Le virus polyoma, moyen d'étude de la régulation génétique dans les cellules de mammifères

Autor(en): **Weil, R. / Hancock, R.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**

Band (Jahr): **70 (1968-1970)**

Heft 333

PDF erstellt am: **28.04.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-276275

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Le virus polyoma, moyen d'étude de la régulation génétique dans les cellules de mammifères [1]

PAR

R. WEIL et R. HANCOCK

Institut suisse de recherches expérimentales sur le cancer, Lausanne

I. Propriétés générales du virus polyoma

Le virus polyoma, endémique chez la souris, induit chez son hôte naturel et chez les rongeurs d'espèces apparentées de nombreuses tumeurs histologiquement distinctes ; son mode d'action est analogue à celui de certains carcinogènes chimiques (5).

Plusieurs autres virus, qui existent chez de nombreuses espèces de mammifères et qui provoquent des tumeurs ou des verrues sont semblables au virus polyoma par leur structure et leurs propriétés biologiques et comme lui possèdent un matériel génétique formé de DNA circulaire (tableau).

Tableau

Virus analogues au virus polyoma. Dénominateur commun : DNA circulaire

	Endémique chez
Virus polyoma	souris
Virus SV-40	singe
Virus du papillome de Shope	lapin
Virus du papillome canin	chien
Virus du papillome bovin	bétail
Virus du papillome humain *	homme

* Inducteur des verrues *(verruca vulgaris)*.

[1] Traduction, publiée avec l'obligeante autorisation de l'Académie suisse des Sciences médicales, d'un travail paru dans « Symposion Friedrich Miescher », *Bulletin de l'Académie suisse des Sciences médicales*, vol. 25, fasc. 1/2, 1970. Ce travail a été présenté à la SVSN par M. R. Weil, dans la séance du 13 février 1969.

Nous remercions le Dr J. P. Zryd et M. I. Marcovitch d'avoir fait cette traduction.

Après infection de cellules de souris en culture, une quantité relativement importante de virus polyoma est produite et la mort des cellules s'ensuit. La préparation virale brute peut être purifiée et concentrée par un traitement à la désoxyribonucléase et à la ribonucléase, suivi de centrifugations différentielles et en gradient de densité de CsCl.

Selon le modèle proposé par KLUG et FINCH (1965) (14) la capside du virus polyoma (fig. 1 a), d'un diamètre extérieur de 450 Å, est composée de 72 capsomères (subunités), disposés selon une symétrie icosaédrique, et formée d'un seul type de polypeptide (6, 20). Le virion infectieux du polyoma consiste en une capside contenant une molécule de DNA circulaire (voir fig. 1 c) (25, 31). Des résultats expérimentaux récents montrent cependant que 10-90 % des particules virales d'une préparation purifiée de virus polyoma sont en réalité des *pseudovirions* non-infectieux (fig. 1 b, d), c'est-à-dire des capsides renfermant, au lieu de DNA circulaire, des fragments linéaires du DNA chromosomique de souris (voir plus loin) (18, 19).

II. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DU DNA DU POLYOMA

Le DNA total des préparations virales purifiées peut être extrait facilement par le phénol ou le dodécylsulfate de sodium. L'analyse des vitesses de sédimentation, par ultracentrifugation du DNA extrait de préparations virales hautement purifiées, met constamment en évidence trois composants distincts que nous avons désignés par ordre de coefficients de sédimentation décroissants, comme : polyoma DNA I (20 S), II (16 S) et III ($\sim$ 14-7 S). Les propriétés des trois types de DNA (18, 25, 28, 31) sont résumées dans la fig. 2. Les DNA I et II du polyoma sont des molécules circulaires de même poids moléculaire (3×10^6), de même longueur ($\sim$ 1,5 μ) et de même densité dans le CsCl (1,709 g cm^{-3}) et donc de même composition en bases (49 % cytosine + guanosine). Tant I que II sont infectieux, c'est-à-dire qu'ils contiennent l'information génétique nécessaire à la production de virus intacts et à l'induction de tumeurs. Le polyoma DNA I est une hélice circulaire tordue sur elle-même, formée de deux chaînes continues qu'il est impossible de dérouler et de séparer. Après dénaturation thermique, il présente une renaturation spontanée de type monomoléculaire. La stabilité thermique inhabituelle du titre infectieux des préparations de DNA polyoma, qui reste inchangé durant une ébullition de 20 à 30 minutes, s'explique par la structure annulaire du DNA I du polyoma (28, 31). L'introduction d'une seule interruption dans l'une ou l'autre des chaînes complémentaires, transforme le polyoma DNA I en un anneau « relâché » correspondant au polyoma DNA II qui présente, lors de la dénaturation, un

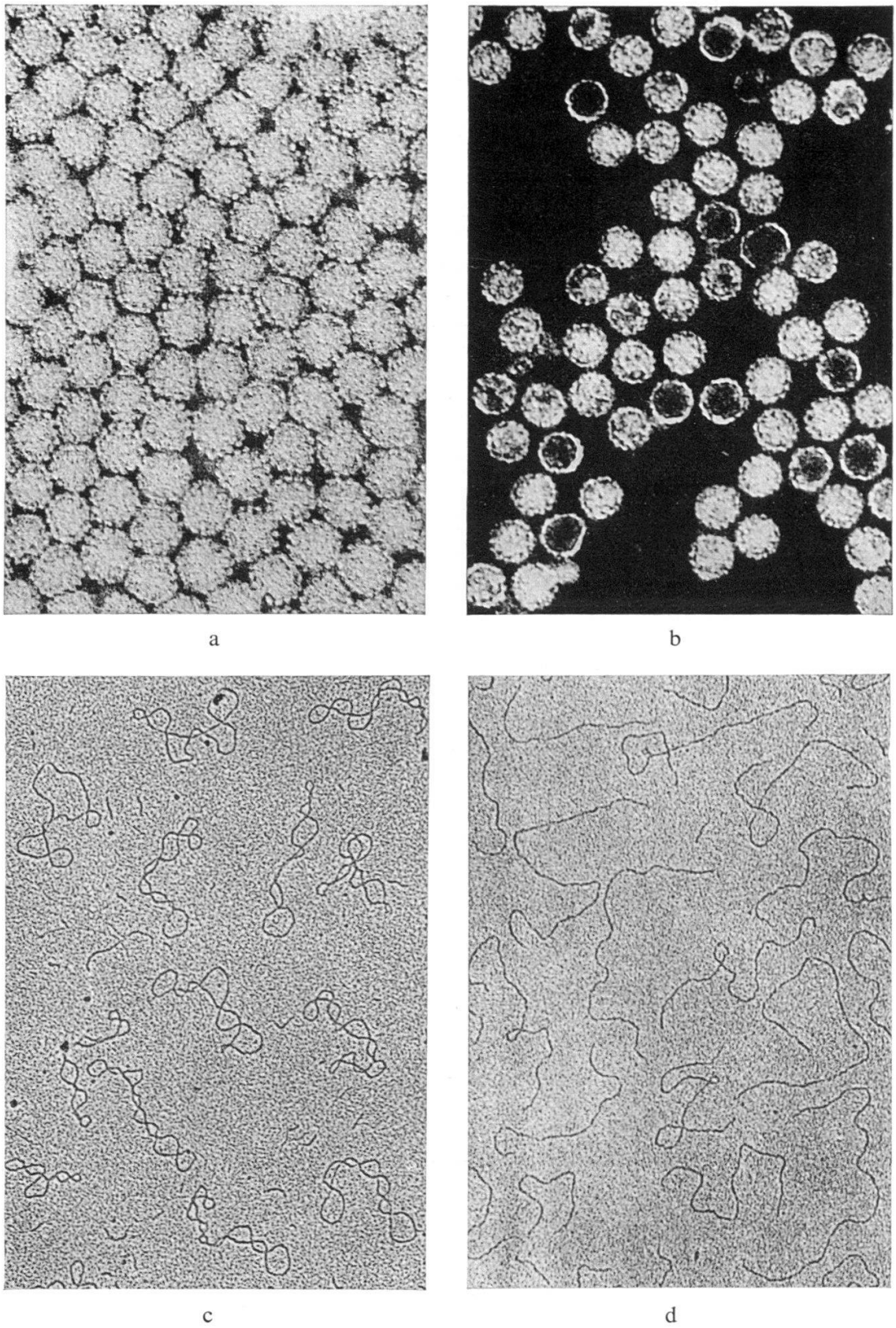

Fig. 1. — *a)* virions du polyoma (gross. 150 000 fois) ; *b)* pseudovirions du polyoma (gross. 150 000 fois) ; *c)* DNA I du polyoma (gross. 38 000 fois) ; *d)* DNA III du polyoma (gross. 38 000 fois).

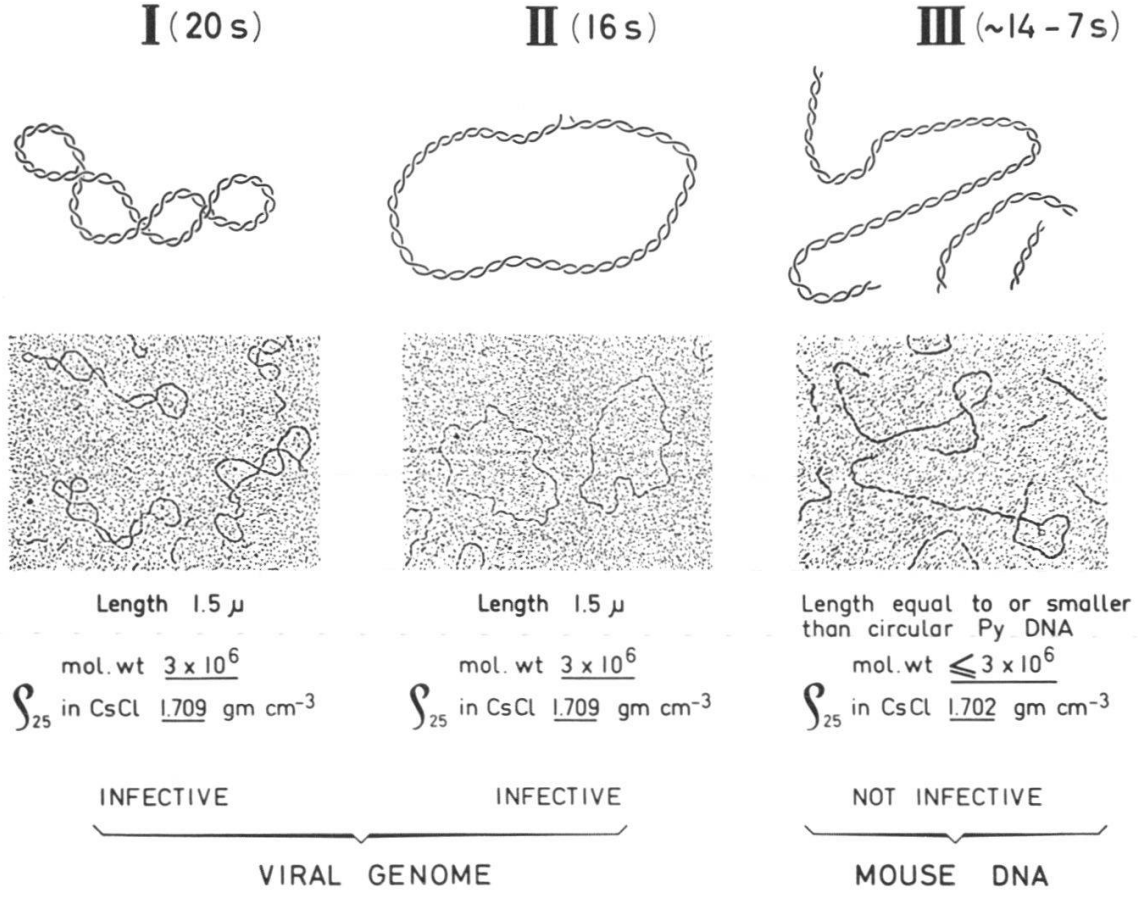

Fig. 2. — DNA du polyoma (voir texte).

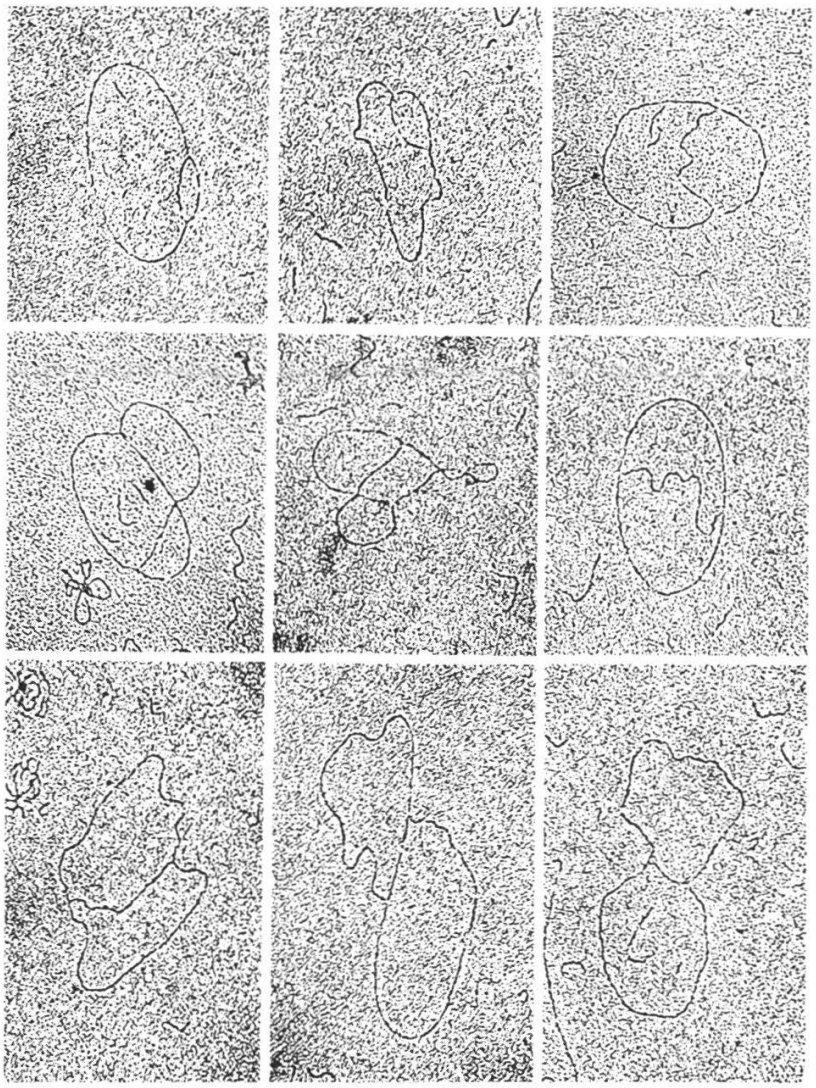

Fig. 3. — Réplication du DNA du polyoma (gross. 38 000 fois).
Préparation Dr B. HIRT.

comportement comparable à celui du DNA linéaire à double chaîne (25). Comme HIRT l'a montré (10, 11), le DNA polyoma circulaire subit une réplication semi-conservative, processus qui nécessite l'introduction d'au moins une discontinuité dans l'une des chaînes de la molécule-mère de DNA. Après la duplication, la continuité des chaînes des molécules-filles est rétablie (voir fig. 3).

Il est surprenant de constater que le composant III consiste surtout en fragments linéaires de DNA chromosomique de souris excisés au hasard durant l'infection lytique de cultures de cellules de souris et enfermés dans les capsides virales (18, 19). Les capsides virales du polyoma qui contiennent du DNA cellulaire de souris au lieu du génome viral (ou de fragments de celui-ci) ne sont pas infectieuses et sont appelées *pseudovirions*. Peut-être peuvent-elles transmettre des marqueurs génétiques de mammifères.

III. INTERACTION ENTRE VIRUS POLYOMA ET CELLULES DE MAMMIFÈRE EN CULTURE

1. *L'infection lytique*

a) Ce type d'interaction a pour conséquence une production de particules virales de polyoma suivie de la mort des cellules (26, 32). Elle peut être étudiée dans les cultures primaires confluentes de reins de souris. Ces cultures sont constituées de cellules d'aspect épithélial, en état d'« inhibition de contact » et ne présentant plus de synthèse de DNA cellulaire ni de mitose avant l'infection. Des études biologiques, cytochimiques et chimiques combinées ont permis de conclure que, dans chaque cellule, le processus lytique a lieu en deux phases distinctes (29, 30) résumées dans la figure 4.

La phase 1 correspond à une séquence d'événements précoces qui précèdent et entraînent la phase 2. Cette dernière consiste en l'activation des systèmes de synthèse du DNA cellulaire et la production de nouvelles particules virales (13, 22, 30).

Quelques heures après l'infection, des molécules du DNA polyoma originel peuvent être mises en évidence dans les noyaux de la plupart des cellules (5).

Des résultats expérimentaux plus récents semblent indiquer que dans toutes les cellules infectées une molécule de DNA viral au moins s'intègre dans le DNA chromosomique et qu'une fraction mineure du RNA messager viral, appelée RNA-polyoma « précoce », pourrait être transcrite à partir de ce DNA intégré (12). Pendant la phase 1, les cellules infectées commencent à synthétiser un nouvel antigène spécifique, appelé T- (« Tumor-antigen ») ou néo-antigène (23) qui peut être mis

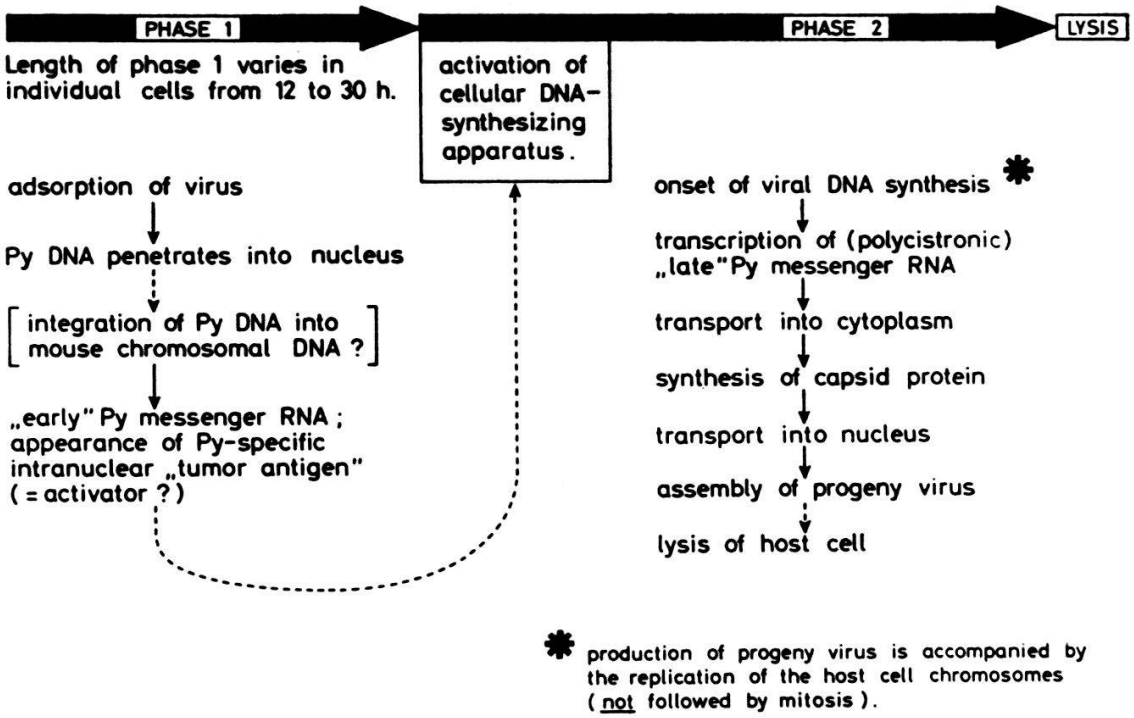

Fig. 4. — Virus polyoma : Cycle infectieux dans les cellules de rein de souris en « inhibition de contact ».

en évidence dans le noyau par immunofluorescence. L'on ne connaît encore ni la nature chimique ni les fonctions de cet antigène. Nous envisageons comme hypothèse de travail la possibilité que cet antigène soit lié à l'activation des systèmes de synthèse du DNA cellulaire. Cette activation comporterait d'une part l'accroissement coordonné de l'activité des enzymes mises en cause dans la synthèse des désoxyribonucléotides pyrimidiques et du DNA (voir fig. 5) et d'autre part, peut-être, la conversion des DNA viral et cellulaire, d'un état de non amorçage (« non-priming ») en un état d'amorçage (« priming ») pour la DNA-polymérase (13, 22, 30). La synthèse du DNA viral s'accompagne toujours de la réplication des chromosomes de la souris (4, 29) et, comme il a été démontré récemment (8), des histones et d'autres protéines associées aux chromosomes.

Immédiatement après le début de la synthèse du DNA viral, des quantités croissantes de RNA-messager polyoma « tardif » sont synthétisées sous la forme de grandes molécules polycistroniques qui portent pratiquement toute l'information génétique contenue dans une des chaînes du DNA circulaire du polyoma (12). Le RNA-messager viral est ainsi transféré du noyau dans le cytoplasme où il forme des polysomes et dirige (probablement) la synthèse de la protéine de la capside virale. Celle-ci est rapidement transportée dans le noyau où le nouveau virus est assemblé.

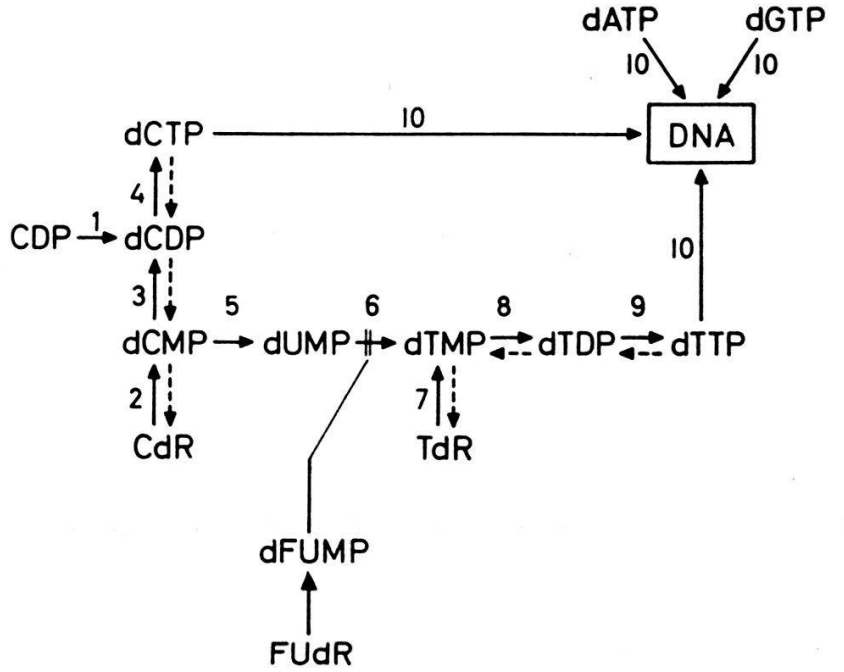

Fig. 5. — Schéma de la biosynthèse des désoxyribonucléotides pyrimidiques et du DNA.

1 = CDP-reductase
2 = CdR-kinase
3 = dCMP-kinase
4 = dCDP-kinase
5 = dCMP-deaminase
6 = dTMP-synthetase
7 = TdR-kinase
8 = dTMP-kinase
9 = dTDP-kinase
10 = DNA-polymerase

CDP = cytidine-5'-diphosphate
CdR = deoxycytidine
TdR = deoxythymidine
dCMP, dCDP, dCTP = deoxycytidine-5'-mono-, di- and triphosphate
dTMP, dTDP, dTTP = deoxythymidine-5'-mono-, di- and triphosphate
dUMP = deoxyuridine-5'-monophosphate
dATP = deoxyadenosine-5'-triphosphate
dGTP = deoxyguanosine-5'-triphosphate
FUdR = 5-fluorodeoxyuridine
dFUMP = 5-fluorodeoxyuridine-5'-monophosphate
DNA = deoxyribonucleic acid

b) *Synchronisation de la synthèse du DNA induite par le virus polyoma*

La durée très variable de la phase 1 (12-30 heures) pour chaque cellule, fait que l'infection des cultures de reins de souris est asynchrone (fig. 6) : dans les premières cellules activées, la synthèse induite du DNA commence environ douze heures après le début de l'infection, puis, le nombre de cellules activées s'accroît rapidement et atteint un plateau environ trente heures après le début de l'infection (22, 30). Afin d'étudier en détail la séquence des étapes du cycle infectieux, particulièrement la transcription du RNA-messager du polyoma, nous avons synchronisé le début de la synthèse induite du DNA à l'aide de la 5-fluorodésoxyuridine (FUdR ; fig. 4 et 7) (22).

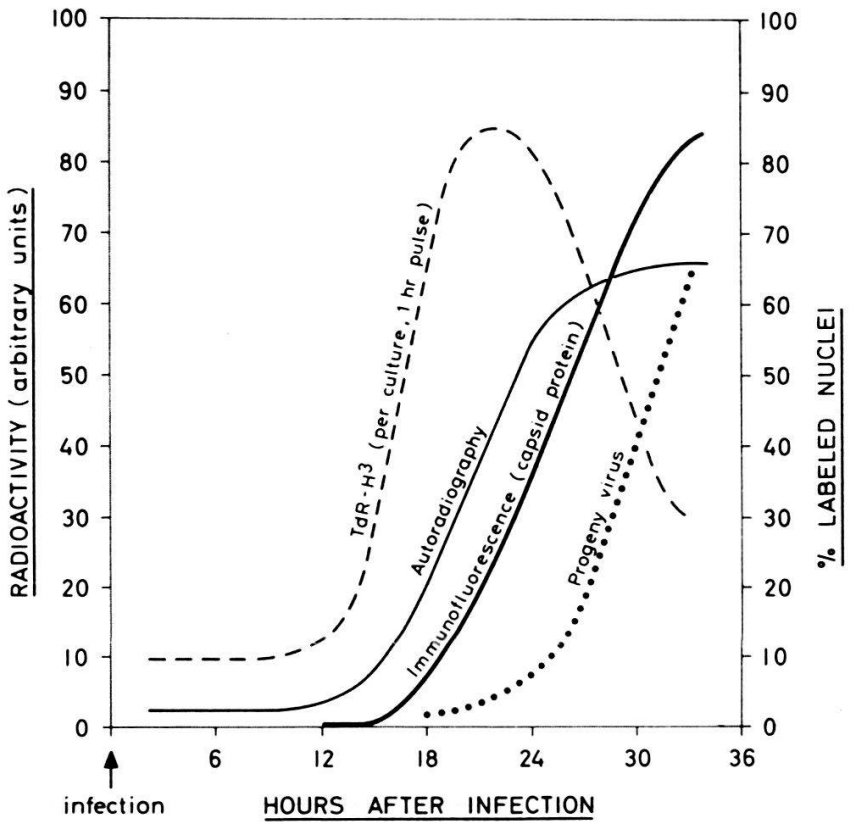

Fig. 6. — Schéma du développement de l'infection, par le virus polyoma des cultures de cellules de rein de souris confluentes (autoradiographie : 1 heure dans la thymidine-H^3).

Si le FUdR est ajouté au milieu de culture immédiatement après l'adsorption du virus, la synthèse des DNA cellulaire et viral, de RNA-messager « tardif » et de protéine de la capside virale est inhibée (12, 22). Cependant, les premiers événements du cycle infectieux, comme la production de l'antigène T (23) et du RNA « précoce » du polyoma (12), ainsi que l'activation des systèmes de synthèse du DNA cellulaire (13, 22, 30), ont lieu en présence de FUdR comme dans les cultures témoins infectées en l'absence de l'inhibiteur (fig. 7). L'addition de thymidine au milieu de culture supprime immédiatement et de manière spécifique le blocage imposé par le FUdR.

Par conséquent, si la thymidine est ajoutée environ trente heures après le début de l'infection, donc lorsque la plupart des cellules sont activées, la synthèse induite du DNA (cellulaire et viral) débute de manière synchrone dans toutes les cellules.

c) *Hypothèse de travail*

Certains stimuli comme la phytohémagglutinine, l'hépatectomie partielle et autres, déclanchent la mitose des cellules différenciées (3, 16, 17) : dans ces systèmes, la synthèse induite du DNA cellulaire est précédée d'une production fortement accrue de RNA cellulaire, suivie

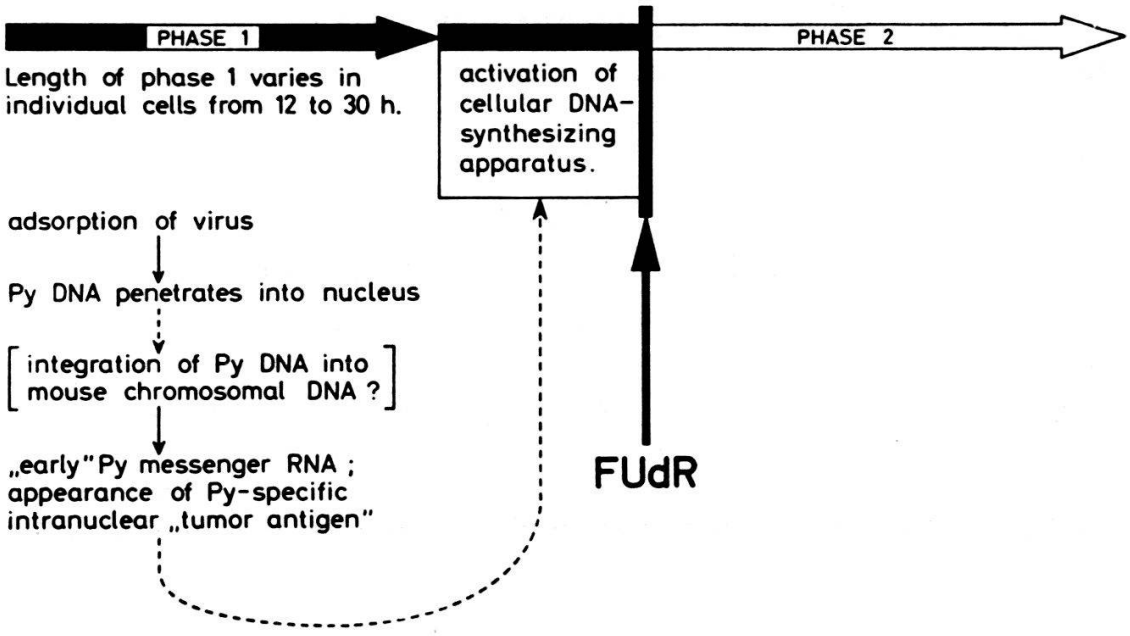

Fig. 7. — Blocage par la 5-fluorodésoxyuridine (FUdR) du cycle infectieux du virus polyoma.

de divisions mitotiques. Par contre, la synthèse du DNA cellulaire induite par le virus polyoma n'est ni précédée ni accompagnée d'une stimulation globale de la synthèse du RNA cellulaire, ni suivie de mitoses. Nos résultats expérimentaux sont compatibles avec l'hypothèse suivante : *dans les cellules de reins de souris en état d'inhibition de contact, le virus polyoma active (déréprime ?) un élément de régulation génétique spécifique qui commande le déclanchement de la réplication des chromosomes dans la cellule hôte.*

2. *L'infection non-lytique (« transformation »)*

L'infection de cultures de cellules de hamster n'est pas suivie d'une production de virus (26), car le cycle infectieux est bloqué à un stade précoce avant l'induction virale de la synthèse du DNA. Le DNA intact du polyoma pénètre rapidement dans le noyau de la plupart des cellules des cultures infectées (9).

Un ou deux jours après l'infection, on peut détecter l'antigène T intranucléaire dans un petit nombre de cellules (23). De plus, beaucoup de ces cellules « transformées » contiennent un nouvel antigène induit par le virus qui pourrait être d'origine cellulaire (21). Puisque les antigènes induits par le virus représentent des marques transmissibles et, en général, parfaitement stables du virus, on peut les considérer, bien qu'indirectement, comme la première indication expérimentale solide de la présence continue du DNA viral dans les cellules transformées, hypothèse qui a été renforcée par la découverte du fait que les cellules transformées produisent continuellement de petites quantités de RNA polyoma

viral (1). Plusieurs laboratoires (2, 7, 15, 24, 27) ont fourni des preuves directes de la présence continue du génome viral dans le DNA (chromosomique ?) des cellules « transformées » par le virus SV-40 : la réplication du DNA viral et la production de virus infectieux SV-40 peuvent être induites par la fusion des cellules « transformées » avec des cellules non infectées d'une culture de reins de singe. Au vu des similitudes entre le virus SV-40 et le virus polyoma, on peut s'attendre à une situation analogue dans le cas de cellules transformées par ce dernier.

L'utilisation en tant que synonymes des termes : « transformées », « néoplasiques », « malignes » a créé une grande confusion conceptuelle. Il faut donc souligner que ni des propriétés morphologiques spécifiques, ni la perte de l'inhibition de contact, ni la malignité évaluée par la possibilité d'une transplantation ne sont associées de manière constante aux cellules transformées par le virus polyoma (ou SV-40) et que, de plus, les mécanismes de l'effet oncogène du polyoma et des virus analogues restent inconnus.

Résumé

La comparaison des poids moléculaires permet d'estimer que l'ADN polyoma circulaire contient 5 à 7 gènes, alors que celui des cellules de mammifères en contiendrait environ 5×10^6. Grâce à sa petite taille et à sa remarquable stabilité physique et biologique, l'ADN polyoma circulaire est un moyen utile pour l'étude de la régulation génétique des cellules de mammifères.

BIBLIOGRAPHIE

1. BENJAMIN, T. L. — *J. mol. Biol.*, *16*, 359 (1966).
2. CASSINGENA, R. et MAY, P. — *C. R. Acad. Sci.* (Paris), *267*, 250 (1968).
3. COOPER, H. L. et RUBIN, A. D. — *Science*, *152*, 516 (1966).
4. DULBECCO, R., HARTWELL, R. L. et VOGT, M. — *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), *53*, 403 (1965).
5. EDDY, B. E. — *Progr. exp. Tumor Res.*, *4*, 1 (1964).
6. FINE, R., MASS, M. et MURAKAMI, W. T. — *J. mol. Biol.*, *36*, 167 (1968).
7. GERBER, P. et KIRSCHSTEIN, R. L. — *Virology*, *18*, 582 (1962).
8. HANCOCK, R. et WEIL, R. — *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), *63*, 1144 (1969).
9. ZUR HAUSEN, H. et WEIL, R. (non publié).
10. HIRT, B. — *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), *55*, 997 (1966).
11. HIRT, B. — *J. mol. Biol.*, *40*, 141 (1969).
12. HUDSON, J. B., GOLDSTEIN, D. A. et WEIL, R. — *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), *65*, 226 (1970).
13. KÁRA, J. et WEIL, R. — *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), *57*, 63 (1967).
14. KLUG, A. et FINCH, J. T. — *J. mol. Biol.*, *11*, 403 (1965).
15. KOPROWSKI, H., JENSEN, F. C. et STEPLEWSKI, Z. — *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), *58*, 127 (1967).
16. LIEBERMAN, I., ABRAMS, R. et OVE, P. — *J. biol. Chem.*, *238*, 2141 (1963).
17. LIEBERMAN, I. et KANE, P. — *J. biol. Chem.*, *240*, 1737 (1965).
18. MICHEL, M. R., HIRT, B. et WEIL, R. — *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), *58*, 1381 (1967).
19. MICHEL, M. R. — Thèse, Université de Berne, 1968.
20. MURAKAMI, W. T., FINE, R., HARRINGTON, M. R. et BEN SASSAN, Z. — *J. mol. Biol.*, *36*, 153 (1968).
21. PEARSON, G. et FREEMAN, G. — *Cancer Res.*, *28*, 1665 (1968).
22. PÉTURSSON, G. et WEIL, R. — *Arch. ges. Virusforsch.*, *24*, 1 (1968).
23. TAKEMOTO, K. K., MALMGREN, R. A. et HABEL, K. — *Virology*, *28*, 485 (1966).
24. TOURNIER, P., CASSINGENA, R., WICKER, R., COPPEY, J. et SUAREZ, H. — *Int. J. Cancer*, *2*, 117 (1967).
25. VINOGRAD, J., LEBOWITZ, J., RADLOFF, R., WATSON, R. et LAIPIS, R. — *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), *53*, 1104 (1965).
26. VOGT, M. et DULBECCO, R. — *Virology*, *16*, 41 (1962).
27. WATKINS, J. F. et DULBECCO, R. — *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), *58*, 1396 (1967).
28. WEIL, R. — *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), *49*, 480 (1963).
29. WEIL, R., MICHEL, M. R. et RUSCHMANN, G. K. — *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), *53*, 1468 (1965).
30. WEIL, R., PÉTURSSON, G., KÁRA, J. et DIGGELMANN, H., in *The Molecular Biology of Viruses*, p. 593. Academic Press Inc., New York, 1967.
31. WEIL, R. et VINOGRAD, J. — *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), *50*, 730 (1963).
32. WINOCOUR, E. — *Virology*, *19*, 158 (1963).