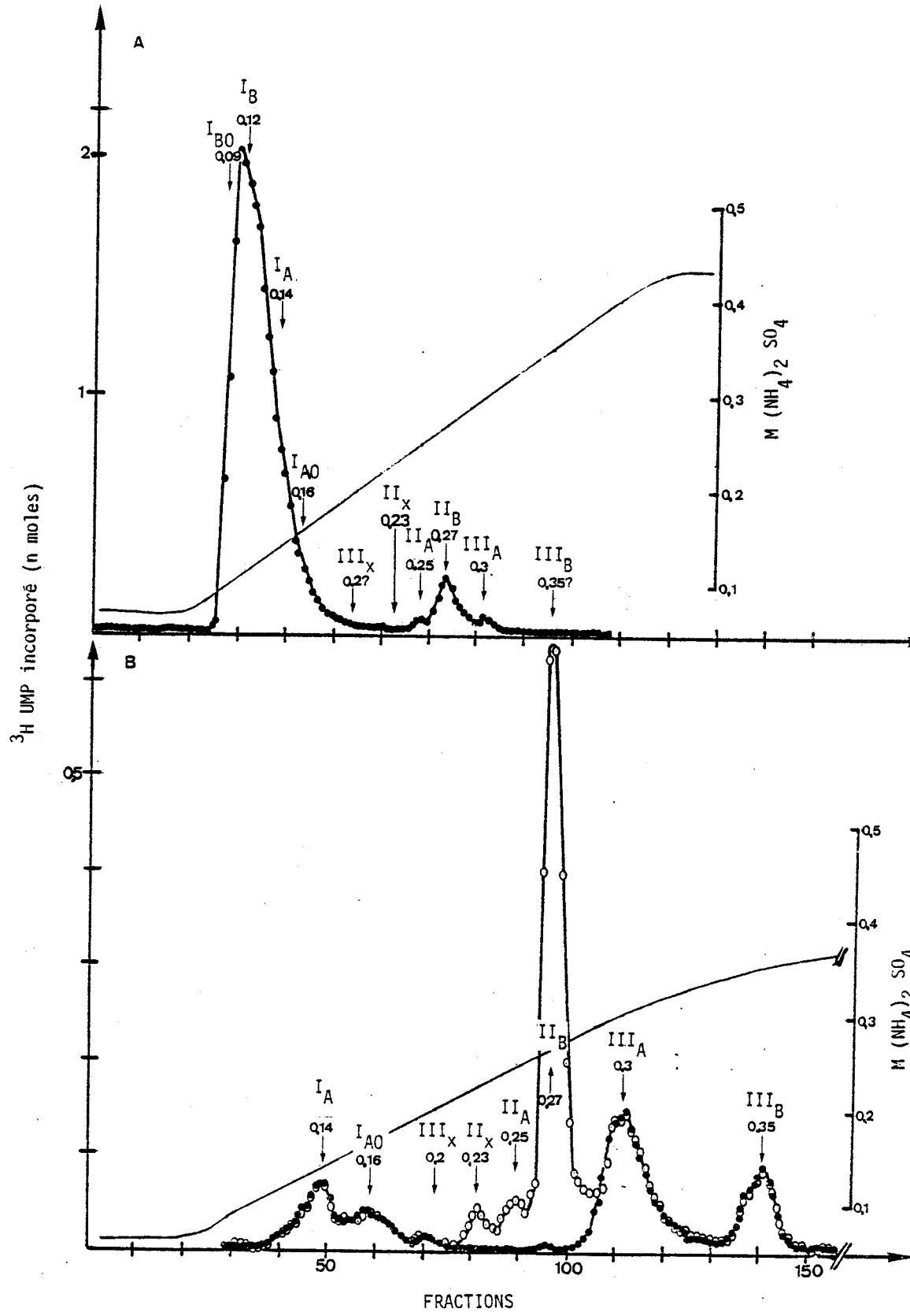


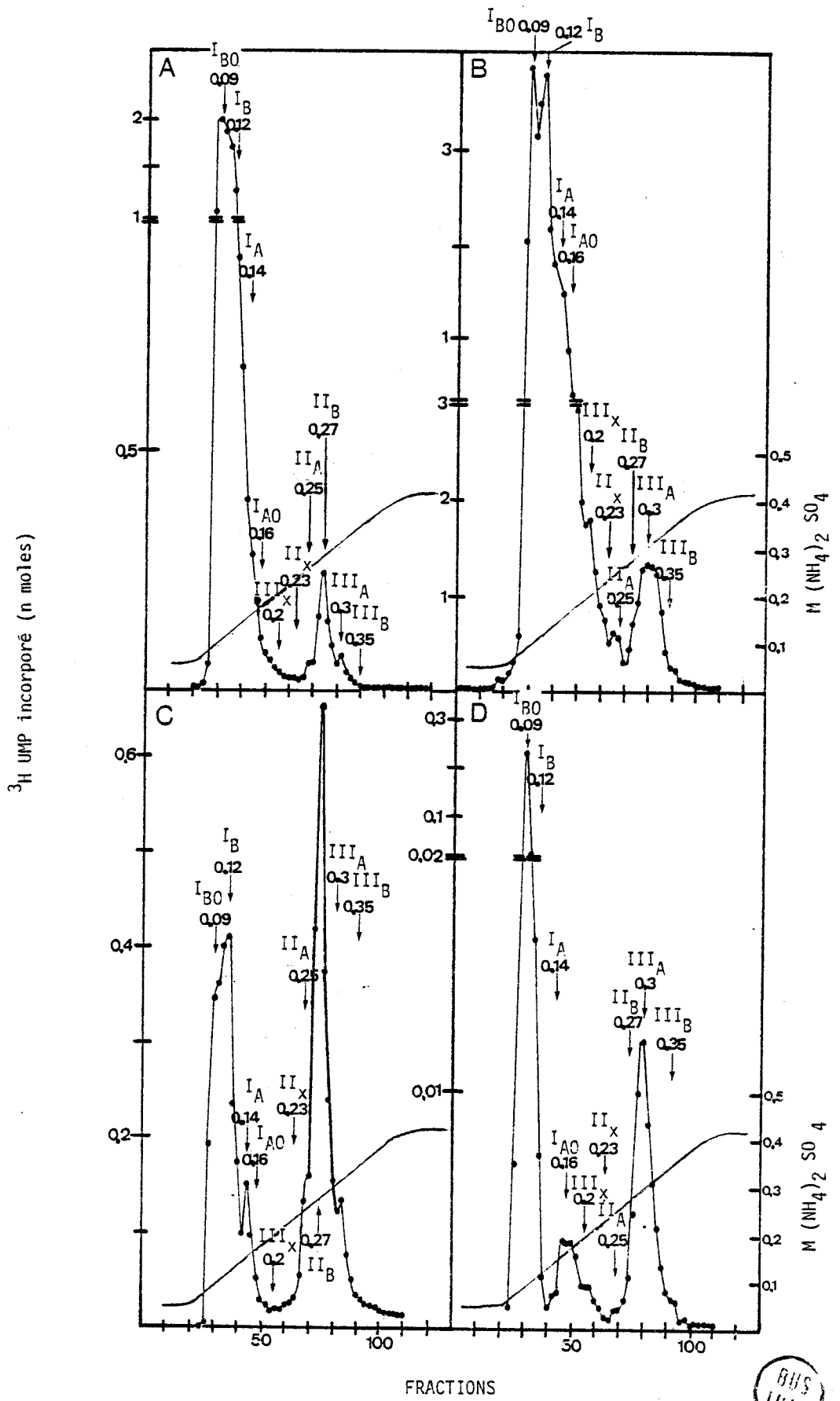


Figure N° 20

Même chromatographie que dans la figure N° 19 page 64.

L'activité RNA polymérasique a été recherchée dans chaque fraction avec les matrices DNA suivantes :

- A ●—● DNA de KB natif (10 µg/ml)
- B ●—● Poly [d(A-T)] (10 µg/ml) + 0,8 µg/ml d'alpha-amanitine
- C ●—● DNA de KB dénaturé (10 µg/ml)
- D ●—● Synthèse de RNA mesuré à haute force ionique (100 µl de chaque fraction + 50 µl de milieu réactionnel standard) en présence de DNA de KB natif (10 µg/ml) et de 0,8 µg/ml d'alpha-amanitine.



- b) Une activité discrète éluée à 0,2 M en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  est détectée dans les noyaux purifiés dans des conditions indiquant qu'il s'agit d'une activité apparentée aux enzymes III (fig. 20-D p. 65).
- c) Bien que la purification des noyaux dure environ 2 heures par la méthode que nous avons choisie, le profil d'élu-tion de la colonne de DEAE-Sephadex est similaire à celui décrit figure 17 page 59. Ce résultat écarte la possibi-lité d'action de protéases endogènes.

Nous avons quantifié ces résultats et comparé les activités RNA polymérasiques contenues dans les extraits nucléaires et cyto-plasmiques préparés à partir de la fraction cellulaire correspon-dante obtenue par la méthode de CHAUVEAU avec les résultats de l'expérience précédente (tableau 6 p. 67).

Nous avons conclu que :

- a) Le total des activités RNA polymérasiques détectées dans les deux préparations est raisonnablement comparable.
- b) La quantité de chaque activité détectée dans la fraction cytoplasmique C20 a augmenté dans la fraction Cch. Si l'on regarde la répartition des protéines dans les fractions C et N, il semble qu'une purification plus poussée des noyaux contribue à une diminution de la contamination des noyaux par du matériel cytoplasmique, comme le mon-trent aussi les contrôles de microscopie électronique (fig. 21 et 22 p. 68 et 69). Il semble que les formes solubles nucléaires migrent rapidement dans la fraction cytoplasmique et ceci quelle que soit la méthode de purification des noyaux utilisée.
- c) La présence de sucrose 2,2 M tout au long de la purifi-cation des noyaux semble stabiliser l'activité des RNA polymérasés. Ce qui expliquerait les différences quanti-tatives observées entre les deux méthodes.
- d) La méthode de préparation des noyaux ne sélectionne pas les activités retrouvées dans la fraction cytoplasmique car le pourcentage relatif des activités trouvées dans les fractions cytoplasmiques C20 et Cch est similaire (tableau 7 p. 67).

Tableau N° 6

REPARTITION DES ACTIVITES RNA POLYMERASIQUES  
DANS LES FRACTIONS CYTOPLASMIQUE ET NUCLEAIRE  
(unités enzymatiques)

	I+II+III	I	II <sub>X</sub>	II <sub>A</sub>	II <sub>B</sub>	III <sub>X</sub>	III <sub>A</sub>	III <sub>B</sub>	Protéines (mg)
N <sub>20</sub>	21920	17887	/	272	1927	/	1390	444	77
C <sub>20</sub>	1074	102	32	23	321	158	318	120	35
N <sub>20</sub> +C <sub>20</sub>	22994	17989	32	295	2248	158	1708	564	112
N <sub>ch</sub>	24044	21960	/	310	1387	/	538	51	16
C <sub>ch</sub>	7315	970	194	323	3310	114	1640	787	90
N <sub>ch</sub> +C <sub>ch</sub>	31359	22930	194	633	4673	114	2178	838	106

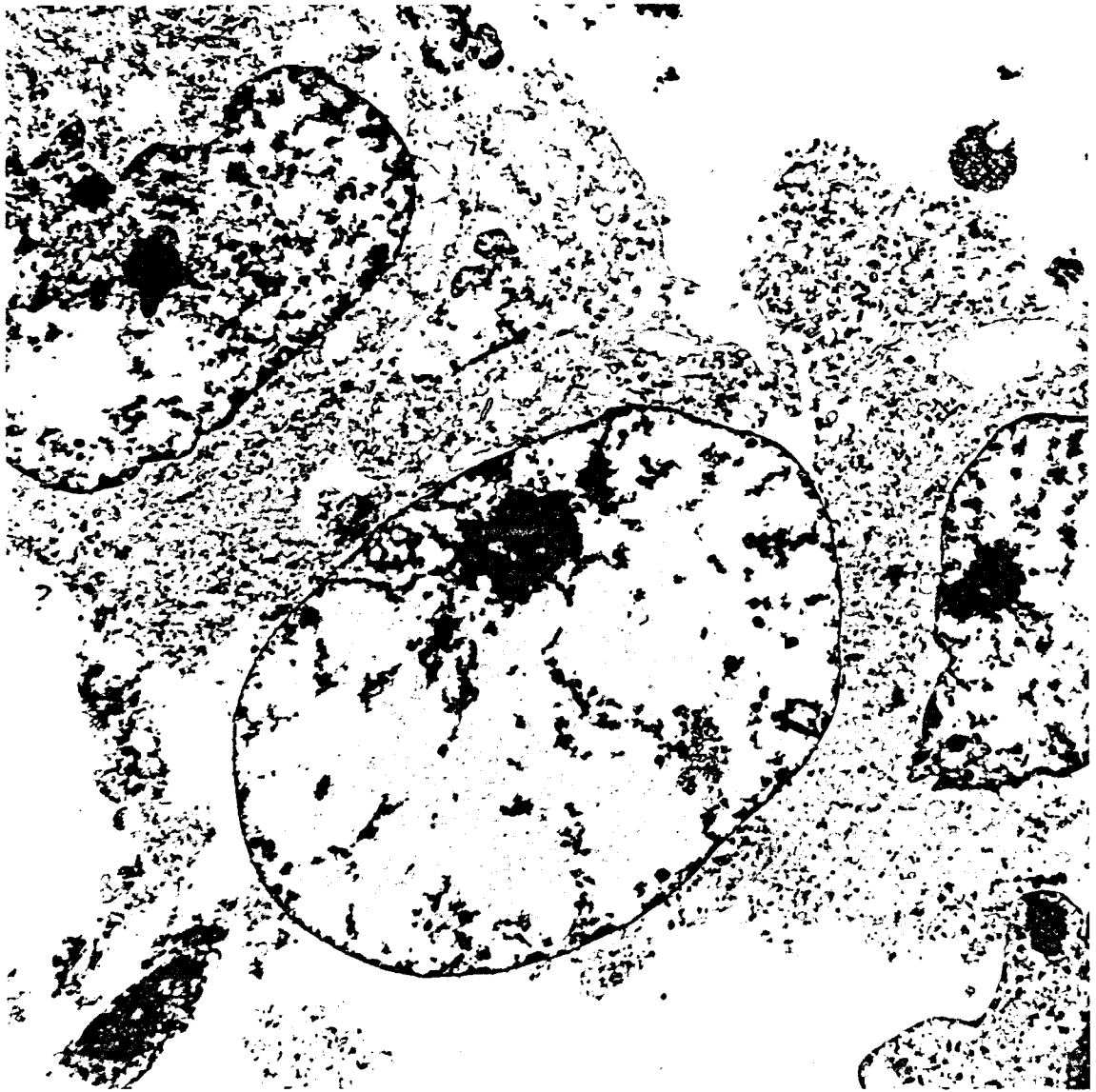
Tableau N° 7

QUANTITE RELATIVE DES ACTIVITES RNA POLYMERASIQUES  
DANS LES FRACTIONS C<sub>20</sub> ET C<sub>ch</sub>

	I <sub>A</sub>	I <sub>A0</sub>	II <sub>X</sub>	II <sub>A</sub>	II <sub>B</sub>	III <sub>X</sub>	III <sub>A</sub>	III <sub>B</sub>	Total
C <sub>20</sub>	76	26	32	23	321	158	318	120	1074
	7%	2.4%	2.9%	2.1%	29.9%	14.7%	29.6%	11.1%	100%
C <sub>ch</sub>	730	240	194	323	3310	114	1640	787	7338
	9.9%	3.2%	2.6%	4.4%	45.1%	1.55%	22.3%	10.7%	100%

Figure N° 21

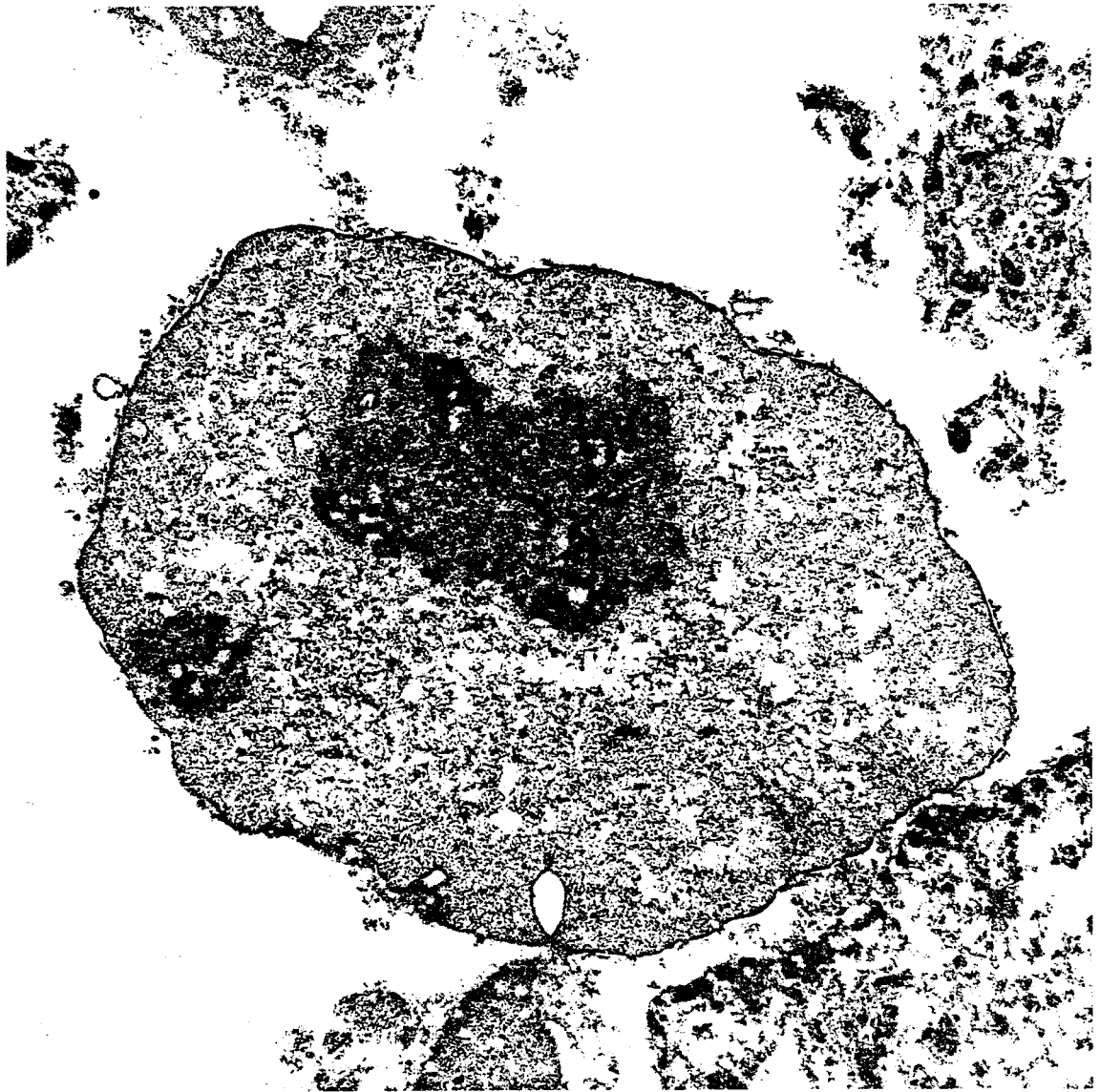
Observation en microscopie électronique  
de noyaux préparés par la méthode du TMMT  
(tampon aqueux)



RUS  
LILLE

Figure N° 22

Observation en microscopie électronique  
de noyaux préparés par la méthode de  
CHAUVEAU



BUS  
LILLÉ



Nous avons voulu apporter une preuve que les activités RNA polymérasiques présentes dans la fraction cytoplasmique étaient des formes solubles. Nous avons préparé les noyaux par la méthode de CHAUVEAU et appliqué le surnageant nucléaire directement sur colonne de DEAE-Sephadex (fig. 23 p. 71). Les résultats que nous avons obtenus montrent clairement que les formes enzymatiques "cytoplasmiques" peuvent être solubilisées sans traitement par les ultrasons à haute force ionique.

Il est difficile de conclure si des formes enzymatiques sont localisées ou non dans la fraction cytoplasmique. Cependant étant donné la fuite importante des activités II et III dans la fraction cytoplasmique, il faut préparer les extraits enzymatiques à partir des cellules entières.

Ayant établi que les conditions les plus favorables pour séparer et détecter les activités RNA polymérasiques connues sont la chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex de l'extrait enzymatique préparé à partir des cellules entières, nous avons examiné les enzymes des cellules infectées.

### C - RNA POLYMERASES DES CELLULES INFECTÉES

Nous savions que les RNA polymérases I pouvaient masquer des activités mineures (voir fig. 20 p. 65) et que les enzymes I ne semblaient pas impliquées dans la transcription des gènes viraux (WALLACE et KATES, 1972 (123) WEINMANN, RASKAS et ROEDER, 1975 (129)). Nous avons décidé de nous débarrasser de la majorité des enzymes I par chromatographie sur phosphocellulose et d'examiner par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex, les enzymes éluées dans le premier pic de la phosphocellulose.

Nous avons préparé des extraits enzymatiques à partir d'aliquotes d'une culture de cellules KB infectées par l'adéno-virus 2, prélevées à la troisième heure et à la dix-huitième heure du cycle lytique. Nous avons vérifié que l'infection avait été effective en évaluant la production de particules virales infectieuses à la trentième heure du cycle lytique.

Les profils d'éluion des colonnes de phosphocellulose et de DEAE-Sephadex sont présentés dans la fig. 24 p. 72. Les profils d'éluion sont identiques en considérant le nombre de pics d'activit

Figure N° 23

Séparation par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex des RNA polymérasés contenus dans la fraction cytoplasmique (Méthode de CHAUVEAU) non traitée aux ultrasons (Cch). (voir B page 28).

L'extrait enzymatique contenant 58 mg de protéines a été chromatographié sur une colonne de 1,4 x 30 cm.

Les RNA polymérasés ont été élués par un gradient linéaire (2 x 250 ml) de 40 à 425 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  dans TGED.

Des fractions de 3 ml ont été recueillies dans la BSA (0,5 mg/ml).

L'activité RNA polymérasique a été recherchée dans chaque fraction en utilisant la matrice DNA suivante :

- O—O      DNA de KB natif (10 µg/ml)
- DNA de KB natif (10 µg/ml)  
          + 0,8 µg/ml d'alpha-amanitine

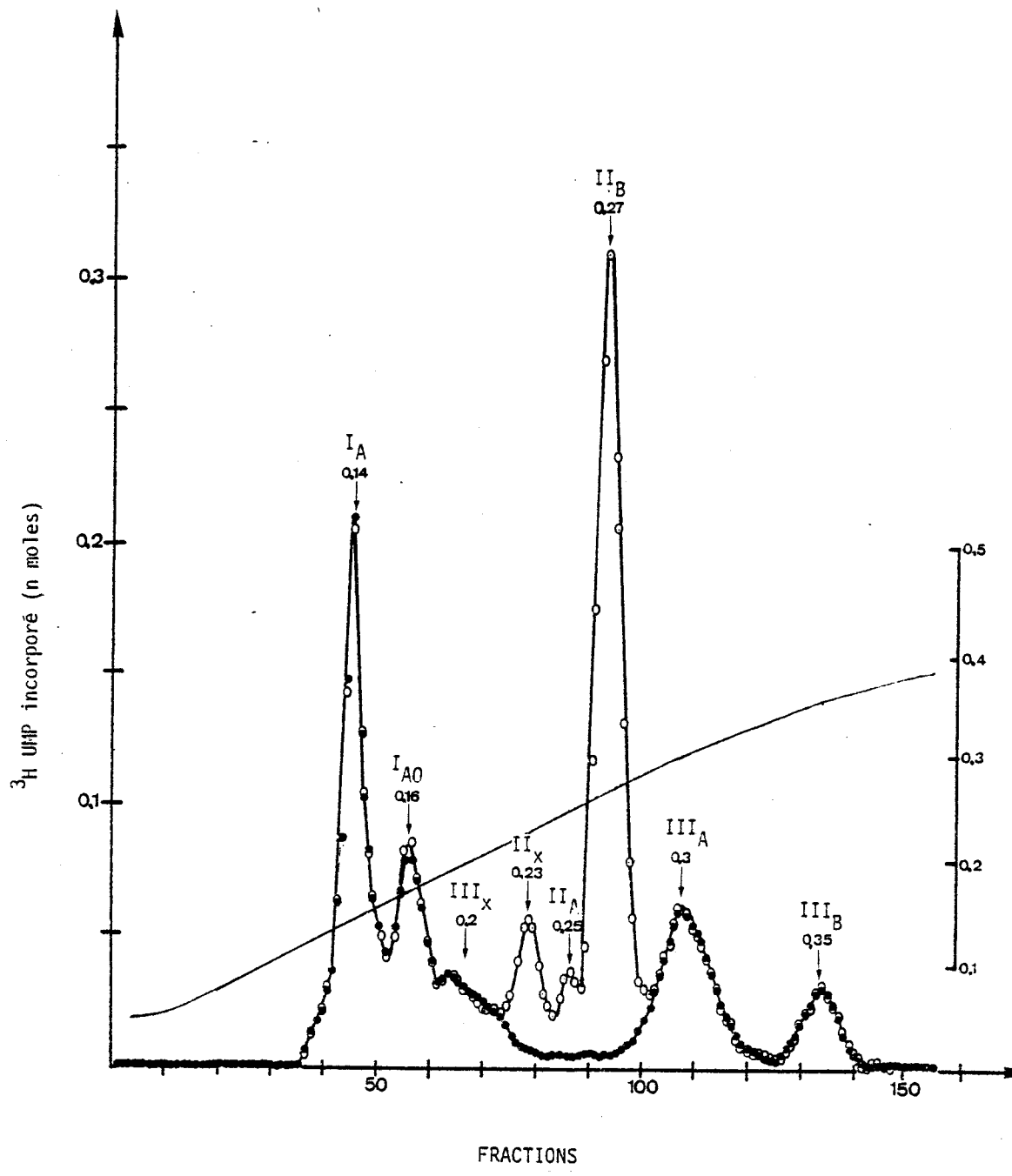


Figure N° 24

Caractérisation chromatographique des RNA polymérasés des cellules KB infectées par l'adénovirus 2.

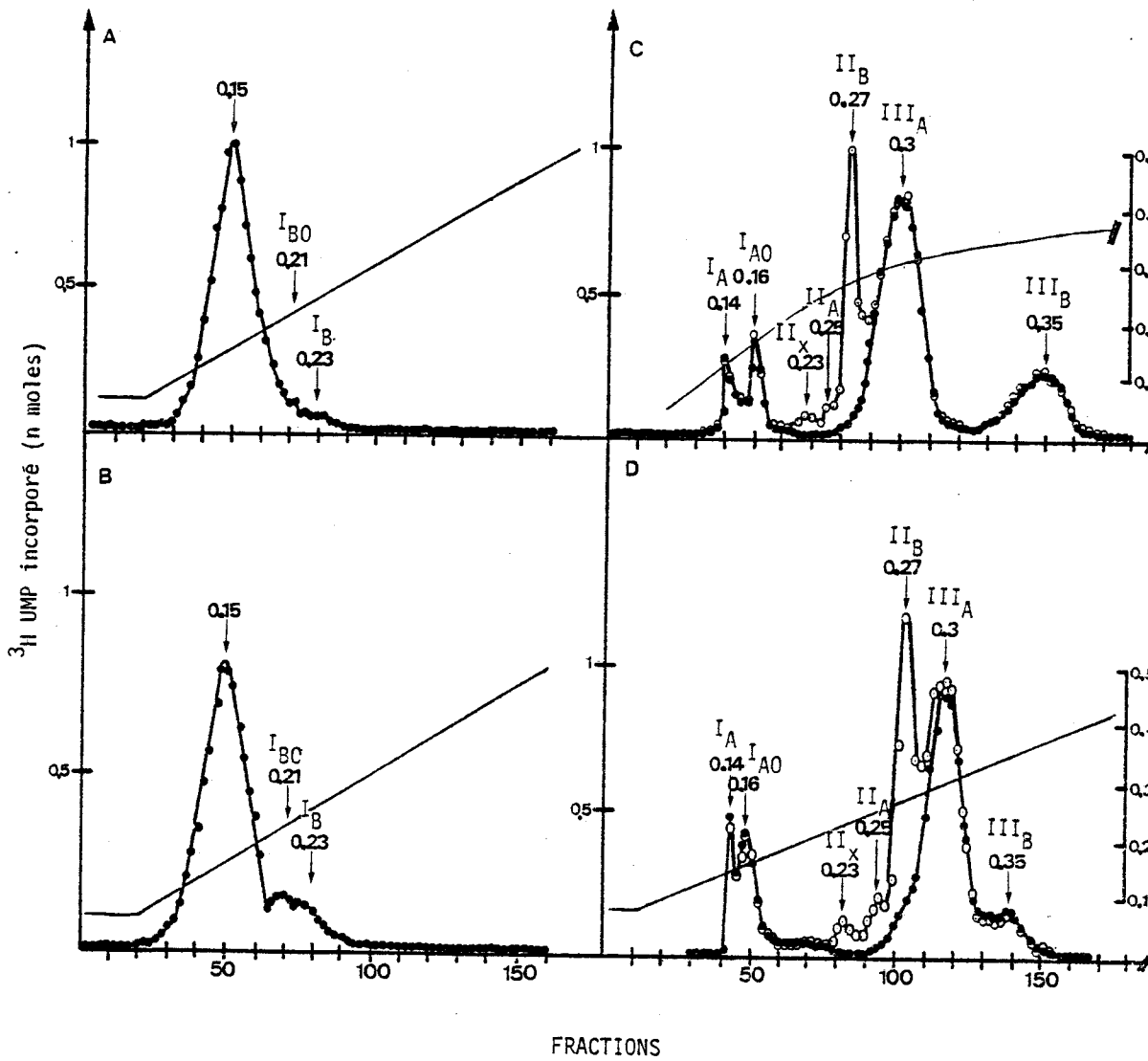
Les extraits enzymatiques ont été préparés par la méthode C page 28.

A - B : Les extraits cellulaires préparés 3 h (A) et 18 h (B) après le début de l'infection à partir de  $15 \times 10^8$  cellules contiennent respectivement 180 mg et 300 mg de protéines. Les extraits enzymatiques ont été chromatographiés sur des colonnes de phosphocellulose WPI, de 100 ml et 150 ml respectivement. Les RNA polymérasés ont été élués par des gradients linéaires (40 à 500 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  dans TGED) de 1 l et 1,5 l respectivement. Des fractions de 6,26 ml et 9 ml ont été recueillies dans la DSA (0,5 mg/ml). L'activité RNA polymérasique a été recherchée dans chaque fraction en utilisant le DNA de KB natif (10  $\mu\text{g/ml}$ ) dans les conditions ioniques optimales pour l'activité des enzymes II et III.

C - D : Les fractions actives 30 à 60 de la colonne de phosphocellulose ont été chromatographiées sur des colonnes de DEAE-Sephadex A-25 de 100 ml. Les RNA polymérasés ont été élués par des gradients linéaires (2 x 470 ml) de 40 à 425 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  dans TGED. Des fractions de 4,5 ml ont été recueillies dans la BSA (0,5 mg/ml). L'activité RNA polymérasique a été recherchée dans chaque fraction en utilisant le DNA de KB (10  $\mu\text{g/ml}$ ) avec ●—● ou sans ○—○ alpha-amanitine 0,8  $\mu\text{g/ml}$ .

C : 3 h P.I.

D : 18 h P.I.



la force ionique à laquelle ils sont élués et leur sensibilité à l'alpha-amanitine. Nous ne pouvions cependant pas écarter la possibilité d'une activité RNA polymérasique préexistante soit modifiée lors de l'infection ou qu'une RNA polymérase virale soit codée par les gènes précoces. De telles enzymes peuvent avoir une spécificité absolue par le DNA viral ou des propriétés catalytiques modifiées. Or, rechercher l'activité RNA polymérasique dans les fractions éluées des colonnes en utilisant le DNA d'Adénovirus 2, nécessite de connaître les conditions ioniques requises pour la transcription du DNA viral in vitro. Connaissant ces paramètres, l'analyse de la spécificité de transcription du DNA d'Adénovirus 2 par les RNA polymérases isolées de cellules infectées et non infectées permettrait aussi de répondre aux questions posées ci-dessus.

D - EFFET DE LA FORCE IONIQUE ET DES CATIONS DIVALENTS  
SUR LA TRANSCRIPTION DU DNA D'ADENOVIRUS 2 PAR LES  
RNA POLYMERASES I, II ET III DES CELLULES KB  
INFECTEES OU NON PAR L'ADENOVIRUS 2

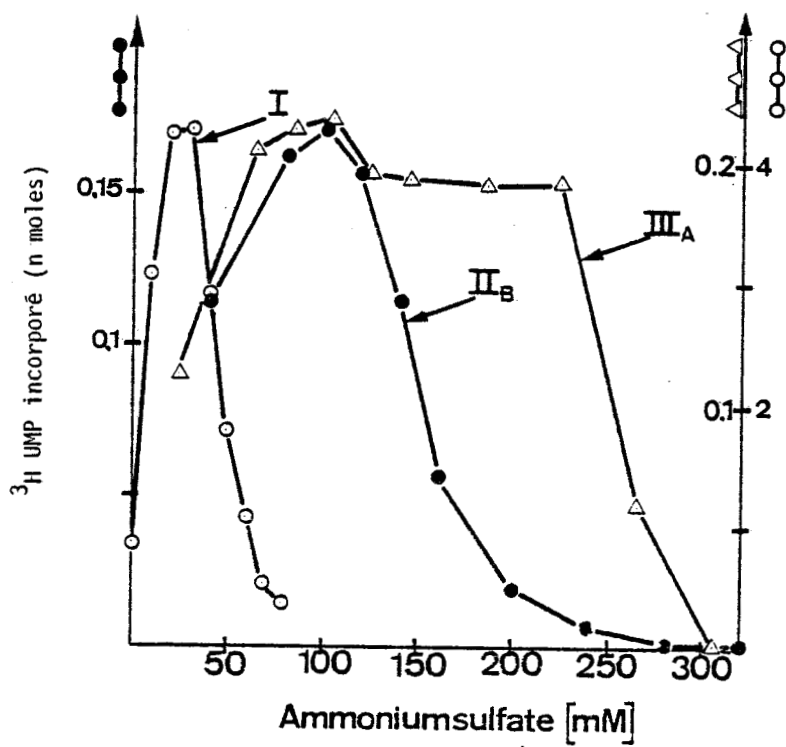
Une partie de ce travail a été publiée dans ARCHIVES OF VIROLOGY, 1974, 45, p. 294-297.

1 - CELLULES NON INFECTEES

ROEDER et RUTTER, 1969 (92) et CHAMBON et al., 1970 (14) avaient déjà montré que les enzymes I, II et III pouvaient être distinguées par leur courbe d'activité en fonction de concentrations croissantes en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . Nous avons obtenu des résultats similaires avec les activités I, II et III isolées après chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex (fig. 25 p. 74), en utilisant le DNA de KB natif comme matrice dans la réaction in vitro. Les enzymes I, II et III décrites par ROEDER et RUTTER, 1969 (92), différaient encore par leur activité en présence de DNA natif ou dénaturé. Les RNA polymérases nucléaires des cellules KB DEAE-Sephadex se différencient aussi par leur activité en présence de DNA de KB natif et dénaturé (fig. 26-A, B et C p. 75).

Les optima de force ionique restent identiques mais le taux d'activité des enzymes diffère selon la matrice utilisée. Les enzymes II transcrivent préférentiellement le DNA dénaturé quelque soit la force ionique. Par contre les enzymes I et III transcrivent mieux le DNA natif.

Figure N° 25



## Figure N° 26

Effet de la concentration en sulfate d'ammonium sur l'activité des RNA polymérases des cellules KB.

Les RNA polymérases ont été partiellement purifiées à partir d'un extrait enzymatique nucléaire (TMMT, méthode A page 28), chromatographié sur colonne de DEAE-Sephadex.

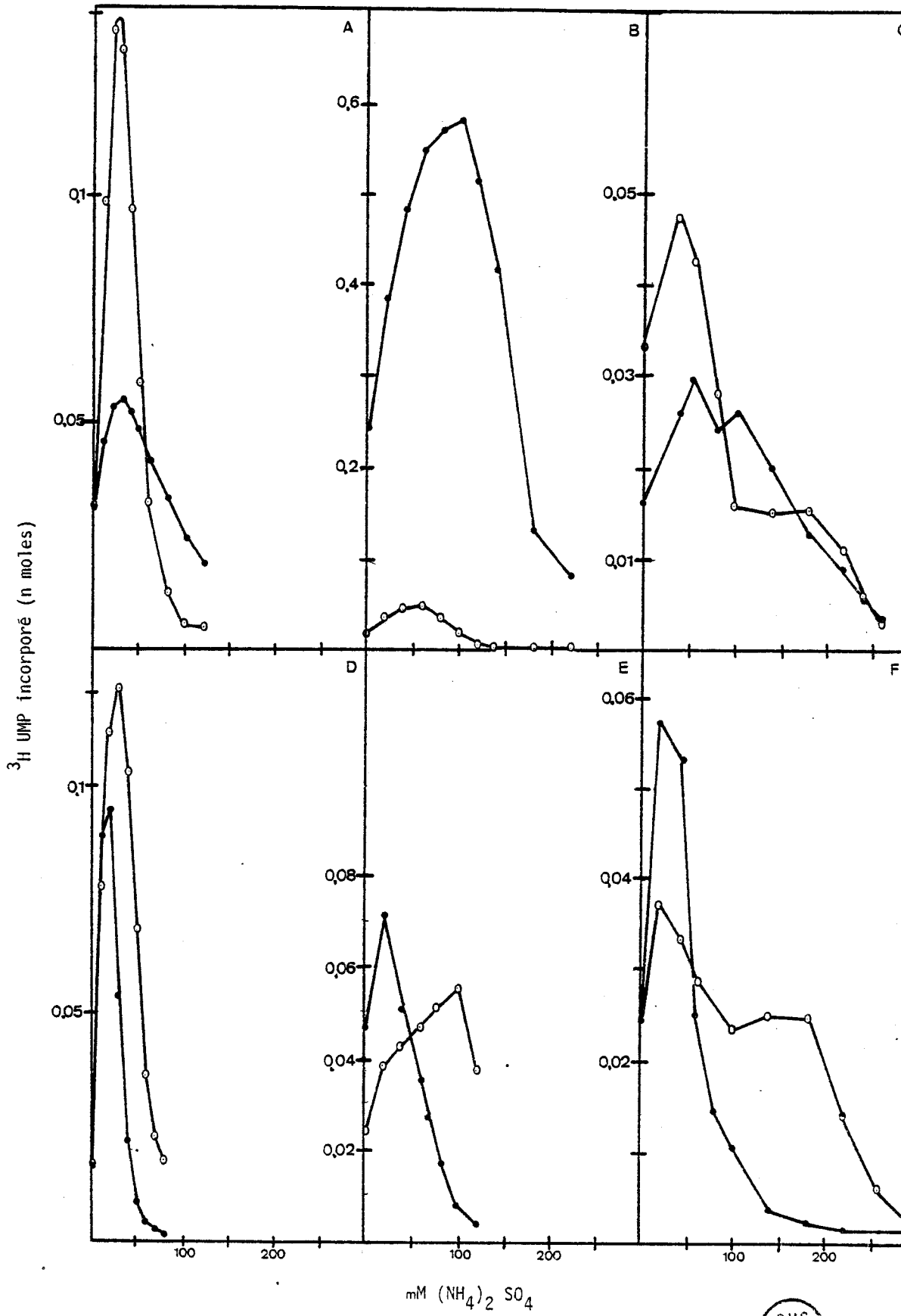
L'activité des RNA polymérases I ( $I_{AO} + I_A + I_{BO} + I_B$ ) (figure 26-A),  $II_B$  (figure 26-B) et  $III_A$  (figure 26-C) a été mesurée en présence des matrices suivantes :

- DNA de KB natif (10 µg/ml)
- DNA de KB dénaturé (10 µg/ml)

L'activité des RNA polymérases I ( $I_{AO} + I_A + I_{BO} + I_B$ ) (figure 26-D),  $II_B$  (figure 26-E) et  $III_A$  (figure 26-F) a été mesurée en présence des matrices suivantes :

- DNA de KB natif (10 µg/ml)
- DNA d'adénovirus 2 natif (10 µg/ml)





BUS  
LILLE

En présence de DNA d'adénovirus 2 natif, il devient impossible de distinguer les activités I, II et III par leur optimum de force ionique, l'activité des trois enzymes étant optimale à une force ionique de 15 à 20 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , et rapidement inhibée par des forces ioniques supérieures à 50 mM (fig. 26-D, E et F p. 75 et fig. 27-Ba p. 77).

Ce qui différencie le DNA viral et le DNA cellulaire c'est le fait que le DNA viral analysé en gradients de saccharose neutre et alcalin se révèle double brin intact (fig. 27-B p. 77) alors que le DNA cellulaire possède des coupures monocaténares ou des brèches (fig. 27-A p. 77). D'autre part nous savions que les spectres d'activité des enzymes I, II et III restent similaires, que l'on utilise le DNA cellulaire natif ou dénaturé (fig. 26 p. 75). Dès lors, il était facile de relier la modification de l'optimum d'activité et la présence de coupures monocaténares ou de régions partiellement dénaturées dans le DNA. Il nous fallait cependant démontrer directement que les deux phénomènes sont liés. D'abord en introduisant des coupures monocaténares dans le DNA viral, nous devrions voir s'élargir le spectre d'activité des enzymes II et III vers des forces ioniques supérieures à 50 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . Nous avons donc utilisé comme matrice in vitro, du DNA d'adénovirus 2 rendu radioactif par l'incorporation de  $^{32}\text{P}$ . Après une semaine, l'analyse de ce DNA par centrifugation en gradient linéaire de sucrose neutre et alcalin démontre la présence de nombreuses coupures (fig. 27-C p. 77). Comme supposé, un tel DNA est transcrit à des forces ioniques plus élevées, 40 à 80 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  pour les enzymes II et jusque 180 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  pour les enzymes III (fig. 27-Cb p. 77).

Comme l'avaient montré GNIAZDOWSKI et al., 1970 (37) et GISSINGER et al., 1974 (35), la synthèse des chaînes de RNA peut démarrer préférentiellement au niveau de zones dénaturées ou de coupures monocaténares sur le DNA, et le démarrage de la synthèse du RNA est beaucoup plus sensible à une augmentation de la force ionique que l'allongement des chaînes de RNA. En considérant l'extrême sensibilité de l'activité des enzymes I, II et III à une augmentation de la force ionique en présence de DNA d'adénovirus 2 et l'élargissement du spectre d'activité des enzymes II + III transcrivant un DNA contenant des coupures monocaténares ( $^{32}\text{P}$ -Ad2 DNA et DNA natif de KB), nous avons conclu qu'en présence d'un DNA bicaténaire intact, les enzymes I, II et III ne pouvaient

Figure N° 27

A - B - C : Analyse du DNA cellulaire (A), du DNA d'Adénovirus 2 (B) et du DNA d'Adénovirus 2 marqué au  $^{32}\text{P}$  (C) par centrifugation en gradient de sucrose neutre et alcalin. Les conditions de centrifugation sont les suivantes :

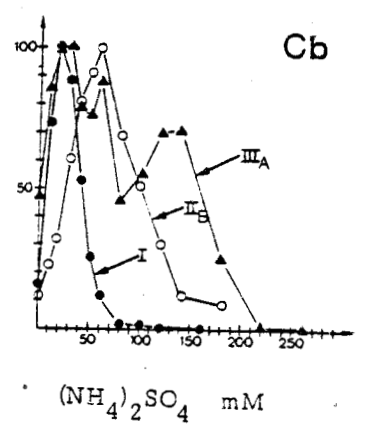
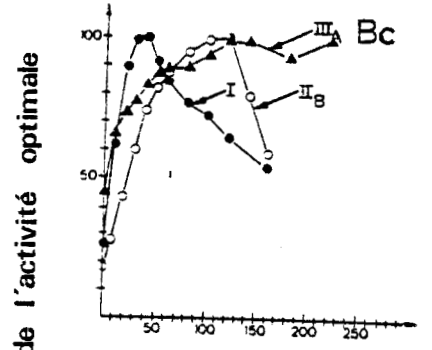
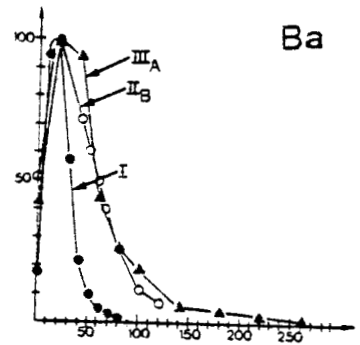
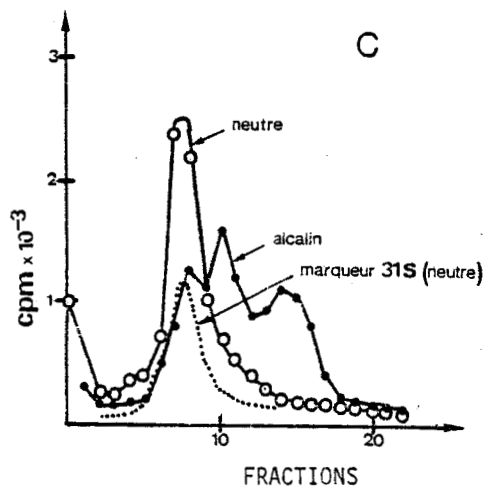
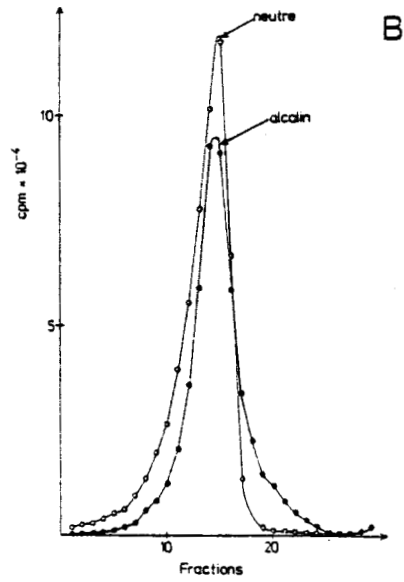
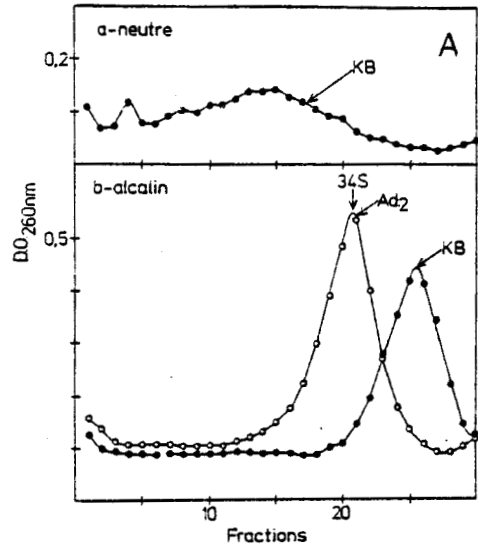
Gradients linéaires de saccharose de 5 à 20 %

- neutre	Tris	0,01 M pH 7,5
	NaCl	1 M
	EDTA	0,1 %
	Sarcosinate	0,1 %
- alcalin	NaOH	0,2 M
	NaCl	0,8 M
	EDTA	1 mM
	Sarcosinate	0,1 %

150 minutes à 40 000 rpm et 20°C  
(dans le rotor SW 50)

Ba - Bc - Cb : Activité des RNA polymérases en présence de DNA d'Adénovirus 2 natif (10 µg/ml) (Ba), de DNA d'Adénovirus 2 dénaturé (10 µg/ml) (Bc) et du DNA d'Adénovirus 2 marqué au  $^{32}\text{P}$  (10 µg/ml) (Cb).

$$I = I_{AO} + I_A + I_{BO} + I_B$$



initier, la polymérisation des ribonucléosides 5'-triphosphates in vitro qu'à basse force ionique, conditions favorables à la déstabilisation partielle de la double hélice de DNA. L'activité des enzymes à une force ionique supérieure à 30 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  indiquait la présence et l'utilisation préférentielle de coupures monocaténares, de brèches ou de régions partiellement dénaturées. La preuve ultime était d'utiliser le DNA d'adénovirus 2 dénaturé et de montrer que l'activité des enzymes I, II et III n'était plus inhibée par des concentrations en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  supérieures à 30 mM. Les résultats de cette expérience sont décrits dans la figure 27-Bc page 77, et confirment cette hypothèse. Il apparaît que dans nos conditions expérimentales, les enzymes I, II et III peuvent initier la synthèse des RNA in vitro sur un DNA bicaténaire intact. Les valeurs obtenues sont en général plus faibles que celles obtenues avec un DNA contenant des coupures monocaténares, bien que les enzymes III semblent utiliser aussi bien les régions intactes que les coupures monocaténares. Ce que l'on peut conclure, c'est d'abord que l'inhibition de l'activité d'une RNA polymérase par une augmentation de la force ionique correspondant à des concentrations en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  supérieures à 30 mM suggère que l'enzyme considérée démarre la synthèse des RNA préférentiellement sur les régions bicaténares de la matrice DNA ou par voie de conséquence que le DNA est bicaténaire intact. Ensuite, cela constitue un bon paramètre pour déterminer si l'enzyme utilisée est contaminée par des endonucléases susceptibles d'introduire des coupures monocaténares ou des brèches dans la matrice DNA lors de la réaction in vitro. Enfin, la transcription d'un DNA à des forces ioniques supérieures à 30 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  indique que l'initiation de la transcription se fait alors sur les régions du DNA dont la structure est altérée.

Cependant, il faut noter qu'aucune des trois enzymes ne peut transcrire le DNA d'adénovirus 2 ou cellulaire natif in vitro en absence de  $\text{Mn}^{++}$  (fig. 28 p. 79) à une force ionique de 20 mM. De plus, la concentration en  $\text{Mn}^{++}$  requise pour l'activité optimale des RNA polymérases I et II transcrivant le DNA viral natif est supérieure à celle nécessaire lorsqu'on substitue le DNA cellulaire natif au DNA viral (tableau 8 p. 80). Sachant que le  $\text{Mn}^{++}$  se fixe préférentiellement sur les paires de bases G-C, provoquant une baisse de la température de fusion de ce DNA. Cet effet est compensé par une augmentation de la force ionique (LUCK et ZIMMER, 1972 (65))

Figure N° 28

Effet de la concentration en cations divalents sur la transcription de différents DNA par les RNA polymérases nucléaires isolées par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex.

DNA	Mg <sup>++</sup>	Mn <sup>++</sup>
KB natif (10 µg/ml)	△—△	○—○
Ad <sub>2</sub> natif (10 µg/ml)	▲—▲	●—●

A - Enzymes I (I<sub>AO</sub> + I<sub>A</sub> + I<sub>BO</sub> + I<sub>B</sub>)

B - Enzyme II<sub>B</sub>

C - Enzyme III<sub>A</sub>

(des résultats identiques ont été obtenus avec les enzymes III<sub>B</sub>)

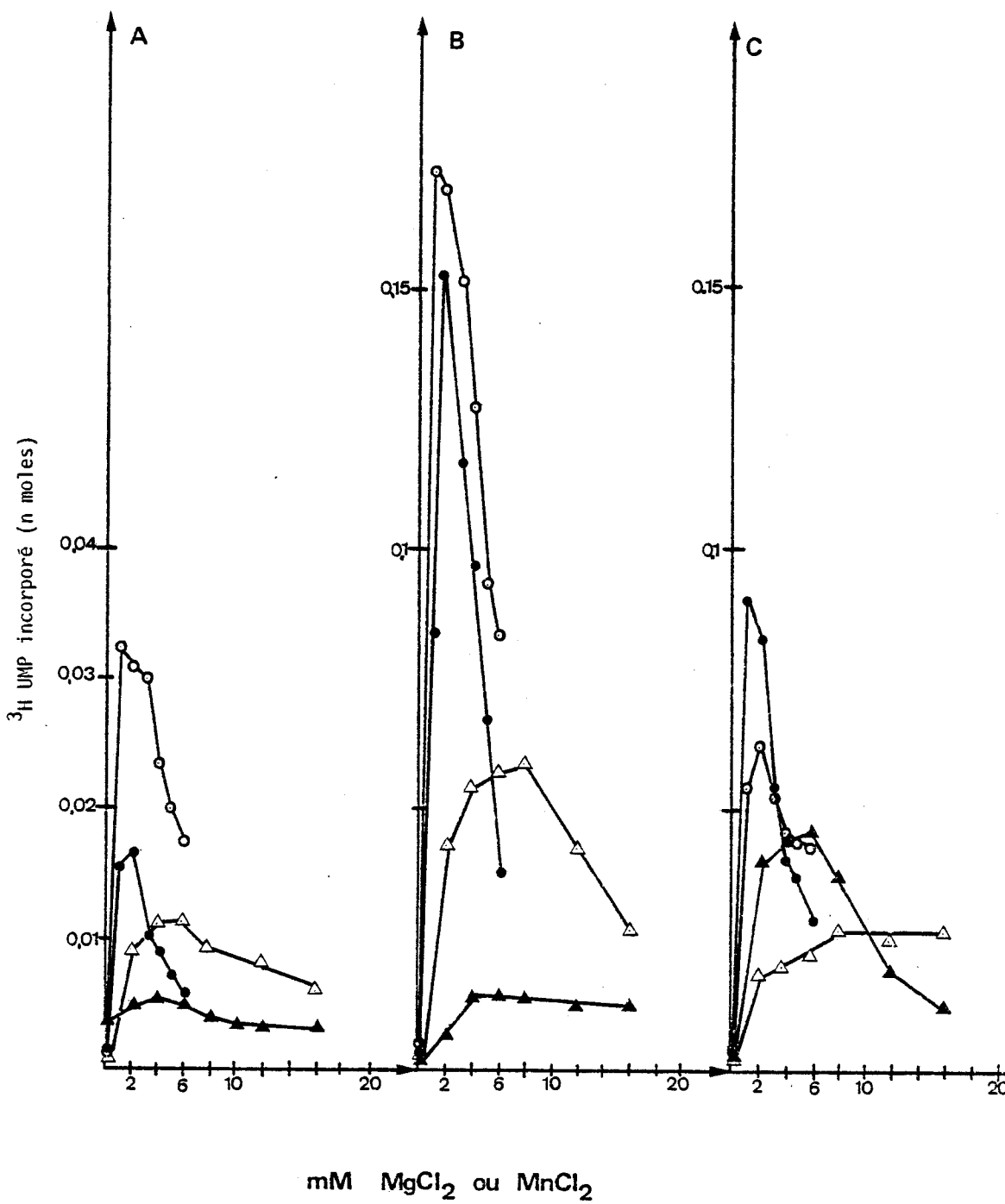


Tableau N° 8

EFFET DES CATIONS DIVALENTS SUR LA SYNTHÈSE  
DES RNA CATALYSÉE PAR LES RNA POLYMERASES DES  
CELLULES KB EN PRÉSENCE DE DNA DE KB ET  
D'ADENOVIRUS 2

Enzyme	DNA		1mM Mn <sup>++</sup>	2mM Mn <sup>++</sup>	3mM Mn <sup>++</sup>	4mM Mn <sup>++</sup>
			p.Moles	p.Moles	p.Moles	p.Moles
I (I <sub>BO</sub> I <sub>B</sub> I <sub>AO</sub> I <sub>A</sub> )	KB <sub>N</sub>	10ug/ml	32.2	31	30	23.7
	Ad <sub>N</sub>	10ug/ml	15.6	16.3	10.7	9.1
II <sub>B</sub>	KB <sub>N</sub>	10ug/ml	172	169	151	127
	Ad <sub>N</sub>	10ug/ml	84	153	116	118
III <sub>A</sub>	KB <sub>N</sub>	10ug/ml	54.4	62.3	52	47
	Ad <sub>N</sub>	10ug/ml	90	83	54	40
III <sub>B</sub>	KB <sub>N</sub>	10ug/ml	6	12	9	6
	Ad <sub>N</sub>	10ug/ml	7	10	15	80

La concentration des matrices DNA utilisées  
dans cette expérience est en excès





L'action du manganèse à basse force ionique est probablement due à une déstabilisation partielle locale du DNA bicaténaire au niveau des paires de base G-C, permettant la fixation des enzymes I, II et III et l'initiation de la synthèse des RNA in vitro. Cet effet est rapidement compensé par une augmentation de la force ionique. Il est particulièrement net avec un DNA bicaténaire intact comme le DNA d'adénovirus 2, mais dans le cas d'un DNA contenant des régions dont la structure est altérée, cet effet est masqué par les initiations non inhibées à haute force ionique. Dire que les enzymes eucaryotes peuvent initier la synthèse de RNA in vitro sur des régions bicaténaires de la matrice DNA signifie peut être que les enzymes eucaryotes ne peuvent démarrer la synthèse des RNA que s'il existe dans le DNA des régions désappariées produites de manière artificielle à basse force ionique en présence de manganèse, ces régions servant de signal de reconnaissance pour la fixation de l'enzyme.

Il était possible de comparer les propriétés catalytiques des enzymes isolées de cellules KB infectées par l'adénovirus 2 avec les propriétés catalytiques des enzymes isolées des cellules KB

## 2 - CELLULES INFECTEES

Les résultats présentés dans la figure 29 page 82 et le tableau 9 page 83 montrent que les enzymes isolées des cellules infectées ne peuvent être différenciées des RNA polymérases isolées de cellules KB non infectées. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par HOSSENLOP et al., 1975 (46) et WEINMANN et al., 1976 (130).

## 3 - CAS PARTICULIER DES ENZYMES I

Tout au long de cette investigation, nous avons été frappé par le comportement particulier des enzymes I. Ces enzymes ont un optimum de fonctionnement in vitro aux environs de 30 mM en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , que le DNA utilisé soit bicaténaire intact (Ad2) ou structurellement altéré (KB). Sauf dans le cas de DNA dénaturé, l'activité des enzymes I est également rapidement inhibée par une augmentation de la force ionique. Ces résultats indiquent que ces enzymes démarrent préférentiellement la synthèse des RNA in vitro sur les régions bicaténaires intactes du DNA et nous ont amené à étudier plus attentivement ces enzymes.

Figure N° 29

Effet de la concentration en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  et en cations divalents ( $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ) sur la transcription de différents DNA par les enzymes isolées des noyaux de cellules infectées (18 h P.I.) et partiellement purifiées par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex.

DNA	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ A-C-E	$\text{Mg}^{++}$ B-D-F	$\text{Mn}^{++}$ B-D-F
KB natif (10 ug/ml)	○ — ○	△ — △	○ — ○
Ad <sub>2</sub> natif (10 ug/ml)	● — ●	▲ — ▲	● — ●

A-B Enzymes I ( $I_{AO} + I_A + I_{BO} + I_B$ )

C-D Enzymes II<sub>B</sub>

E-F Enzymes III<sub>A</sub>

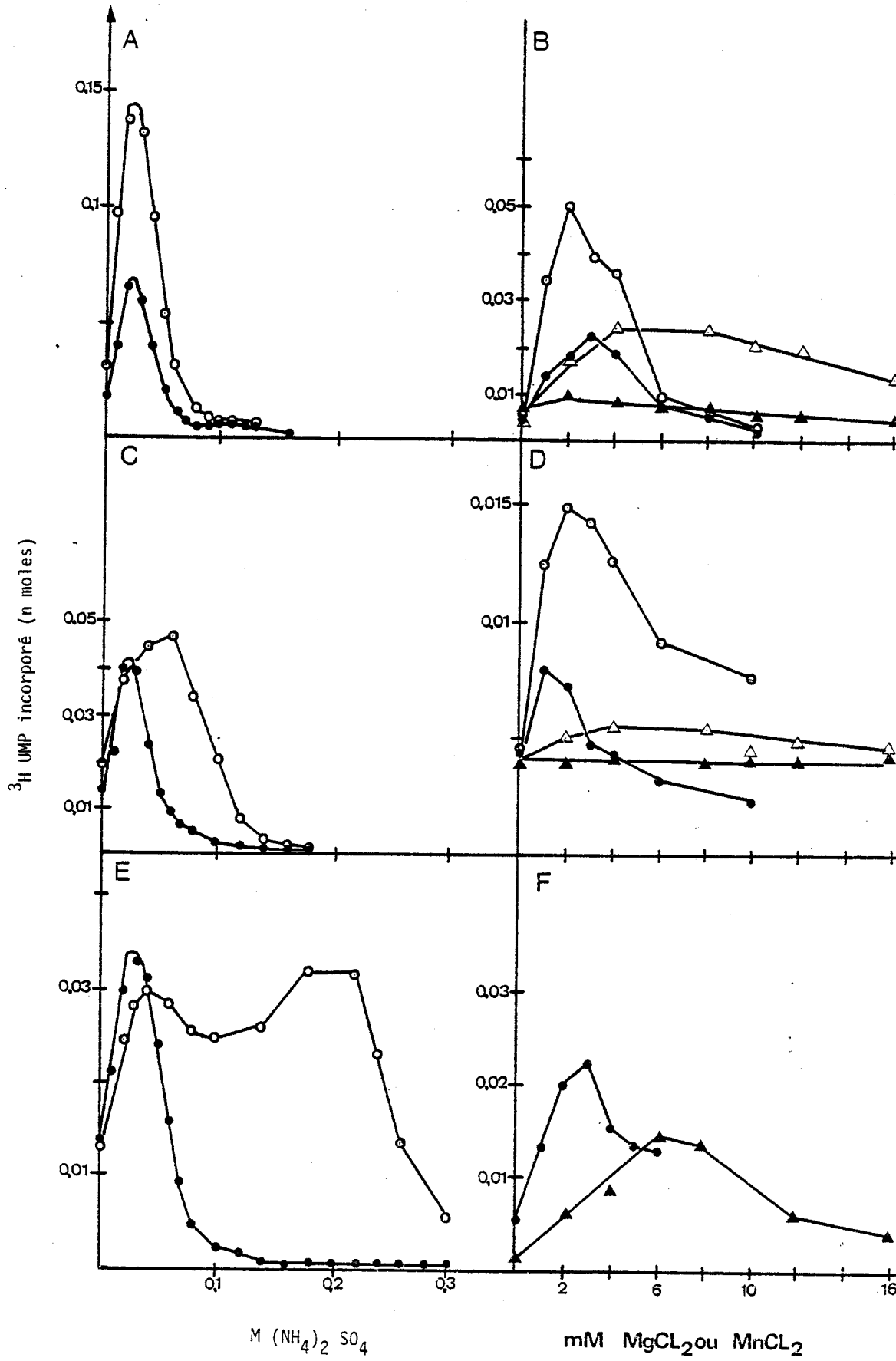


TABLEAU N° 9

CARACTERISTIQUES CATALYTIQUES DES RNA POLYMERASES I,II et III ISOLEES DES CELLULES INFECTEES ET NON INFECTEES PAR L'ADENOVIRUS 2

		DMA	I (IA <sub>o</sub> , IA, IB <sub>o</sub> , IB)		IIB		IIIA		IIIB		
			NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	
OPTIMUM DE FORCE IONIQUE (mM en (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )		KB <sub>N</sub> (10µg/ml)	30	30	60	60	50-200	50-200	50-200	50-200	
		KB <sub>d</sub> (10µg/ml)	20-100	20-100	50-150	50-150	50-200	50-200	50-200	50-200	
		Ad <sub>N</sub> (10µg/ml)	30	30	30	30	30	30	30	30	
		Ad <sub>d</sub> (10µg/ml)	20-100	20-100	50-150	50-150	50-200	50-200	50-200	50-200	
pMoles d'UMP- <sup>3</sup> H incorporées par ml d'enzyme à 30 mM en (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		KB <sub>N</sub> (10µg/ml)	120	130	40	40	40	25	20	/	
		Ad <sub>N</sub> (10µg/ml)	90	70	70	50	60	35	11	/	
OPTIMUM EN IONS DIVERGENTS(mM)		Mg <sup>++</sup>	KB <sub>N</sub> (10µg/ml)	2-8	4-10	2-10	/	2-16	/	/	/
			Ad <sub>N</sub> (10µg/ml)	2-8	/	4-16	/	2-8	4-10	4-12	/
		Mn <sup>++</sup>	KB <sub>N</sub> (10µg/ml)	1	2	1	2	1	/	/	/
			Ad <sub>N</sub> (10µg/ml)	2	3	2	2	2	3	3	/

Nous avons jusqu'ici utilisé les enzymes DEAE-Sephadex ; or, nous savons que la RNA polymérase I isolée par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex contient quatre activités séparables par chromatographie sur colonne de phosphocellulose. Nous avons séparé les quatre formes  $I_{AO}$ ,  $I_A$ ,  $I_B$  et  $I_{BO}$  et observé qu'elles avaient des propriétés similaires aux enzymes I de DEAE-Sephadex et ne pouvaient être distinguées entre elles par les propriétés que nous avons testées (fig. 30 p. 85, fig. 31 p 86 et le tableau 10 p. 86). Nous avons donc choisi la forme  $I_B$  ( $I_{BO} + I_B$ ) qui est la plus active, soit isolée en une seule étape par chromatographie sur colonne de phosphocellulose, soit plus purifiée. Nous avons dans un premier temps défini les conditions de la réaction du RNA polymérisation in vitro, puisque celles décrites page 31 avaient été fixées par les enzymes DEAE-Sephadex.

1) Conditions de synthèse in vitro

a) Concentration en triphosphates

La synthèse de RNA est optimale à une concentration des quatre triphosphates de 0,06 M (fig. 32-A p. 87). La concentration en UTP de 0,015 mM n'est pas limitante (fig 32-Aa p. 87).

b) Concentration en DNA

Nous avons utilisé une concentration de 5  $\mu\text{g/ml}$  pour chaque DNA (fig. 32-B p. 87). Dans ces conditions, nous sommes en excès de DNA ce qui favorise les initiations non spécifiques sur les régions du DNA dont la structure est altérée.

c) Effet de la dilution

Nous avons vérifié que la dilution de l'enzyme par le milieu réactionnel n'avait pas d'influence sur l'activité RNA polymérasique (fig. 32-C p. 87).

d) Action de la BSA

Nous avons gardé le BSA qui protège l'activité enzymatique et ceci quelque soit la qualité du DNA et sa concentration dans le milieu réactionnel (fig. 32-D p. 87).

Figure N° 30

A - B - C

Propriétés des RNA polymérases  $I_{AO}$ ,  $I_A$ ,  $I_{BO}$  et  $I_B$  partiellement purifiées par chromatographie sur colonne de phosphocellulose.

Effet de la concentrations en  $(NH_4)_2 SO_4$  (A)  
en  $MnCl_2$  (B)  
en  $MgCl_2$  (C)

sur l'activité des enzymes  $I_{AO}$  (●—●)  
 $I_A$  (○—○)  
 $I_{BO}$  (▲—▲)  
 $I_B$  (△—△)

en présence de DNA de KB natif (10  $\mu g/ml$ ).

D - Effet de la température sur l'activité des RNA polymérases I en présence de DNA de KB natif

(10  $\mu g/ml$ ) ○—○

et de DNA de KB dénaturé

(10  $\mu g/ml$ ) ●—●

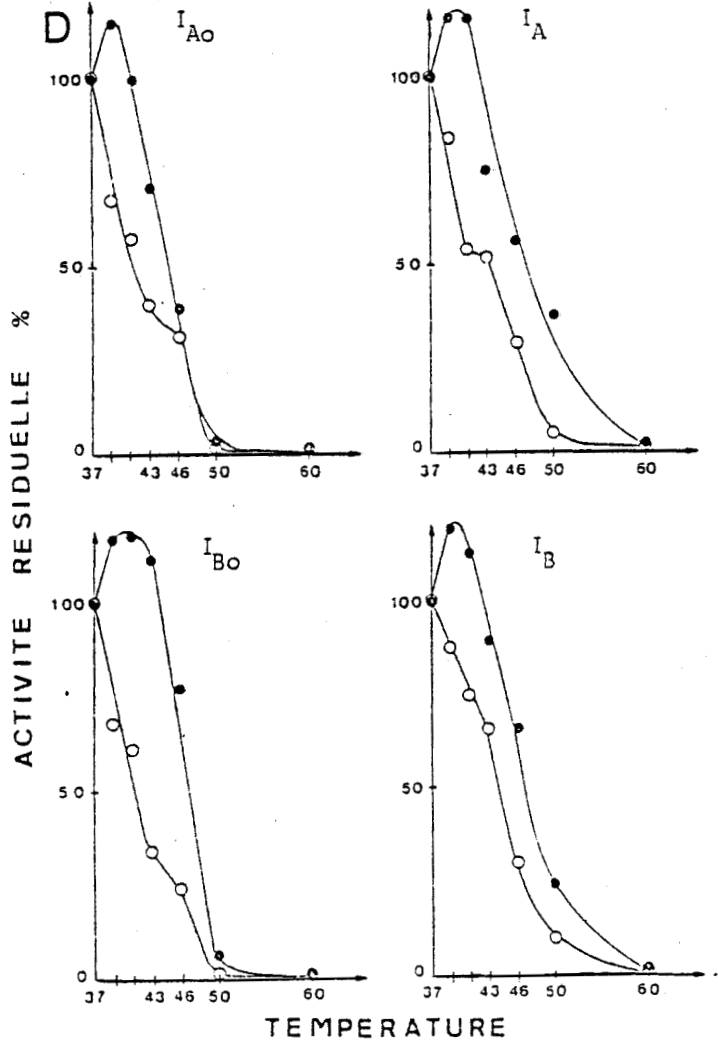
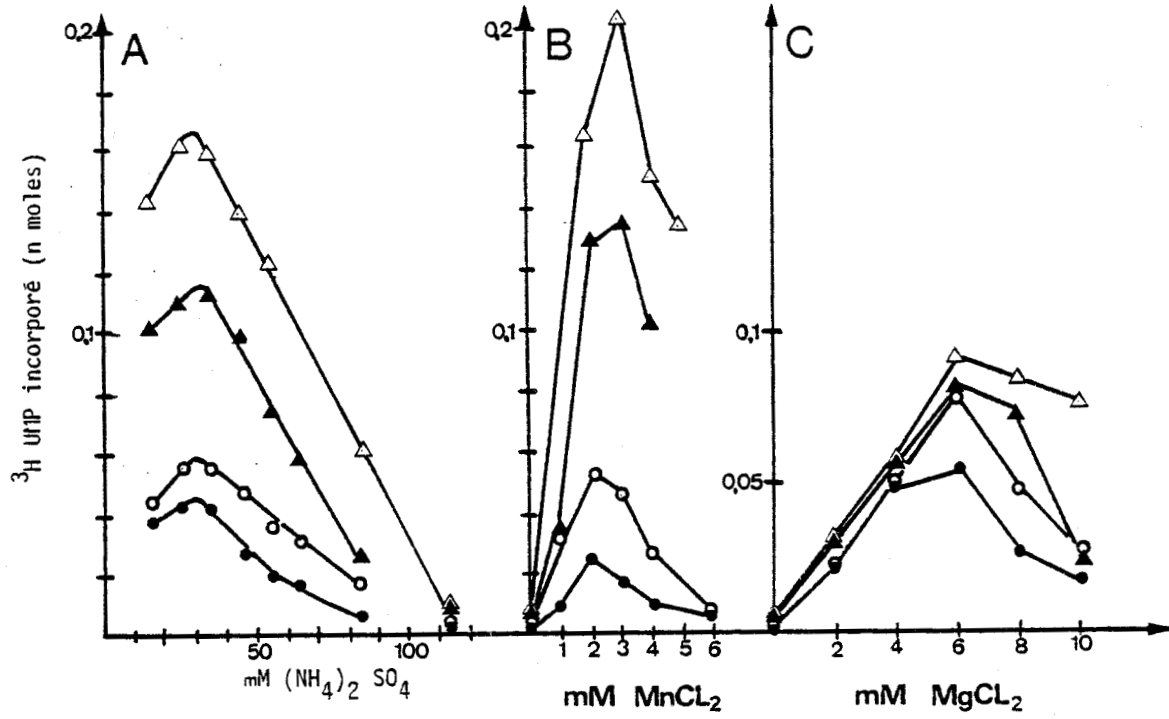


Figure N° 31

Effet de concentrations croissantes en alpha-amanitine sur l'activité des RNA polymérase  $I_{AO}$ ,  $I_A$ ,  $I_{BO}$  et  $I_B$  partiellement purifiées par chromatographie sur colonne de phosphocellulose.

L'activité RNA polymérasique a été mesurée en présence de DNA de KB natif (10  $\mu\text{g/ml}$ ).

$I_{AO}$     ●—●

$I_A$      ○—○

$I_{BO}$     ▲—▲

$I_B$      △—△

Enzyme  $III_A$  comme contrôle    ■—■



Tableau N° 10

Type de matrice utilisée	DNA $\mu\text{g/ml}$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mM	Activité des RNA polymérase I $\mu\text{M/ml}$			
			$I_{Ao}$	$I_A$	$I_{Bo}$	$I_B$
DNA de KB natif	15 $\mu\text{g/ml}$	30	73,2	99	179,5	231,4
DNA dénaturé de cellule KB	15 $\mu\text{g/ml}$	30	56,1	72,2	89	115,3
DNA natif d'Ad 2	15 $\mu\text{g/ml}$	15	45,2	42	63,2	95,4
Poly[d(A-T)]	15 $\mu\text{g/ml}$	30	236,9	361	402,1	644

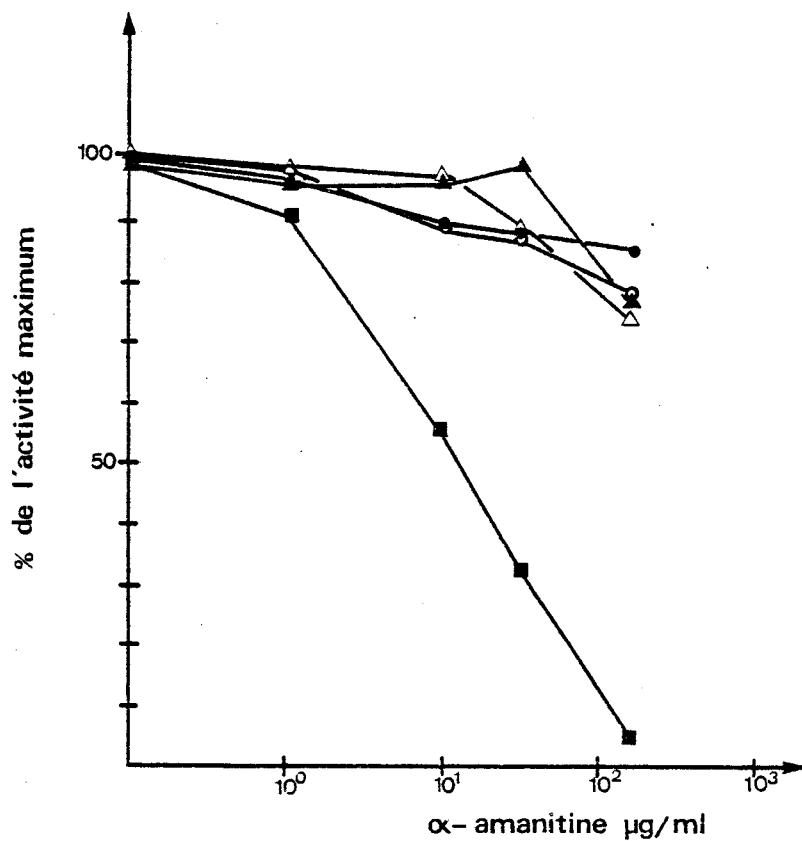


Figure N° 32

CONDITIONS DE SYNTHÈSE DU RNA IN VITRO CATALYSÉE PAR  
LES ENZYMES  $I_{BO} + I_B$

A - Concentration en triphosphates

La concentration des quatre triphosphates varie, mais la radioactivité spécifique de l'UTP reste constante (50 mCi/mM). En Aa, seule la concentration en UTP varie, la concentration des trois autres triphosphates étant fixée à 1 mM.

- enzyme phosphocellulose
- enzyme plus purifiée

B - Concentration en DNA

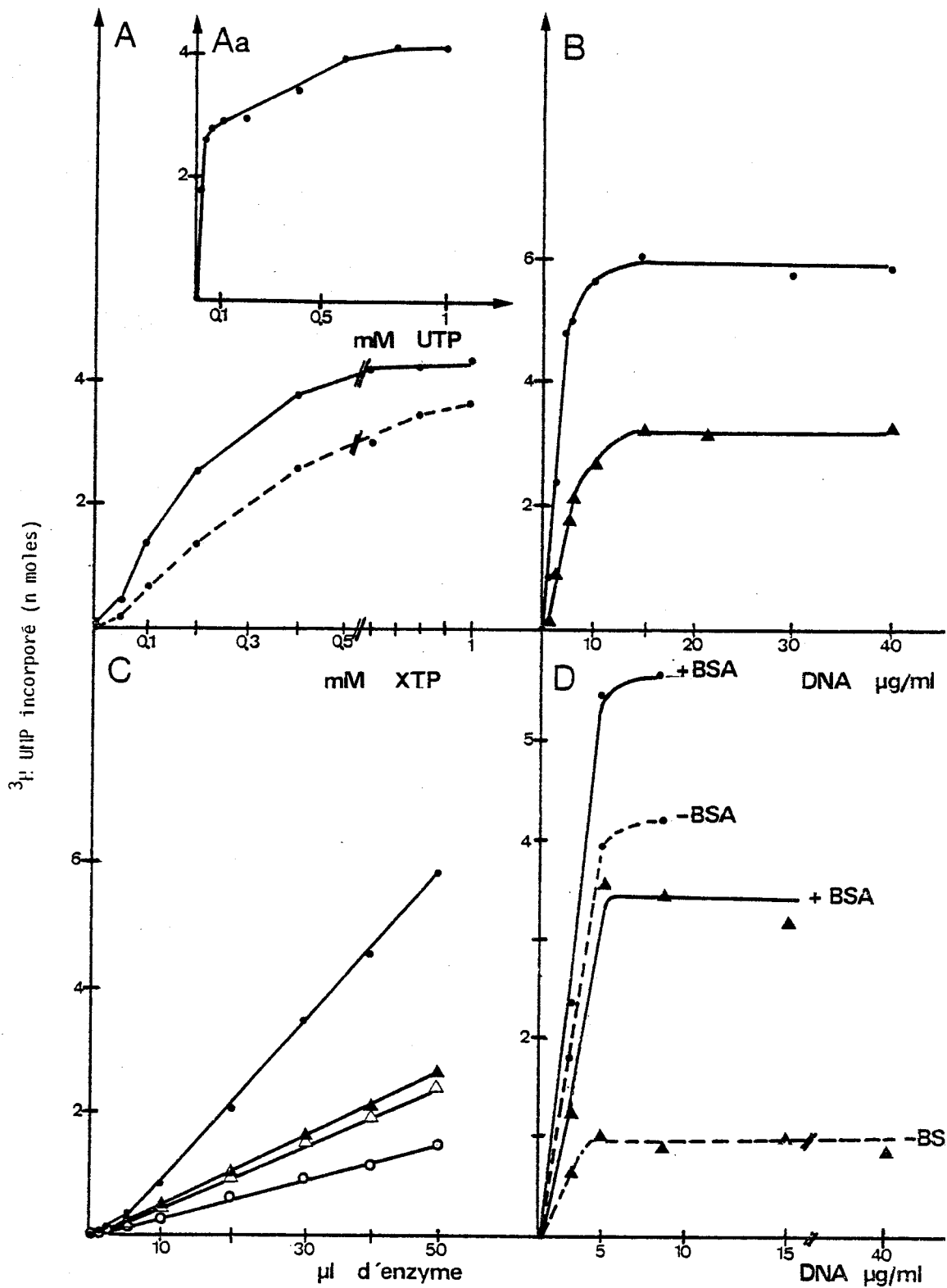
- DNA de KB natif
- ▲—▲ DNA d'Adénovirus 2

C - Effet de la dilution de l'enzyme

- DNA de KB dénaturé (5 µg/ml)
- DNA de KB natif (5 µg/ml)
- △—△ DNA d'Adénovirus 2 dénaturé (5 µg/ml)
- ▲—▲ DNA d'Adénovirus 2 natif (5 µg/ml)

D - Effet de la BSA

- DNA de KB natif (5 µg/ml) + BSA (0,5 mg/ml)
- DNA de KB natif (5 µg/ml) - BSA
- ▲—▲ DNA d'Adénovirus 2 natif (5 µg/ml) + BSA (0,5 mg/ml)
- ▲---▲ DNA d'Adénovirus 2 natif (5 µg/ml) - BSA



2) La RNA polymérase IB peut-elle amorcer spécifiquement la synthèse des RNA sur des régions bicaténaires du DNA

Nous avons établi les courbes d'activités des RNA polymérases  $I_B$  en faisant varier soit la concentration en  $(NH_4)_2 SO_4$  (fig. 33 p. 89), soit la concentration en  $MgCl_2$ , soit la concentration en  $MnCl_2$  (fig. 34 p. 90) et ceci en utilisant le DNA cellulaire natif et dénaturé et le DNA d'adénovirus 2 natif et dénaturé.

De ces résultats nous pouvons tirer les informations suivantes :

- a) Le degré de purification des enzymes I ne semble pas influencer sur le taux relatif de transcription des différents DNA qui est  $DNA\ KB_N \gg DNA\ KB_d \gg DNA\ Ad_d \gg DNA\ Ad_N$  (fig. 33 p. 89).
- b) En présence d'un excès de matrice dénaturée, l'activité des RNA polymérases  $I_B + I_{BO}$  devient moins sensible à une augmentation de la force ionique qu'en présence d'un excès de matrice native.
- c) Cependant lorsque la matrice native est le DNA de KB, la courbe d'activité est légèrement décalée vers les forces ioniques plus élevées, comparée à la courbe d'activité en présence de DNA viral natif.
- d) Toutefois, en présence d'une matrice DNA bicaténaire dont la structure est altérée, l'activité de la RNA polymérase  $I_B + I_{BO}$  est rapidement inhibée par une augmentation de la force ionique, ce qui suggère que cette enzyme initie préférentiellement sur les régions bicaténaires intactes du DNA. L'activité très faible des enzymes  $I_B + I_{BO}$  en présence de DNA viral intact serait à rapprocher du fait que ces enzymes ne transcrivent pas le DNA viral in vivo.
- e) L'activation préférentielle par le  $Mn^{++}$  en présence de DNA viral et cellulaire natif (fig. 34-A p. 90) renforce l'hypothèse selon laquelle les enzymes I peuvent initier préférentiellement la synthèse du RNA sur les régions bicaténaires intactes de la matrice. Cette dernière observation suggère que l'action du manganèse favoriserait le démarrage des chaînes de RNA en modifiant à basse force

Figure N° 33

Effet de la concentration en  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  sur la transcription de différents DNA par les RNA polymérases  $\text{I}_{\text{BO}} + \text{I}_{\text{B}}$  purifiées par chromatographie sur phosphocellulose, DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex et CM-Sephadex (A) ou partiellement purifiées par chromatographie sur colonne de phosphocellulose (B)

- DNA de KB natif (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
- DNA de KB dénaturé (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
- DNA d'Adénovirus 2 natif (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
- DNA d'Adénovirus 2 dénaturé (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

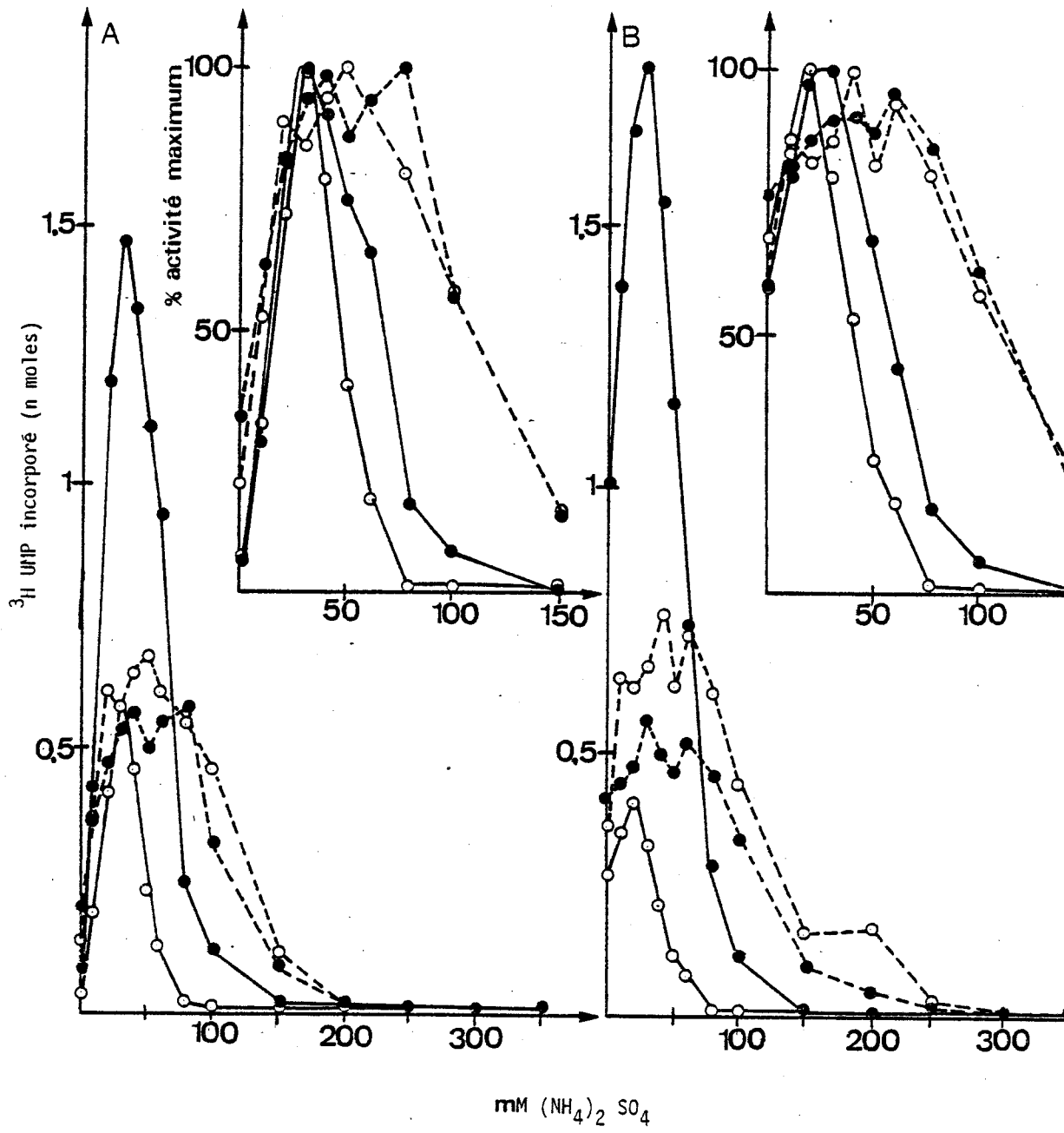


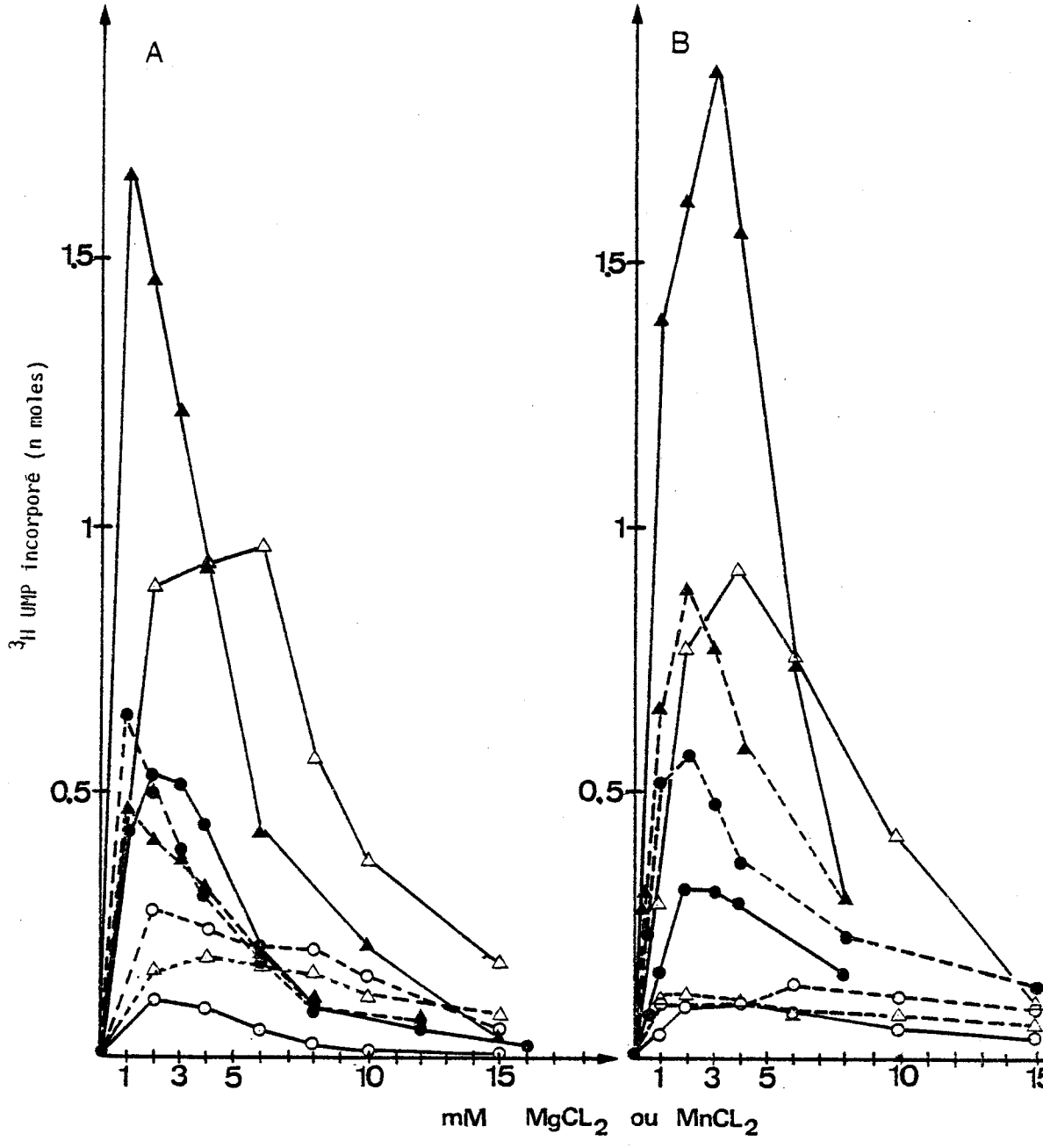
Figure N° 34

Effet de la concentration en cations divalents sur la transcription de différents DNA par les enzymes  $I_{BO} + I_B$

A - Enzymes purifiées

B - Enzymes partiellement purifiées

DNA	$Mg^{++}$	$Mn^{++}$
KB natif (5 $\mu\text{g/ml}$ )	●—●	▲—▲
Adénovirus natif (5 $\mu\text{g/ml}$ )	○—○	●—●
KB dénaturé (5 $\mu\text{g/ml}$ )	●- - ● ●	▲- - ▲
Adénovirus dénaturé (5 $\mu\text{g/ml}$ )	○- - ○	●- - ●



BUS  
LILLE



ionique la structure secondaire du DNA (LUCK et ZIMMER, 1972 (65) HOSSENLOP et al., 1975 (46)).

L'ensemble des résultats exposés dans cette première partie montre que les enzymes des cellules infectées ou non infectées sont similaires quant à leurs propriétés chromatographiques et à leur capacité à transcrire le DNA viral in vitro.

De plus, aucune des RNA polymérases ne peut initier la synthèse des RNA in vitro sur le DNA viral bicaténaire intact à moins de créer artificiellement "un promoteur ouvert" à basse force ionique et en présence de  $Mn^{++}$ , semblable à celui décrit par DEZELEE, 1974 (25).

In vivo, ces "promoteurs" pourraient être créés par des protéines associées au DNA viral, ouvrant la double hélice ou créant des contraintes physiques dans la double hélice qui font apparaître des régions désappariées. Dans cette optique, il était intéressant d'aborder l'étude de l'organisation du génome viral in vivo.

D'autre part, connaissant l'organisation du DNA d'adénovirus 2 in vivo, il serait plus facile d'adapter une méthode d'isolement compatible avec sa structure, et ainsi permettre de l'utiliser dans un système de transcription in vitro.

2ème PARTIE

ORGANISATION FONCTIONNELLE DU GENOME  
DE L'ADENOVIRUS 2 IN VIVO

MATERIEL ET METHODES

A - CULTURE DES CELLULES KB

Les cellules KB ont été cultivées en suspension comme décrit page 25.

B - PREPARATION DES STOCKS D'ADENOVIRUS 2

Voir page 25.

C - PREPARATION DES VIRIONS RADIOACTIFS

1 - VIRIONS <sup>32</sup>P

Pour préparer des virions dont le DNA a été rendu radioactif par incorporation de <sup>32</sup>P, les cultures de cellules KB sont concentrées à  $6 \times 10^6$  cellules par ml dans du milieu MEM ne contenant pas de sérum ni de phosphate. A cet effet, du tampon HEPES 0,01 M (N-2-hydroxyéthyl piperazine N'-2' ethane sulfonic acid, Sigma Chemical Co.) a été substitué au Na H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> et le pH final ajusté à 7 par Na H CO<sub>3</sub>. Les cellules sont ensuite infectées à une multiplicité infectieuse de 15 unités formant une plaque (pfu) de virus par cellule. Après une heure d'adsorption à 37°C, les cultures sont diluées jusqu'à une concentration de  $3 \cdot 10^5$  cellules par ml avec le milieu sans phosphate supplémenté de 2,5 % de sérum de cheval. Après 7 heures d'infection à 37°C, on ajoute 50 mCi par litre de culture de <sup>32</sup>P-orthophosphate sans entraîneur (New England Nuclear). A la 30ème heure du cycle lytique, les cellules sont récoltées par centrifugation (10 minutes à 600 g) et le virus purifié comme décrit page 26. La bande de virus s'équilibrant à la densité de 1,34 g/cc dans le gradient de chlorure de césium, est gardée à -20°C après dilution au 1/20 par du tampon Tris 0,01 M, pH 8,1, NaCl 0,15 M, BSA 0,1 % (w/v) (Sigma Chemical Co.) et glycérol 50 %. Chaque stock de virus <sup>32</sup>P a été utilisé dans les deux semaines suivant le jour où l'isotope radioactif a été ajouté à la suspension de cellules infectées sans perte apparente de pouvoir infectieux.

La radioactivité spécifique du virus a été calculée en isolant 1 µg de DNA à partir de la bande de virus radioactif et en mesurant avant chaque utilisation du virus la radioactivité de cette aliquote de DNA par comptage CERENKOV.

L'infectivité du virus radioactif a été déterminée à partir de la densité optique de la bande isolée par gradient de CsCl, en utilisant les formules suivantes :

$$1 \text{ unité de densité optique à } 260 \text{ nm} = 3 \cdot 10^{10} \text{ pfu}$$
$$(\text{O.D./ml}) \times (3 \cdot 10^{10}) = \text{pfu/ml de virus}$$

Si l'on veut infecter 1 l de cellules ( $3 \cdot 10^8$  cellules) à une multiplicité infectieuse (m.o.i) de 50 pfu par cellule, il faudra :

$$\frac{(50 \text{ pfu/cellule}) \times (3 \cdot 10^8 \text{ cellules})}{\text{pfu/ml de virus}} = \text{ml de la bande de virus non diluée}$$

Nous avons toujours trouvé une bonne corrélation entre le calcul d'infectivité par cette méthode et par la méthode des plages.

## 2 - VIRIONS MARQUES PAR LA THYMIDINE TRITIEE ET PAR LA METHIONINE <sup>35</sup>S

Des cellules KB sont infectées par l'Adénovirus 2 comme décrit page 25. A la 17ème heure du cycle lytique, les cellules infectées sont concentrées deux fois ( $6 \times 10^5$  cellules/ml), dans le milieu MEM de JOKLIK sans L-Methionine mais supplémenté avec du sérum de cheval (2,5 %), de la <sup>35</sup>S-L-Methionine (25 µCi/ml, New England Nuclear, Inc.) et de la L-Methionine (5 µM). Après une heure à 37°C, on ajoute 20 µCi/ml de <sup>3</sup>H-Thymidine. A la 22ème heure du cycle infectieux, la suspension cellulaire est diluée par un volume égal de milieu MEM de JOKLIK sans L-Methionine supplémenté avec du sérum de cheval (2,5 %) et de la L-Methionine (5 µM). Les cellules sont recueillies à la 30 ème heure afin de préparer le virus.

## D - ISOLEMENT DES NOYAUX DES CELLULES INFECTEES

De façon routinière et sauf indication contraire, les cellules KB en suspension ont été infectées à une multiplicité infectieuse de 1 000 particules radioactives par cellule ou 100 pfu par cellule de virus non radioactif. Sauf indication contraire, les infections ont été arrêtées entre 3 et 4 heures après le début de l'adsorption. Toutes les manipulations décrites ci-dessous ont été effectuées à 0-4°C ; les trois méthodes suivantes ont été utilisées pour isoler les noyaux à partir des

culots de cellules obtenus après centrifugation et lavés deux fois par du PBS préalablement refroidi à 0°C.

### 1 - TAMPON ISOTONIQUE

Le culot cellulaire est resuspendu à une concentration de  $3 \cdot 10^6$  cellules par ml dans du tampon Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M,  $MgCl_2$  0,0015 M et Triton X-100 0,5 % (Sigma Chemical Co). Après 15 minutes à 4°C, les cellules sont lysées dans un homogénéiseur de DOUNCE par 10 aller et retour du piston T (tight). Les noyaux sont alors sédimentés par centrifugation pendant 5 minutes à 600 x g et à 4°C.

### 2 - TAMPON HYPOTONIQUE

Le culot cellulaire est resuspendu pour obtenir une densité de  $3 \cdot 10^6$  cellules par ml dans le tampon Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,01 M,  $MgCl_2$  0,0015 M et 0,05 % Triton X-100. Après 5 minutes à 4°C, les cellules sont lysées dans un homogénéiseur de DOUNCE par 20 aller et retour du piston L (loose). Les noyaux sont séparés de la fraction cytoplasmique par centrifugation pendant 5 minutes à 600 x g et à 4°C.

### 3 - TAMPON SACCHAROSE

Le culot cellulaire est dispersé à raison de  $1 \cdot 10^7$  cellules par ml dans le tampon contenant : Saccharose 0,3 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 7,9,  $CaCl_2$  0,001 M et Nonidet P-40 0,5 % (NP 40, Schell Chemical Co.). Les cellules sont lysées immédiatement dans un homogénéiseur de DOUNCE par 20 aller et retour du piston L. Le culot de noyaux obtenu après centrifugation (5 minutes à 600 x g et à 4°C) est lavé deux fois par le tampon d'homogénéisation et deux par le tampon contenant : Saccharose 0,3 M, Tris-HCl 0,001 M, pH 7,9 et  $CaCl_2$  0,001 M.

Une observation de contrôle au microscope à contraste de phase nous permet de dire que les noyaux préparés par les méthodes citées ci-dessus sont intacts, et que la méthode 3 permet d'obtenir une préparation dépourvue de contamination cytoplasmique. Dans toutes les expériences les noyaux ont été utilisés immédiatement après purification.

## E - CENTRIFUGATION DU DNA VIRAL EN GRADIENT DE CHLORURE DE CESIUM

Le DNA viral a été isolé des noyaux des cellules infectées ou des virions purifiés.  $2-6 \cdot 10^6$  noyaux ou  $10^{10}$  virions sont digérés dans 5 ml de tampon Tris-HCl 0,02 M, pH 7,9, NaCl 0,1 M, EDTA 0,005 M, N-lauryl sarcosine 0,5 % (Geigy Chemical Co.) et 300 µg de pronase B (Sigma Chemical Co.), prédigérée 4 heures à 37°C et chauffée 10 minutes à 80°C. Après une nuit de digestion à 37°C, les solutions visqueuses sont diluées à 8 ml par de l'EDTA 0,005 M et la densité de chacune ajustée à 1.706 par addition de CsCl en poudre. La dissolution du CsCl est effectuée à 37°C sous agitation très douce. Le volume de chaque échantillon est finalement complété à 10 ml avec une solution de CsCl de densité 1.706, et chaque échantillon est placé dans un tube en polyallomer du rotor 50 TI spinco. La solution de CsCl contenue dans les tubes est couverte par un film d'huile de paraffine et centrifugée à 100.000 x g pendant 70 heures et à 15°C. A la fin de la centrifugation, chaque gradient est divisé en fractions de 0,2 ml en collectant des gouttes par un trou percé au fond du tube. La densité de chaque fraction est déterminée par réfractométrie. Chaque fraction est ensuite diluée à 1 ml par de l'eau déminéralisée et bidistillée afin de lire la densité optique et de déterminer la radioactivité.

## F - SYNTHÈSE DE RNA IN VITRO PAR LES NOYAUX ISOLES

Les noyaux préparés par les méthodes 1, 2 et 3 sont lavés une fois dans le tampon contenant : Tris-HCl 0,05 M, pH 7,9, glycérol 25 %, EDTA 0,001 M, DTT 0,005 M et  $MgCl_2$  0,005 M, puis dispersés dans le même tampon par homogénéisation douce dans un homogénéiseur de DOUNCE ( $4 \cdot 10^7$  noyaux par ml). La suspension nucléaire est alors mélangée à un volume égal de milieu de synthèse de RNA de façon à obtenir la composition finale :  $2 \cdot 10^7$  noyaux par ml Tris-HCl 0,05 M, pH 7,9, glycérol 12,5 %,  $MgCl_2$  0,005 M,  $MnCl_2$  0,001 M, KCl 0,125 M, DTT 0,005 M, ATP, GTP, CTP 0,001 M, UTP 0,00002 M et 500 µCi par ml de  $^3H$ -UTP (uridine-5'-triphosphate (5,5- $^3H$ ), 35 Ci/nmole, New England Nuclear). Après 15 minutes d'incubation à 37°C, le milieu de synthèse est dilué par un volume égal de tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 7,9, NaCl 0,2 M, N-lauryl sarcosine 2 %, sulfate de dextran 200 µg/ml, UTP 0,002 M et protéinase K 300 µg/ml (fungique, purifiée par chromatographie et lyophilisée, E. MERCK). La suspension est mélangée doucement par

pipetage lent à travers l'extrémité la plus large d'une pipette en plastique de 10 ml, jusqu'à obtention d'une solution très visqueuse et transparente. Après une incubation d'une nuit à 37°C, les RNA synthétisés in vitro sont extraits et purifiés comme décrit dans le paragraphe suivant.

#### G - EXTRACTION ET PURIFICATION DES RNA SYNTHETISES IN VITRO

Le lysat nucléaire est dilué par deux volumes d'une solution d'EDTA 0,002 M, additionnée de 200 µg de tRNA, est extrait deux fois par le mélange phénol/chloroforme/alcool-isoamylique (un volume de phénol, plus un volume du mélange chloroforme/alcool-isoamylique (24 : 1, v : v)). Les phases aqueuses finales sont extraites une fois par le mélange chloroforme/alcool-isoamylique (24 : 1, v : v). Les acides nucléiques contenus dans la phase aqueuse finale sont précipités par l'éthanol à 67 p 100 pendant une nuit à -20°C. Les culots obtenus après centrifugation (100000 xg, 1 heure, 4°C) sont séchés lentement sous courant d'azote gazeux, suspendus dans 1 ml du tampon Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 0,01 M et addtionnés de 50 µg/ml de DNase I (Désoxyribonucléate-5-oligonucléotidchydrolase, E 3.1.4.5., Worthington Biochemical Co.). Après 30 minutes d'incubation à 37°C, la solution est extraite par un volume du mélange phénol/chloroforme/alcool-isoamylique. La phase aqueuse contenant les RNA est ajustée à une concentration de 0,15 M avec du NaCl 1 M, mélangée à 2,5 volumes d'éthanol à 95 %, et l'ensemble est abandonné pendant une nuit à -20°C. Les RNA précipités sont concentrés par centrifugation et traités une seconde fois par la DNase I. Le culot final de RNA obtenu après centrifugation est dissous dans 100 µl de 0,1 x SSC, et la solution est ajustée à une concentration finale de 6 x SSC et 0,1 % SDS par du 20 SSC et du SDS 1 %. Cette solution contient des RNA cellulaires et viraux, radioactifs et non radioactifs. La preuve que le matériel radioactif présent dans la solution est du RNA, a été faite en comparant la radioactivité acido précipitable contenue dans des aliquotes avant et après incubation pendant 16 heures à 37°C en présence de KOH 0,3 M. Moins de 1 % de la radioactivité subsiste après hydrolyse par la potasse 0,3 M. La taille des RNA viraux synthétisés in vitro a été estimée par électrophorèse en gel d'acrylamide-formamide. Elle est comparable à la taille des RNA viraux précoces synthétisés in vivo.



## H - HYBRIDATION ENTRE DNA VIRAL FIXE SUR FILTRE ET RNA SYNTHETISES IN VITRO PAR LES NOYAUX ISOLES

Des filtres de nitrocellulose de 6,5 mm de diamètre (Schleicher Schuell, type BA-85) chargés d'environ 10 µg de DNA viral dénaturé, sont incubés dans 100 µl de la solution contenant les RNA synthétisés in vitro et purifiés comme décrit dans le paragraphe précédent. Les conditions d'hybridation sont : 6 x SSC, 0,1 % SDS pendant 36 heures à 66°C (Mc GROGAN et al., 1978 (70)). Tous les filtres ont été testés pour déterminer leur efficacité d'hybridation en utilisant comme sonde du DNA d'Adénovirus marqué au <sup>32</sup>P.

## I - PREPARATION DE LA CHROMATINE

Les noyaux isolés par la méthode 3 sont resuspendus et lavés une fois par le tampon Tris 0,001 M, pH 7,9, EDTA 0,005 M et NP40 0,5 %. Le culot nucléaire obtenu après centrifugation (600 x g, 5 minutes) est dispersé dans le même tampon à raison de 10<sup>6</sup> noyaux par ml. Après 30 minutes à 4°C, la solution gélatineuse de chromatine est lavée deux fois par une solution d'EDTA 0,002 M.

## J - DIGESTION DES NOYAUX ET DE LA CHROMATINE PAR LA NUCLEASE MICROCOCCALE



Les noyaux isolés par la méthode 3 sont resuspendus dans le tampon de digestion (Saccharose 0,3 M, Tris-HCl 0,001 M, pH 7,9, CaCl<sub>2</sub> 0,001 M). La concentration en DNA est déterminée par la densité optique à 260 nm d'une aliquote diluée dans une solution d'urée 5 M et NaCl 2 M (AXEL, 1975 (5)). Le volume final de la suspension nucléaire homogène est alors ajusté de façon à obtenir une concentration en DNA d'environ 300 µg/ml. Les noyaux sont ensuite digérés à 37°C par 30 unités/ml de nucléase micrococcale. Des aliquotes sont prélevées à différents temps de la digestion et la quantité de matériel rendu acido-soluble est estimée après précipitation au TCA 10 %. Chaque culot est lavé deux fois par de l'EDTA 2 mM et du TCA 2 % à 0°C. Le culot est ensuite dissous dans 2 ml de KOH 1 M à 60°C. Le surnageant de précipitation et les deux lavages du culot sont mélangés.

La digestion de la chromatine se fait d'une manière un peu différente, pour des raisons pratiques. En effet, la présence de calcium dans le tampon de digestion provoque une agglomération

immédiate de la chromatine qui devient inutilisable. Il faut donc diviser la solution mère qui est dans l'EDTA 0,002 M en aliquotes et ajouter la nucléase micrococcalle à chaque aliquote de façon à obtenir un rapport DNA ( $\mu\text{g/ml}$ ) / enzyme (unités/ml) = 10, mélanger soigneusement et finalement amener chaque aliquote à une concentration de 0,001 M en  $\text{CaCl}_2$ .

Lorsque l'on veut analyser par électrophorèse la taille des fragments de DNA partiellement protégés durant la digestion enzymatique, les aliquotes prélevées aux différents temps de la digestion sont mélangées à un volume égal de tampon Tris-HCl 0,02 M, pH 7,9, NaCl 0,3 M et EDTA 0,02 M, afin d'arrêter la réaction et de lyser les noyaux. Les RNA nucléaires sont détruits par incubation du lysat nucléaire pendant une heure à 37°C en présence de 50  $\mu\text{g}$  de ribonucléase pancréatique (Worthington Biochemical Co.), préalablement chauffée 10 minutes à 80°C pour détruire toute trace d'activité désoxyribonucléasique, bien que la présence d'EDTA y suffise déjà.

Les aliquotes sont ensuite additionnées de N-lauryl sarcosine (0,5 % concentration finale) et de 800  $\mu\text{g}$  de pronase B. Après une incubation d'une nuit à 37°C les aliquotes sont traitées une fois par du phénol saturé en Tris-HCl 0,01 M, pH 7,9, NaCl 0,1 M et EDTA 0,01 M. La phase aqueuse obtenue après centrifugation (10 minutes, 10 000 x g) est traitée par le mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 : 1, v : v). La phase aqueuse finale est ajustée à 0,1 M NaCl et le DNA précipité par l'éthanol 67 % à -20°C.

Lorsque l'on veut étudier les désoxyribonucléoprotéines (DNP) libérées par action de la nucléase micrococcalle, la digestion enzymatique est arrêtée par addition d'EDTA (0,01 M concentration finale). Dans le cas des noyaux, la suspension nucléaire est abandonnée à 0°C pendant 60 minutes, puis centrifugée pendant 10 minutes à 10 000 x g. Le surnageant est utilisé comme source de nucléosomes. Dans le cas de la chromatine, après addition d'EDTA, la suspension est centrifugée directement.

#### K - ELECTROPHORESE SUR GEL DU DNA ET DES DNP

Les fragments de DNA purifiés après digestion des noyaux ou de la chromatine par la nucléase micrococcalle ont été analysés par électrophorèse sur gel. Deux types de gels ont été utilisés : des gels laminaires verticaux dont les dimensions sont 0,3 x 25 x

15 cm ou 0,3 x 18 x 17 cm et des gels cylindriques (12 x 0,3 cm).

1 - Les gels d'agarose sont préparés en portant à ébullition une suspension d'agarose en poudre (Bio. Rad. Laboratories) dans le tampon E (Tris 0,04 M, acétate de sodium 0,002 M et EDTA 0,001 M, pH 7,4). La solution d'agarose est refroidie à 50°C, additionnée de bromure d'éthidium (0,5 µg/ml concentration finale) et coulée dans le moule. La gélification se fait après environ 30 minutes.

2 - Les gels composites d'agarose 0,5 % - polyacrylamide 3 % sont préparés en mélangeant un volume égal d'une solution contenant pour 100 ml :

6 g d'acrylamide

0,315 g de N, N'méthylène bisacrylamide

10 ml de tampon 10 x concentré contenant	Tris	0,064 M
	Acetate de Na	0,032 M
	EDTA	0,0032 M
	pH	8

50 µg de bromure d'éthidium

1 mg de persulfate de sodium, préchauffé à 37°C avec un volume égal d'une solution d'agarose 1 % préparée dans le même tampon et refroidie à 50°C.

On ajoute ensuite au mélange le catalyseur de polymérisation TEMED et on coule le mélange immédiatement dans le moule, en évitant soigneusement de faire des bulles.

3 - Les gels de polyacrylamide (4-6 %, acrylamide : N, N'méthylène bisacrylamide, 20 : 1) sont préparés dans le tampon E.

Les échantillons de DNA à analyser (10 à 50 µg par piste) sont dissous dans le tampon 0,1 x E contenant 10 % de saccharose (W : v) et du bleu de bromophénol 0,025 % dans le cas des gels d'agarose et de polyacrylamide. Les électrophorèses sont conduites sous tension constante de 50 V et à température ambiante. Le tampon E est le tampon d'électrophorèse à l'anode et à la cathode.

Dans le cas des gels composites, les aliquotes à analyser sont séparées sous courant constant de 20 ma, avec recirculation du tampon (Tris 0,0064 M, acétate de sodium 0,0032 M et EDTA 0,00032 M, pH 8), et en enceinte réfrigérée. Le tampon d'électrophorèse est le même à l'anode et à la cathode.

Dans tous les cas, après électrophorèse, les gels sont trempés une heure dans le tampon d'électrophorèse contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. Les gels sont ensuite photographiés sous lumière ultra-violette, à travers un filtre rouge.

#### L - ANALYSE DE LA RADIOACTIVITE CONTENUE DANS LES GELS

La radioactivité contenue dans les gels a été visualisée soit par autoradiographie soit en découpant les gels en tranches égales et en déterminant la radioactivité contenue dans chaque tranche. Les autoradiographies ont été faites à partir des gels humides ou des gels préalablement séchés sous vide sur un support de papier Whatman 1, placés au contact de films Kodak X-omat R (XR-5). Dans le cas de radioactivité due au tritium, les gels ont été traités selon la méthode de LASKEY et MILLS, 1975 (146).

#### M - PROFILS DE DENSITE OPTIQUE

Les négatifs des photographies des gels après électrophorèse, des autoradiogrammes et des fluorogrammes, ont été analysés à une longueur d'onde de 600 nm, dans l'unité d'enregistrement en continu de la densité optique d'un spectrophotomètre GILFORD (GILFORD 2510 gel scanner).

#### N - TRANSFERT HYBRIDATION

La méthode de transfert hybridation se fait en deux étapes. Premièrement, du DNA d'Adénovirus 2 non radioactif est digéré par l'enzyme de restriction Endo R. SmaI et les 13 fragments obtenus sont séparés par électrophorèse sur un gel vertical d'agarose 1 % de dimensions 0,3 x 18 x 17. Le gel est imprégné de bromure d'éthidium et photographié comme décrit précédemment. Les fragments de DNA sont dénaturés par trempage du gel pendant une heure dans une solution de 0,6 M NaCl et 0,2 M NaOH, puis l'ensemble est neutralisé par trempage du gel pendant une heure dans le tampon Tris-HCl 1,5 M, pH 7,4 et NaCl 3 M. Les fragments de DNA sont alors transférés sur une feuille de nitrate de cellulose (Schleicher et Schull, selectron-filter BA 85).

Afin de préparer les fragments de DNA radioactif à hybrider, les noyaux isolés des cellules KB infectées par des <sup>32</sup>P Adénovirions (3 heures P.I.) sont digérés par la nucléase micrococcale.

Les fragments de DNA après déprotéinisation sont fractionnés par électrophorèse sur un gel vertical d'agarose 1,5 % (0,3 x 18 x 17). Le gel est ensuite trempé une heure dans une solution de 0,6 M NaCl et 0,2 M NaOH, et une heure dans le tampon de neutralisation Tris-HCl 1 M, pH 7,4, NaCl 3 M et 0,1 % SDS.

L'étape d'hybridation transfert se fait alors en plaçant la feuille de nitrocellulose contenant les fragments froids du DNA d'Adénovirus au dessus du gel contenant les fragments de DNA radioactif, de façon à ce que les bandes de DNA se croisent en formant un angle de 90°, et que chaque bande de DNA radioactif croise chaque bande de DNA fixé sur le filtre de nitrocellulose. L'hybridation se fait en milieu 6 x SSC, 0,1 % SDS et à 65°C pendant une nuit.

Après hybridation, la feuille de nitrate de cellulose est lavée plusieurs fois par du Tris 3 mM séchée, et mise en contact avec un film Kodak pour autoradiographie.

#### O - PREPARATION DU COMPLEXE DNA D'ADENOVIRUS 2 PROTEINE TERMINALE (HAd2DNA-55K)

Les complexes HAd2DNA-55K ont été préparés à partir de virions radioactifs ou à partir de noyaux isolés des cellules infectées par des virions radioactifs. Les virions ou les noyaux sont additionnés d'un volume égal de chlorhydrate de guanidine (GuHCl) 8 M et abandonnés 5 minutes à 0°C.

#### P - PURIFICATION DU COMPLEXE HAd2DNA-55K

Trois méthodes de purification ont été utilisées :

##### 1 - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SEPHAROSE 2B-CL

La solution de GuHCl 4 M contenant les complexes HAd2DNA-55K est chargée sur une colonne de sépharose 2B-CL (1 x 3) équilibrée dans du tampon Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4, EDTA 0,001 M, GuHCl 4 M, Sarkosyl 1 % et béta-mercaptoéthanol 0,001 M (GuHCl-TSEB). La colonne est éluée par le même tampon et des fractions de 0,2 ml sont recueillies à la sortie de la colonne.

## 2 - CENTRIFUGATION A L'EQUILIBRE EN GRADIENT DE CHLORURE DE CESIUM/CHLORYDRATE DE GUANIDINE

L'aliquote à analyser, préalablement traitée par du GuHCl 8 M, est diluée par le tampon GuHCl-TSEB. La solution est ajustée à une molarité de 3,026 par du CsCl en poudre et centrifugée dans le rotor 60TI à 40 000 rpm pendant 72 heures à 15°C. Les gradients sont ensuite fractionnés en aliquotes de 0,5 ml.

## 3 - CENTRIFUGATION EN GRADIENT LINEAIRE DE SACCHAROSE

L'aliquote à analyser, préalablement traitée par du GuHCl 8 M, est déposée au sommet d'un gradient linéaire de saccharose de 5 à 20 p. 100 préparé dans le tampon GuHCl-TSEB. Les gradients sont centrifugés dans le rotor SW40 à 30 000 rpm. Les gradients sont fractionnés en aliquotes de 0,2 ml.

## Q - DIGESTION DES DNA PAR LES ENZYMES DE RESTRICTION

### 1 - ENDO. R. ECO RI

Le tampon de digestion a la composition suivante :

Tris	0,1 M	pH 7,5
MgCl <sub>2</sub>	0,01 M	
NaCl	0,05 M	

Le rapport enzyme/DNA est déterminé pour chaque lot d'enzyme de façon à obtenir une digestion complète du DNA à analyser. La température d'incubation est 37°C.

### 2 - ENDO. R. SMAI

Le tampon de digestion a la composition suivante :

Tris	0,015 M	pH 8,5
MgCl <sub>2</sub>	0,015 M	
KCl	0,006 M	

La température d'incubation est 25°C. L'enzyme est inhibée par des concentrations en KCl supérieures à 0,05 M.

R - INCORPORATION DE 5-BROMODEOXYURIDINE (Brdu) DANS LE DNA

Les cellules KB ont été infectées par des Adénovirions radioactifs. Au temps indiqué dans le texte, on ajoute la 5-fluorodéoxyuridine (Fdu) (Sigma Chemical Co.) à la concentration finale de  $5 \cdot 10^{-6}$  M pour inhiber la thymidilate synthétase. Après 30 minutes, on ajoute la 5-bromodéoxyuridine (Brdu) (Sigma Chemical Co.) à la concentration finale de  $10^{-5}$  M. La Brdu est incorporée à la place de la thymidine entraînant une augmentation de la densité du DNA nouvellement synthétisé. Cette propriété du DNA nouvellement synthétisé en présence de Brdu permet de le séparer du DNA parental par centrifugation à l'équilibre de densité en gradient de CsCl-GuHCl à condition d'augmenter la densité de la solution de départ : 3,250 M en CsCl.

RESULTATS



1er CHAPITRE : LE DNA PARENTAL VIRAL INTRANUCLEAIRE A-T'IL UNE ORGANISATION SEMBLABLE A LA CHROMATINE CELLULAIRE ?

A - CHOIX D'UNE METHODE DE PREPARATION DES NOYAUX DE CELLULES KB CONTENANT LE DNA PARENTAL VIRAL

Le but des expériences que nous allons décrire a été de déterminer l'organisation du génome viral parental à l'intérieur du noyau de la cellule hôte, au moment précoce du cycle lytique, et de suivre le devenir de ces molécules jusqu'au début du stade tardif, i.e., après le début de la réplication du DNA viral.

Comme première étape, nous nous sommes fixés de trouver une méthode d'isolement des noyaux la plus compatible avec le but à atteindre. A cet effet, nous avons établi une liste de critères à respecter. Nous savions déjà, grâce aux travaux dont les résultats sont décrits dans la première partie, qu'il n'existe pas de méthode de préparation des noyaux permettant d'éviter les fuites de matériel nucléaire vers la fraction cytoplasmique. Toutefois, il nous fallait des noyaux intacts, ayant perdu le moins possible de leur contenu et débarrassés de toute contamination cytoplasmique. En outre, les conditions d'isolement des noyaux devaient être telles que la structure nucléosomique de la chromatine cellulaire restât intacte et qu'il n'y ait pas de possibilité d'échange entre les protéines nucléaires et le DNA viral infectieux.

Comme l'a observé HANKOK, 1976 (45), le traitement des noyaux par un tampon de basse force ionique contenant un détergent non ionique (NP 40) permet d'isoler la chromatine dans sa forme native, sans qu'il y ait association non spécifique de protéines additionnelles présentes dans le noyau. Les structures nucléaires préparées de cette façon étant assez fragiles, nous avons décidé d'inclure dans le tampon du saccharose pour fournir un support osmotique et du  $\text{CaCl}_2$  pour protéger la structure de la membrane nucléaire. La procédure et les tampons que nous avons choisis sont décrits dans la méthode 3 page 96. Afin d'être sûr que les noyaux préparés par la méthode 3 répondraient aux normes que nous nous étions fixées, nous les avons comparé à des noyaux préparés par des méthodes éprouvées utilisant :

1) un tampon isotonique (méthode 1 page 96) (WILHEM et al., 1976, (137) et décrite comme limitant la fuite de DNA viral intranucléaire vers la fraction cytoplasmique ;

2) un tampon hypotonique (méthode 2 page 96) décrite comme donnant des noyaux intacts dépourvus de contamination cytoplasmique mais favorisant d'une manière très variable la fuite de DNA viral intranucléaire vers la fraction cytoplasmique (WILHEM et al., 1976 (137)).

Afin d'obtenir des résultats comparables, nous avons infecté une suspension de cellules KB (m.o.i. 100) avec des  $^{32}\text{P}$ -Adénovirions (1.332.000 cpm par  $\mu\text{g}$  de DNA). Trois heures après le début de l'infection, nous avons divisé la suspension cellulaire en trois et préparé les noyaux par les méthodes 1, 2 et 3.

La distribution de la radioactivité dans les différentes fractions obtenues durant le fractionnement cellulaire est détaillée dans le tableau 11 p. 109. Il est clair que les résultats obtenus par chacune des trois méthodes sont très semblables. Il faut noter que les lavages des noyaux dans la méthode 3 ne contiennent au total qu'environ 5 % de la radioactivité de départ, ce qui suggère que la fuite de matériel nucléaire est limitée. Nous avons exprimé ces résultats en nombre de génomes viraux dans le tableau 12 p. 110, connaissant la radioactivité spécifique du génome viral (1.332.300 cpm/ $\mu\text{g}$  de DNA) et considérant qu'il y a  $2.6 \times 10^{10}$  génomes par  $\mu\text{g}$  de DNA viral.

Enfin, nous avons encore comparé les trois méthodes en déterminant la quantité de RNA viral synthétisé par les noyaux in vitro (tableau 12 p. 110). L'ensemble des résultats obtenus nous a conduit à considérer la méthode 3 comme compatible avec les normes que nous nous étions fixées, en ce que les noyaux obtenus ne différaient pas par leurs propriétés des noyaux obtenus par des méthodes éprouvées. Toutefois, il nous restait à vérifier si la présence de calcium dans les tampons pouvait être responsable d'une adsorption non spécifique du DNA viral ou des particules virales sur la membrane nucléaire. Nous avons mélangé à deux lysats de cellules KB provenant de 200 ml de culture d'une part, du  $^{32}\text{P}$ -Ad2 DNA, et d'autre part, des  $^{32}\text{P}$ -Adénovirions, de façon à ce que la radioactivité ajoutée soit identique à celle ajoutée aux cellules in vivo. La radioactivité  $^{32}\text{P}$  retrouvée dans les différentes fractions nous a permis de calculer qu'environ 0,10 % des particules

TABLEAU N° 11

DISTRIBUTION DE LA RADIOACTIVITE <sup>32</sup>P DANS LES FRACTIONS  
OBTENUES DURANT LE FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

	Methode I		Methode II		Methode III	
	cpm CERENKOV	% du total	cpm CERENKOV	% du total	cpm CERENKOV	% du total
Milieu de culture	5.800 000		5.800 000		5.800 000	
1er lavage des cellules par PBS	620.000		620.000		620.000	
2ème lavage des cellules par PBS	207.491		197.213		209.156	
Fraction cytoplasmique	6.488.563		5.990.625		5.320.641	
1er lavage des noyaux avec NP40					268.200	} 5%
2ème lavage des noyaux avec NP40					406.000	
1er lavage des noyaux sans NP40	101.615		97.874		161.900	
2ème lavage des noyaux sans NP40					13.000	
Noyaux	2.343.066	15%	3.604.35	22%	3.008.865	19%
Total	15.560.735	100%	16.310.018	100%	15.807.762	



TABLEAU N° 12

ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE IN VITRO DES NOYAUX PREPARES  
PAR LES METHODES I,II et III

methode de preparation des noyaux	DNA viral intranucleaire		<sup>3</sup> H-UTP incorporé (cpm par 10 <sup>8</sup> cellules)	% d'hybridation du du <sup>3</sup> H-RNA au DNA d'Adenovirus 2
	genomes par noyaux	% de l'inoculum		
Methode I	500	15%	423,000	1.90%
Methode II	700	22%	490,000	2.60%
Methode III	600	19%	327,000	3.00%



virales ou du DNA exogène restaient associées avec la fraction nucléaire en fin de purification, ce qui nous a paru tout à fait satisfaisant (tableau 13 p. 112).

Nous avons donc adopté dans la suite de notre travail le schéma de purification 3 décrit page 96.

## B - ANALYSE DU DNA PARENTAL INTRANUCLEAIRE PAR CENTRIFUGATION A L'EQUILIBRE EN GRADIENT DE CsCl

Sachant que les noyaux des cellules KB infectées contiennent 14 à 21 % de la radioactivité présente dans l'inoculum, il fallait vérifier que cette radioactivité était liée uniquement au DNA viral. Nous avons donc analysé par centrifugation en gradient de CsCl le DNA contenu dans les noyaux purifiés (fig. 35 p. 113). Plus de 95 % de la radioactivité  $^{32}\text{P}$  s'équilibre à la densité du DNA viral 1.714 g/cc (fig. 35-A p. 113). Puisque moins de 5 % de la radioactivité  $^{32}\text{P}$  a la densité du DNA cellulaire, cela représente la limite supérieure de la quantité de DNA viral qui pourrait être intégré de façon covalente dans le génome de la cellule (SCHIK et al., 1976 (98), ou piégé par le matériel cellulaire durant la centrifugation. Alternativement, ces 5 % pourraient représenter les  $^{32}\text{P}$ -nucléotides réincorporés dans le DNA cellulaire après dégradation d'une certaine proportion de DNA viral lors du processus infectieux. Cependant, il nous semble que ces 5 % représentent plutôt un piègeage ("trapping") banal d'une petite quantité de DNA viral lors de la centrifugation. En effet, lorsque l'on augmente la quantité de DNA dans les gradients de CsCl (fig. 35-B et C p. 113) la radioactivité  $^{32}\text{P}$  retrouvée à la densité du DNA cellulaire augmente jusqu'à atteindre 21 % lorsque le gradient est surchargé (fig. 35-C p. 113). Enfin, il paraît peu probable qu'après 3 heures d'infection, le DNA viral infectieux soit dégradé puisque GRONEBERG et al., 1975 (43) et VLAK et al., 1976 (122) ont montré que le DNA parental infectieux isolé des noyaux et du cytoplasme de la cellule hôte, 24 heures après le début du cycle infectieux, était intact puisqu'il cosédimentait avec le marqueur 34 S. Toutefois, il nous fallait confirmer ce résultat.

## C - DETERMINATION DE L'INTEGRITE DU DNA PARENTAL INTRANUCLEAIRE INFECTIEUX PAR DIGESTION AVEC L'ENZYME DE RESTRICTION Endo. R. Eco RI

TABLEAU N° 13

DISTRIBUTION DE LA RADIOACTIVITE  $^{32}\text{P}$  DANS LES FRACTIONS  
SUBCELLULAIRES OBTENUES PAR LA METHODE III

	$^{32}\text{P}$ virions		$^{32}\text{P}$ DNA	
	cpm CERENKOV	% Total	cpm CERENKOV	% Total
milieu de culture + lavages au PBS + fraction cytoplasmique	1.339.348		1.436.955	
1er lavage des noyaux par NP40	9409		14865	
2ème lavage des noyaux par NP40	333		2625	
3ème lavage des noyaux par NP40	155		4283	
1er lavage des noyaux sans NP40	124		2638	
2ème lavage des noyaux sans NP40	76		2978	
Noyaux	1256	0.09%	2093	0.14%
Total	1.350.585	100 %	1.466.437	100%



Figure N° 35

Analyse par centrifugation en gradient de CsCl du  $^{32}\text{P}$ -DNA parental viral intranucléaire.

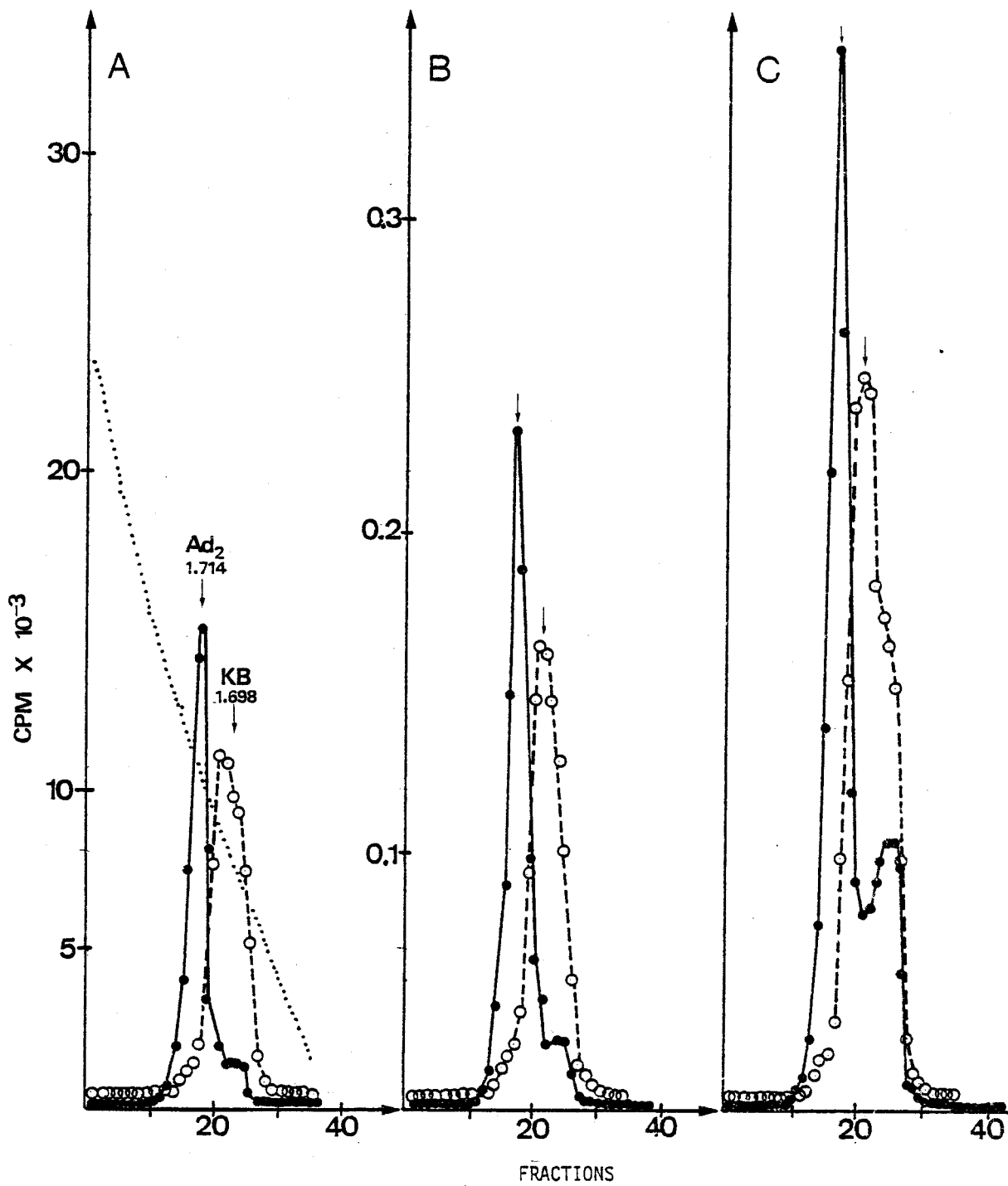
30  $\mu\text{g}$  (A)

60  $\mu\text{g}$  (B)

120  $\mu\text{g}$  (C)

du DNA nucléaire préparés 3 heures après le début de l'infection ont été centrifugés à l'équilibre dans des gradients de 10 ml (100 000 x g, 69 h, 15°C).

●—● radioactivité  $^{32}\text{P}$   
○—○ O.D. à 260 nm



BUS  
LILLE



La progression logique de notre travail nécessitait de déterminer l'intégrité des molécules de DNA parental infectieux intranucléaire. Plutôt que l'analyse par centrifugation en gradient de saccharose alcalin, nous avons choisi de digérer par Endo. R. Eco RI le DNA viral purifié des noyaux isolés et d'analyser les fragments de DNA produits par électrophorèse en gel d'agarose.

Cette méthode ne nous permet pas de dire si le DNA contient des coupures monocaténares ou des brèches, ou encore des régions partiellement dénaturées, mais elle est tout à fait satisfaisante pour ce que nous voulons démontrer.

Le profil électrophorétique obtenu nous a paru satisfaisant (fig. 36 p. 115). Nous avons obtenu les six fragments Eco RI caractéristiques (MULDER et al., 1974 (74)), et la quantification des résultats indique que plus de 95 % du DNA parental intranucléaire est intact. En outre, les fragments de DNA cellulaire étant largement en excès puisque nous avons digéré le DNA isolé des noyaux, le fond de radioactivité indique qu'il n'y a pas eu de réincorporation de  $^{32}\text{P}$  dans le DNA cellulaire. Une radioactivité  $^{32}\text{P}$  due au DNA cellulaire donnerait un profil semblable à celui présenté dans la figure 37 page 116.

A ce stade du développement des expériences, nous savions que 14 à 21 % de la radioactivité présents dans l'inoculum se retrouvaient dans les noyaux des cellules infectées. La majorité (95 %) de cette radioactivité s'équilibre à la densité du DNA viral en gradient de CsCl et représente des molécules intactes. Nous avons donc poursuivi par l'étude de l'organisation de ces molécules.

#### D - CINÉTIQUE DE DIGESTION DU DNA D'ADENOVIRUS 2 INTRANUCLÉAIRE PAR LA NUCLEASE MICROCOCCALE

Une des propriétés caractéristiques de l'organisation nucléosomique de la chromatine est la cinétique de digestion par la nucléase micrococcale. Lorsque l'on digère les noyaux isolés ou la chromatine de cellules eucaryotes par la nucléase micrococcale, la quantité de DNA rendue acido-soluble est d'abord proportionnelle au temps de digestion, et graduellement atteint un plateau lorsque 50 % (AXEL, 1975 (5)) ou 75 % (COMPTON et al., 1976 (21)) du DNA a été digéré. Cette différence entre les résultats publiés par différents auteurs réside dans la méthode utilisée pour quantifier

Figure N° 36

Détermination de l'intégrité du  $^{32}\text{P}$ -DNA viral parental intranucléaire par digestion avec l'enzyme de restriction Endo. Eco RI.

50  $\mu\text{g}$  de DNA nucléaire déprotéinisé ont été digérés par Endo. R. Eco RI. et les fragments séparés par électrophorèse en gel d'agarose 1 %.

A - Photographie des gels cylindriques contenant les marqueurs Endo. R. Eco RI, A, B, C, D, E, F obtenus après digestion du DNA d'Adénovirus 2 non radioactif par Endo. R. Eco RI.

B - Radioactivité contenue dans les gels.

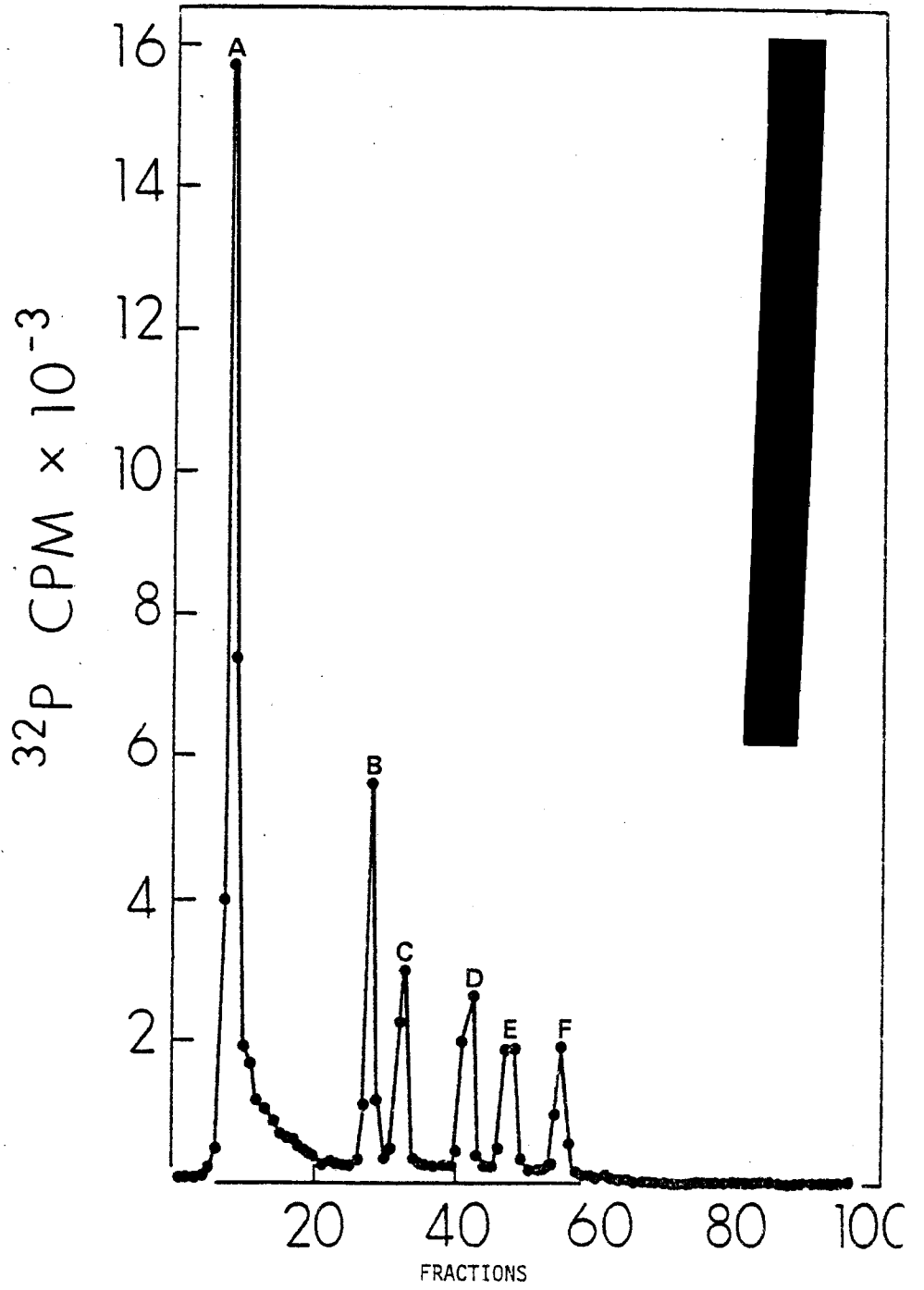


Figure N° 35

Analyse par centrifugation en gradient de CsCl du  $^{32}\text{P}$ -DNA parental viral intranucléaire.

30  $\mu\text{g}$  (A)

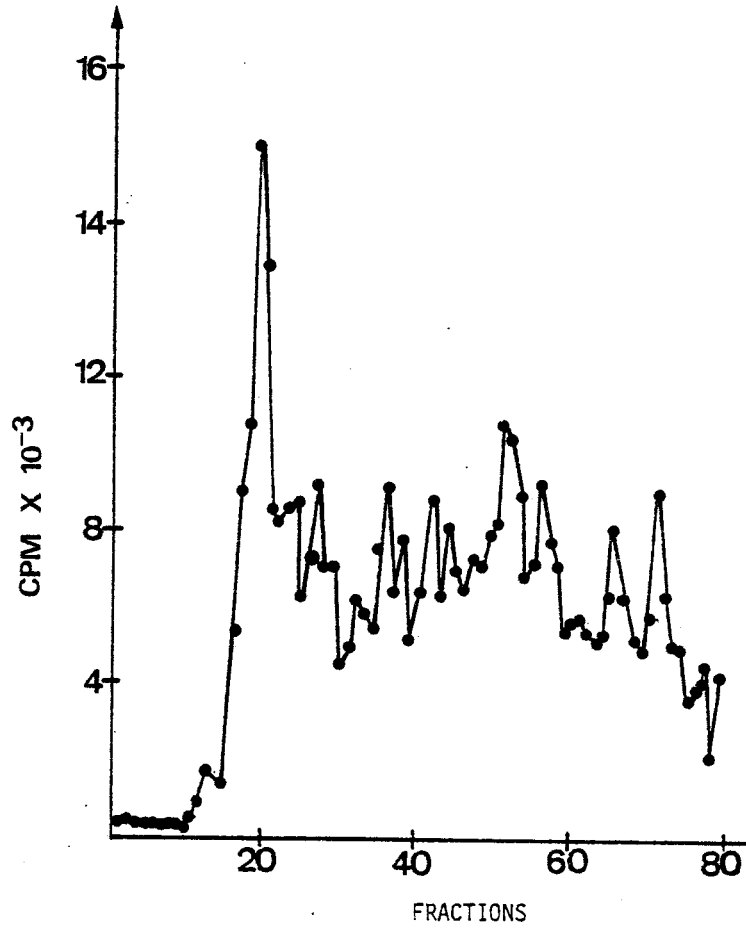
60  $\mu\text{g}$  (B)

120  $\mu\text{g}$  (C)

du DNA nucléaire préparés 3 heures après le début de l'infection ont été centrifugés à l'équilibre dans des gradients de 10 ml (100 000 x g, 69 h, 15°C).

●—● radioactivité  $^{32}\text{P}$

○—○ O.D. à 260 nm



le DNA rendu acido-soluble. Lorsque la mesure est faite en lisant la densité optique, les auteurs trouvent un plateau à 50 % de digestion. Par contre, lorsque la mesure est faite en déterminant la radioactivité acido-soluble après marquage du DNA cellulaire par la thymidine tritiée, le plateau se trouve à 75 %. Cette différence est due à la présence de produits nucléaires interférant dans la lecture de la densité optique à 260 nm (SMELDON et al., 1978 (109)).

Nous avons tracé la cinétique de digestion du  $^{32}\text{P}$ -DNA viral intranucléaire par la nucléase micrococcale. Elle est similaire à celle de la chromatine cellulaire avec un plateau lorsque 60 % de la radioactivité  $^{32}\text{P}$  a été rendue acido-soluble (fig. 38 p. 118). Comme contrôle, nous avons tracé la cinétique de digestion de  $^{32}\text{P}$ -DNA extrait de virions et mélangé à des noyaux isolés de cellules non infectées (fig. 38 p. 118). Après 30 secondes de digestion, 55 % du  $^{32}\text{P}$ -DNA viral exogène étaient acido-solubles comparés à 5 % seulement du DNA viral intranucléaire. Au moment où la digestion du DNA intranucléaire atteint un plateau à environ 68 % de digestion, le DNA exogène est digéré à plus de 90 %. Dans aucune des expériences nous n'avons pu obtenir plus de 95 % de digestion du  $^{32}\text{P}$ -DNA viral exogène. Nous expliquons ce résultat de la manière suivante. La radioactivité restant acido-précipitable (5 %), étant associée à des molécules de petite taille (probablement inférieure à 10 nucléotides - voir fig. 39 p. 119), ces 5 % représentent le fond de radioactivité dû au piègeage par le matériel nucléaire lors de la précipitation acide des aliquotes.

Il fallait être sûr que la digestion plus rapide du  $^{32}\text{P}$ -DNA viral exogène, comparée à la digestion du DNA viral intranucléaire, était due à une différence structurale et non pas à une différence d'accessibilité géographique. Pour ce faire, nous avons préparé la chromatine native à partir de noyaux isolés de cellules non infectées, et mélangé cette chromatine à du  $^{32}\text{P}$ -DNA viral déprotéinisé, de façon à englober le DNA viral exogène dans la chromatine lors de l'addition de  $\text{CaCl}_2$  au moment de la digestion enzymatique. Comme attendu, la cinétique de digestion du DNA viral exogène (fig. 38 p. 118) est superposable aux deux autres cinétiques. De plus, nous avons vérifié la taille des fragments de DNA portant la radioactivité résiduelle par électrophorèse en gel d'agarose (fig. 39 p. 119), et conclu qu'ils avaient une taille nettement inférieure à la bande de DNA cellulaire nucléosomique de 140 paires de bases.

Figure N° 38

Cinétiques de digestion par la nucléase micrococcale du  $^{32}\text{P}$ -DNA viral parental dans les noyaux purifiés.

- $^{32}\text{P}$ -DNA viral infectieux intranucléaire
- $^{32}\text{P}$  Ad<sub>2</sub> DNA déprotéinisé ajouté à des noyaux isolés de cellules non infectées
- $^{32}\text{P}$  Ad<sub>2</sub> DNA déprotéinisé ajouté à de la chromatine isolée de noyaux purifiés de cellules non infectées

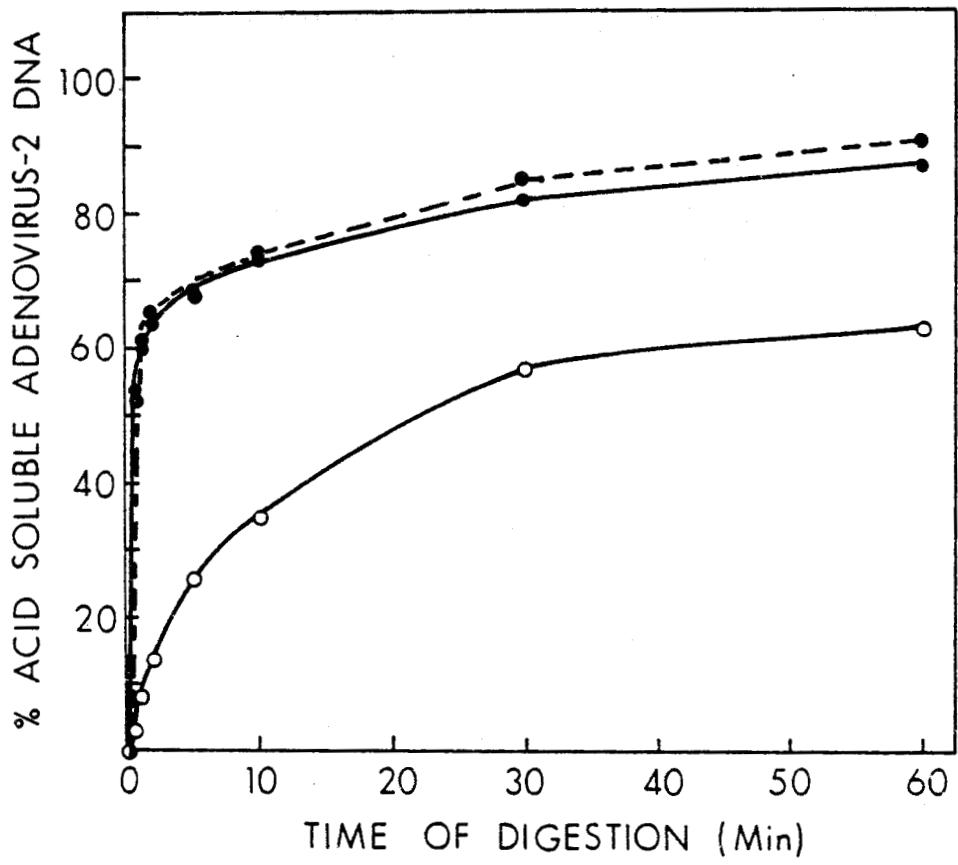




Figure N° 39

Taille des fragments du  $^{32}\text{P}$ -DNA viral déprotéinisé  
mélangé à de la chromatine et digérés par la nucléase  
micrococcale.

M, D, T : monomère, dimère et trimère de DNA nucléosomique  
de taille 200, 400 et 600 paires de bases  
approximativement

0, 1, 2, 5, 10 et 30 minutes de digestion respectivement.  
Aux aliquotes 0 et 30 ont été ajouté les fragments  
Endo. R. SmaI du  $^{32}\text{P}$ -DNA d'Adénovirus 2.

0

1

2

5

10

30



I

T

D

M



## E - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES FRAGMENTS DE DNA

Comme nous l'avons écrit page 18, les fragments de DNA acido-précipitables, produits lors de la digestion des noyaux par la nucléase micrococcalle, sont des multiples entiers d'une unité structurale d'environ 200 paires de bases, correspondant au nucléosome.

Ces fragments sont parfaitement séparés par électrophorèse en gel d'agarose. Nous avons analysé et comparé la taille des fragments de DNA cellulaire et de DNA viral obtenus après digestion des noyaux isolés de cellules infectées. Dans cette expérience, nous avons utilisé des cellules KB dont le DNA avait été rendu radioactif par incorporation de thymidine tritiée, et infecté ces cellules par des  $^{32}\text{P}$ -Adénovirions. A différents temps de la cinétique de digestion, nous avons purifié les fragments de DNA et nous avons analysé leur taille par électrophorèse en gel d'agarose (fig. 40 p. 121).

Après électrophorèse, les fragments de DNA ayant migré dans le gel ont été mis en évidence par différentes méthodes. D'abord les fragments de DNA cellulaire ont été visualisés en présence de bromure d'éthidium sous lumière ultraviolette (fig. 40-A p. 121). La photographie du gel et l'enregistrement de la densité optique à 600 nm des différentes pistes du gel montrent qu'une digestion limitée des noyaux (fig. 40-Aa) entraîne la libération d'une série de fragments de DNA dont la taille correspond à un multiple entier d'un morceau de DNA comparable en taille au fragment Endo. R. SmaI-M du DNA d'Adénovirus 2. Ce fragment M a une taille d'environ 200 paires de bases (Mc Grogan et RASKAS, communication personnelle).

Lorsque le temps de digestion augmente (fig. 40-Aabc), la quantité relative d'oligomères et de monomères augmente aux dépens du DNA de haut poids moléculaire. En outre, lorsque la cinétique de digestion atteint le plateau (fig. 40-Ad), pratiquement tout le DNA résistant à la digestion enzymatique migre dans le gel en une bande correspondant à des molécules dont la taille est d'environ 140 paires de bases. Il est intéressant de noter que durant la digestion enzymatique, la taille moyenne des oligomères et des monomères diminue. Ceci est dû à la digestion progressive des fragments de DNA en position externe. Enfin, comme l'on montré aussi différents auteurs (COMPTON et al., 1976 (21)), une série de

Figure N° 40

Séparation par électrophorèse en gel d'agarose 2 % des fragments de DNA produits lors de la digestion par la nucléase micrococcalle des noyaux purifiés à la 3ème heure des cellules infectées par des  $^{32}\text{P}$ -Adénovirions.

A - Fragments de DNA cellulaire

M, D, T, t, P : monomère, dimère, trimère, tétramère  
et pentamère de DNA nucléosomique

B - Fragments de  $^3\text{H}$ -DNA cellulaire      O—O  
et de  $^{32}\text{P}$ -DNA viral                    ●—●

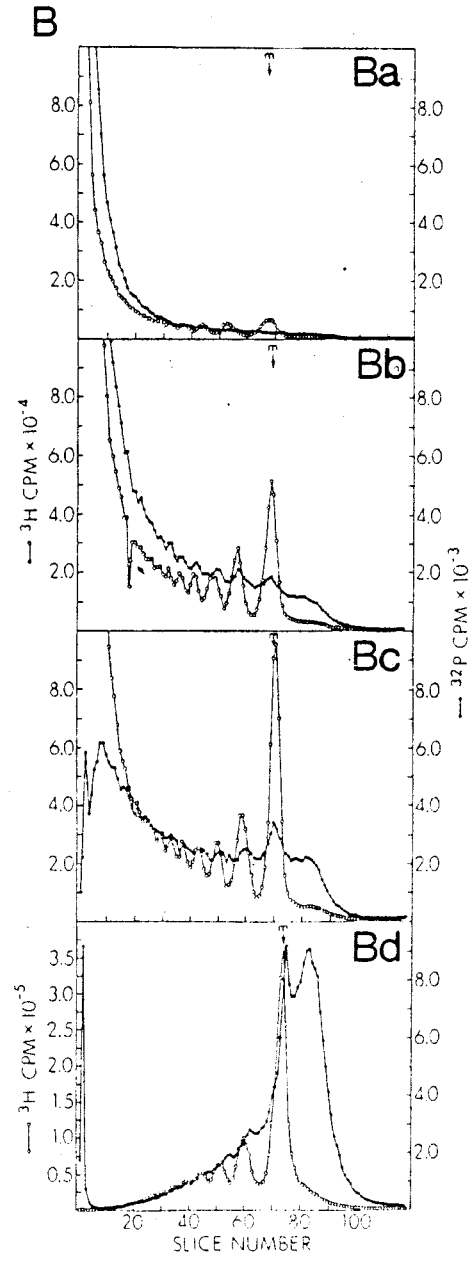
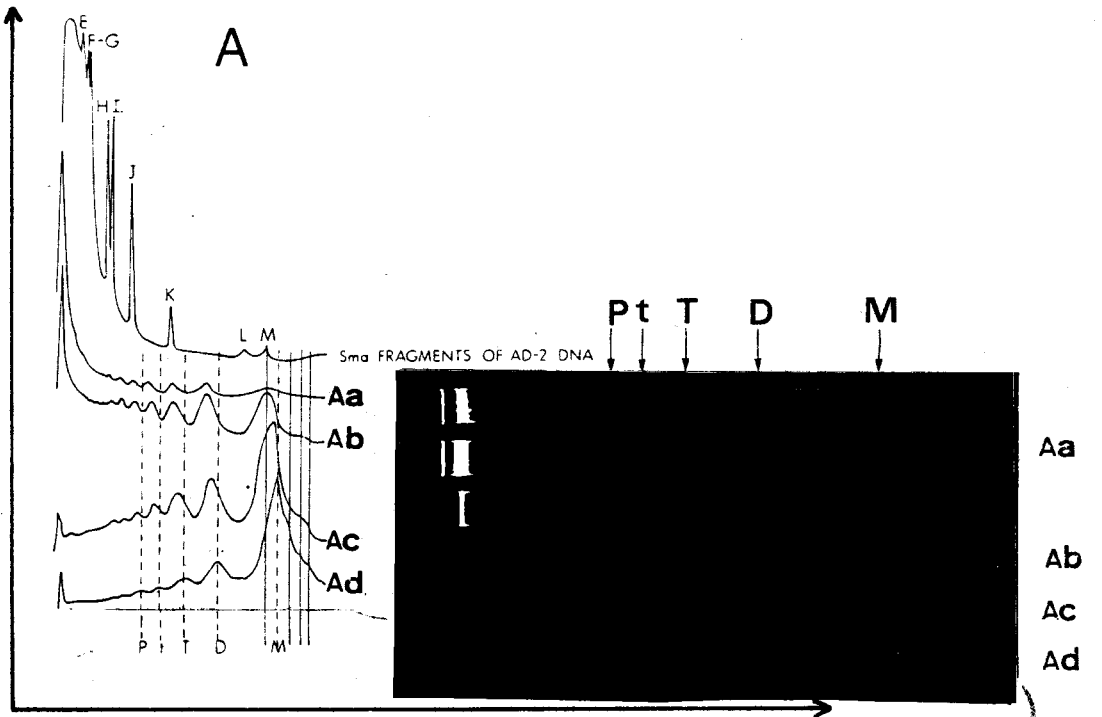
m : monomère de DNA nucléosomique cellulaire  
(200 paires de bases)

Ba 1 minute de digestion, 1 % de DNA acido-soluble

Bb 3 minutes de digestion, 10 % de DNA acido-soluble

Bc 5 minutes de digestion, 15 % de DNA acido-soluble

Bd 15 minutes de digestion, 20 % de DNA acido-soluble



fragments de DNA dont la taille est plus petite que la taille du monomère (lignes verticales continues) apparaissent lorsque l'enzyme digère le DNA à l'intérieur du nucléoïde.

L'ensemble des résultats décrits ci-dessus est similaire aux résultats décrits par d'autres dans des systèmes cellulaires différents.

Nous avons démontré que cette expérience était concluante quant aux résultats obtenus avec le DNA cellulaire. Il nous fallait maintenant analyser les fragments de  $^{32}\text{P}$ -DNA viral contenus dans le gel et les comparer aux fragments de  $^3\text{H}$ -DNA cellulaire. Dans ce but, nous avons séparé chaque piste du gel et découpé les bandes obtenues en fractions égales de 1 mm et déterminé la radioactivité  $^{32}\text{P}$  et la radioactivité  $^3\text{H}$ , contenue dans chaque tranche de gel (fig. 40-B p. 121). Les profils de radioactivité obtenus sont pratiquement superposables, démontrant que le DNA parental viral présent à l'intérieur du noyau de la cellule hôte 3 heures après le début de l'infection est protégé, au moins en partie, d'une manière identique au DNA cellulaire contre la digestion par la nucléase micrococciale.

Afin de comparer plus avant les fragments de DNA obtenus après digestion des noyaux isolés de cellules infectées, nous avons séparé par électrophorèse en gel de polyacrylamide 6 % (fig. 41 p. 123), les fragments de DNA présents dans l'hydrolysât au moment où la cinétique de digestion s'est stabilisée au plateau. Plusieurs fragments de DNA cellulaire (fig. 41-A) et viral (fig. 41-B) plus petits que le monomère, sont séparés dans ces conditions expérimentales des monomères et oligomères. Cependant, il faut noter certaines différences quantitatives. D'abord la quantité relative aux monomères des petits fragments de DNA diffère en A et B. Ensuite, une quantité non négligeable de radioactivité migre à l'extrémité du gel, radioactivité que nous n'avons pas identifiée.

Cependant, ces résultats suggèrent fortement qu'il existe des sites spécifiques de digestion par la nucléase micrococciale sur le DNA viral, identiques à ceux présents dans le nucléoïde des nucléosomes de la cellule hôte. Peut-on conclure que le DNA viral parental nucléaire est protégé par des protéines d'une façon similaire à la chromatine, en unités répétitives fonctionnelles dont l'organisation est proche des nucléosomes cellulaires ? Ces résultats ajoutés à ceux des expériences décrites ci-après nous incitent à le croire.

Figure N° 41

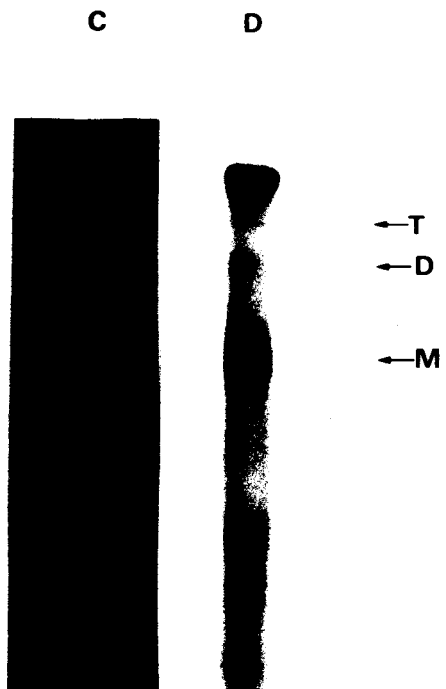
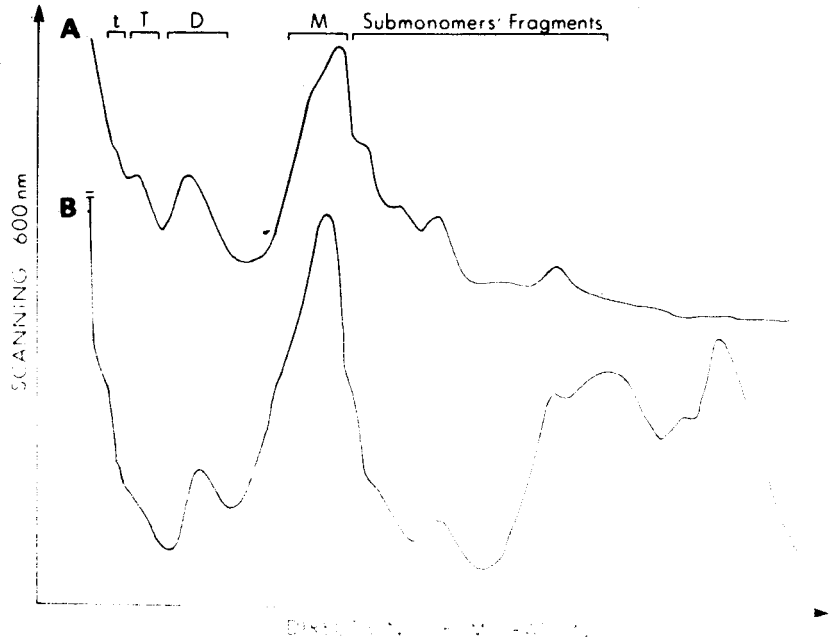
Séparation par électrophorèse en gel d'acrylamide 6 % des fragments de DNA produits lors de la digestion limitée des noyaux des cellules infectées par la nucléase micrococciale.

A - Tracé densitométrique (560 nm) du gel C montrant les fragments de DNA cellulaire

B - Tracé densitométrique (560 nm) de l'autoradiogramme D du gel C montrant les fragments de  $^{32}\text{P}$ -DNA viral

M, D, T : monomère, dimère et trimère de DNA nucléosomique





BIS  
LIFE



F - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES DESOXYRIBONUCLEOPROTEINES  
LIBEREES APRES DIGESTION DES NOYAUX PAR LA NUCLEASE  
MICROCOCCALE

Les nucléosomes cellulaires formés par l'association de deux copies de chacune des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4, et d'un fragment de DNA d'environ 200 paires de bases peuvent être séparés sous forme de monomères, oligomères et multimères par électrophorèse sur gel composite d'agarose 0,5 % acrylamide 3 % (voir matériel et méthode page 100). De la même façon, si notre hypothèse est juste, nous devrions pouvoir séparer les unités structurales virales sous forme de DNP, puisqu'elles semblent être très similaires aux nucléosomes cellulaires.

1 - MISE AU POINT TECHNOLOGIQUE

La préparation des nucléosomes et de leurs multiples nécessite premièrement la digestion des noyaux purifiés par la nucléase micrococcale. A différents temps dans la cinétique de digestion, des aliquotes de noyaux sont prélevées et ajustées à une concentration de 0,01 M en EDTA, et abandonnées 60 minutes à 0°C. Ce traitement a pour effet de lyser les noyaux et de permettre de récupérer les nucléosomes et leurs multiples dans le surnageant de centrifugation (10 minutes, 10 000 x g, 4°C). Nous avons voulu vérifier la répartition du matériel nucléaire dans le culot (C) et le surnageant de centrifugation (S) dans les aliquotes obtenues lors de la digestion des noyaux isolés de cellules infectées par des <sup>32</sup>P-Adénovirions. Le tableau 14 page 125 donne la répartition de la radioactivité dans les fractions C et S à différents temps de la cinétique de digestion. Si l'on trace la courbe en pourcentage de matériel radioactif libéré dans la fraction S (fig. 42 p. 126), on s'aperçoit que la courbe ressemble, quantitativement, à la cinétique de digestion obtenue par la méthode de précipitation acide décrite page 117. Toutefois, qualitativement, elle est totalement différente. Si nous déterminons la radioactivité acido-soluble et la radioactivité acido-précipitable contenues dans les fractions C et S (tableau 14 page 125), nous voyons que la radioactivité acido-soluble dans le culot (C) est pratiquement constante tout au long de la digestion, alors que la radioactivité acido-précipitable diminue progressivement pour finalement atteindre un plateau. Ce résultat est compatible avec la libération progressive de matériel vers la fraction S au cours de la digestion. Par contre,

TABLEAU N° 14

Temps de digestion minutes	Culot (C) (cpm CERENKOV)			Surnageant (S) (cpm CERENKOV)		
	total	CS	CP	total	SS	SP
0	28930	3500	25430	1100	1060	40
0.5	28336	3895	24441	4282	1613	2749
1	28949	4300	29649	7951	2596	5355
2	22052	4144	17908	12963	4412	8551
5	11766	3306	8460	19109	8312	10747
10	13824	3615	10209	20106	11273	8833
36	12547	3059	8488	18770	16510	2260
60	11886	3649	8237	20783	19967	816

CS : Radioactivité acido soluble dans le culot C

CP : Radioactivité acido précipitable dans le culot C

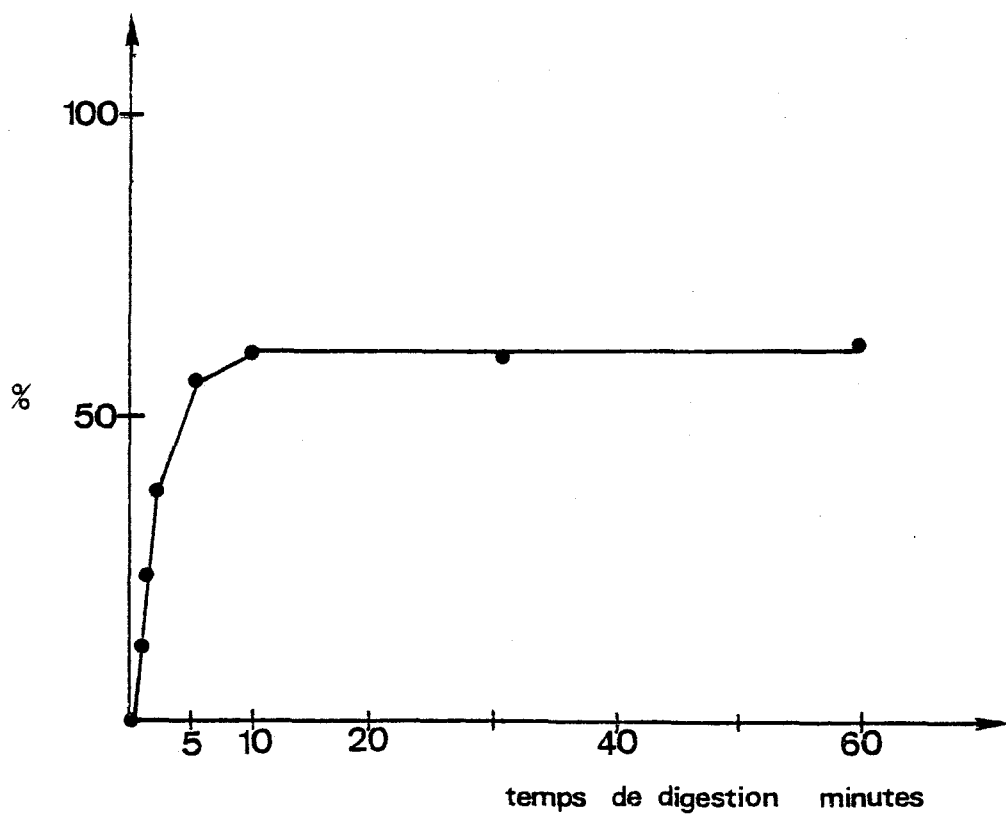
SS : Radioactivité acido soluble dans le surnageant S

SP : Radioactivité acido précipitable dans le surnageant S



Figure N° 42

Pourcentage de la radioactivité libérée dans la fraction S.



dans la fraction S, la radioactivité acido-soluble augmente tout au long de la digestion et la radioactivité acido-précipitable commence par augmenter pour atteindre un maximum après 5 minutes de digestion, puis diminue progressivement jusqu'à atteindre la valeur zéro en fin de digestion. Il fallait savoir à quoi correspondait, en terme de DNA, ce que contenaient les fractions C et S à différents temps de la cinétique de digestion. Nous avons donc analysé par électrophorèse en gel composite d'agarose-acrylamide, le DNA contenu dans les fractions C et S aux temps de la cinétique indiqués dans la légende de la figure 43 page 128. Les résultats que nous avons obtenus confirment ceux décrits plus haut. Dans le cas du matériel cellulaire (fig. 43-A), jusque 30 minutes, la fraction C ne contient que du DNA de haut poids moléculaire mais pas de polymères de DNA nucléosomique. Cependant, la fraction S contient tout le DNA nucléosomique. Après 30 minutes, la fraction C contient tout le DNA.

Le matériel viral intranucléaire a été visualisé par autoradiographie (fig. 43-B). Les résultats obtenus sont identiques à ceux obtenus avec le matériel de la cellule hôte. On peut conclure de ces expériences que, lorsque la nucléase micrococcalle attaque l'intérieur des nucléosomes, ceux-ci précipitent en présence d'EDTA. Cette conclusion est fondée sur l'observation suivante : la totalité du DNA nucléosomique précipite lorsque apparaissent les bandes de DNA migrant plus vite que l'unité structurale d'environ 200 paires de bases et uniquement en présence d'EDTA. D'autre part, et ceci nous semble très encourageant, les fragments de DNA viral sont distribués de façon identique aux fragments de DNA cellulaire dans les fractions C et S, et, ont un comportement identique au matériel cellulaire, ce qui constitue un nouvel indice tendant à prouver l'organisation "nucléosomique" du DNA parental viral in vivo.

## 2 - RESULTATS

Nous avons donc analysé sur gel composite d'agarose-acrylamide les DNP libérées lors de la digestion par la nucléase micrococcalle des noyaux isolés de cellules infectées. Les monomères, dimères et trimères de nucléosomes cellulaires sont notés sur la figure Mc, Dc et Tc. L'autoradiogramme du gel (fig. 44 p. 129) montre clairement la présence de bandes radioactives, les bandes dimères et trimères virales (D<sub>V</sub> et T<sub>V</sub>) migrant plus rapidement que les bandes de DNP cellulaires correspondantes (D<sub>C</sub> et T<sub>C</sub>).

Figure N° 43

Analyse par électrophorèse en gel d'agarose 0,5 %, acrylamide 2 %, des fragments de DNA libérés dans les fractions C et S lors de la digestion des noyaux isolés des cellules infectées (3 H P.I.) par la nucléase micrococcale.

A - Fragments de DNA cellulaire

B - Fragments de DNA viral (autoradiographie du gel A)

M, D, T, t : monomère, dimère, trimère, tétramère de  
DNA nucléosomique cellulaire

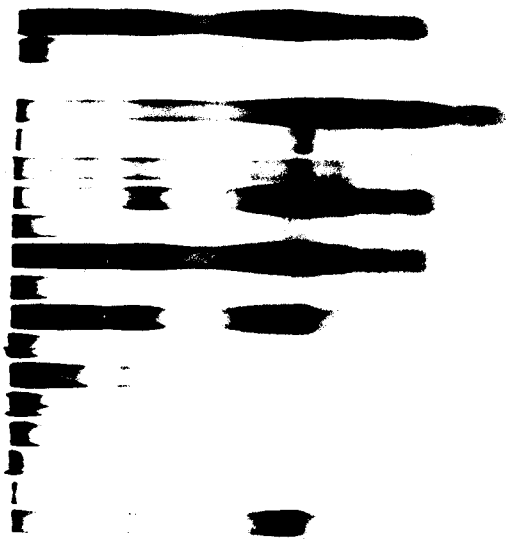
0, 1, 2, 5, 10, 30, 60 minutes de digestion

C = culot

S = surnageant



0 1 2 5 10 30 60  
C S C S C S C S C S C



A

0 1 2 5 10 30 60  
C S C S C S C S C S C



B



Figure N° 44

Analyse électrophorétique des DNP libérées après digestion par la nucléase micrococcalle des noyaux des cellules infectées.

Des cellules KB ont été infectées par des  $^3\text{H}$ -thymidine Adénovirions 2 (3 000 particules/cellule).

Les noyaux ont été préparés et digérés comme décrit dans matériel et méthode.

Les DNP ont été séparées en gel composite 0,5 % agarose, 3,5 % acrylamide.

Mc, Mv, Dc, Dv, Tc, Tv : monomères, dimères et trimères de nucléosome, cellulaire et viral





-T<sub>c</sub>

T<sub>v</sub><sup>-</sup>

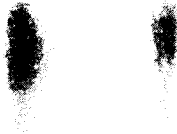


-D<sub>c</sub>

D<sub>v</sub><sup>-</sup>



M<sub>v</sub><sup>-</sup>



-M<sub>c</sub>



Nous avons montré la similitude de comportement de la chromatine cellulaire et du DNA parental intranucléaire vis à vis de la nucléase micrococcalle. Cette similitude nous a conduit tout naturellement à penser que le DNA viral parental était organisé in vivo, d'une manière identique à la chromatine cellulaire. Cependant, il restait de nombreux points à éclaircir.

G - LES "NUCLEOSOMES" VIRAUX SONT-ILS DUS A UNE ASSOCIATION NON SPECIFIQUE DE PROTEINES NUCLEAIRES AVEC LE DNA VIRAL DURANT LA DIGESTION ENZYMATIQUE DES NOYAUX ?  
ALTERNATIVEMENT, L'IDENTITE DES PROFILS ELECTROPHORETIQUES EST-ELLE DUE A UN PIEGEAGE DE MATERIEL RADIOACTIF PAR LE MATERIEL CELLULAIRE PRESENT EN LARGE EXCES ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons mélangé du  $^{32}\text{P}$ -DNA viral déprotéinisé à des noyaux isolés de cellules non infectées ou à de la chromatine isolée des mêmes noyaux. Les mélanges ont été faits d'une façon telle que le rapport  $^{32}\text{P}$  cpm / O.D. 260 nm, soit identique à celui observé in vivo. Après digestion par la nucléase micrococcalle nous avons purifié les fragments de DNA et nous les avons analysés par électrophorèse en gel d'agarose (fig. 45 p. 131). Dans tous les cas, la révélation par le bromure d'éthidium dévoile la série des fragments de DNA cellulaire caractéristique de la digestion de la chromatine par la nucléase micrococcalle (fig. 45-A et fig. 47 p. 133). L'analyse de la radioactivité des mêmes gels montre qu'il n'y a pas de fragments de  $^{32}\text{P}$ -DNA viral de la taille ou multiple de la taille de 200 paires de bases (fig. 45-B p. 131 et fig. 46 p. 132). Au contraire, le  $^{32}\text{P}$ -DNA migre dans le gel sous forme d'une bande unique dont la taille est bien inférieure à 100 paires de bases, et ceci quel que soit le temps de digestion. Enfin, nous nous sommes placés dans les conditions favorisant un piégeage maximum et un fond de radioactivité élevé. Après 10 secondes de digestion, alors que le DNA cellulaire déprotéinisé est très visqueux, nous avons surchargé une piste de gel (200  $\mu\text{g}$  de DNA) (fig. 47 p. 133). La révélation au bromure d'éthidium montre que dans ces conditions de digestion il n'y a pratiquement pas de monomère de DNA nucléosomique cellulaire (fig. 47-A). L'autoradiogramme du gel confirme que, même dans ces conditions, la radioactivité résiduelle migre en une bande unique, plus loin que la zone où devrait migrer la bande de DNA cellulaire de 200 paires de bases (fig. 47-B).

Figure N° 45

Analyse par électrophorèse en gel d'agarose des fragments de DNA libérés lors de la digestion par la nucléase micrococcalle de  $^{32}\text{P}$ -Adénovirus 2 DNA déprotéinisé, mélangé à des noyaux de cellules non infectées.

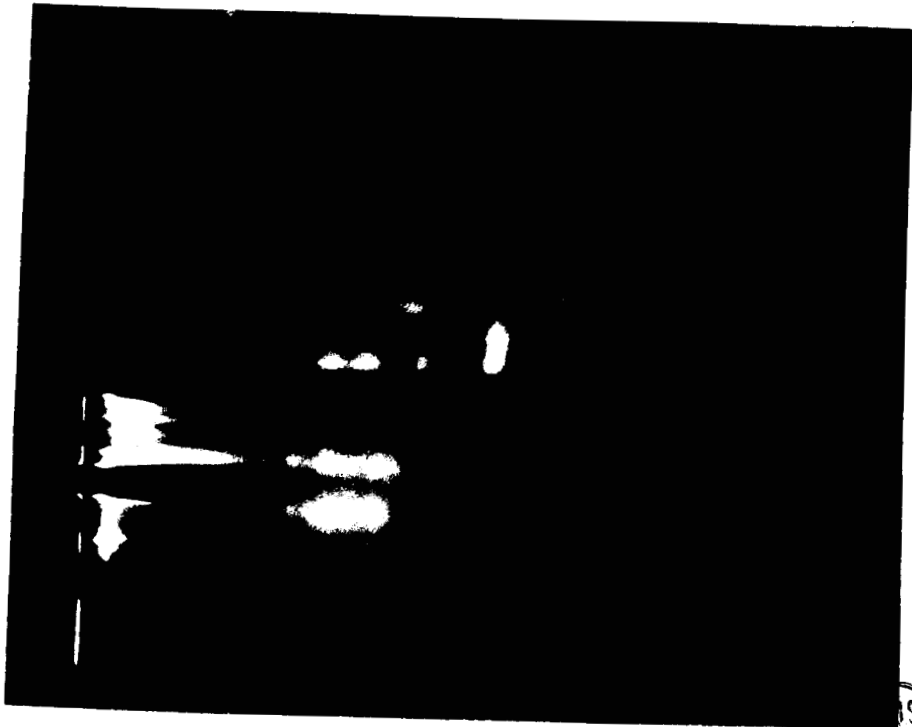
A - Fragments de DNA cellulaire  
(imprégnation au bromure d'éthidium).

B - Fragments de  $^{32}\text{P}$ -DNA viral déprotéinisé  
(autoradiographie du gel A).

Mc, Dc : monomère et dimère de DNA nucléosomique  
cellulaire



A



B

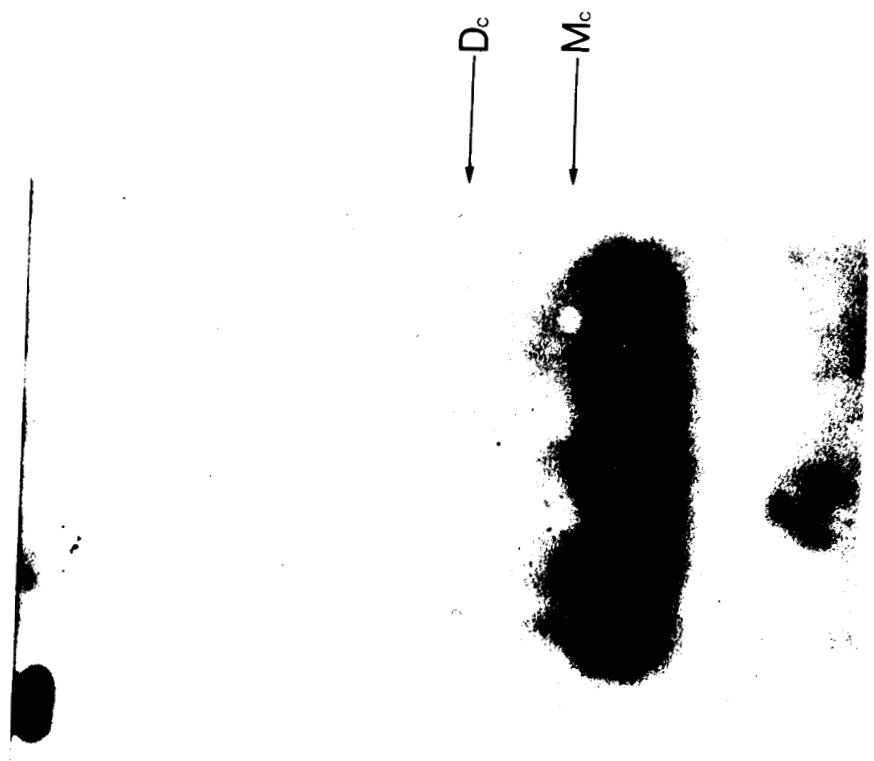


Figure N° 46

Fragments de DNA libérés lors de la digestion par la nucléase micrococcale du  $^{32}\text{P}$ -DNA viral déprotéinisé, mélangé à de la chromatine marquée par la Thymidine  $^3\text{H}$ .

A - 1 minute de digestion

$^3\text{H}$  : 0,1 % acido-soluble  
 $^{32}\text{P}$  : 22 % acido-soluble

B - 3 minutes de digestion

$^3\text{H}$  : 3 % acido-soluble  
 $^{32}\text{P}$  : 22 % acido-soluble

C - Contrôle

$^3\text{H}$  DNA de KB mélangé à du  $^{32}\text{P}$ -DNA d'Adénovirus 2 et digéré par la nucléase micrococcale

$^3\text{H}$  : 25 % acido-soluble  
 $^{32}\text{P}$  : 65 % acido-soluble

m : monomère (200 paires de bases environ)

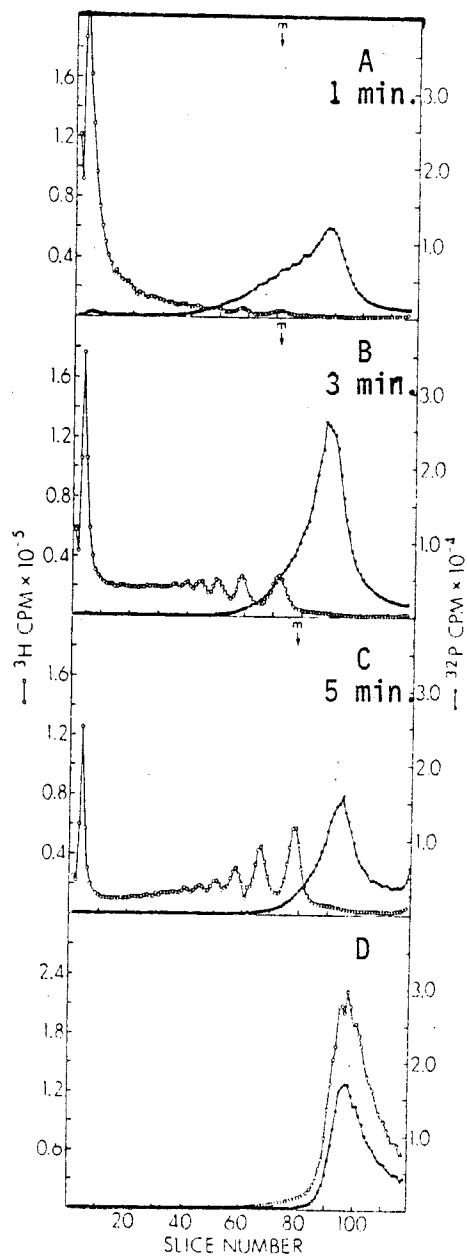


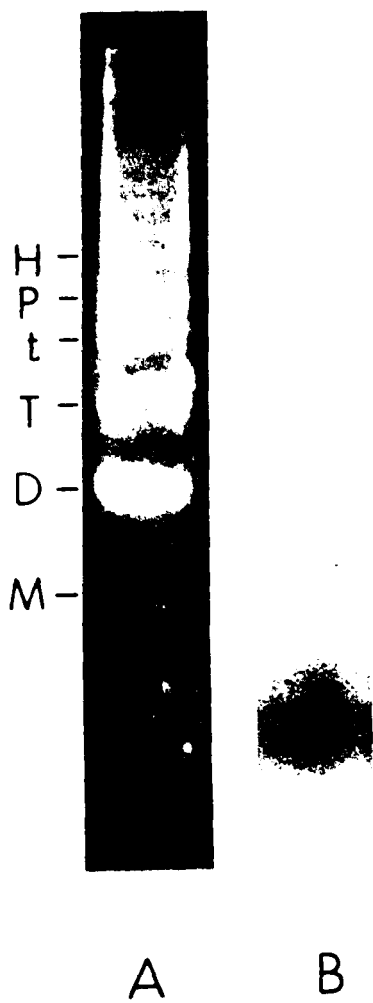
Figure N° 47

Séparation des fragments de DNA libérés après digestion par la nucléase micrococcale du mélange chromatine de cellules KB non infectées +  $^{32}\text{P}$ -Adénovirus 2 DNA déprotéinisé.

A - Fragments de DNA cellulaire

B - Fragments de  $^{32}\text{P}$ -DNA viral déprotéinisé

M, D, T, t, P, H : monomère, dimère, trimère, tétramère, pentamère de DNA nucléosomique.





Nous considérons ces résultats comme satisfaisants et comme preuve que dans nos conditions, le DNA parental viral n'est pas associé à des protéines nucléaires de manière non spécifique et artéfactuelle.

#### H - TOUTES LES REGIONS DU GENOME VIRAL SONT REPRESENTÉES DANS LES "NUCLEOSOMES" VIRAUX IN VIVO

Il fallait encore déterminer si tout le génome viral était représenté dans les séquences de  $^{32}\text{P}$ -DNA comigrant avec les monomères et multiples du DNA nucléosomique cellulaire en gel d'agarose. Nous avons, dans ce but, procédé comme suit. Les fragments de DNA produits après digestion par la nucléase micrococcalle de noyaux isolés de cellules infectées par des  $^{32}\text{P}$ -Adénovirions, ont été séparés par électrophorèse préparative en gel d'agarose. Deux temps de digestion ont été retenus : 5 minutes et 60 minutes correspondant respectivement à environ 35 % (fig. 48 p. 135) et 65 % (fig. 49 p. 136) de digestion. La photographie des gels après imprégnation par le bromure d'éthidium montre un profil de migration typique de fragments de DNA cellulaire multiples d'une unité structurale (fig. 48-A), et uniquement la bande de DNA monomère pour le temps plus long de digestion (fig. 49-A). Les fragments de DNA radioactif viral contenus dans les gels ont ensuite été hybridés avec une série de fragments de DNA d'Adénovirus 2 obtenus après clivage par l'endonucléase Endo. R. SmaI comme décrit page 104. Après une digestion limitée (fig. 48-B), les fragments de  $^{32}\text{P}$ -DNA viral contenus dans les bandes monomères jusque pentamère, hybrident avec tous les fragments Ad2-SmaI. Nous avons obtenu les mêmes résultats lorsque le DNA digéré par la nucléase micrococcalle migre dans le gel en une bande unique de monomère (fig. 49-B).

Ces résultats n'indiquent pas que chaque génome est entièrement protégé par des protéines, mais que nous retrouvons tout le génome viral représenté dans les séquences libérées par la nucléase micrococcalle. Le fait que nous ayons une hybridation en présence d'un large excès de DNA cellulaire est une indication que l'hybridation est très spécifique.

Il nous fallait maintenant tenter d'établir si de telles structures étaient fonctionnelles in vivo au stade précoce du cycle lytique.

Figure N° 48

Transfert - hybridation du DNA viral "nucléosomique" aux fragments Endo. R. SmaI du DNA d'Adénovirus fixé sur nitrocellulose.

Les noyaux isolés de cellules infectées par des  $^{32}\text{P}$  Adénovirus 2 (3 H P.I., 2 000 particules/cellule) ont été digérés 5 minutes par la nucléase micrococcale (500  $\mu\text{g/ml}$  DNA, 30 unités/ml d'enzyme).

Les fragments de DNA purifié ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose 1,4 % (A).

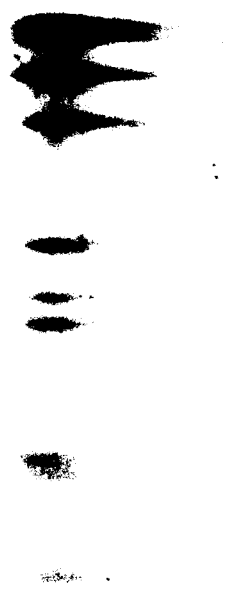
Le  $^{32}\text{P}$ -DNA contenu dans le gel a été hybridé à des fragments non radioactifs Endo. R. SmaI de DNA d'Adénovirus 2, séparés probablement sur gel d'agarose 1 % (B) et transférés sur nitrocellulose.

C - Autoradiographie de la nitrocellulose après hybridation.





Mc Dc Tc tc Pc



Mc Dc Tc Pc

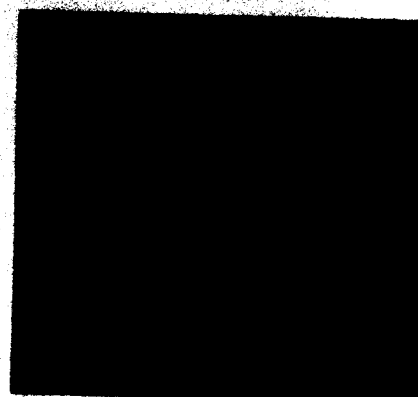
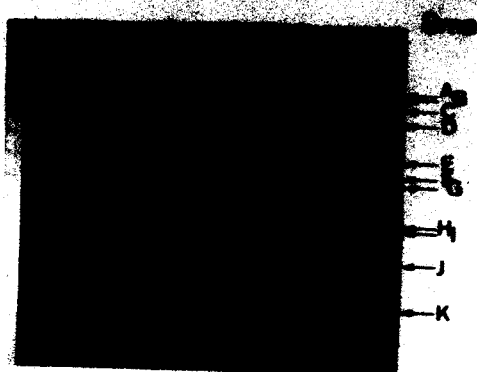
O  
↓ Sma  
A  
B  
C  
D  
E  
F  
G  
H  
I  
J



Figure N° 49

Mêmes conditions que figure N° 48 page 135, sauf 65 %  
de digestion.





↑  
Mc



Sma

← B

← C

← D

← E

← F

← G

← H

← J

← K



## I - LA "CHROMATINE" VIRALE EST-ELLE FONCTIONNELLE IN VIVO

L'approche que nous avons choisie a été d'étudier et de comparer trois paramètres en fonction de multiplicités infectieuses (m.o.i.) croissantes :

- 1) la quantité de DNA viral intranucléaire ;
- 2) la quantité de RNA viral synthétisé in vitro dans les noyaux purifiés ;
- 3) la cinétique de digestion du DNA viral intranucléaire par la nucléase micrococcale.

Comme l'indiquent les chiffres du tableau 15 page 138, la quantité absolue de DNA viral intranucléaire augmente lorsque la m.o.i. augmente, jusqu'à atteindre un plateau à 4000 particules physiques par cellule (m.o.i. de 130 environ). Ensuite, le nombre de génomes intranucléaires reste constant quelle que soit la multiplicité infectieuse. Dans cette expérience, nous ne donnons pas de résultats au delà de la m.o.i. 300, mais dans d'autres expériences nous avons augmenté la m.o.i. jusque 1000 (30 000 particules physiques par cellule) sans modification des résultats.

La quantité de RNA viraux synthétisés in vitro dans les noyaux isolés augmente avec la m.o.i., pour atteindre un plateau à la valeur de 4000 particules physiques par cellule (tableau 16 p. 139).

Enfin, nous avons établi les cinétiques de digestion du DNA viral intranucléaire par la nucléase micrococcale (tableau 17, p. 140). Les chiffres que nous avons obtenus, exprimés en pourcentage de DNA viral rendu acido-soluble, sont similaires.

Nous avons porté les chiffres des tableaux en système ortho-normé dans la figure 50 page 141.

Que nous apprennent ces résultats ?

D'abord qu'une quantité limitée de DNA viral peut pénétrer dans le noyau de la cellule hôte, indiquant que

- 1) soit les sites de pénétration à l'intérieur du noyau cellulaire sont limités ;
- 2) soit les protéines protégeant le DNA viral sont d'origine cellulaire et le pool disponible n'est pas illimité, ce qui entraîne la dégradation des molécules de DNA viral une fois le pool épuisé.

TABLEAU N° 15

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE (cpm CERENKOV) DANS LES  
FRACTIONS SUBCELLULAIRES

FRACTIONS \ m.o.i.	400 particules/ cellules	3000 particules/ cellules	4000 particules/ cellules	10.000 particules/ cellules
Milieu de culture	1.157 216	8 266 849	11 777 446	41 445 735
Lavages de culture	330 772	2 790 949	2 829 204	8 286 075
Fraction Cytoplasmique	960 246	5 991 337	8 723 115	19 117 650
Lavages des noyaux par NP40	100 964	586 328	867 442	1 070 940
Lavages des noyaux sans NP40	8 174	77 055	97 379	329 959
Noyaux (7.5x10 <sup>7</sup> )	1 127 612	5 921 387	7 816 666	9 240 000
Total	3 684 984	23 660 905	32 111 252	79 484 359
% DNA infectieux	30.6%	25%	24%	11.6%
Génomes viraux par noyaux	131	693	904	1085

Radioactivité spécifique du <sup>32</sup>P-DNA dans les particules virales  
utilisées pour l'infection : 2 943 865 cpm/ug



TABLEAU N° 16

QUANTITE DE RNA VIRAL SYNTHETISE DANS LES NOYAUX  
IN VITRO APRES INFECTION A DIFFERENTES M.O.I

m.o.i. (Particules/ cellule )	RNA total synthétisé par $9.3 \times 10^6$ noyaux (cpm $^3\text{H-U}MP$ )	Hybridation contre le DNA d'Adénovirus 2 (10ug/filter)			RNA hybridé par $10^8$ noyaux (cpm $^3\text{H-U}MP$ )
		INPUT (cpm)	Hybridé (cpm)	% hybridé	
400	89 408	180 000	1723	0.9%	8938
3000	53 137	100 000	5387	5.38%	29132
4000	41 429	90 000	6018	6.68%	31932
10000	21 093	50 000	3400	6.8%	18140





TABLEAU N° 17

## CINETIQUES DE DIGESTION DU DNA PARENTAL INTRANUCLEAIRE

m.o.i particules/ cellule	temps de digestion	Surgageant	Culot	Total	% acido soluble
400	0	4 939	99 223	104 162	4.7
	0.5	15 820	87 870	103 690	15.2
	1	17 790	95 982	113 782	15.6
	2	22 134	84 468	106 602	20.76
	5	35 450	68 156	103 606	34.2
	10	45 014	61 134	106 148	42.28
	30	62 231	43 270	105 501	58.98
	60	67 639	36 885	104 524	64.71
	90	68 467	36 669	105 136	65
3000	0	14 665	503 622	518 287	2.8
	0.5	74 809	440 817	515 626	14.5
	1	89 220	459 014	548 234	16.2
	2	113 074	420 792	533 866	21.18
	5	187 413	358 493	545 816	34.3
	10	228 224	307 655	535 879	42.5
	30	309 224	215 935	525 859	58.8
	60	328 293	188 132	516 425	63.5
	90	351 535	195 057	546 592	64.3
4000	0	14 273	627 647	641 920	2.2
	0.5	94 869	564 272	659 141	14.3
	1	106 610	572 180	678 790	15.7
	2	145 337	530 854	676 191	21.49
	5	229 598	440 720	670 318	34.25
	10	284 123	392 402	676 525	42
	30	412 352	279 267	691 619	59.6
	60	408 406	243 079	651 485	62.6
	90	431 518	246 694	678 212	63.6
10000	0	79 790	738 733	818 523	9
	0.5	132 541	707 394	839 935	15.7
	1	147 344	708 857	856 201	17.2
	2	190 252	664 931	855 183	22.24
	5	280 233	543 423	823 656	34.02
	10	330 008	496 401	826 409	40
	30	448 477	361 616	810 093	55.3
	60	475 493	289 290	764 783	62.1
	90	497 060	312 920	809 980	61.3



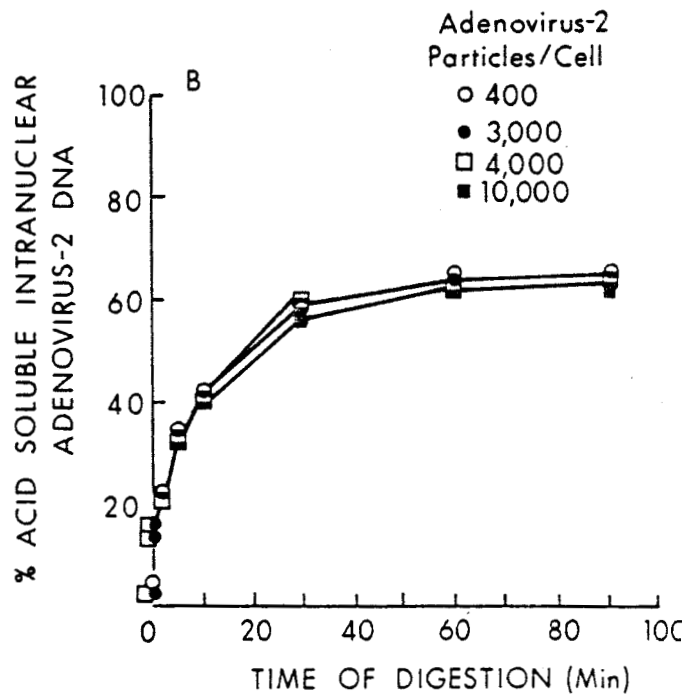
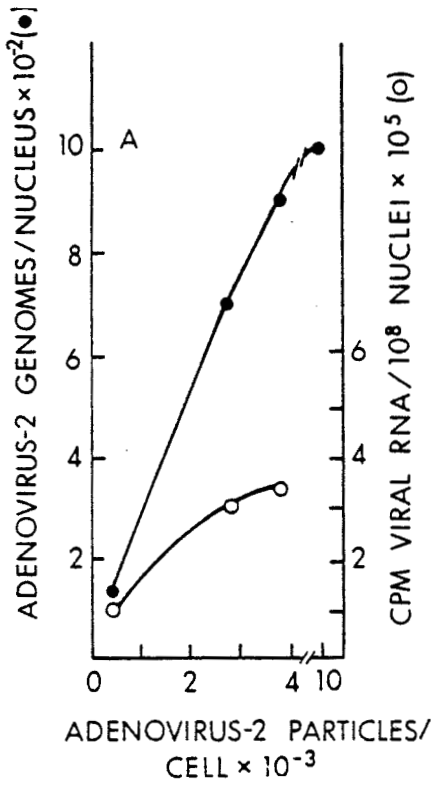
Figure N° 50

A - Effet de l'augmentation de la multiplicité infectieuse (m.o.i.) sur la quantité de DNA viral parental intranucléaire, la synthèse de RNA viral dans les noyaux in vitro et la quantité de RNA viral résistant à la digestion par la nucléase micrococcale.

●—● génomes parentaux intranucléaires

○—○ RNA viral synthétisé dans les noyaux in vitro

B - Cinétiques de digestion par la nucléase micrococcale.



Ensuite, la quantité de RNA viral transcrit in vitro augmente avec la quantité de DNA viral intranucléaire, suggérant que les deux phénomènes sont liés. Or les cinétiques de digestion du DNA viral intranucléaire sont superposables quelle que soit la m.o.i., ce qui nous permet de dire que les gènes précoces viraux transcrits pourraient être organisés en unités structurales similaires par leurs propriétés aux nucléosomes de la cellule hôte. Cependant, nous ne pouvons exclure la possibilité que les gènes précoces soient transcrits à partir de molécules organisées différemment puisque l'on ne connaît pas le pourcentage de génomes viraux transcrits. Il se pourrait en effet qu'un génome sur cent ou moins soit transcrit in vivo au stade précoce du cycle lytique. Dans ce cas, même si l'organisation des gènes transcrits était différente, il nous serait impossible, dans nos conditions expérimentales, de le mettre en évidence.

#### J - DEVENIR DU DNA PARENTAL INTRANUCLEAIRE AU COURS DU CYCLE LYTIQUE

Il était intéressant de suivre le devenir des molécules de DNA viral et plus particulièrement après le début de la réplication du génome viral in vivo qui se situe environ 6 heures après le début de l'adsorption.

Nous avons étudié deux paramètres à différents temps du cycle lytique :

- 1) la quantité de génomes intranucléaires ;
- 2) les cinétiques de digestion du DNA viral parental par la nucléase micrococcale.

Comme on peut le voir figure 51-A page 143, le DNA viral parental est déjà présent dans le noyau de la cellule hôte 1 heure après le début de l'adsorption. La pénétration nucléaire est maximale après 4 heures d'infection (4 H P.I.) et reste ensuite constante jusque 8 H P.I., point le plus éloigné que nous ayons examiné pour des raisons purement pratiques. A chaque temps examiné, le pourcentage de  $^{32}\text{P}$ -DNA parental, résistant à la digestion par la nucléase micrococcale, est constant et les cinétiques de digestion semblables (fig 51-B p. 143). Il est sûr que la radioactivité intranucléaire retrouvée après le début de la réplication correspond en partie à des brins de DNA parental incorporés dans des

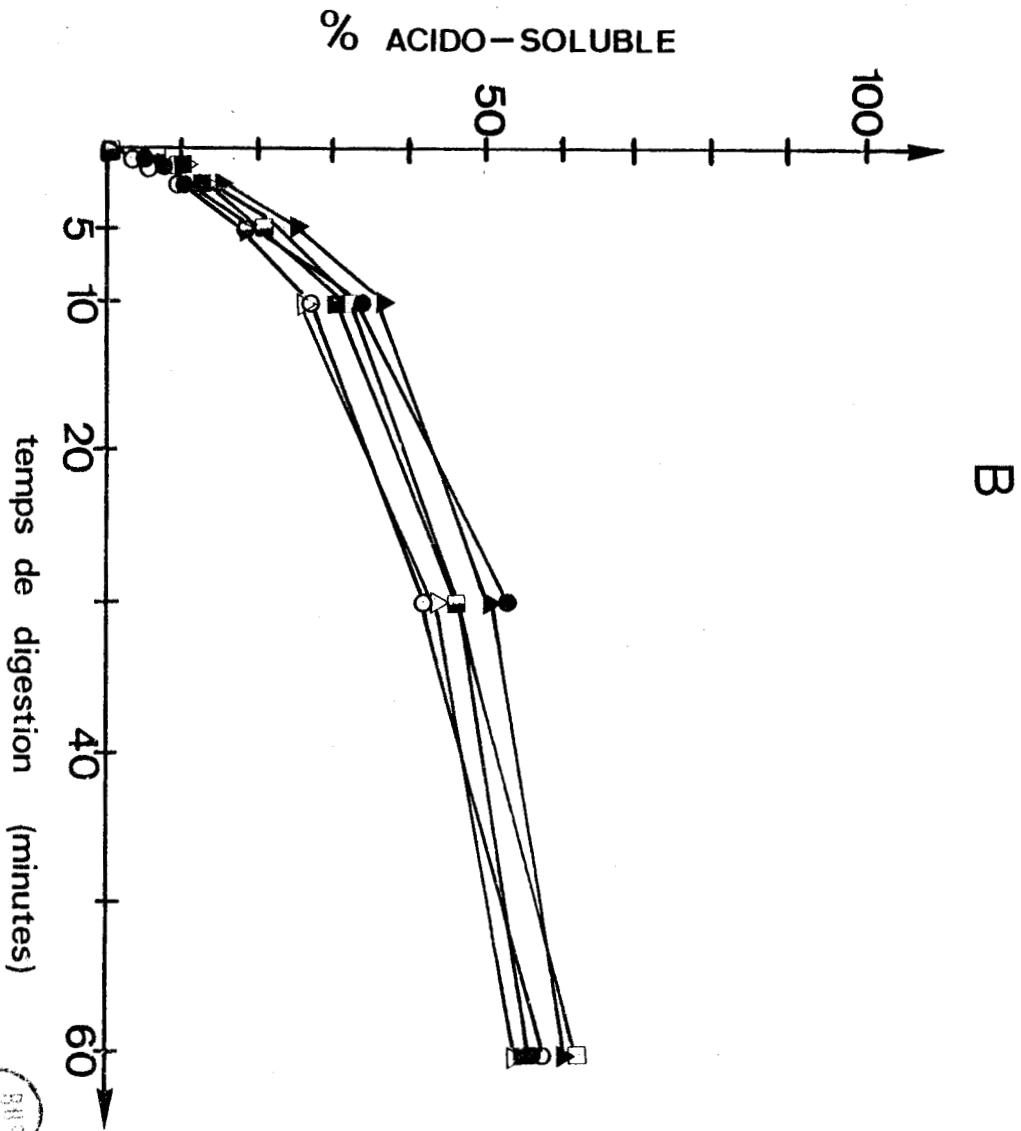
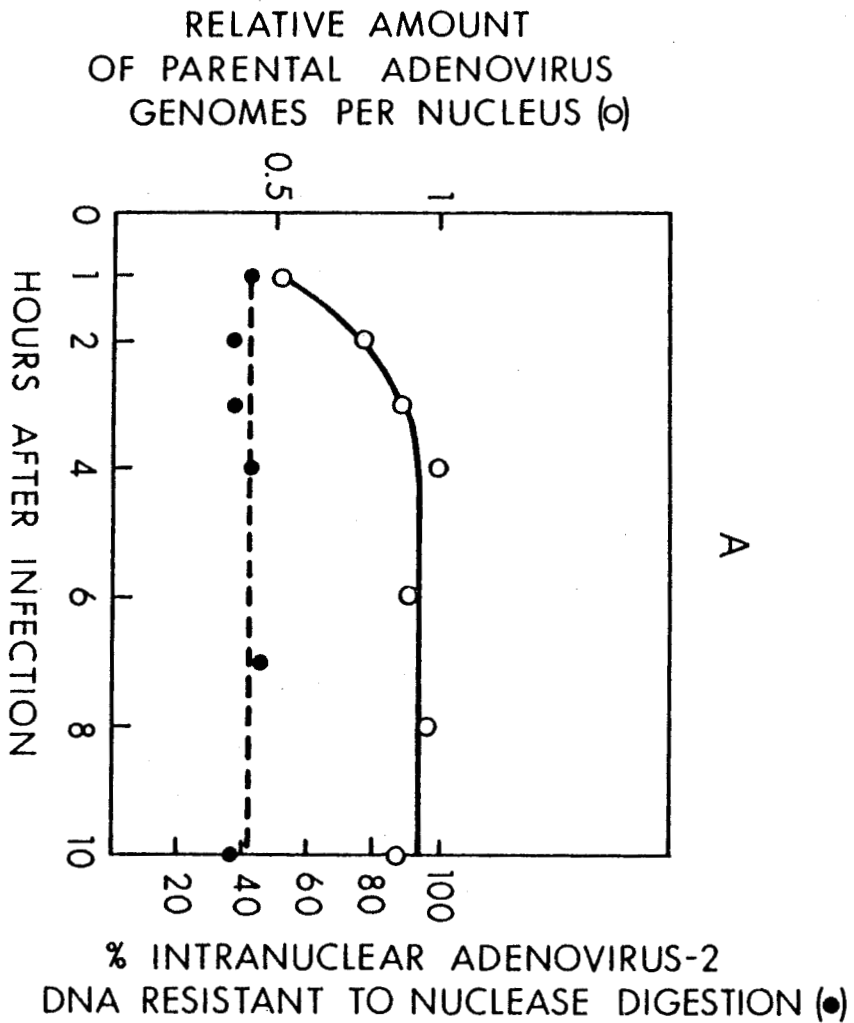
Figure N° 51

Digestion du DNA viral parental intranucléaire à différents temps dans le cycle lytique.

A -     ●—●     génomes viraux par noyau  
         ○—○     DNA résistant à la digestion poussée  
                      (au plateau)

B - Cinétiques de digestion

●—●     1 heure  
○—○     2 heures  
▲—▲     3 heures  
△—△     4 heures  
■—■     6 heures  
□—□     8 heures



molécules nouvellement répliquées (voir page 161). Si comme l'ont publié certains auteurs (KEDINGER et al., 1978 (58), le DNA hybride (1 brin parental - 1 brin nouvellement synthétisé), n'a pas de structure "nucléosomique", nous devrions trouver une différence dans les cinétiques de digestion après le début de la réplication du DNA viral. Or les cinétiques que nous avons obtenues sont parfaitement superposables et ceci jusque 10 H P.I. ; on peut alors dire que 10 H P.I. ne correspond pas au maximum de la synthèse de DNA viral qui est 13 H P.I., et que dans ce cas le pourcentage de brins parentaux incorporés dans des molécules filles est trop faible pour que l'on puisse détecter une différence dans les cinétiques de digestion. Nous avons voulu apporter une preuve expérimentale concluante. Au temps 18 H P.I., 42 % du DNA parental viral intranucléaire ont la densité des hybrides HL (heavy-light) lorsque la Brdu a été ajoutée à la culture infectée avant le début de la réplication du DNA viral (voir nos résultats page 161). Nous avons répété cette expérience sans Brdu en utilisant des cellules KB dont le DNA avait été préalablement rendu radioactif par incorporation de thymidine tritiée, et infectées par des <sup>32</sup>P-Adénovirions. Au temps 18 H P.I. nous avons isolé les noyaux des cellules infectées, et les avons digérés par la nucléase micrococcalle. La cinétique de digestion du DNA viral intranucléaire est identique à celles décrites dans la figure 38 page 118. De plus nous avons voulu savoir si les fragments de DNA acido-précipitables étaient identiques, après électrophorèse en gel d'agarose aux fragments de DNA cellulaire. A différents temps de la cinétique de digestion, nous avons extrait et purifié le DNA et nous l'avons analysé par électrophorèse en gel d'agarose (fig. 52 page 145).

Les résultats que nous avons obtenus suggèrent fortement que, 18 H P.I., le DNA parental viral non encore répliqué et le DNA parental présent dans les molécules hybrides (1 brin parental - 1 brin nouvellement répliqué) ont gardé une structure analogue à celle de la chromatine cellulaire.

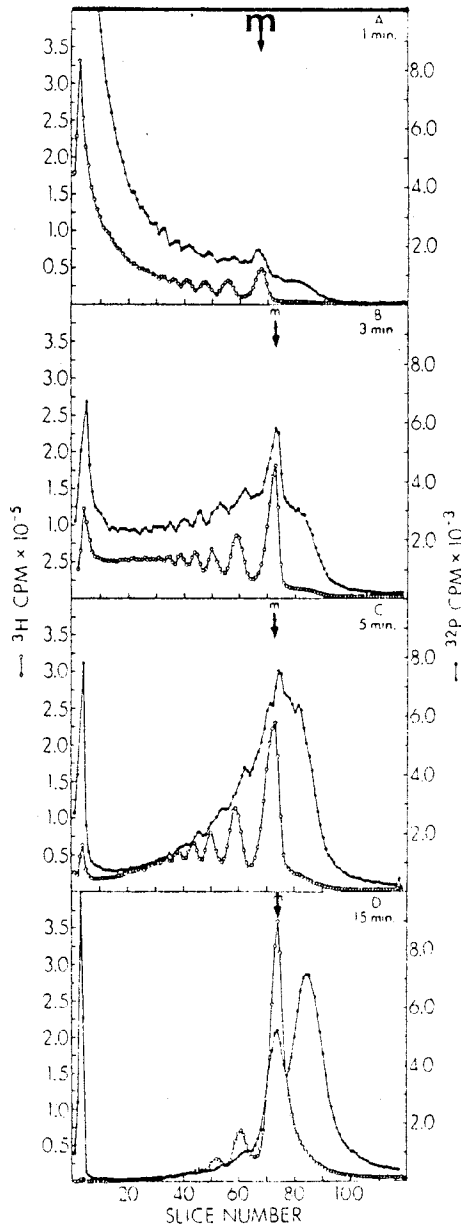
Nous avons écrit jusqu'à présent "nucléosomes" viraux et "chromatine" virale. Pourquoi des guillemets ? Et bien nous ne savons pas encore quelles sont les protéines impliquées dans la protection du DNA parental viral. Les notions de nucléosome et de chromatine sont très restrictives puisqu'elles impliquent la présence des histones, et nous n'avons pas le moindre début de preuve que des histones sont associées avec le DNA parental viral

Figure N° 52

Séparation des fragments de DNA libérés lors de la digestion par la nucléase micrococcale des noyaux isolés à la 18ème heure de cellules KB (<sup>3</sup>H) infectées par des <sup>32</sup>P-virions.

Mêmes conditions que figure 40 page 121.





in vivo. D'autre part, le modèle proposé par CORDEN et al., 1976 (22) suggère que les protéines virales V et VII, associées au DNA viral à l'intérieur de la particule purifiée, pourraient reproduire le nucléosome cellulaire dans toutes ses propriétés, ce qui réduit à priori les chances de pouvoir régler le problème. Toutefois, sachant que les dimères et trimères de DNP virales (Dv et Tv, fig. 44 p. 129) sont séparées de leurs équivalents cellulaires Dc et Tc, nous avons pensé qu'en utilisant des Adénovirions dont les protéines ont été rendues radioactives par la méthionine <sup>35</sup>S et le DNA rendu radioactif par incorporation de thymidine tritiée, nous pourrions peut être démontrer, au moins, la présence ou l'absence des protéines virales V et VII sur le DNA viral "nucléosomique". Le schéma expérimental que nous avons choisi fondé sur les travaux publiés par TODD et GARRARD, 1977 (118) est présenté figure 53 page 147.

Le résultat que nous avons obtenu ne permet pas de conclure quelles protéines sont responsables de l'organisation structurale en unités répétitives du DNA parental viral in vivo, mais confirme ce que l'ensemble de ce travail tend à démontrer, puisque nous retrouvons des spots radioactifs là où les monomères et dimères de DNA nucléosomique cellulaire migrent (fig. 54 p. 148).

Figure N° 53

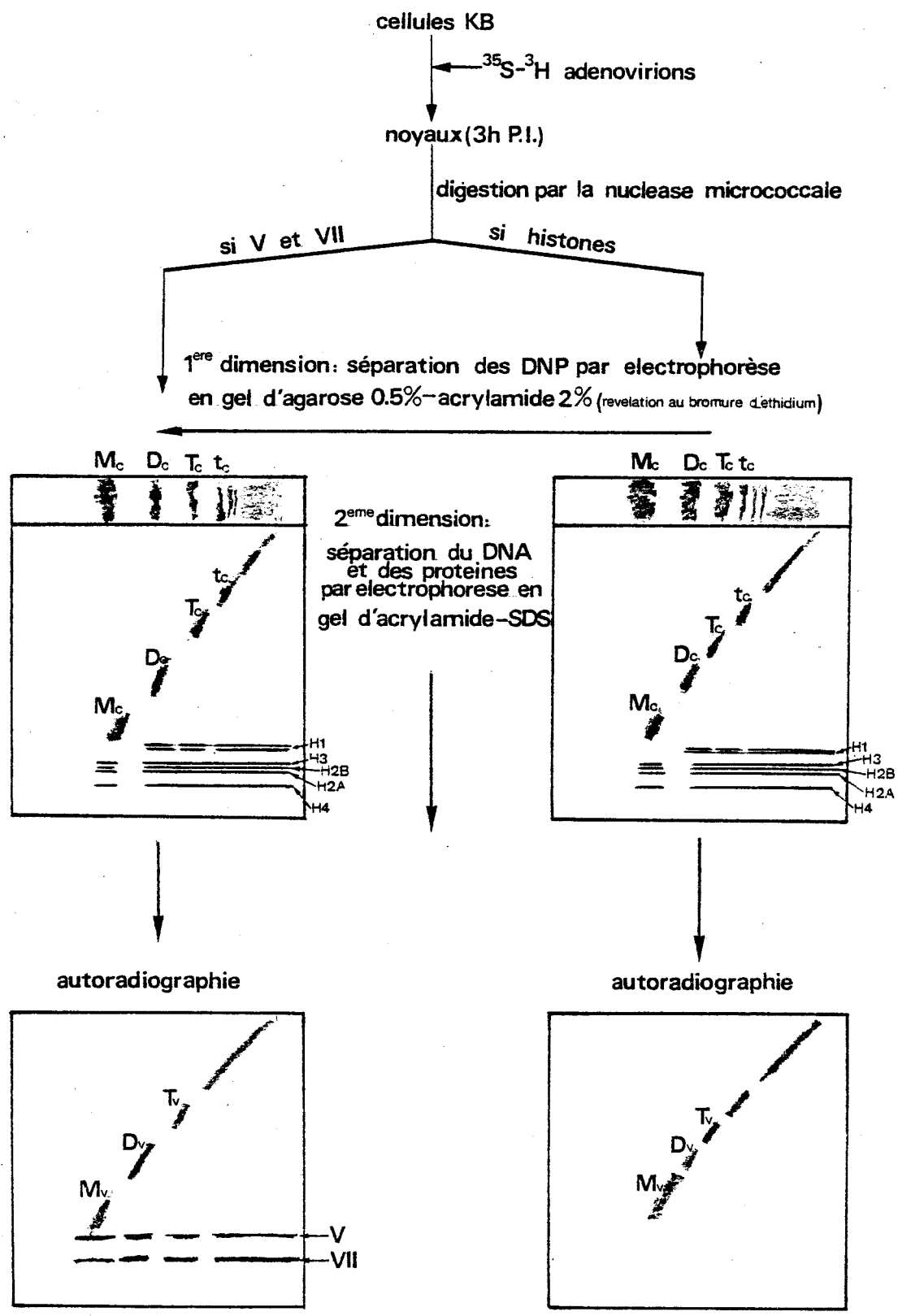
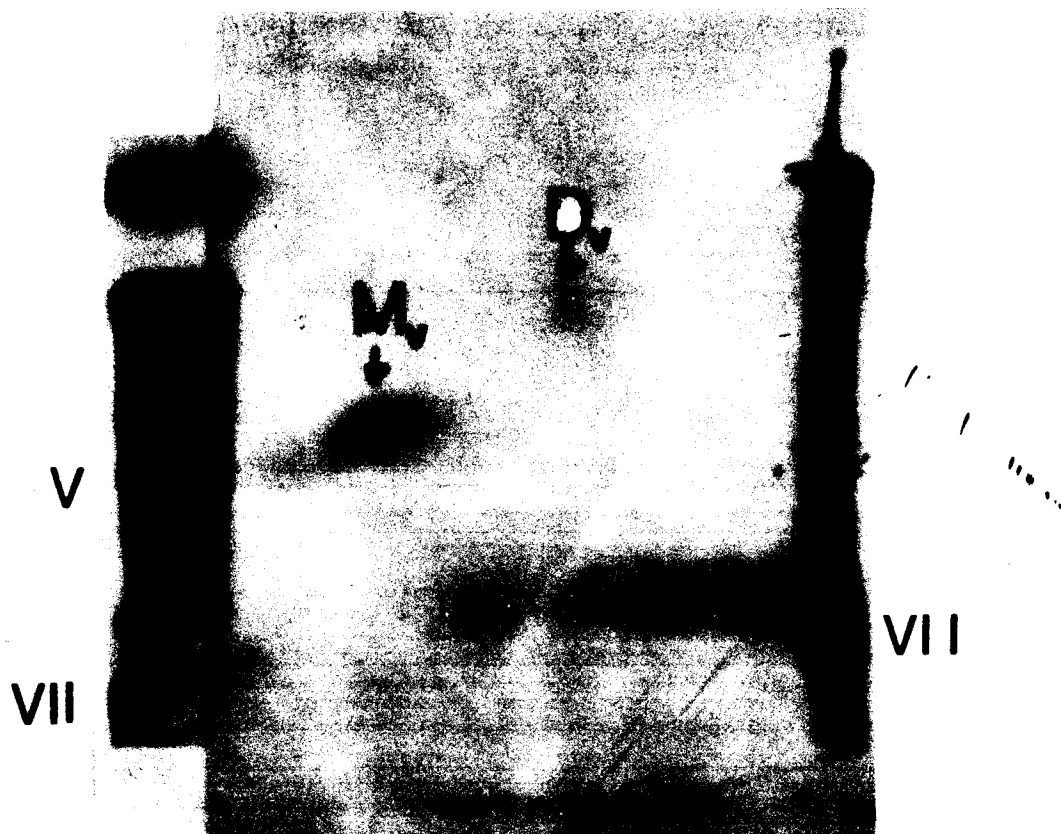


Figure N° 54



BUS  
LILLE

2ème CHAPITRE : LES GENOMES PARENTAUX VIRAUX INTRANUCLEAIRES  
POSSEDENT-ILS LES PROTEINES TERMINALES 55 K ?

La série d'expériences dont nous allons décrire les résultats a eu pour but de suivre le devenir des complexes HAd2 DNA-55K parentaux depuis leur pénétration dans le noyau de la cellule hôte jusqu'au stade tardif du cycle lytique i.e., après le début de la réplication du DNA viral.

Afin de pouvoir quantifier nos résultats et ainsi posséder un standard de comparaison avec le DNA parental viral intranucléaire, nous avons d'abord étudié les complexes isolés de virions purifiés.

A - COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE DES FRAGMENTS TERMINAUX  
DU DNA ISOLE DES VIRIONS PURIFIES

Des particules de  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ -Adénovirus 2 ont été traitées par le  $\text{GuHCl}$  4M et le lysat appliqué sur une colonne de sépharose 2B-CL (fig. 55 p. 150). Le  $^3\text{H}$ -DNA est élué nettement avant pratiquement toute la radioactivité  $^{35}\text{S}$  liée aux protéines virales. Environ 0,2 % de la radioactivité  $^{35}\text{S}$  est élue avec le DNA viral. Le pic de radioactivité  $^3\text{H}$  devrait correspondre aux complexes HAd2 DNA-55K purifiés. Afin d'en être sûr, nous avons d'abord digéré une portion du matériel  $^3\text{H}/^{35}\text{S}$  élué de la colonne par la désoxyribonucléase I et analysé le matériel résistant par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS 15 %. L'autoradiographie de ce gel a révélé une bande unique de protéines dont le poids moléculaire est environ 55 000 daltons. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés sur la taille et les caractéristiques de marquage de la protéine purifiée des complexes HAd2 DNA-55K (REKOSH et al., 1977 (89)). Ensuite nous avons clivé une autre portion du matériel  $^3\text{H}/^{35}\text{S}$  élué de la colonne à l'aide d'endonucléases de restriction, et analysé les produits de digestion par électrophorèse en gel d'agarose 1 %. La digestion du DNA d'Adénovirus 2 en Endo. R. Eco RI produit six fragments caractéristiques (MULDER et al., 1974 (74)), les fragments terminaux A et C représentent 68,8 % des séquences totales du DNA viral (fig. 56-A p. 151). Lorsque l'on analyse par électrophorèse sur gel d'agarose les produits de digestion par endo. R. Eco RI des complexes purifiés à partir des virions, on observe que seuls les fragments

Figure N° 55

Séparation chromatographique des complexes Ad<sub>2</sub> DNA-55K

Des virions marqués par la <sup>3</sup>H-Thymidine et la <sup>35</sup>S-méthionine sont traités par un volume de 8 M GuHCl dans le tampon TE.

Le lysat est chromatographié sur colonne de sépharose CL-2B (1 x 13 cm) comme décrit page 103.

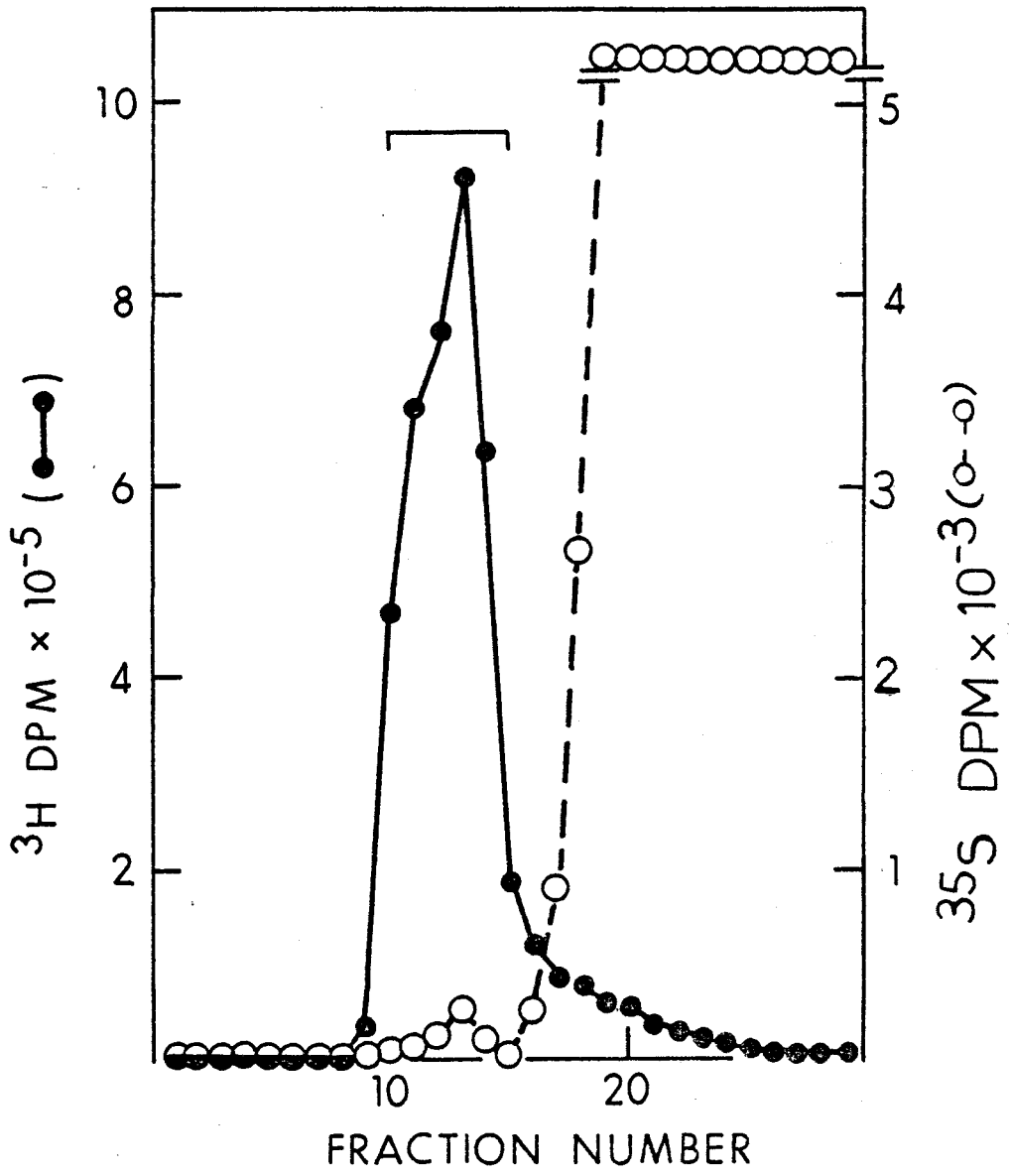


Figure N° 56

A - Sites de coupure du DNA d'Adénovirus 2 par Endo. R. Eco RI  
et Endo. R. SmaI

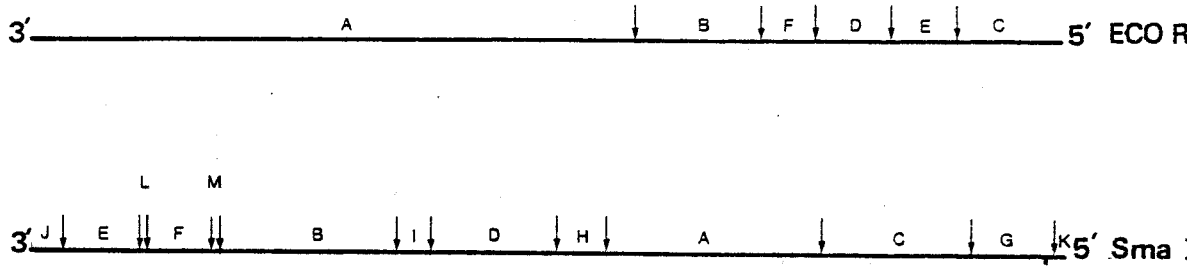
B - Séparation par électrophorèse sur gel d'agarose des  
complexes Ad<sub>2</sub> DNA-55K clivés par Endo. R. Eco RI (a et b)  
et Endo. R. SmaI (c et d)

a et c : les fragments sont analysés sans traitement  
préalable par la pronase

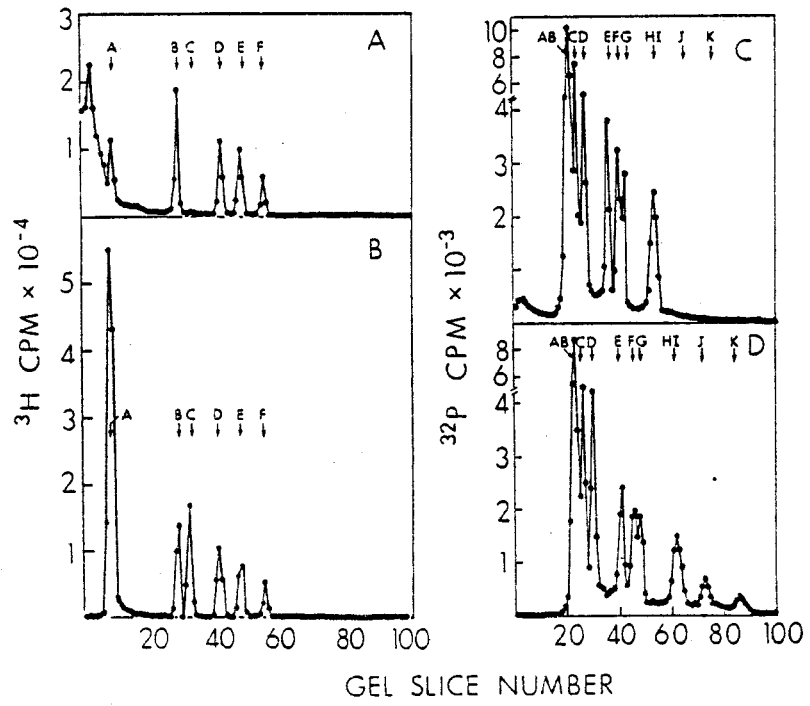
b et d : les fragments sont analysés après traitement  
préalable par la pronase



A



B



internes B, D, E et F entrent et sont séparés dans le gel (fig. 56-B p. 151) et qu'une fraction de la radioactivité reste dans les premières fractions au sommet du gel. En outre, la radioactivité migrant à la position des fragments terminaux est réduite à environ 10 % de celle attendue. Cependant, si l'on traite les produits de digestion avant l'électrophorèse par la protéinase K, alors tous les fragments Eco RI migrent dans le gel à la position et dans le rapport attendu (fig. 56-Bb p. 151). La quantification de cette expérience (tableau 18 page 153) permet de conclure que plus de 90 % des molécules de DNA viral ont, à l'intérieur de la particule, leurs extrémités associées avec les protéines 55 K.

Nous avons voulu définir plus précisément les régions du génome viral qui sont associées avec les protéines 55K. Dans ce but, des  $^{32}\text{P}$ -complexes extraits des virions et purifiés par chromatographie sur colonne de sepharose ont été digérés par Endo. R. SmaI. Cet enzyme reconnaît 12 sites de coupure sur le DNA viral et produit donc 13 fragments (fig. 56-A p. 151). Les fragments terminaux J et K représentent 2,9 % et 1 % du génome respectivement. Après séparation par électrophorèse en gel d'agarose des fragments de DNA obtenus par clivage des complexes par Endo. R. SmaI, on observe que les fragments terminaux J et K sont absents et qu'une petite fraction de la radioactivité totale reste dans les fractions au sommet du gel (fig. 56-Bc p. 151). Après traitement protéolytique, les pics radioactifs correspondant aux fragments J et K apparaissent, et conséquemment la radioactivité au sommet du gel disparaît (fig. 56-Bc p. 151). Nous avons quantifié les résultats dans le tableau 18 page 153. Ces expériences confirment la présence de protéines de poids moléculaire 55K aux extrémités ou à proximité des extrémités du DNA viral dans la particule purifiée, et nous ont fourni des standards pour comparer la structure du DNA viral intranucléaire avec celle du DNA extrait des virions purifiés dans nos conditions expérimentales.

#### B - DES PROTEINES SONT-ELLES ASSOCIEES AUX EXTREMITES DU DNA PARENTAL VIRAL INTRANUCLEAIRE ?

D'abord il nous a été impossible d'utiliser la méthode de chromatographie sur colonne de sépharose pour rechercher la présence des complexes HAd2 DNA-55K, car en lysant plus de  $10^6$  noyaux (14  $\mu\text{g}$  de DNA total), la viscosité du DNA cellulaire est telle qu'il n'entr

TABLEAU N° 18

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE (cpm) DANS LES FRAGMENTS OBTENUS  
APRES DIGESTION PAR Endo R. Eco R. et Endo. R SmaI DES  
COMPLEXES ISOLES DES VIRIONS

FRAGMENTS \ ENZYME	Endo R EcoRI		Endo R SmaI	
	sans pronase	avec pronase	sans pronase	avec pronase
Sommet du gel	12 9780 (61%)	0	14606 (3.9%)	0
A	12 420 (5.3%)	13 3000 (58.9%)	228 404 (62%)	346 939 (64.9%)
B	27 600 (12.9%)	25 600 (12%)		
C	2000 (0.94%)	23 000 (10.6%)		
D	16 900 (8%)	17 000 (8%)		
E	13 800 (6.5%)	14 000 (6.2%)	29 310 (8%)	42 300 (7.92%)
F	100 000 (4.7%)	12 000 (5%)	54 400 (14.8%)	71 000 (13.3%)
G	/	/		
H	/	/		
I	/	/	32 530 (8.8%)	42 680 (8%)
J	/	/		
K	/	/	15 00 (0.4%)	15 500 (2.9%)
L	/	/	5 300 (1.4%)	7 010 (1.31%)
M	/	/		
Total	21 250	225 600	533 529	366 050

pas dans le gel de sépharose. Utiliser moins de  $10^6$  noyaux ne nous permettait pas d'avoir une radioactivité suffisante liée au DNA viral intranucléaire, en considérant qu'il est difficile de déposer plus de 10  $\mu$ g de DNA total au sommet d'un gel cylindrique d'agarose de dimensions 0,3 x 15 cm, ce qui correspond dans nos conditions expérimentales à environ 75 000 cpm  $^{32}$ P. Nous avons préféré purifier de façon préparative les complexes DNA-protéines préparés à partir des noyaux isolés de cellules infectées, en centrifugeant les lysats nucléaires dans une solution CsCl 3,026 M/GuHCl 4 M (ROBINSON et BELLET, 1974 (91)). Le schéma expérimental que nous avons décidé d'utiliser, élaboré à partir de nos expériences avec les complexes purifiés de virions et à partir des résultats publiés par d'autres groupes, est exposé dans la figure 57 page 155. Avant de commencer des expériences avec les cellules infectées, il était indispensable de vérifier si cette méthode était adéquate. En effet, nous savions qu'il serait difficile dans les conditions expérimentales choisies, de séparer complètement le DNA cellulaire du DNA viral et, ce qui est plus gênant, d'éliminer la contamination du pic de DNA viral par les protéines nucléaires. Or, il nous fallait à un moment du schéma expérimental éliminer le GuHCl et le sarkosyl par dialyse ce qui augmentait sérieusement les risques d'association artéfactuelle entre protéines nucléaires et DNA viral. D'autre part, nous ne savions pas si la méthode du GuHCl était applicable aux noyaux cellulaires. Enfin, il nous semblait plus judicieux d'examiner le contenu des noyaux totaux plutôt que de tenter d'extraire des molécules virales par les méthodes déjà publiées, de peur de sélectionner des populations de molécules ce qui rendrait l'interprétation de nos résultats plus difficiles. Nous avons donc dans un premier temps mélangé du  $^{32}$ P-DNA viral d'une part, et des complexes protéines  $^{32}$ P-DNA isolés de virions d'autre part, à des noyaux isolés de cellules non infectées et suivi le schéma proposé page 155.

Les résultats de cette expérience sont présentés figure 58 page 156. Les profils de sédimentation en gradients de CsCl/GuHCl-TSEB montrent que comme supposé, les pics de matériel radioactif sont hétérogènes dû au piégeage du DNA viral par le DNA cellulaire. Cependant, la position des pics radioactifs laissait supposer que la déprotéinisation du matériel avait été satisfaisante. Nous avons donc rassemblé les fractions radioactives et poursuivi le développement de l'expérience. Nous avons séparé les fragments de DNA obtenus après clivage par Endo. R. Eco R. sur un gel d'agarose vertical, ceci avec et sans traitement par la pronase (fig. 59 p. 157). Comme attendu, dans le cas du DNA viral, tous les fragments

Figure 57

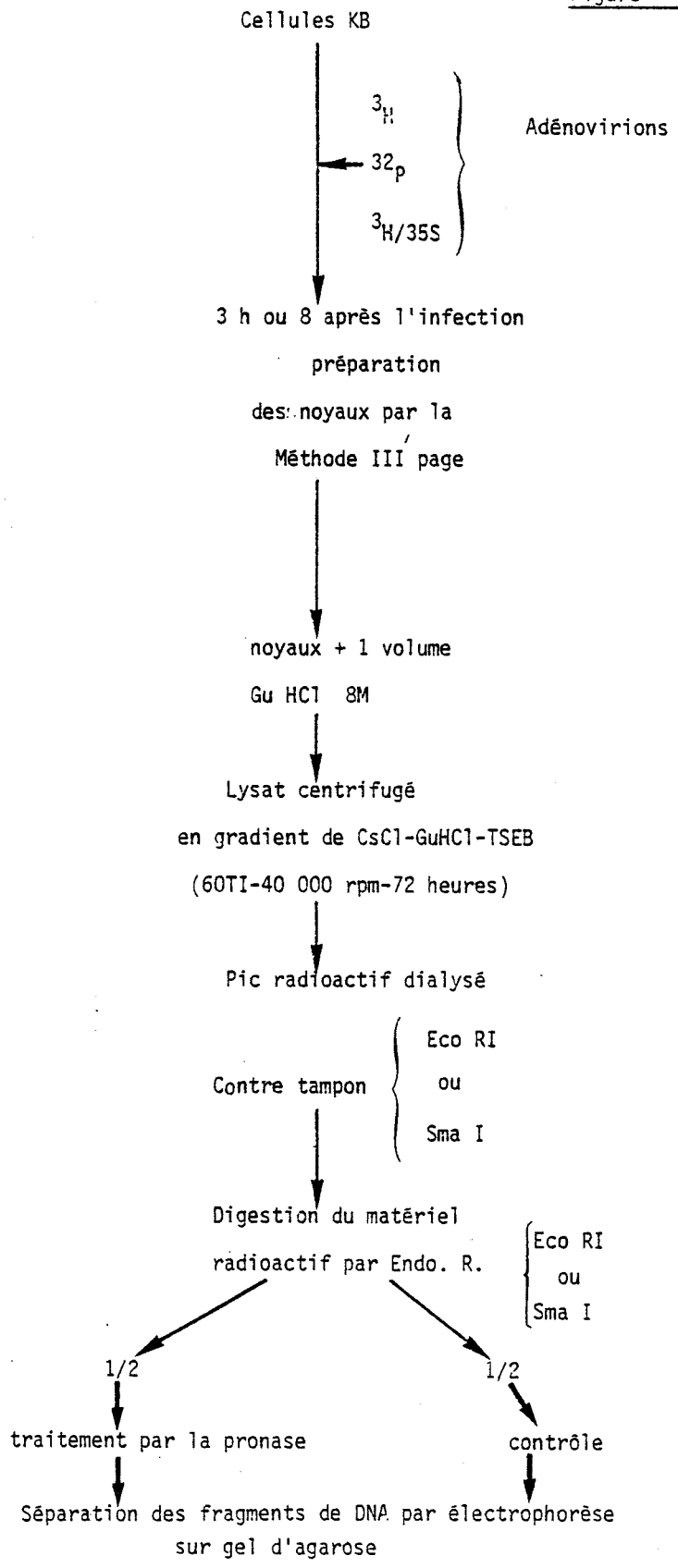


Figure N° 58

Centrifugation à l'équilibre dans des gradients  
CsCl/GuHCl-TSEB

A - Noyaux de cellules non infectées +  $^{32}\text{P}$ -DNA viral

B - Noyaux de cellules non infectées +  $^{32}\text{P}$ -HAd<sub>2</sub> DNA-55K

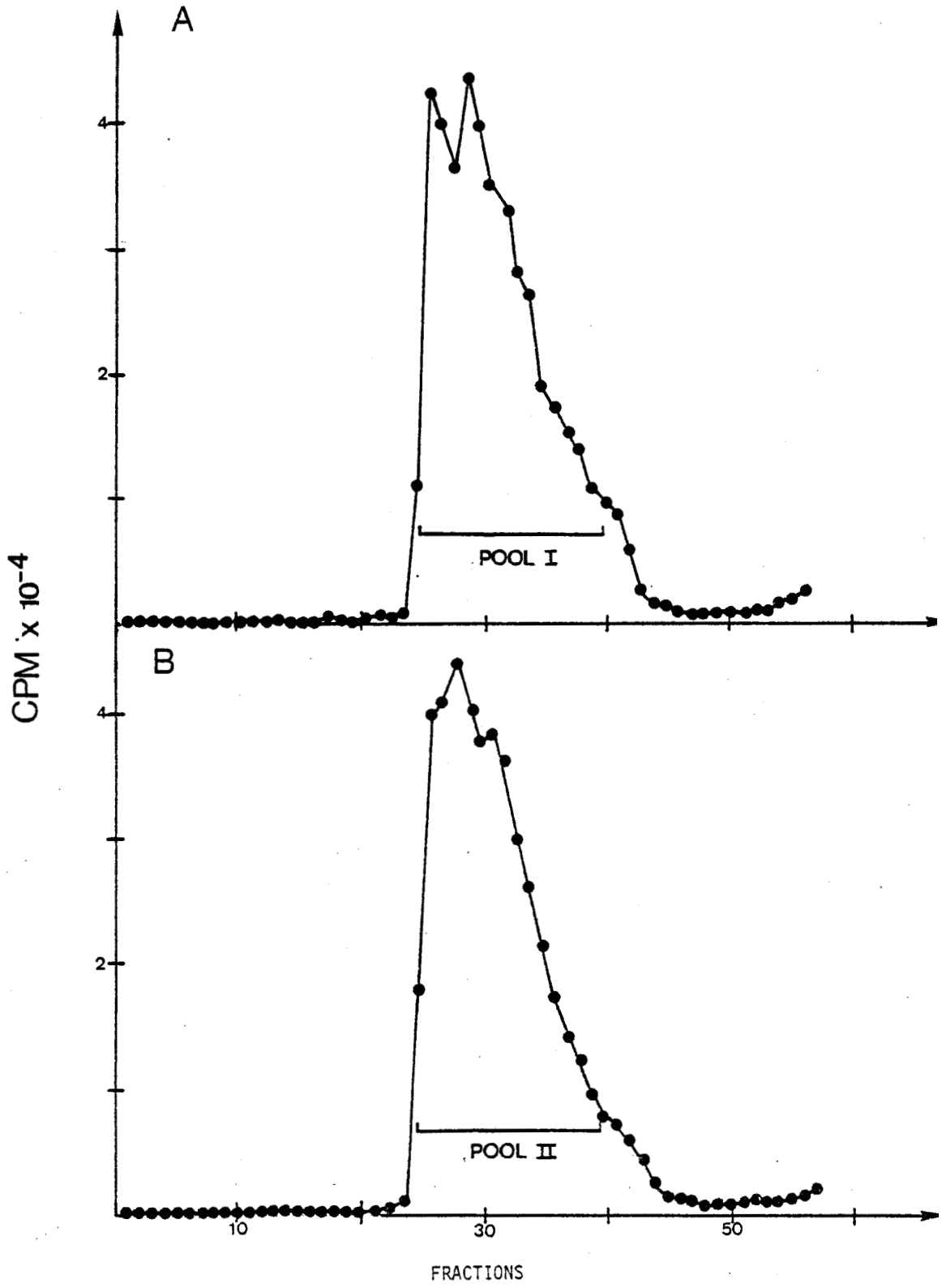
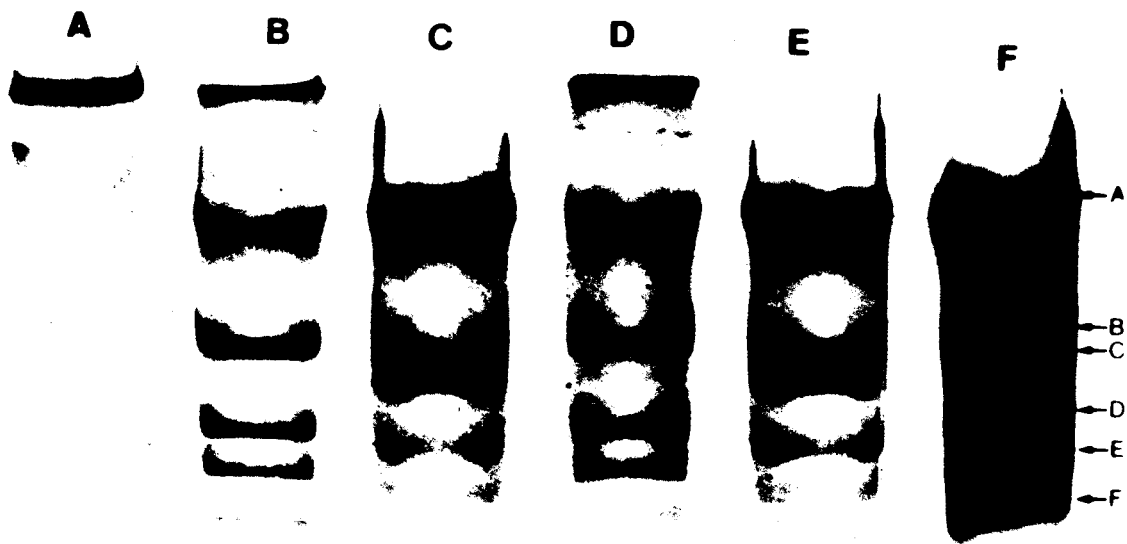


Figure N° 59

Analyse des fragments de DNA libérés après digestion du matériel radioactif (fig. 58 p. 156) par Endo. R. Eco RI

- A -  $^{32}\text{P}$ -DNA viral non digéré comme témoin
- B -  $^{32}\text{P}$ -HAD<sub>2</sub> DNA-55K digéré par Endo. R. Eco RI comme témoin
- C - DNA du pool I digéré par Endo. R. Eco RI  
(sans traitement par la pronase)
- D - DNA du pool II digéré par Endo. R. Eco RI  
(sans traitement par la pronase)
- E - Même que (D) mais traité par la pronase avant  
l'électrophrèse
- F -  $^{32}\text{P}$ -DNA viral digéré par Endo. R. Eco RI comme témoin





Eco RI sont présents dans le gel, alors que dans le cas des complexes isolés de virions la présence des fragments terminaux A et C est aliénée au traitement par la pronase. Ces résultats nous ont paru satisfaisants et nous avons poursuivi notre investigation par l'étude du DNA viral intranucléaire à différents temps du cycle lytique.

Dans la figure 60 page 159, nous montrons les profils de sédimentation de  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ -virions (fig. 60-A) et de noyaux isolés au temps précoce (3 H P.I.) de cellules infectées par des  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ -Adénovirions (fig. 60-B). Plus de 95 % de la radioactivité de départ liée au DNA est retrouvée dans les pics radioactifs. Comme nous l'avions supposé, la répartition de la radioactivité  $^{35}\text{S}$  montre d'une part que la déprotéinisation du matériel a été satisfaisante, et d'autre part, que comparés à la méthode chromatographique (fig. 55 p. 150), les gradients de CsCl/GuHCl-TSEB ont un pouvoir séparateur moindre. Il était donc possible de purifier partiellement le DNA parental viral intranucléaire par traitement par du GuHCl 4 M et centrifugation en gradient de CsCl/GuHCl-TSEB. Nous avons ensuite analysé le DNA parental viral partiellement purifié comme décrit ci-dessous, en le soumettant à une digestion par Endo. R. Eco RI (fig. 61 p. 160). Nous avons préparé deux échantillons, un 3 heures après le début de l'adsorption (fig. 61-A-B), l'autre 18 heures après le début de l'adsorption de  $^{32}\text{P}$ -Adénovirions (fig. 61-C-D). Comme pour les complexes purifiés des virions, une quantité importante de la radioactivité reste au sommet des gels et les fragments terminaux A et C sont absents (fig. 61-A-C). Un traitement par les enzymes protéolytiques avant l'électrophorèse fait apparaître les fragments terminaux et fait disparaître la radioactivité agglomérée au sommet du gel (fig. 61-B-D). Nous avons traité une aliquote des mêmes échantillons par Endo. R. SmaI et analysé les fragments de DNA obtenu par électrophorèse en gel d'agarose.

Qualitativement, nous avons obtenu les mêmes résultats qu'avec Endo. R. Eco RI. Nous avons quantifié les résultats et trouvé que 3 heures ou 18 heures après le début du cycle lytique, plus de 90 % des molécules parentales ont gardé leurs protéines terminales.

Nous avons voulu apporter la preuve directe que la radioactivité présente au sommet des gels était due aux fragments terminaux du génome viral, produit par restriction du DNA parental viral intranucléaire avec Endo. R. SmaI et Endo. R. Eco RI. Nous avons élué la radioactivité présente dans les premières fractions de

Figure N° 60

Centrifugation à l'équilibre des complexes HAd<sub>2</sub> DNA-55K

A - Complexes HAd<sub>2</sub> DNA-55K purifiés de particules virales marquées par la <sup>32</sup>S-méthionine et par la <sup>3</sup>H-Thymidine

B - Complexes HAd<sub>2</sub> DNA-55K préparés à partir de 100 ml de noyaux de cellules KB infectées par des <sup>35</sup>S, <sup>3</sup>H adénovirions

L'infection a été arrêtée 3 heures après le début de l'adsorption des virions radioactifs.

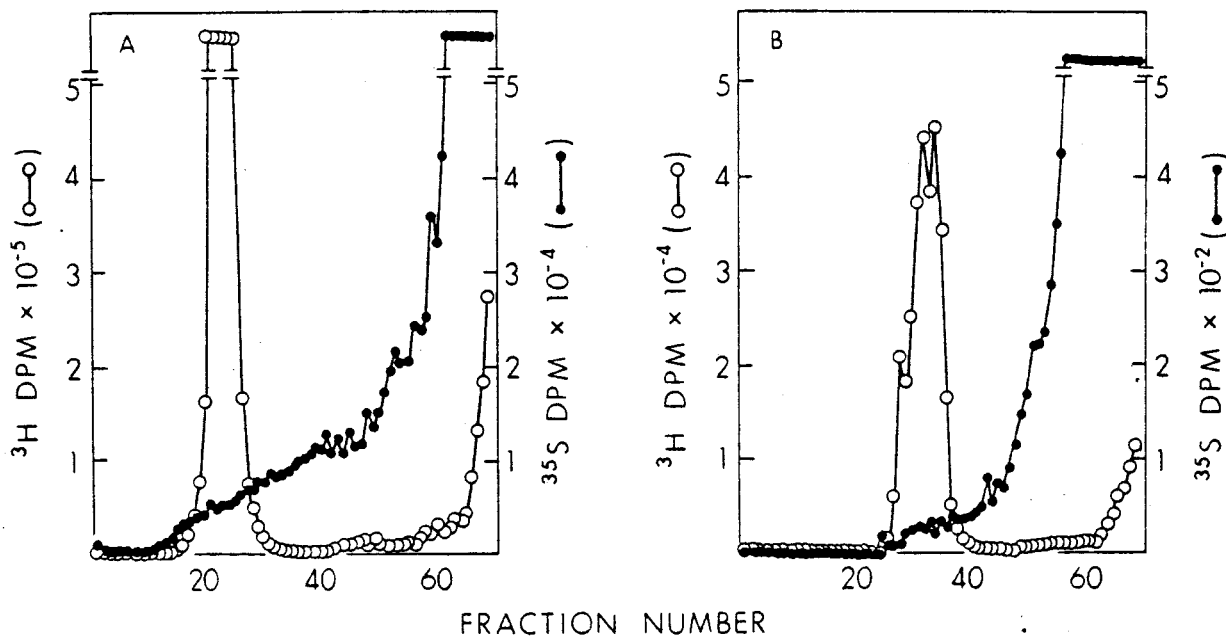


Figure N° 61

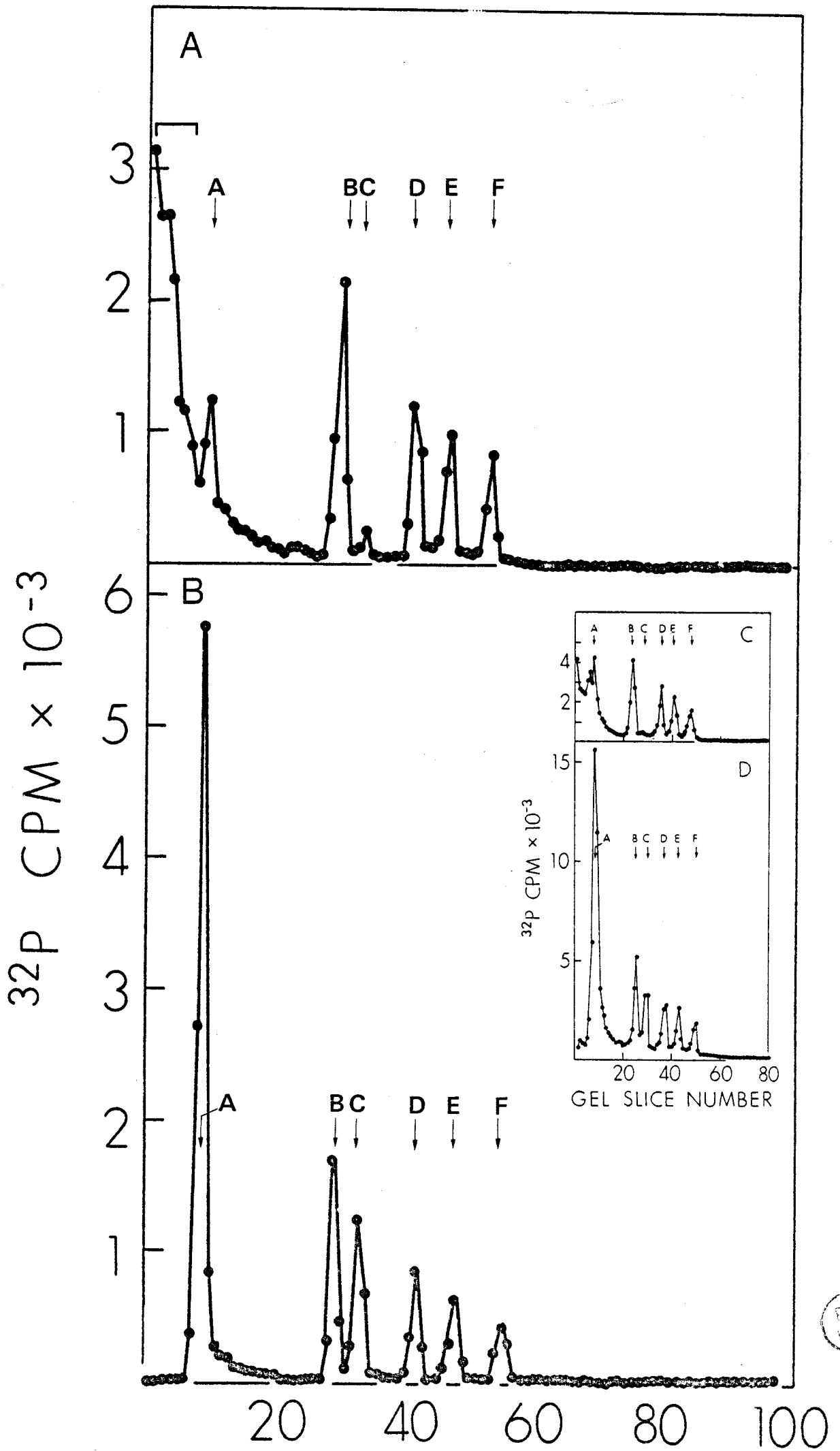
Séparation par électrophorèse en gel d'agarose des fragments de DNA libérés lors de la digestion par Endo. R. Eco RI des complexes HAd<sub>2</sub> DNA-55K.

Les complexes ont été partiellement purifiés par centrifugation en gradient de CsCl/GuHCl-TSEB de lysats de noyaux isolés à la 3ème heure (A - B)  
et à la 18ème heure (C - D)  
du cycle lytique.

Les fragments de DNA ont été analysés avant (A - C)  
et après (B - D)  
traitement par la pronase.

(A - B) Complexes <sup>32</sup>P-HAd<sub>2</sub> DNA-55K isolés à la  
3ème heure du cycle lytique

(C - D) Complexes <sup>32</sup>P-HAd<sub>2</sub> DNA-55K isolés à la  
18ème heure du cycle lytique



RHS  
LILLE

chaque gel et divisé l'éluat en deux aliquotes égales. Une aliquote a été traitée par la protéinase K et les deux aliquotes ont été analysées par électrophorèse en gel d'agarose (fig. 62 p. 162 et fig. 63 p. 163). En fait nous ne montrons dans ces figures qu'une des deux aliquotes car nous nous sommes aperçu avec surprise que le simple fait d'éluier le matériel radioactif suffisait à rendre aux fragments terminaux la possibilité de migrer à leur position respective dans le gel d'agarose. Ce résultat nous incite à penser que les protéines associées aux extrémités du génome viral pourraient ne pas l'être de manière covalente. Qualitativement, la radioactivité éluee au sommet des gels représente les fragments terminaux Eco RI A et C, et, SmaI J et K. Nous avons quantifié les résultats dans le tableau 19 page 164. La quantité des fragments Endo. R. Eco RI A et C retenue au sommet du gel est proche de celle obtenue par le calcul théorique. Dans le cas des fragments produits par la digestion avec Endo. R. SmaI, les fragments J et K retenus au sommet du gel sont enrichis plus de 30 fois par rapport aux autres fragments qui sont probablement retenus non spécifiquement ("trailing").

Nous savions que le DNA parental viral intranucléaire était encore intact 18 heures après le début de l'infection puisque les profils électrophorétiques des fragments Eco RI et SmaI étaient qualitativement identiques aux profils obtenus avec le DNA isolé des virions purifiés. Bien sûr, cette méthode ne permet pas de déterminer si le DNA possède des coupures monocaténaïres ou des brèches, mais est tout à fait satisfaisante en considérant le but de nos expériences. D'autre part, une partie des molécules de DNA parental devait avoir participé à un ou plusieurs cycles de réplication, et être présent dans des molécules hybrides du type : 1 brin parental - 1 brin nouvellement synthétisé. Sachant qu'environ 40 % du DNA est entré en réplication 18 H P.I., si les molécules hybrides ne possèdent pas de protéines terminales, la quantité de fragments terminaux migrant dans les gels en absence de traitement protéolytique devrait augmenter dans la même proportion. Or, nos résultats montrent qu'il n'en est rien. Nous avons voulu apporter la preuve directe que notre raisonnement était correct.

### C - LE DNA PARENTAL REPLIQUE POSSEDE DES PROTEINES TERMINALES

La façon la plus simple de séparer les molécules de DNA parental répliqué est de les alourdir par incorporation du BrdU dans le brin de DNA nouvellement synthétisé. Il nous fallait

Figure N° 62

Analyse par électrophorèse en gel d'agarose de la radioactivité éluée des fractions au sommet des gels de la figure 61 page 160.

A - DNA élué des fractions au sommet du gel A de la figure 61

B - DNA élué des fractions au sommet du gel C de la figure 61



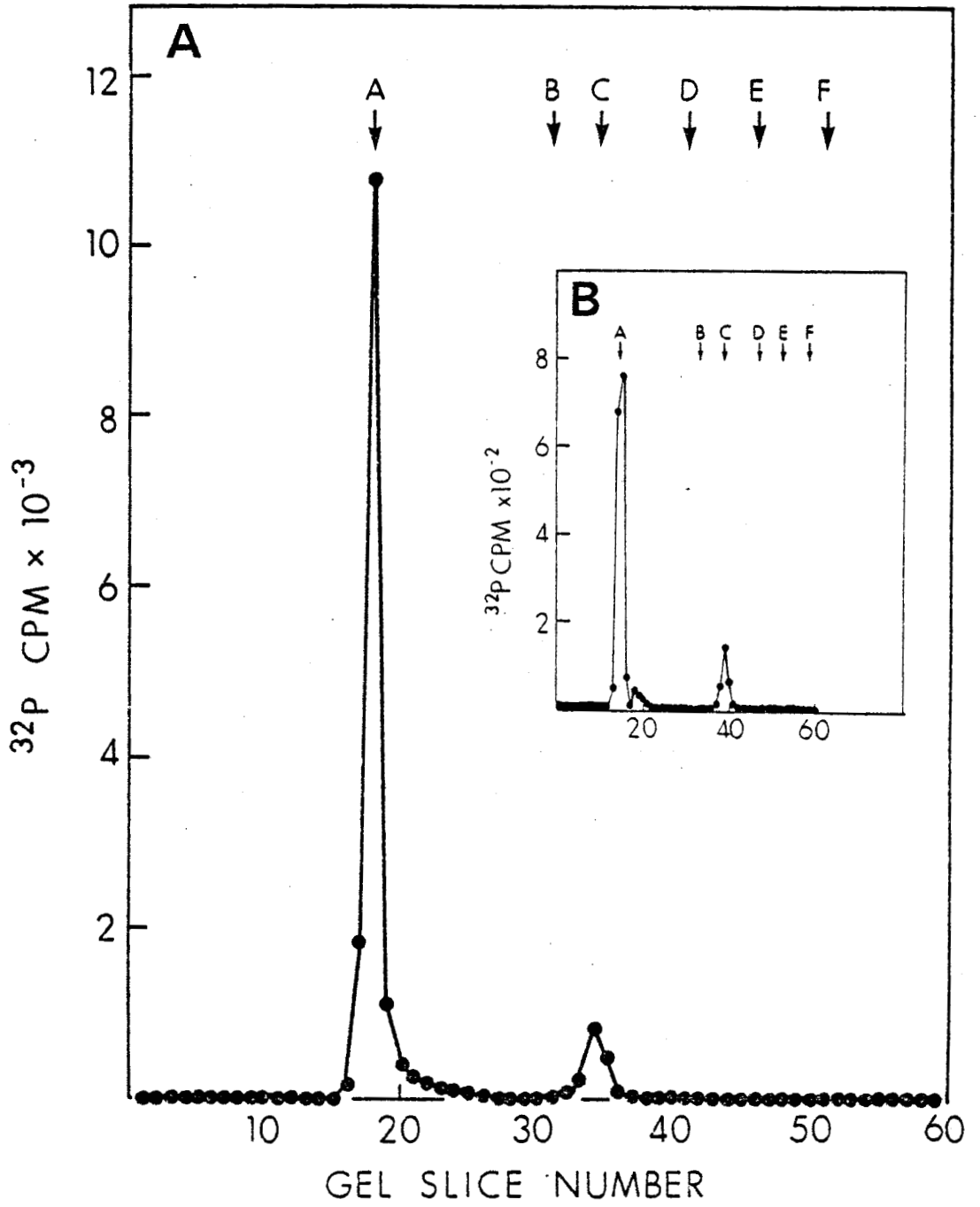


Figure N° 63

Analyse de la radioactivité dans les fractions au  
sommet des gels contenant les fragments Endo. R. SmaI  
des complexes  $^{32}\text{P}$ -HAD<sub>2</sub> DNA-55K isolés à la 3ème et à  
la 18ème heure du cycle lytique.

A - 3 H P.I.

B - 18 H P.I.

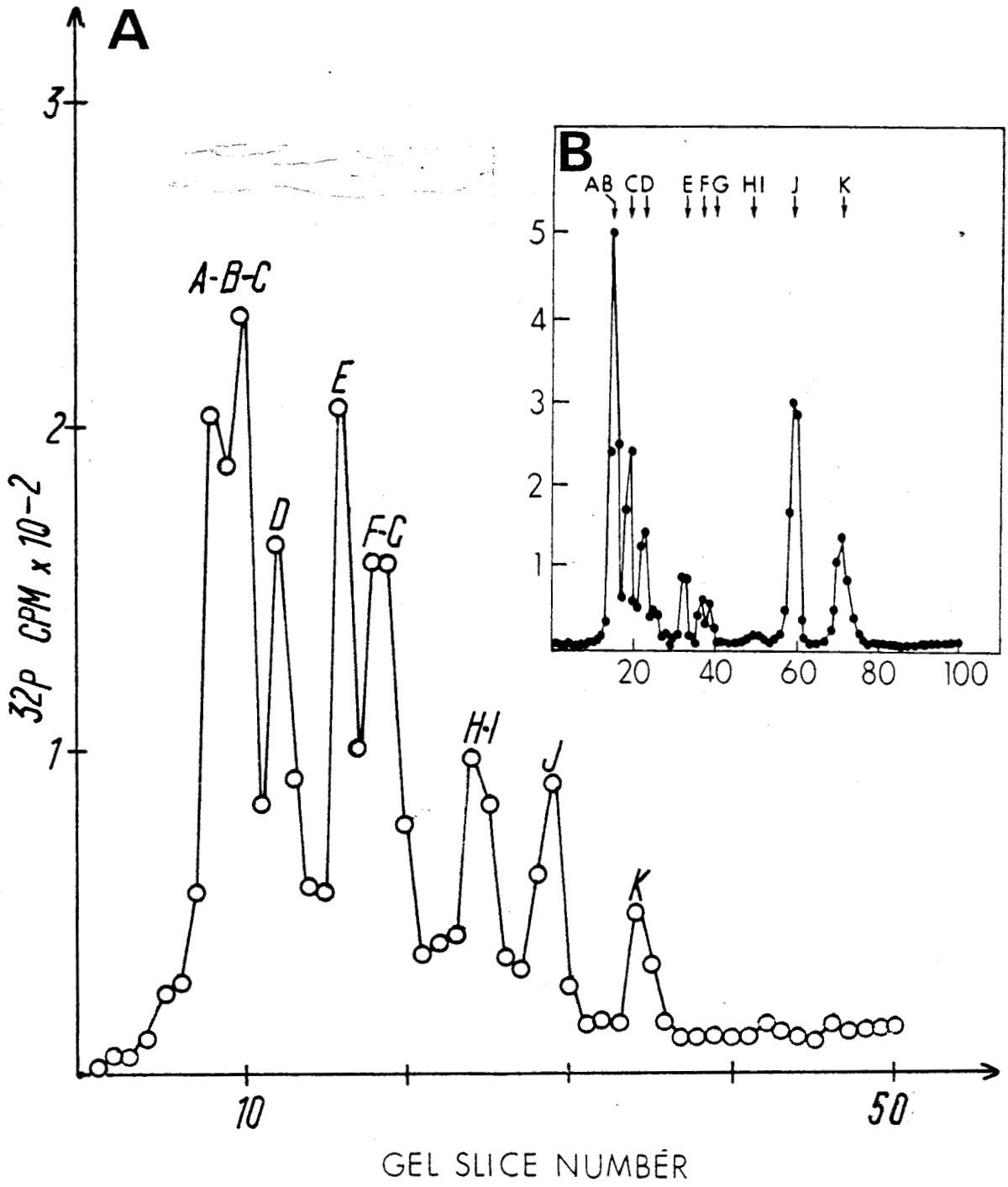


TABLEAU N° 19

REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE DANS LES FRAGMENTS DE  
DNA RESTES AU SOMMET DES GELS D'AGAROSE

ENZYME \ TEMPS		3 heures PI			18 heures PI			
		cpm	% total		cpm	% total		
			Théorique	Obtenu		Théorique	Obtenu	
EcoRI	A	15 000	85.7%	85.72%	17 000	85.7%	84%	
	C	2 500	14.8%	14.28%	3 400	14.8%	16%	
	Total	17 500	100 %	100 %	20 400	100 %	100%	
SmaI	A	} 21 300			A			
	B				B			11 000
	C				4 700			
	D				4 000			
	E				21 000			
	F				} 2 400			
	G							
	H							
	I				900			
	J	2 100	9.9%	8.6%	8 400	2.9%	22.16%	
	K	1 100	1.5%	4.49%	4 400	1.5%	11.6%	
	L							
	M							
Total	24 500	100 %	100 %	37 900	100 %	100 %		



d'abord déterminer si nous pourrions dans les gradients de CsCl/GuHCl-TSEB séparer le DNA viral du DNA viral ayant incorporé la BrdU. La figure 64 page 166 montre qu'en augmentant la molarité initiale du CsCl dans la solution du GuHCl, les deux types de molécules sont parfaitement séparés. Nous avons infecté des cellules KB avec des  $^{32}\text{P}$ -Adénovirus 2 et ajouté la BrdU aux temps indiqués dans la légende de la figure 65 page 167. Comparé au contrôle sans BrdU (fig. 65-A), il n'y a pas de changement de densité des molécules parentales radioactives quand le BrdU est ajouté une heure après le début de l'adsorption et que l'infection est arrêtée au temps 3 H P.I (fig. 65-B). Par contre, quand la BrdU est ajoutée 1 heure ou 6 heures après le début de l'adsorption, en moyenne 42 % (variation de 39 % à 46 % dans quatre expériences) du  $^{32}\text{P}$ -DNA viral parental se retrouvent à la densité des molécules hybrides lourd-léger (HL : heavy-light) 18 heures après le début de l'infection (fig. 65-C). Les fractions des gradients contenant les molécules parentales non répliquées (LL) et les molécules hybrides (HL) ont été rassemblées, et chaque lot de molécules digéré par Endo. R. SmaI. L'analyse des fragments obtenus par électrophorèse en gel d'agarose est présentée dans la figure 66 page 168. Les fragments terminaux J et K dans chaque lot sont absents du profil électrophorétique, ce qui indique que les molécules parentales répliquées possèdent des protéines terminales. De plus, puisque les molécules parentales (LL) ont elles aussi les protéines terminales, il est évident que le fait qu'elles ne se soient pas répliquées 18 heures après le début du cycle lytique n'est pas dû à l'absence de protéines terminales.

Figure N° 64

Séparation en gradient de CsCl/GuHCl-TSEB des molécules de DNA viral natives (LL) et alourdies par incorporation du Bud R (HH).

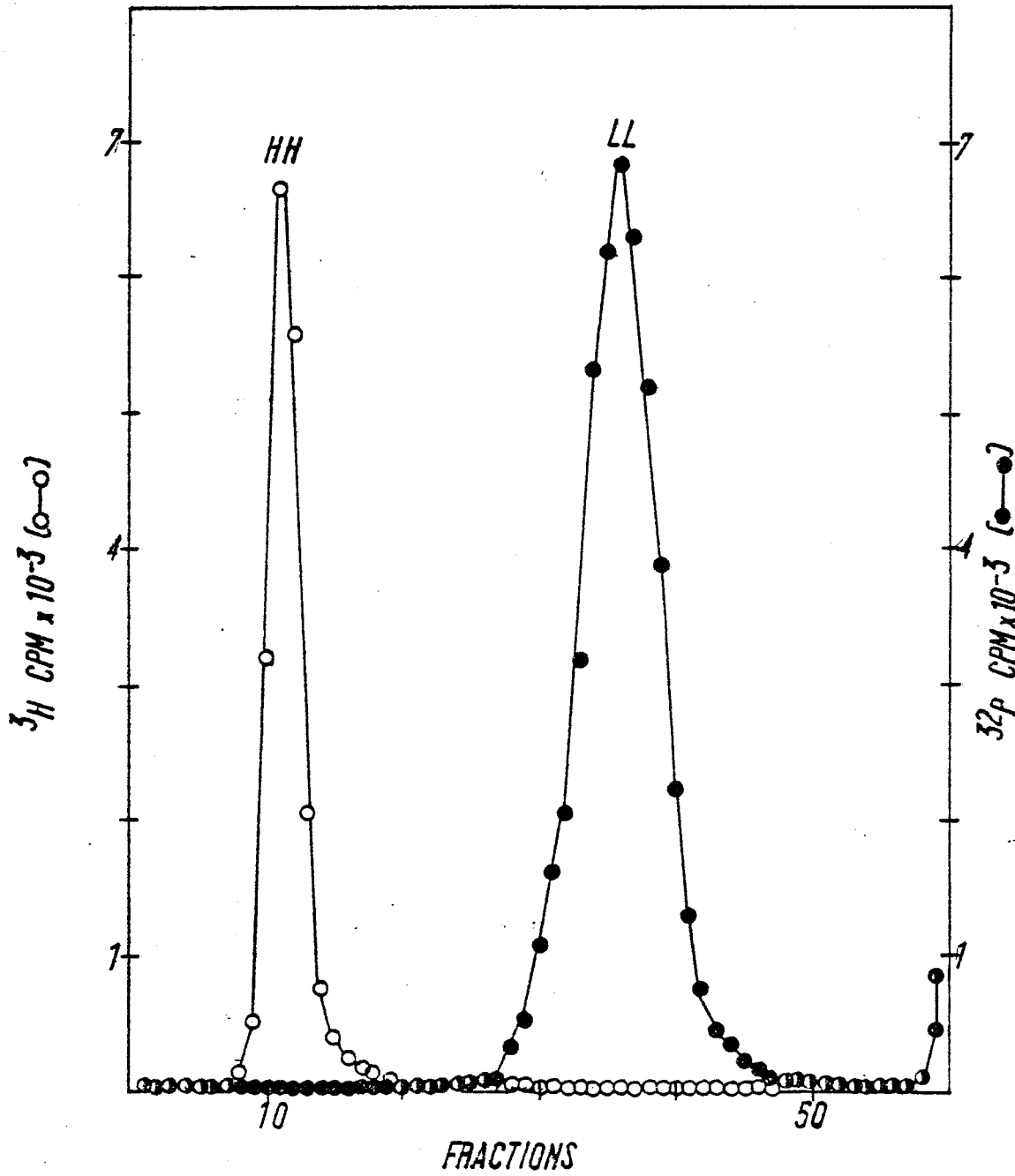


Figure N° 65

Analyse par centrifugation en gradient de  $\text{CcCl}_2/\text{GuHCl}$ -TSEB des complexes  $\text{HAd}_2$  DNA-55K alourdis ou non par le Bud R.

Une culture de cellules KB (300 ml) a été infectée par des  $^{32}\text{P}$  virions. Après 1 heure d'adsorption, la culture a été divisée en trois fractions égales (A, B et C).

A - Contrôle sans FdU/Bud R

B - A 1 heure et 1,5 heure P.I.

on ajoute la FdU et la Bud R.

L'infection est arrêtée à la 3ème heure du cycle

C - A 5,5 et 6 heures P.I.

on ajoute la FdU et la Bud R

Les infections en A et C sont arrêtées à la 18ème heure du cycle lytique.

Les fractions 12-24 (hybrides HL) et 27-35 (molécules parentales) du gradient C ont été rassemblées et digérées par SmaI (fig. 66 p. 168).



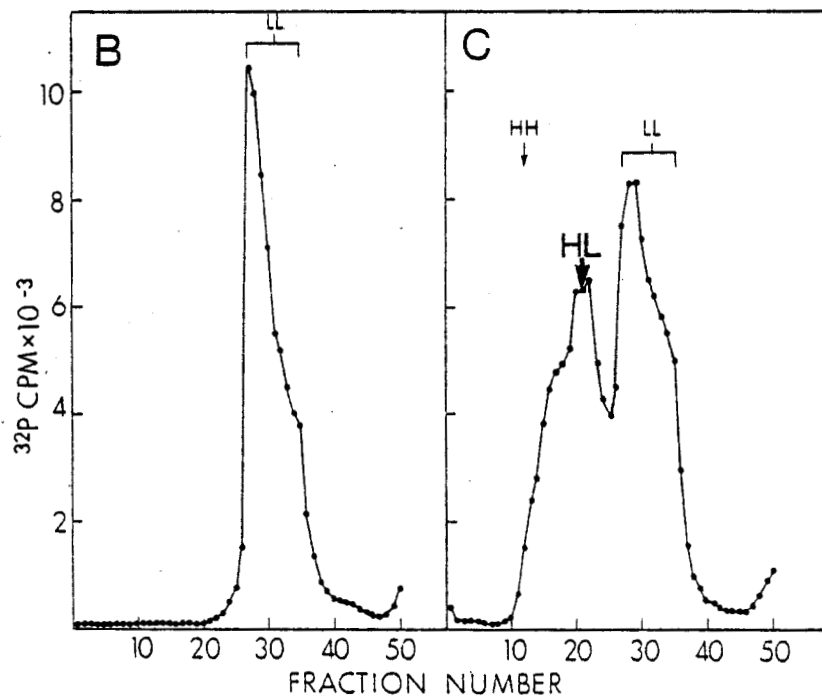
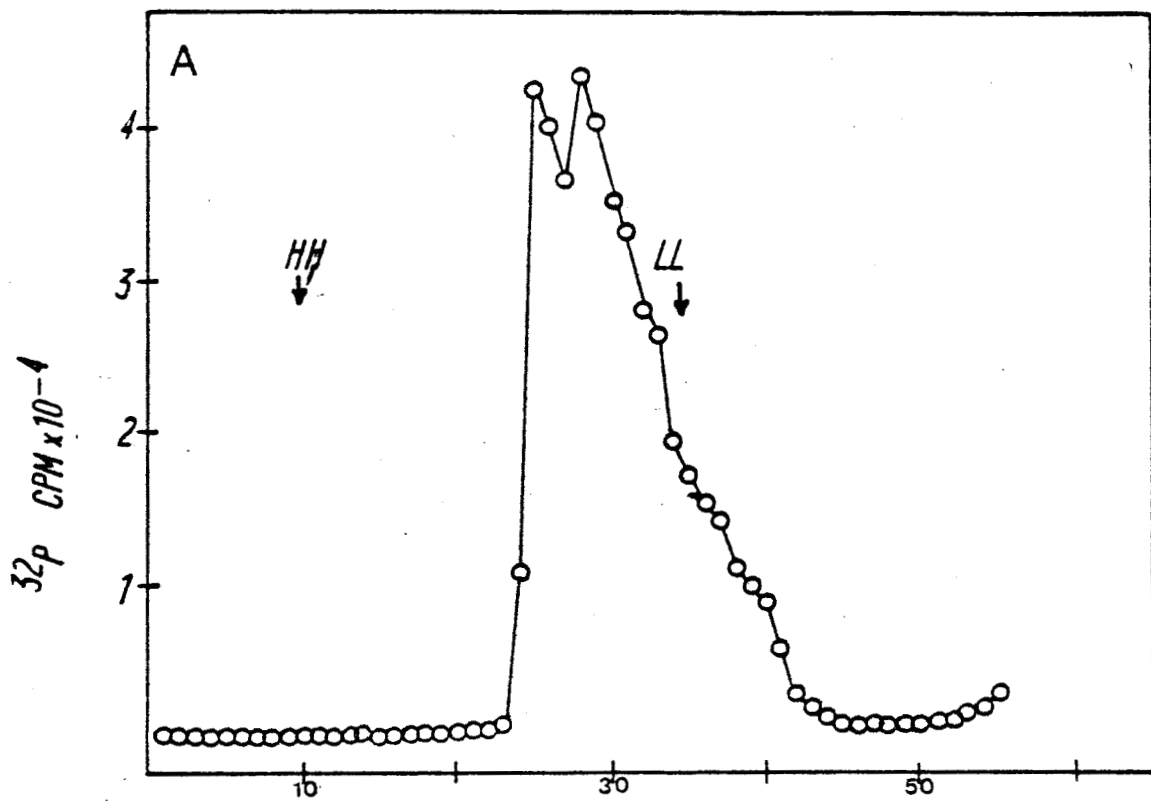


Figure N° 66

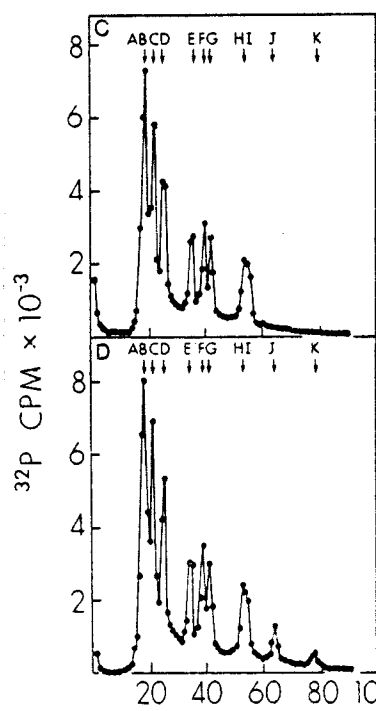
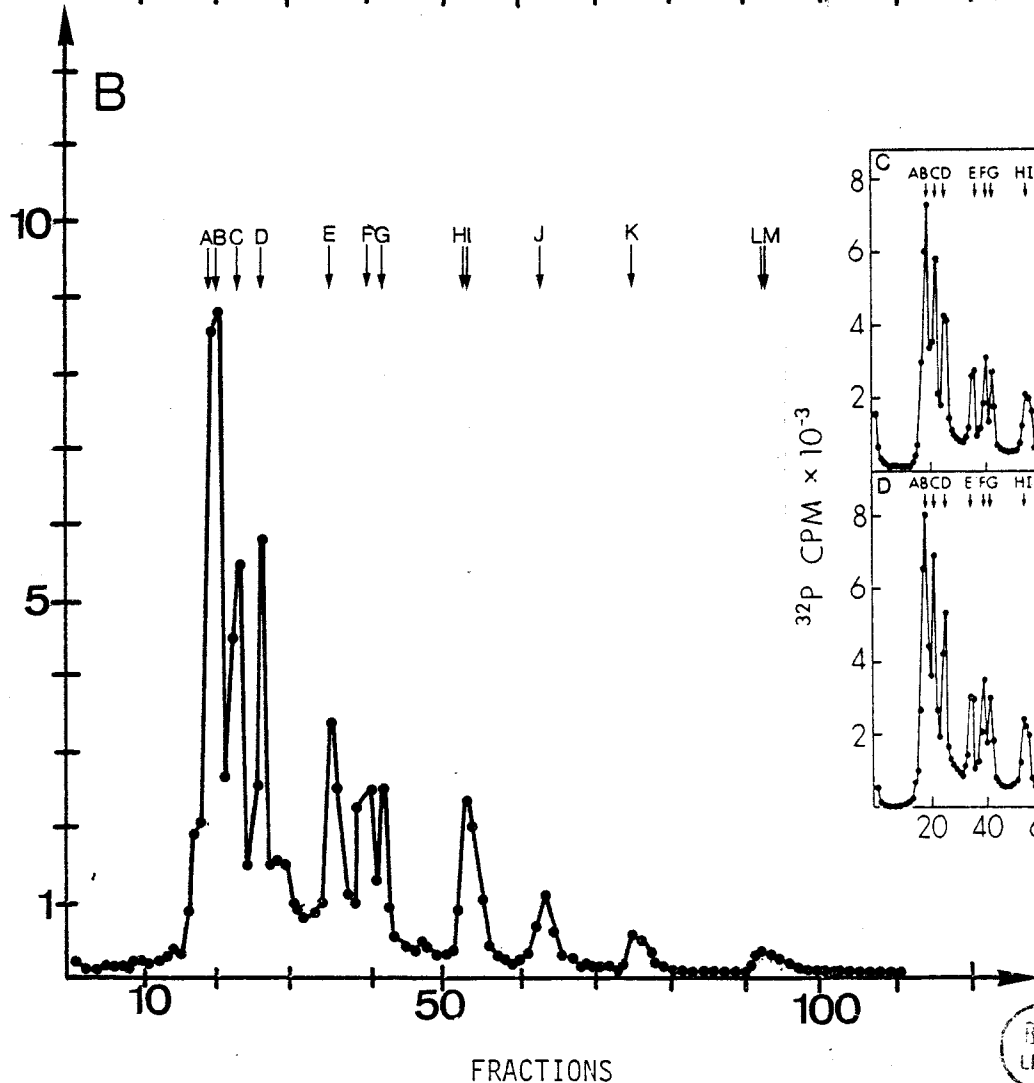
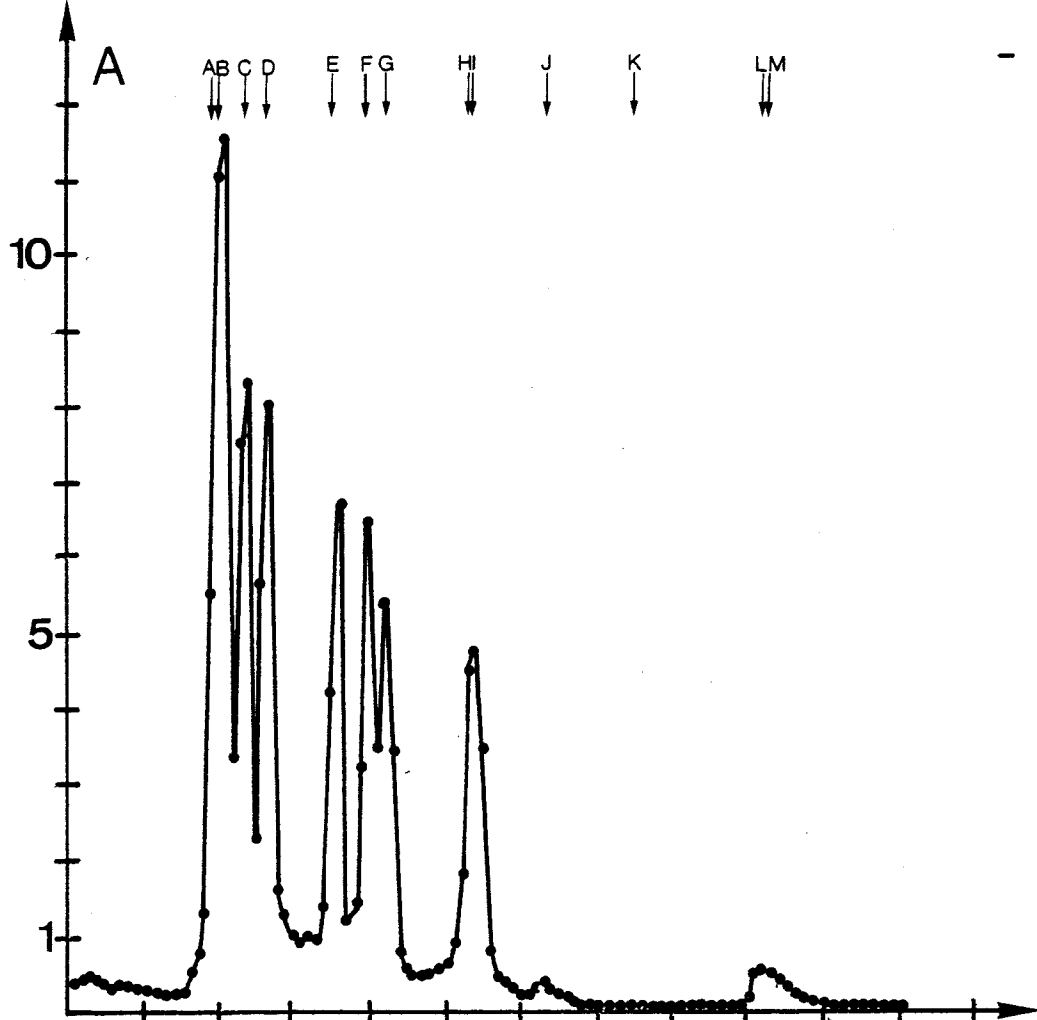
Séparation par électrophorèse en gel d'agarose 1 % des fragments libérés lors de la digestion par Endo. R. SmaI des molécules radioactives contenues dans les fractions 12 à 25 (HL) et 27 à 35 (LL) du gradient C (figure 65 page 167).

Les fragments ont été séparés avant (A et C)  
et après (B et D)  
traitement préalable par la pronase.

(A - B) molécules s'équilibrant à la densité LL

(C - D) molécules s'équilibrant à la densité  
des hybrides HL

CPM x 10<sup>-3</sup>



DISCUSSION ET CONCLUSIONS

---

## A - MULTIPLICITE DES RNA POLYMERASES DES CELLULES KB

Après avoir démontré l'existence de la RNA polymérase III dans le noyau des cellules KB, et avoir différencié cette enzyme des RNA polymérases I et II par son comportement chromatographique original sur DEAE-cellulose, ses propriétés catalytiques et son poids moléculaire, nous avons établi une méthodologie chromatographique appropriée permettant de détecter et de séparer en une seule étape sept activités RNA polymérasiques sur DEAE-Sephadex. Nous avons appelé ces activités dans l'ordre d'éluion I, III<sub>X</sub>, II<sub>X</sub>, II<sub>A</sub>, II<sub>B</sub>, III<sub>A</sub> et III<sub>B</sub>.

### 1 - HETEROGENEITE DES ENZYMES I

Le premier pic d'activité élué de la colonne de DEAE-Sephadex correspond aux enzymes I décrites par d'autres (pour références voir CHAMBON, 1975 (15) et ROEDER, 1976 (95)). Nous avons apporté les preuves que ce pic d'activité est en fait composé par quatre formes enzymatiques du type RNA polymérase I, appelées I<sub>AO</sub>, I<sub>A</sub>, I<sub>BO</sub> et I<sub>B</sub>. Comme les enzymes I<sub>A</sub> et I<sub>B</sub> décrites par ROEDER, 1974 (94), GISSINGER et CHAMBON, 1975 (36), MATSUI et al., 1976 (67) et KELLAS et al., 1977 (59), nos enzymes I<sub>A</sub> (I<sub>AO</sub> et I<sub>A</sub>) sont éluées de la colonne de phosphocellulose avant les enzymes I<sub>B</sub> (I<sub>BO</sub> et I<sub>B</sub>) alors que l'ordre d'éluion de la colonne de DEAE-Sephadex est I<sub>BO</sub>, I<sub>B</sub>, I<sub>A</sub> et I<sub>AO</sub>. Les quatre formes enzymatiques ont des propriétés identiques, tout au moins celles que nous avons examinées, ce qui est conforme aux résultats de MATSUI et al., 1976 (68). L'ensemble de nos résultats nous incite à penser que les quatre formes obtenues ne sont pas produites artificiellement au cours d'une des étapes de purification. Cependant nous ne pouvons exclure la possibilité de la conversion d'une partie des enzymes I<sub>B</sub> en enzymes I<sub>A</sub> au cours de la sonication des noyaux à haute force ionique (KELLAS et al., 1977 (59)). Comme l'ont montré KELLAS et al., 1977 (59) et MATSUI et al., 1976 (68), les enzymes I<sub>A</sub> et I<sub>B</sub> pourraient représenter deux populations de molécules fonctionnellement différentes in vivo, les enzymes I<sub>B</sub> étant engagées dans les complexes de transcription ("bound enzyme"), les enzymes I<sub>A</sub> étant non associées au DNA ("free enzyme"). Nos résultats indiquent aussi que les enzymes I<sub>A</sub> ne seraient pas actives in vivo puisque ce sont les formes I<sub>AO</sub> et I<sub>A</sub> qui sont systématiquement dans la fraction cytoplasmique obtenue par la méthode de CHAUVEAU et sans sonage à haute force ionique.

Nos résultats diffèrent des résultats déjà publiés en ce que nous avons séparé quatre formes de la RNA polymérase I. Il serait intéressant de déterminer la structure de ces enzymes qui dans d'autres cellules diffèrent au moins par un polypeptide (60 K) (SCHWARTZ et ROEDER, 1974 (100), GISSINGER et CHAMBON, 1975 (36) et MATSUI et al., 1977 (67)) ou par deux polypeptides (48 K et 37 K) (HUET et al., 1975 (48) et VALENZUELA et al., 1976 (119)). Seuls HUET et al., 1975 (48) ont pu relier l'absence des polypeptides 48 K et 63 K et la modification de certaines propriétés de l'enzyme A in vitro.

## 2 - HETEROGENEITE DES ENZYMES II

Nous avons aussi caractérisé trois activités RNA polymérase II ( $II_X$ ,  $II_A$  et  $II_B$ ) et ce principalement par leur extrême sensibilité à l'alpha-amanitine (50 % d'inhibition de l'activité des enzymes  $II_X$ ,  $II_A$  et  $II_B$  à environ 0,05 ug/ml d'alpha-amanitine). Trois RNA polymérases II ( $II_O$ ,  $II_A$  et  $II_B$ ) ont été décrites par KEDINGER et al., 1974 (57) et SCHWARTZ et ROEDER, 1975 (101) différant structurellement par le polypeptide de plus haut poids moléculaire. Il est difficile d'identifier ces enzymes aux enzymes  $II_X$  et  $II_A$  que nous avons partiellement caractérisées puisque les formes enzymatiques  $II_O$ ,  $II_A$  et  $II_B$  n'ont pu être séparées par chromatographie sur DEAE-Sephadex. Toutefois, ROEDER, 1974 (94) a décrit une RNA polymérase  $II_A$  éluée de la DEAE-Sephadex juste avant la forme majeure  $II_B$  et qui est absente des noyaux purifiés. Dans notre cas, la forme enzymatique  $II_X$  est uniquement détectable dans la fraction cytoplasmique et serait identique à la forme  $II_A$  décrite par ROEDER, 1974 (94) dans les extraits de *Xenopus laevis*. Par analogie avec les enzymes I, la forme  $II_X$  des cellules KB pourrait ne pas être active in vivo.

Enfin, HOSSENLOP et al., 1975 (46) ont décrit une forme  $B_X$  séparable de la forme majeure B par chromatographie d'un extrait de cellules Hela sur DEAE-Sephadex.

## 3 - HETEROGENEITE DES RNA POLYMERASES III

La mise en évidence de la RNA polymérase III dans les cellules KB était inattendue puisque KELLER et GOOR, 1970 (60) et AUSTIN et al., 1973 (2) n'ont pu caractériser cette enzyme après chromatographie des extraits enzymatiques de cellules KB sur colonne de DEAE-Sephadex.

Nous avons démontré qu'il existe trois activités RNA polymérase III dans les cellules KB. Deux de ces activités, les formes III<sub>A</sub> et III<sub>B</sub> sont semblables aux formes III<sub>A</sub> et III<sub>B</sub> décrites par SKLAR et ROEDER, 1975 (107) et WEINMAN et al., 1975 (129), et aux formes CII et CIII décrites par HOSSENLOP et al., 1975 (46). La troisième forme III est similaire à la forme CI décrite par HOSSENLOP et al., 1975 (46) éluée de la DEAE-Sephadex entre les RNA polymérases I et II. Comme pour les enzymes I<sub>A</sub> et II<sub>X</sub>, il semble que les RNA polymérases III<sub>X</sub> et III<sub>B</sub> ne sont pas actives in vivo puisque nous retrouvons ces activités préférentiellement dans la fraction cytoplasmique. Ces résultats sont à rapprocher des résultats de WIHLEM et al., 1974 (136), SCHWARTZ et al., 1974 (100) et SEIFART et BENECKE, 1975 (103) qui ont rapporté l'existence d'une RNA polymérase III (c) cytoplasmique qui pourrait être identifiée à la forme III<sub>B</sub> (CIII).

#### 4 - SIGNIFICATION DE L'HETEROGENEITE CHROMATOGRAPHIQUE DES RNA POLYMERASES DES CELLULES KB : NOTION DE CLASSE ENZYMATIQUE

Nous avons, utilisant nos conditions chromatographiques, montré qu'il existe trois classes de RNA polymérases dans les cellules KB. Chaque classe semble être formée de plusieurs formes enzymatiques ayant les propriétés générales caractéristiques des enzymes I<sub>B</sub>, II<sub>B</sub> et III<sub>A</sub> qui sont les formes les plus actives in vitro. Ces formes existent-elles in vivo ou sont-elles produites artificiellement au cours des différentes étapes d'isolement ?

On ne peut exclure une protéolyse limitée de certains polypeptides composant les RNA polymérases, et cela expliquerait comment les formes enzymatiques majeures I<sub>B</sub>, II<sub>B</sub> et III<sub>A</sub> donnent naissance à des formes ayant une faible activité in vitro et dont le comportement chromatographique est modifié. Cependant, SKLAR et al., 1976 (108) ont montré que les formes III<sub>A</sub> et III<sub>B</sub> sont présentes dans les extraits enzymatiques préparés en présence de P.M.S.F. inhibiteur des protéases. On ne peut encore exclure la possibilité, comme l'ont montré HUET et al., 1975 (48) qu'un nouveau pic d'activité corresponde à une forme enzymatique déjà décrite dont une des sous-unités a été dissociée et il faut noter que les formes enzymatiques séparées par chromatographie sur DEAE-Sephadex (III<sub>A</sub> et III<sub>B</sub>) ou par chromatographie sur phosphocellulose (I<sub>A</sub> et I<sub>B</sub>) diffèrent par un ou deux polypeptides.

Enfin, si l'on considère qu'un ou plusieurs polypeptides sont en quantité limitante dans la cellule, cette situation fait que l'on peut séparer plusieurs formes du même enzyme.

Si l'ensemble des travaux effectués par différents groupes ont montré que les classes I, II et III fonctionnent dans le noyau in vivo, la signification physiologique des formes multiples de RNA polymérase reste à établir.

## B - LES RNA POLYMERASES DES CELLULES KB INFECTÉES PAR L'ADÉNOVIRUS 2

Quelque soit la signification biologique des RNA polymérase que nous avons dénombrées, notre but était d'établir une méthode chromatographique permettant de séparer rapidement et de façon reproductible les RNA polymérase des cellules KB. Nous y sommes parvenus. En utilisant le DEAE-Séphadex et les extraits préparés à partir des cellules entières, nous avons comparé les RNA polymérase des cellules KB infectées ou non par l'Adénovirus 2.

Le nombre, la force ionique d'éluion, la quantité relative et la sensibilité à l'alpha-amanitine des différents pics d'activité sont similaires dans les extraits enzymatiques préparés aux temps 0,3 et 18 heures P.I.

Cependant, nous avons recherché l'activité RNA polymérasique en utilisant le DNA de KB dans les réactions in vitro. Dans ces conditions, nous ne pouvons exclure que dans les cellules KB infectées par l'Adénovirus 2, il existât une RNA polymérase additionnelle ayant une spécificité absolue pour le DNA viral. D'une autre façon, dans les cellules infectées, les RNA polymérase impliquées dans la transcription des gènes viraux sont celles de la cellule hôte mais associées à des facteurs viraux. Ces enzymes auraient une spécificité plus grande pour le DNA viral comparées aux enzymes de la cellule non infectée. Répondre à de telles questions nécessitait de connaître les conditions ioniques optimales requises pour la transcription du DNA d'Adénovirus 2 in vitro par les RNA polymérase I, II et III des cellules KB non infectées.



C - TRANSCRIPTION IN VITRO DU DNA D'ADENOVIRUS 2 PAR LES  
RNA POLYMERASES DES CELLULES KB

Dans cette étude, nous avons utilisé les RNA polymérase I ( $I_{AO}$ ,  $I_A$ ,  $I_{BO}$  et  $I_B$ ),  $II_B$ ,  $III_A$  et  $III_B$  qui sont les formes enzymatiques majeures séparables par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex. Nous avons démontré que les conditions ioniques optimales requises pour la transcription in vitro du DNA d'Adénovirus 2 intact sont différentes de celles requises pour la transcription d'un DNA contenant des coupures monocaténares ou des régions dénaturées. Le DNA viral intact n'est pas mieux transcrit par les RNA polymérase isolées des cellules infectées que par les RNA polymérase isolées de cellules non infectées. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par AUSTIN et al., 1973 (3) et HOSSENLOP et al., 1975 (46). Dans des expériences que nous n'avons pas présentées dans ce mémoire, nous avons pu détecter un pic d'activité RNA polymérasique élué en dehors des pics déjà caractérisés en recherchant l'activité RNA polymérasique avec le DNA d'Adénovirus 2 dans les fractions recueillies après chromatographie d'un extrait de cellules infectées sur DEAE-Sephadex. Ces résultats sont similaires à ceux de WEINMAN et al., 1976 (130) et HOSSENLOP et al., 1975 (46).

Ce qui ressort de nos résultats, c'est que bien que les RNA polymérase des cellules KB peuvent amorcer la synthèse des RNA sur un DNA bicaténaire intact, ces enzymes démarrent plus efficacement la synthèse du RNA sur les régions du DNA dont la structure est altérée (coupures monocaténares ou régions dénaturées). Cependant, sachant que des RNA polymérase apparentées aux enzymes II et III transcrivent les gènes viraux in vivo (PRICE et PENMAN, 1972 (86), WALLACE et KATES, 1972 (123) et WEINMAN et al., 1974 (130)) et puisque ces enzymes peuvent transcrire, bien que faiblement, le DNA viral intact in vitro, des travaux ont été menés afin d'établir la spécificité de transcription du génome viral in vitro. JAEHNING et ROEDER, 1977 (52), JAEHNING et al., 1977 (53), HOSSENLOP et al., 1975 (46) et HOSSENLOP et al., 1978 (47) ont montré que les gènes viraux n'étaient pas transcrits correctement par les RNA polymérase III isolées des cellules infectées ou non par l'Adénovirus 2. Quelque soit le degré de purification des enzymes, et en évitant l'emploi de la phosphocellulose, les résultats de ces différents travaux sont similaires : toutes les régions du génome viral sont

transcrites, et sur les deux brins du DNA. Des résultats identiques ont été trouvés avec les enzymes II (M. COLOMB, communication personnelle).

Il est clair que des composants autres que les RNA polymérases et le DNA viral intact sont nécessaires à la transcription correcte des gènes viraux. JAEHNING et ROEDER, 1977 (52) ont publié que les RNA polymérases III (III<sub>A</sub> et III<sub>B</sub>) purifiées à partir de cellules KB infectées ou non par l'Adénovirus 2, et ajoutées à des noyaux isolés de cellules KB infectées par l'Adénovirus 2, transcrivent spécifiquement les gènes des RNA 5.5S (VA-RNA). YAMAMOTO et al., 1977 (140) ont observé que la RNA polymérase III (C) de cellules Hela transcrit préférentiellement in vitro le RNA 5S dans la chromatine de cellules Hela. De la même façon, la RNA polymérase III (C) de *Xenopus laevis* transcrit spécifiquement in vitro le RNA 5S dans la chromatine d'oocytes (PARKER et ROEDER, 1977 (79)).

Ce que nous déduisons de nos résultats associés aux résultats décrits ci-dessus, c'est que les RNA polymérases II et III de cellules KB ne peuvent amorcer la synthèse des RNA sur un DNA bicaténaire intact in vitro que si l'on introduit dans le DNA des régions désappariées (basse force ionique et manganèse). Toutefois, les enzymes ne sont pas capables de localiser les promoteurs des gènes dont ils sont spécifiques sur le DNA viral déprotéinisé (HOSENLOP et al., 1978 (47) et M. COLOMB communication personnelle). In vivo, ces promoteurs pourraient être créés par des protéines associées au DNA viral, ouvrant la double hélice ou créant des contraintes physiques dans la double hélice qui font apparaître des boucles de DNA monobrin. Nous avons donc décidé d'aborder l'étude de l'organisation du génome viral in vivo avec l'espoir que connaissant une structure il nous serait plus facile de fixer les conditions favorables pour l'isoler dans une forme la plus native possible.

#### D - ORGANISATION DU GENOME DE L'ADENOVIRUS 2 IN VIVO

Sachant que les gènes précoces viraux sont vraisemblablement transcrits par les RNA polymérases de la cellule hôte, nous avons voulu savoir si l'organisation du génome viral parental intranucléaire était semblable à celle de la chromatine de la cellule hôte.

L'ensemble de nos résultats concernant ce problème nous permet de conclure que le DNA viral parental présent dans le noyau des cellules infectées 3 heures après le début du cycle lytique est organisé en unités structurales similaires aux nucléosomes de la chromatine cellulaire. Le DNA parental viral garde cette organisation jusque 18 heures après le début du cycle lytique. La digestion par la nucléase micrococcalle des noyaux isolés de cellules infectées par l'Adénovirus 2 libère des DNP cellulaires et virales contenant des fragments de DNA qui sont des multiples d'une unité monomérique d'environ 200 paires de bases.

Au moins 90 % du DNA viral est organisé en unités structurales puisque, lorsque seuls des fragments de DNA de taille égale ou inférieure à 200 paires de bases sont visibles dans les gels d'agarose, environ 10 % du DNA viral reste au sommet du gel.

KEDINGER et al., 1978 (58) n'ont pu observer au microscope électronique des structures nucléosomiques dans leurs intermédiaires de réplication, isolés tardivement dans le cycle lytique.

Toutefois, notre travail a été consacré exclusivement à l'étude de l'organisation du génome viral parental qui est un composant mineur parmi les molécules de DNA viral présentes au stade tardif dans la cellule infectée.

Les fragments multimères de DNA "nucléosomique" viral diffèrent en taille des fragments de DNA cellulaire. Les oligomères de DNA viral sont plus petits que leurs équivalents cellulaires, et les fragments de DNA viral submonomériques apparaissent plus rapidement que leurs homologues cellulaires.

Ces résultats suggèrent que le DNA dans la "chromatine" virale est plus accessible à la nucléase micrococcalle que le DNA dans la chromatine cellulaire, et ceci aussi bien au niveau du nucléoïde qu'au niveau du fragment de DNA reliant deux nucléoïdes.

Le fait que le DNA viral soit plus accessible à la nucléase micrococcalle que le DNA cellulaire, peut s'expliquer par le fait qu'en terme de proportion relative du génome transcrit, les séquences virales sont plus activement transcrites aux temps précoce et tardif du cycle lytique que les gènes cellulaires. En effet, BLOOM et ANDERSON, 1978 (8) ont montré que les régions activement transcrites de la chromatine d'oviducte de poule sont plus accessibles à la nucléase micrococcalle que les régions non

transcrites. Cependant, il est difficile de conclure de nos résultats que les gènes transcrits in vivo ont une organisation semblable à celle de la chromatine cellulaire. Si la quantité de "chromatine" virale parentale intranucléaire augmente avec la multiplicité infectieuse (m.o.i.) jusqu'à environ 4 000 particules physiques par cellule, l'activité transcriptionnelle spécifiquement virale mesurée in vitro dans les noyaux isolés atteint un plateau à une m.o.i. un peu inférieure à 4 000. Ainsi, la quantité de "chromatine" virale intranucléaire ne reflète pas directement le taux de transcription des gènes viraux. En fait, il n'y a aucune indication sur le pourcentage de génomes viraux parentaux qui servent de matrice pour la transcription des gènes précoces in vivo.

Bien que toutes les régions du génome viral soit représentées dans la "chromatine" virale, il est possible que les gènes précoces aient une organisation différente des gènes exprimés tardivement (FLINT et WEINTRAUB, 1977 (28)).

Les polypeptides responsables de l'organisation du DNA viral en unités structurales in vivo, similaires aux nucléosomes de la cellule hôte, n'ont pas été identifiés. Le génome viral est associé, à l'intérieur de la particule virale, avec les polypeptides viraux V et VII. Le DNA semble être coupé par la nucléase micrococciale en fragments dont la taille est un multiple d'une unité structurale de 200 paires de bases (CORDEN et al., 1976 (22)). Cependant, il est possible d'infecter des cellules avec le DNA viral déprotéinisé (GRAHAM et VAN DER ERB, 1973 (39) et GRONEBERG et al., 1975 (43)). Cela suggère que les protéines V et VII ne sont pas indispensables à l'expression des gènes viraux précoces. L'efficacité infectieuse du DNA viral déprotéinisé est augmentée d'un facteur 10 si le DNA garde les protéines 55K associées à ses extrémités dans la particule (SHARP et al., 1976 (106) et CHINADURAI et al., 1978 (144)). Il était intéressant de déterminer le devenir des protéines 55K au cours du cycle lytique.

Nous avons démontré que 3 h et 18 h après le début du cycle lytique, plus de 90 % du DNA parental viral intranucléaire possède les protéines 55K à ses extrémités.

Les molécules parentales répliquées contenant un brin parental et un brin fils, non seulement ont gardé une structure nucléosomique, mais possèdent les protéines terminales 55K.

Notre but n'a pas été de déterminer le rôle des protéines 55K dans l'infectivité et la réplication du DNA viral. Ces problèmes ont été discutés par MONCANY, 1978 (72) et STRAUS et al., 1979 (150).

Ce que nous voulons dire en conclusion, c'est qu'aux moments du cycle lytique, du moins ceux que nous avons considérés comme représentatifs, la majorité du DNA parental viral intranucléaire est organisée en unités structurales répétitives et peut se circulariser.

YAMAMOTO et al., 1977 (140) et PARKER et ROEDER, 1977 (79) ont montré que les enzymes III peuvent transcrire in vitro dans la chromatine les gènes dont elles sont spécifiques. Par contre le DNA déprotéinisé est transcrit non spécifiquement. Il serait intéressant d'isoler la "chromatine" virale parentale des noyaux des cellules infectées par l'Adénovirus 2 pour étudier in vitro la transcription des gènes viraux par les RNA polymérases II et III.

Etant donné que des facteurs autres que ceux associés au DNA sont probablement impliqués dans la sélection des gènes viraux à transcrire (WILHEM et al., 1976 (137) et WU, 1977 (139)), il serait aussi très intéressant d'étudier la transcription des gènes viraux dans les systèmes cellulaires grossièrement purifiés, décrits par WU, 1977 (139) et SCHMIDT et al., 1978 (151).

De tels systèmes ouvrent un champ d'investigation qui permettrait de rechercher les composés cellulaires et/ou viraux impliqués dans la régulation de la transcription des gènes viraux.

R E S U M E

---

- 1 - Nous avons solubilisé les RNA polymérases à partir des cellules KB infectées ou non par l'Adénovirus 2. En recherchant les conditions chromatographiques optimales permettant de séparer les RNA polymérases, nous avons partiellement caractérisé 10 activités  $I_{AO}$ ,  $I_A$ ,  $I_{BO}$ ,  $I_B$ ,  $III_X$ ,  $II_X$ ,  $II_A$ ,  $II_B$ ,  $III_A$  et  $III_B$  éluées d'une colonne de DEAE-Sephadex aux molarités 0.09, 0.12, 0.14, 0.16, 0.2, 0.23, 0.25, 0.27, 0.3, et 0.35 M en  $(NH_4)_2 SO_4$ . Ces activités ne semblent pas être des artefacts de chromatographie.
- 2 - Le nombre de pics d'activités, leur force ionique d'éluion et leur activité relative sont similaires dans les extraits de cellules infectées ou non par l'Adénovirus 2. Ces résultats indiquent qu'il n'existe pas de RNA polymérases codées par les gènes viraux.
- 3 - Pour les RNA polymérases appartenant aux classes I, II et III, ni l'optimum de force ionique, ni les concentrations en cations bivalents ne sont des caractéristiques intangibles des enzymes, mais varient en fonction de l'état de la matrice DNA. Les RNA polymérases I, II et III peuvent, bien que faiblement, transcrire un DNA bicaténaire intact in vitro si l'on introduit des modifications locales dans la structure secondaire de la matrice.
- 4 - On ne peut distinguer les RNA polymérases des cellules infectées, des enzymes des cellules non infectées, par leur capacité à transcrire le DNA viral in vitro.
- 5 - In vivo, la majorité du DNA parental viral intranucléaire a une organisation similaire à celle de la chromatine de la cellule hôte, et ceci jusque 18 heures après le début de l'infection alors que 50 % des molécules parentales se sont répliquées au moins une fois.
- 6 - In vivo, les molécules de "chromatine" virale portent des protéines à leurs extrémités (55K) similaires à celles présentes dans la particule purifiée.

BIBLIOGRAPHIE

---



- 1 - ADMAN R., L.D. SCHULTZ et B.D. HALL,  
(1972), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 1702.
- 2 - AUSTIN G.E., L.J. BELLO et J.J. FURTH,  
(1973a), Biochim. Biophys. Acta, 324, 488.
- 3 - AUSTIN G.E., L.J. BELLO et J.J. FURTH,  
(1973b), Biochim. Biophys. Acta, 324, 591.
- 4 - AUSTOKER J.L., T.J.C. BEEBEE, C.J. CHESTERTON et  
P.H.W. BUTTERWORTH,  
(1975), Cell, 3, 227.
- 5 - AXEL R.,  
(1975), Biochemistry, 14, 2921.
- 6 - AXEL R., W. MELCHIOR, B. SOLLNER-WEBB et G. FELSENFELD,  
(1974), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71, 4101.
- 7 - BLATTI S.P., C.J. INGLES, T.J. LINDELL, P.W. MORRIS,  
R.F. WEAVER, F. WEINBERG et W.J. RUTTER,  
(1970), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35, 649.
- 8 - BLOOM K.S. et J.N. ANDERSON,  
(1978), Cell, 15, 141.
- 9 - BROWN D.T., H. WESTPHAL, B.T. BURLINGHAM, V. WINTERHOFF  
et W. DOERFLER,  
(1975), J. Virol., 16, 366.
- 10 - BUHLER J.M., A. SENTENAC et P. FROMAGEOT;  
(1974), J. Biol. Chem., 249, 5963.
- 11 - BUHLER J.M., F. IBORRA, A. SENTENAC et P. FROMAGEOT,  
(1976), J. Biol. Chem., 251, 1712.
- 12 - BURGESS R.R., A.A. TRAVERS, J.J. DUNN et E.K.F. BAUTZ,  
(1969), Nature, 221, 43.
- 13 - CHAMBERLIN M. et P. BERG,  
(1962), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 48, 81.
- 14 - CHAMBON P., F. GISSINGER, J.L. MANDEL Jr, C. KEDINGER,  
M. GNIAZDOWSKI et M. MEIHLAC,  
(1970), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35, 693.

- 15 - CHAMBON P.,  
(1975), Annu. Rev. Biochem., 43, 613.
- 16 - CHAUVEAU J., Y. MOULE et C. ROUILLER,  
(1956), Exptl. Cell Res., 11, 317.
- 17 - CHESTERTON C.J. et P.H.W. BUTTERWORTH,  
(1971), Europ. J. Biochem., 19, 232.
- 18 - CHESTERTON C.J. et P.H.W. BUTTERWORTH,  
(1971), FEBS Letters, 15, 169.
- 19 - CHESTERTON C.J., S.M. HYPHREY et P.H.W. BUTTERWORTH,  
(1972), Biochem. J., 126, 675.
- 20 - COCHET-MEILHAC M. et P. CHEMBON,  
(1974), Biochim. Biophys. Acta, 353, 160.
- 21 - COMPTON J.L., R. HANCOCK, P. OUDET et P. CHAMBON,  
(1976), Europ. J. Biochem., 70, 555.
- 22 - CORDEN J., H.M. ENGELKING et G.D. PEARSON,  
(1976), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 401.
- 23 - CREMISI C., P.F. PIGNATTI et M. YANIV,  
(1976), Biochem. Biophys. Res. Commun., 73, 548.
- 24 - DEZELEE S., A. SENTENAC et P. FROMAGEOT,  
(1972), FEBS Letters, 21, 1.
- 25 - DEZELEE S.,  
(1974), Thèse Doc. Es Sciences, Paris.
- 26 - ESTES M.K.,  
(1978), J. Virol., 25, 917.
- 27 - FIUME L. et F. STIRPE,  
(1966), Biochim. Biophys. Acta, 123, 643.
- 28 - FLINT S.J. et H.M. WEINTRAUB,  
(1977), Cell, 12, 783.
- 29 - FOE V.E., L.E. WILKINSON et C.D. LAIRD,  
(1976), Cell, 2, 131.
- 30 - FRANKE W.W., U. SCHEER, M.F. TRENDELENBURG, H. SPRING et ZENTGRAF,  
(1976a), Cytobiologie, 13, 401.

- 31 - FROENER S.C. et J. BONNER,  
(1973), Biochem., 12, 3065.
- 32 - GAREL A. et R. AXEL,  
(1976), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 3966.
- 33 - GIRARD M., J.P. BOUCHE, L. MARTY, B. REVET et N. BERTHELOT,  
(1977), Virology, 83, 34.
- 34 - GISSINGER F. et P. CHAMBON,  
(1972), Europ. J. Biochem., 28, 277.
- 35 - GISSINGER F., C. KEDINGER et P. CHAMBON,  
(1974), Biochimie, 56, 319.
- 36 - GISSINGER F. et P. CHAMBON,  
(1975), FEBS Letters, 58, 53.
- 37 - GNIAZDOWSKI M., J.L. MANDEL Jr, F. GISSINGER, C. KEDINGER  
et P. CHAMBON,  
(1970), Biochim. Biophys. Res. Commun., 38, 1033.
- 38 - GOTTESFELD J.M., R.F. MURPHY et J. BONNER,  
(1975), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 4404.
- 39 - GRAHAM F.L. et A.J. VAN DER EB,  
(1973a), Virology, 52, 456.
- 40 - GREEN M. et M. PINA,  
(1963), Virology, 20, 199.
- 41 - GREEN M., J.T. PARSONS, M. PINA, K. FUJINAGA, H. CAFFIER  
et L. DANDGRAF-LEURS,  
(1970), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35, 803.
- 42 - GRIFFITH J.D.,  
(1975), Science, 187, 1202.
- 43 - GRONEBER J., D.T. BROWN et W. DOERFLER,  
(1975), Virology, 64, 115.
- 44 - HAGER G.L., M.J. HOLLAND et W.J. RUTTER,  
(1977), Biochemistry, 16, 1.
- 45 - HANCOCK R.,  
(1974), J. Mol. Biol., 86, 649.

- 46 - HOSSENLOP P., D. WELLS et P. CHAMBON,  
(1975), Europ. J. Biochem., 58, 237.
- 47 - HOSSENLOP P., J. SUMEGI et P. CHAMBON,  
(1978), Europ. J. Biochem., 90, 615.
- 48 - HUET J., J. BUHLER, A. SENTENAC et P. FROMAGEOT,  
(1975), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 3034.
- 49 - HUET J., F. WYERS, J.M. BUHLER, A. SENTENAC et P. FROMAGEOT,  
(1976), Nature, 261, 431.
- 50 - JACOB S.T., E.M. SADJEL, W. MUECKE et H.W. MUNRO,  
(1970), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35, 681.
- 51 - JACOB S.T.,  
(1973), Prog. Nucl. Acid Res. Molec. Biol., 13, 93.
- 52 - JAEHNING J.A. et R.G. ROEDER,  
(1977), J. Biol. Chem., 252, 8753.
- 53 - JAEHNING J.A., P.S. WOODS et R.G. ROEDER,  
(1977), J. Biol. Chem., 252, 8762.
- 54 - KEDINGER C., M. GNIAZDOWSKI, J.L. MANDEL Jr, F. GISSINGER  
et P. CHAMBON,  
(1970), Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 165.
- 55 - KEDINGER C., P. NURET et P. CHAMBON,  
(1971), FEBS Letters, 15, 169.
- 56 - KEDINGER C. et P. CHAMBON,  
(1972), Europ. J. Biochem., 28, 283.
- 57 - KEDINGER C., F. GISSINGER et P. CHAMBON,  
(1974), Europ. J. Biochem., 44, 421.
- 58 - KEDINGER C., F. O'BRISON, F. PERRIN et J. WIHELM,  
(1978), J. Virol., 26, 364.
- 59 - KELLAS B.L., J.L. AUSTOKER, T.J.C. BEEBEE et P.H.W. BUTTERWORTH,  
(1977), Europ. J. Biochem., 72, 583.
- 60 - KELLER W. et R. GOOR,  
(1970), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35, 671.

- 61 - KORNBERG R.D.,  
(1977), Ann. Rev. Biochem., 46, 931.
- 62 - KUO M.T., C.G. SAHASRABUDDHE et F.G. SAUNDERS,  
(1976), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 3978.
- 63 - LINDELL T.J., F. WEINBERG, P.W. MORRIS, R.G. ROEDER  
et W.J. RUTTER,  
(1970), Science, 170, 447.
- 64 - LOSIK R. et M.J. CHAMBERLIN,  
(1976), RNA polymérasés, Cold Spring Harbor Prep, New York.
- 65 - LUCK C. et C. ZIMMER,  
(1972), Europ. J. Biochem., 29, 528.
- 66 - MARZLUFF W.F. Jr, E.C. MURPHY Jr et R.C. HUANG,  
(1974), Biochemistry, 13, 3689.
- 67 - MATSUI T., T. ONISHI et M. MURAMATSU,  
(1976), Europ. J. Biochem., 71, 351.
- 68 - MATSUI T., T. ONISHI et M. MURAMATSU,  
(1976), Europ. J. Biochem., 71, 361.
- 69 - MAUL G.G. et T.H. HAMILTON,  
(1967), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 57, 1371.
- 70 - Mc GROGAN M. et H.J. RASKAS,  
(1978), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 625.
- 71 - Mc KNIGHT S.L., M. BUSTIN et O.L. MILLER,  
(1977), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42
- 72 - MONCANY M.L.J.,  
(1978), Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Paris.
- 73 - MORRIS N.R.,  
(1976), Cell, 8, 357.
- 74 - MULDER C., J.R. ARRAND, H. DELIUS, W. KELLER, U. PETERSSON,  
R.J. ROBERTS et P.A. SHARP,  
(1974), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 397.
- 75 - NOLL M. et R.D. KORNBERG,  
(1977), J. Mol. Biol., 109, 393.

- 76 - NOVELLO F., L. FIUME et F. STIRPE,  
(1970), J. Biochem., 116, 177.
- 77 - OHE K. et S.M. WEISSMAN,  
(1971), J. Biol. Chem., 246, 6991.
- 78 - O'MALLEY W., H.C. TOWLE et R.J. SCHWARTZ,  
(1977), An. Rev. Genet., 11, 239.
- 79 - PARKER C.S. et R.G. ROEDER,  
(1977), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 44.
- 80 - PARSONS J.T. et M. GREEN,  
(1971), Virology, 45, 154.
- 81 - PAUL J. et R.S. GILMOUR,  
(1968), J. Mol. Biol., 34, 305.
- 82 - PHILLIPS J.P. et H.S. FOREST,  
(1973), J. Biol. Chem., 248, 265.
- 83 - PHILIPSON L. et U. LINDBERG,  
(1974), Comprehensive Virology, H. FRAENKEL-CONRAT  
et R.R. WAGNER, eds., Plenum Press, New York, 3, 143.
- 84 - POGO A.V., V.C. LITTAU, V.G. ALFFREY et A.E. MIRSKY,  
(1967), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 57, 743.
- 85 - PONTA H.U. et E. WINTERSBERGER,  
(1971), FEBS Letters, 18, 204.
- 86 - PRICE R. et S. PENMAN,  
(1972), J. Mol. Biol., 70, 435.
- 87 - PRICE R. et S. PENMAN,  
(1972), J. Virol., 9, 621.
- 88 - REEDER R.H. et R.G. ROEDER,  
(1972), J. Mol. Biol., 67, 433.
- 89 - REKOSH D.M.K., W.C. RUSSELL, A.J.D. BELLET et A.J. ROBINSON,  
(1977), Cell, 11, 283.
- 90 - ROBERTS J.W.,  
(1969), Nature, 224, 1168.

- 91 - ROBINSON A.J. et A.J.D. BELLET,  
(1974), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 39, 523.
- 92 - ROEDER R.G. et W.J. RUTTER,  
(1969), Nature, 224, 234.
- 93 - ROEDER R.G. et W.J. RUTTER,  
(1970), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 65, 675.
- 94 - ROEDER R.G.,  
(1974), J. Biol. Chem., 248, 241.
- 95 - ROEDER R.G.,  
(1976), RNA polymerases, LOSKI R. et CHAMBERLIN M., eds.,  
pp 285-329, Cold Spring Harbor Press, Cold  
Spring Harbor, New York.
- 96 - RUSSEL W.C. et Y. BECKER,  
(1968), Virology, 35, 18.
- 97 - SCHEER U.,  
(1978), Cell, 13, 535.
- 98 - SCHIK J., K. BACZKO, E. FANNING, J. GRONABERG, H. BURGER  
et W. DOERFLER,  
(1976), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 1043.
- 99 - SCHULTZ L.D. et B.D. HALL,  
(1976), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 1029.
- 100 - SCHWARTZ L.B. et R.G. ROEDER,  
(1974), J. Biol. Chem., 249, 5898.
- 101 - SCHWARTZ L.B. et R.G. ROEDER,  
(1975), J. Biol. Chem., 250, 3221.
- 102 - SEIFART K.H., B.J. BENECKE et P.P. JUHASZ,  
(1972), Arch. Biochem. Biophys., 151, 519.
- 103 - SEIFART K.H. et B.J. BENECKE,  
(1975), Europ. J. Biochem., 53, 293.
- 104 - SERGEANT A. et V. KRSMANOVIC,  
(1973), FEBS Letters, 35, 331.
- 105 - SERGEANT A., J.C. D'HALLUIN, A.P. VERBERT et V. KRSMANOVIC,  
(1974), Arch. Virology, 45, 294.

- 106 - SHARP P.A., C. MOORE et J.L. HAVERTY,  
(1976), *Virology*, 75, 442.
- 107 - SKLAR V.E.F., L.B. SCHWARTZ et R.G. ROEDER,  
(1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 348.
- 108 - SKLAR V.E.F. et R.G. ROEDER,  
(1976), *J. Biol. Chem.*, 251, 1064.
- 109 - SMERDON M.J., T.D. TLSTY et M.W. LIEBERMAN,  
(1978), *Biochemistry*, 17, 2377.
- 110 - SOLLNER-WEBB E. et G. FELSENFLED,  
(1975), *Biochemistry*, 14, 2915.
- 111 - STEIN H. et P. HAUSEN,  
(1970), *Europ. J. Biochem.*, 14, 270.
- 112 - STEVENS A.,  
(1961), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3, 92.
- 113 - STIRPE F. et L. FIUME,  
(1967), *Biochem. J.*, 105, 779.
- 114 - SUGDEN B. et W. KELLER,  
(1973), *J. Biol. Chem.*, 248, 3777.
- 115 - SUMMERS W.C. et R.B. SIEGEL,  
(1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35, 253.
- 116 - SUZUKI Y. et P.E. GISA,  
(1976), *J. Mol. Biol.*
- 117 - TOCCHINI-VALENTINI G.P. et M. CRIPPA,  
(1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35, 737.
- 118 - TODD R.D. et W.T. GARRARD,  
(1977), *J. Biol. Chem.*, 252, 4729.
- 119 - VALENZUELA P., G.L. HAGER, F. WEINBERG et W.J. RUTTER,  
(1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 1024.
- 120 - VALENZUELA P., F. WEINBERG, G. BELL et W.J. RUTTER,  
(1976), *J. Biol. Chem.*, 251, 1464.
- 121 - VERSTEEGH L.R. et C.M. WARNER,  
(1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, 168, 133.



- 122 - VLAK J.M., T.R.H. ROZIJN et F. SPIES,  
(1976), *Virology*, 72, 99.
- 123 - WALLACE R.D. et J. KATES,  
(1972), *J. Virol.*, 9, 627.
- 124 - WATSON J.D. et F.H.S. CRICK,  
(1953), *Nature*, 171, 737.
- 125 - WEAVER R.F., S.P. BLATTI et W.J. RUTTER,  
(1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 2994.
- 126 - WEIL P.A. et S.P. BLATTI,  
(1976), *Biochemistry*, 15, 1500.
- 127 - WEINMAN R. et R.G. ROEDER,  
(1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 1790.
- 128 - WEINMAN R. et R.G. ROEDER,  
(1974), *Fed. Proc.*, 33, 1349.
- 129 - WEINMAN R., H.J. RASKAS et R.G. ROEDER,  
(1975), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 39, 495.
- 130 - WEINMAN R., J.A. JAEHNING, H.J. RASKAS et R.G. ROEDER,  
(1976), *J. Virol.*, 17, 114.
- 131 - WEINTRAUB H. et M. GROUDINE,  
(1976), *Science*, 93, 848.
- 132 - WEISS S.B. et W.L. GLADSTONE,  
(1959), *J. Amer. Chem. Soc.*, 81, 4418.
- 133 - WIDNELL C.C. et J.R. TATA,  
(1964), *Biochem. Biophys. Acta.*, 87, 533.
- 134 - WIDNELL C.C. et J.R. TATA,  
(1966), *Biochem. Biophys. Acta.*, 123, 478.
- 135 - WEILAND T.H.,  
(1968), *Science*, 159, 946.
- 136 - WILHEM J., D. CRIPPA et M. CRIPPA,  
(1974), *Biochemistry*, 13, 1200.
- 137 - WILHEM J., Q. O'BRISON, C. KEDINGER et P. CHAMBON,  
(1976), *J. Virol.*, 19, 61.

- 138 - WOODCOCK C.L.F., L.L.Y. FRADO, C.L. HATCH et L. RICCIARDIELLO,  
(1976), *Chromosoma*, 58, 33.
- 139 - WU G.,  
(1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 2175.
- 140 - YAMAMOTO M., D. JONAS et K. SEIFART,  
(1977), *Europ. J. Biochem.*, 80, 243.
- 141 - YOUNG E.T. et R.L. SINSHEIMER,  
(1967), *J. Mol. Biol.*, 30, 147.
- 142 - ZYLBER E. et S. PENMAN,  
(1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 2861.
- 143 - CHAMBERLIN M.J.,  
(1974), *Annu. Rev. Biochem.*, 43, 721.
- 144 - CHINNADURAI G., S. CHINNADURAI et M. GREEN,  
(1978), *J. Virol.*, 26, 195.
- 145 - DEZELEE S. et A. SENTENAC,  
(1973), *Europ. J. Biochem.*, 34, 41.
- 146 - LASKEY R.A. et D. MILLS,  
(1975), *Europ. J. Biochem.*, 56, 335.
- 147 - MURAMATSU M., T. ONISHI, T. MATSUI, C. KAWABATA et S. TOKUGAWA,  
(1974), *Biochemistry of the cell nucleus*, pp 325-350,  
Academe Kiado, Budapest.
- 148 - OHE K.,  
(1972), *Virology*, 47, 726.
- 149 - ROEDER R.G.,  
(1974b), *J. Biol. Chem.*, 248, 249.
- 150 - STAUS S., A. SERGEANT, M. TIGGES et H.J. RASKAS,  
(1979), *J. Virol.*, accepté pour publication.
- 151 - SCHMIDT O., J.I. MAO, S. SILVERMAN, B. HOVEMANN et D. DOLL,  
(1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 4819.

