

50376
1985
7

Université des Sciences et Techniques de Lille

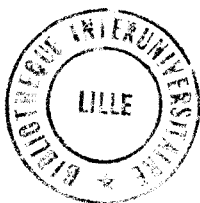
Année 1985

N° d'ordre 1247

THESE
présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE 3ème CYCLE
Spécialité : BIOCHIMIE

par

Claude DELSERT



PERMISSIVITE ET HIERARCHIE DE TRANSDOMINANCE INTERSEROTYPIQUE
DANS LE SYSTEME ADENOVIRUS HUMAIN-CELLULES SIMIENNES

Présentée le 17 janvier devant la Commission d'examen

JURY

Président :	M. MONTREUIL
Rapporteurs :	M. D'HALLUIN
	M. KEDINGER
	M. KREMBEL
Examineur :	M. BOULANGER

... Le copihue rouge est la fleur du sang, le copihue blanc est la fleur de la neige. Dans un frisson de feuilles la vélocité d'un renard a traversé le silence, mais le silence est la loi de ces feuillages... A peine le cri lointain d'un vague animal...

L'intersection pénétrante d'un oiseau caché... L'univers végétal susurre à peine jusqu'au moment où une tempête déclenche toute la musique terrestre.

Qui ne connaît pas la forêt chilienne ne connaît pas cette planète.

C'est de ces terres, de cette boue, de ce silence que je suis parti cheminer et chanter à travers le monde.

Pablo Neruda

(Confieso que he vivido)

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de l'Unité de Virologie Moléculaire (U. 233 - INSERM) dirigé par Monsieur le Professeur BOULANGER.

Monsieur BOULANGER, vous m'avez accueilli dans votre équipe ; vos judicieux conseils, votre compréhension et votre indispensable humour m'ont été d'une aide quotidienne. Je tiens à vous en exprimer ma très vive reconnaissance.

Je voudrais remercier en particulier Jean-Claude D'HALLUIN qui a été l'instigateur et le guide de ce travail.

Monsieur le Professeur MONTREUIL, vous nous faites l'honneur de présider ce Jury de Thèse, veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Nous tenons à remercier toutes les personnalités de ce Jury d'avoir accepté de juger ce mémoire.

Je remercie également les membres de l'équipe du Docteur STEHELIN pour leur précieuse aide technique.

Je tiens à témoigner mon amitié aux membres de l'équipe qui m'ont apporté conseils et encouragements ; particulièrement à Chantal VERCAMER pour sa patiente gentillesse.

Je suis reconnaissant à Virginie DELECROY d'avoir dactylographié ce mémoire.

Les résultats exposés dans le présent mémoire ont fait (ou feront) l'objet des publications suivantes:

1. Claude Delsert & Jean-Claude D'Halluin. Genetic expression of human adenoviruses in simian cells. Evidence for interserotypic inhibition of viral DNA synthesis. *Virus Research*, 1 (1984) 365-380.
2. Jean-Claude D'Halluin, Claude Delsert, Michèle Milleville & Pierre Boulanger. An adenovirus cytotoxic function related to the control of a cellular endonuclease activity. *Journal of General Virology*, (1985) soumis.
3. Claude Delsert & Jean-Claude D'Halluin. Transdominance between adenovirus serotypes. Analysis at the transcriptional level. *Journal of General Virology*, (1985) en préparation.

LEXIQUE

1) CELLULES

AGMK	Cellule de rein de singe vert africain
BHK21	Lignée établie de cellules de rein de hamster
CV1	Lignée établie d'AGMK
HEK	Cellule humaine embryonnaire de rein
HEK-293	Cellules HEK, transformée par l'Adénovirus de type 5 et contenant l'extrémité gauche du génome (du 270 au 4123e nucléotide)
HeLa	Cellule humaine de lignée continue, provenant d'un carcinome du col utérin
HEP 2	Cellule de carcinome épithélial du pharynx
KB	Cellule humaine de lignée continue, provenant d'un carcinome de plancher buccal
LLC-MK2	Lignée établie de cellules de rein de singe Rhésus
Vero	Lignée établie de cellules de rein de singe vert africain.

2) VIRUS

Ad	Adénovirus
SV40	Papovavirus dont l'hôte naturel est le singe
AdND	Hybride d'Adénovirus et de SV40 contenant un fragment plus ou moins grand du génome de SV40

3) AUTRES ABREVIATIONS

Ø 29	Bacteriophage de Bacillus Subtilis à ADN bicaténaire circularisé par une protéine.
DBP	DNA Binding Protein (Protéine se fixant à l'ADN monocaténaire)
E	Early (région d'expression précoce)
hr	Host range (mutant hôte dépendant)
K	Kilodalton
Kb	Kilobase
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
pfu	plaque-forming unit, unité formant plaque (unité de titre infectieux viral)
pTP	Precursor of the terminal protein (précurseur de la protéine terminale)
p.i	Post infection
S	Coefficient de SVEDBERG
SDS	Sodium dodecyl sulfate
ts	Thermosensible
UG	Unité génome

TABLE DES MATIERES

P R E F A C E

G E N E R A L I T E S

p1

A. INTRODUCTION

p1

B. LA PARTICULE VIRALE

p3

1. Structure de la capside

p3

2. Les protéines de structure

p3

2.1. Les protéines majeures

p3

2.1.1. L'hexon

p3

2.1.2. Le penton complet

p3

2.1.2.1. La base du penton

2.1.2.2. La fibre

2.2. Les protéines mineures

p6

2.2.1. Le polypeptide IIIa

p6

2.2.2. Le polypeptide VI

p7

2.2.3. Le polypeptide VIII

p7

2.2.4. Le polypeptide IX

p7

2.2.5. Les polypeptides X et XII

p7

3. L'ADN et son organisation

p7

C. INTERACTIONS DU VIRUS AVEC LA CELLULE HOTE

p8

1. Le cycle lytique

p8

1.1. La pénétration

p9

1.2. La phase précoce

p9

1.2.1. La région E1

p9

1.2.1.1. La zone E1A

a. La régulation de la transcription

b. Les messagers de E1A

c. Les polypeptides de E1A

1.2.1.2. La zone E1B

a. Les messagers de E1B

b. Les messagers du polypeptide IX

- c. Les messagers du brin "I"
 - d. Les polypeptides de E1B
 - 1.2.1.3. Cinétique de transcription de la zone E1
 - 1.2.1.4. Maturation des ARNm de E1
 - 1.2.2. La région E2 *p19*
 - 1.2.2.1. La zone E2A
 - a. Les messagers de E2A
 - b. Les polypeptides de E2A
 - 1.2.2.2. La zone E2B
 - 1.2.3. La région E3 *p24*
 - 1.2.3.1. Les messagers de E3
 - 1.2.3.2. Les polypeptides de E3
 - 1.2.4. La région E4 *p26*
 - 1.2.4.1. Les messagers de E4
 - 1.2.4.2. Les polypeptides de E4
- 1.3. La réplication *p28*
 - 1.3.1. Introduction *p28*
 - 1.3.2. Induction de la réplication *p28*
 - 1.3.2.1. L'origine de réplication
 - 1.3.2.2. La protéine terminale
 - 1.3.2.3. L'ADN polymérase virale
 - 1.3.2.4. Autres protéines
 - 1.3.3. L'élongation *p30*
 - 1.3.3.1. Dépendance vis à vis de l'ATP
 - 1.3.3.2. Sensibilité au 2-3' didéoxynucléoside triphosphate et à l'aphidicoline
 - 1.3.3.3. La protéine E2A/72 K
 - 1.3.3.4. La protéine terminale
- 1.4. La phase tardive *p31*
 - 1.4.1. Transcription tardive *p31*
 - 1.4.1.1. Généralités
 - 1.4.1.2. Expression des gènes tardifs
 - a. Le promoteur majeur tardif
 - b. Les ARNm ne dépendant pas du promoteur majeur tardif
 - 1.4.1.3. Synthèse des ARNm précoces pendant la phase tardive
 - 1.4.1.4. Les ARN associés aux virus (VA RNA)

1.4.2.	<u>Assemblage</u>	p34
1.4.2.1.	<u>Introduction</u>	
1.4.2.2.	<u>Les différentes phases</u>	
a.	<u>Assemblage des capsomères</u>	
b.	<u>Les capsides vides</u>	
c.	<u>Insertion de l'ADN viral</u>	
d.	<u>Maturation en virions</u>	
2.	<u>La transformation</u>	p37
2.1.	<u>Définition</u>	p37
2.2.	<u>Le cycle cellulaire</u>	p37
2.3.	<u>Caractéristiques de la transformation</u>	p37
2.3.1.	<u>Introduction</u>	p37
2.3.2.	<u>La transformation virale</u>	p38
2.3.2.1.	<u>Généralités</u>	
2.3.2.2.	<u>Les PAPOVAVIRIDAE</u>	
2.3.2.2.1.	<u>Le virus simien SV40</u>	
A.	<u>Structure</u>	
B.	<u>Structure et expression du génome viral</u>	
a)	Protéines tardives	
b)	Protéines précoces	
	. L'Ag grand T	
	. L'Ag petit t	
	. L'Ag TSTA	
2.3.2.2.2.	<u>Le polyome</u>	
2.3.2.3.	<u>Caractères induits lors de la transformation par le SV40 ou le polyome</u>	
A.	<u>Introduction</u>	
B.	<u>Propriétés des cellules transformées par le SV40 ou le polyome</u>	
a.	<u>Prélèvement de métabolites</u>	
b.	<u>Agglutination par les lectines</u>	
c.	<u>Distribution des fibronectines</u>	
d.	<u>Taux de protéases</u>	
e.	<u>Le cytosquelette</u>	
C.	<u>Paramètres de la transformation</u>	

a.	<u>Notion de permissivité</u>	
-	Transformation d'une cellule permissive par un virus défectif	
-	Transformation d'une cellule non permissive	
b.	<u>Multiplicité d'infection</u>	
c.	<u>Etat physiologique de la cellule</u>	
d.	<u>Transformation abortive de cellules non permissives</u>	
e.	<u>Double transformation cellulaire</u>	
2.3.2.4.	<u>La transformation par Les ADENOVIRIDAE</u>	
a.	<u>Introduction</u>	
b.	<u>Les étapes de la transformation</u>	
c.	<u>Nature de la région transformante de l'adénovirus</u>	
3.	<u>Le cycle abortif</u>	<i>p51</i>
3.1.	<u>Introduction</u>	<i>p51</i>
3.2.	<u>Le cycle abortif de l'adénovirus de type 2 dans certaines cellules simiennes</u>	<i>p51</i>
3.3.	<u>Les hybrides Adénovirus-SV40</u>	<i>p53</i>
3.3.1.	<u>Introduction</u>	<i>p53</i>
3.3.2.	<u>Les hybrides défectifs</u>	<i>p53</i>
3.3.2.1.	<u>L'hybride Ad7-SV40</u>	
3.3.2.2.	<u>Les hybrides Ad2⁺ D1 et Ad2⁺ D2</u>	
3.3.2.3.	<u>Les hybrides non défectifs</u>	
a.	<u>Structure génomique</u>	
b.	<u>Transcription et traduction</u>	
c.	<u>La fonction "helper"</u>	
3.4.	<u>Autres cas de cycle abortif</u>	<i>p60</i>

T R A V A U X P E R S O N N E L S *p61*

A. INTRODUCTION *p61*

B. PERMISSIVITE DES CELLULES DE SINGE ET DE HAMSTER AUX DIFFERENTS SEROTYPES D'ADENOVIRUS HUMAIN. *p61*

1. Production virale sur cellules CV1 et BHK-21. *p61*

2.	<u>Absence de production de protéines tardives des sérotypes 4, 9 et 12 dans les cellules CV1 et BHK 21.</u>	p61
3.	<u>Synthèse d'ADN viral en système simien et de hamster.</u>	p63
4.	<u>Expression des zones précoces d'Ad3 dans les cellules simiennes non permissives CV1.</u>	p63
5.	<u>Discussion</u>	p68
C.	<u>MISE EN EVIDENCE DU PHENOMENE DE TRANSDOMINANCE ENTRE SEROTYPES D'ADENOVIRUS HUMAIN.</u>	p69
1.	<u>Observations préliminaires</u>	p69
2.	<u>Publication dans "Virus Research"</u>	p69
3.	<u>Discussion des résultats</u>	p86
D.	<u>ANALYSE DU PHENOMENE DE TRANSDOMINANCE INTERSEROTYPIQUE AU NIVEAU TRANSCRIPTIONNEL.</u>	p90
1.	<u>Introduction</u>	p90
2.	<u>Résultats</u>	p90
2.1.	<u>Diminution de l'expression de la zone E2A d'Ad2</u>	p90
2.2.	<u>Diminution de l'expression de la zone E1 d'Ad2</u>	p93
2.3.	<u>Transdominance et expression de gènes exogènes</u>	p98
2.4.	<u>Discussion</u>	p100
	CONCLUSIONS GENERALES	p103
	MATERIELS ET METHODES	p105
	BIBLIOGRAPHIE	p110

P R E F A C E

L'histoire des adénovirus humains est celle d'une longue suite de "scoops" scientifiques, et ce terme journalistique est volontairement utilisé puisque chacune de ces découvertes a été publiée dans la revue Nature, spécialisée dans ce genre d'articles à sensation. Rappelons simplement en 1962, dix ans après leur mise en évidence, la démonstration du pouvoir oncogène in vivo d'un virus animal à DNA. Pour la deuxième fois, trois ans après les expériences faites sur la souris avec le virus Polyome, de façon expérimentale, en laboratoire, un cancer était directement lié à un agent viral isolé et caractérisé. 5 ans plus tard, la transformation maligne cellulaire était réalisée in vitro.

Enfin, les deux dernières dates significatives sont 1977, marquant la découverte, pour la première fois, grâce à l'adénovirus 2, de l'épissage des messagers eucaryotes, et 1983, année de la mise en évidence du mécanisme de transformation maligne séquentielle, en 2 étapes successives: éternisation cellulaire suivie de transformation phénotypiquement apparente et stable. Cette conception a le mérite d'unifier les mécanismes de cancérogénèse virale due aux virus oncogènes à DNA (adénovirus, polyome, SV40) et aux rétrovirus à RNA, en assignant ces deux phénomènes biologiques à deux groupes de gènes apparentés.

Durant les cinq années qui viennent de s'écouler, le phénomène d'épissage alternatif a été également retrouvé chez l'adénovirus, et on sait que dans d'autres systèmes comme celui de la calcitonine humaine, il revêt une importance physiologique fondamentale. L'avantage d'un tel épissage alternatif sur le plan d'un génome viral est évident : une même zone génomique peut coder pour deux protéines totalement différentes structurellement et fonctionnellement.

Le travail présenté ici aurait pu peut-être constituer un "scoop" si Lille avait été placée sous d'autres longitudes, mais a obtenu tout de même un certain succès d'estime au dernier atelier sur l'Adénovirus organisé par la Fondation Gulbenkian à Lisbonne.

L'inhibition intracellulaire et le phénomène de hiérarchie de transdominance intersérotypiques chez les adénovirus, décrits ci-après, offre une voie d'approche nouvelle des systèmes de régulation d'expression génétique eucaryote. Comment un virus, tel l'adénovirus, détourne à son profit une machinerie cellulaire n'a toujours pas été élucidé. L'observation faite à l'U. 233 de Lille qu'un sérotype d'adénovirus humain (l'Ad3), sans se répliquer lui-même en cellule simienne, ou en se répliquant sur cellule humaine, puisse inhiber la réplication d'un virus simien, le SV40, et celle d'un autre sérotype d'adénovirus humain, nous paraît représenter un fil d'Ariane infiniment précieux pour l'analyse des séquences temporelles et des niveaux d'expression de gènes d'eucaryotes.

Les perspectives médicales ou thérapeutiques éventuelles ne sont sans doute pas non plus à négliger, quand on sait qu'un enfant sur trois qui meurt dans le Tiers-Monde "doit" sa mort aux adénovirus entériques.

Ceci, ajouté aux questions fondamentales évoquées ci-dessus, nous semble justifier la poursuite des études exposées dans le présent ouvrage.

Il revient à Claude Delsert et à Jean-Claude D'Halluin le mérite d'avoir su ouvrir une voie nouvelle.

Pierre Boulanger

GENERALITES

A. INTRODUCTION

L'adénovirus, découvert par ROWE et al., (1953) dans des cultures de tissus d'amygdales humaines, est un virus à ADN, non enveloppé.

La famille des ADENOVIRIDAE est responsable de conjonctivites, d'affections respiratoires et digestives (FLEWETT et al., 1975 ; FADEN et al., 1978).

L'étude de l'adénovirus a marqué quelques grandes étapes de la biologie moléculaire :

- 1962 : Mise en évidence du pouvoir oncogène d'un virus à ADN (TRENTIN et al., 1962 ; HUEBNER et al., 1962)

- 1967 : Effet transformant de l'Adénovirus sur une cellule "in vitro" (FREEMAN et al., 1967)

- 1977 : Découverte du "raboutage" ou "épissage" des ARNm (CHOW et al., 1977 ; KLESSIG, 1977)

- 1979-1983 : Découverte du phénomène d'épissage alternatif des messagers (cas des zones E2A, E1A, E1B) (PETTERSSON et al., 1983)

- 1980 : Transformation en 2 étapes (HOUWELING et al., 1980):
 - . immortalisation cellulaire et induction de la transformation
 - . maintien de l'état transformé.

L'adénovirus est donc une sonde particulièrement adaptée à l'étude de l'organisation et de l'expression des gènes eucaryotes.

Les adénovirus sont présents dans de nombreuses espèces animales. 41 sérotypes ont été identifiés chez l'homme (DE JONG et al., 1983). Leur classification en différents sous-groupes (numérotés de A à G) est réalisée selon divers critères :

- leur pouvoir oncogène chez le hamster nouveau né (HUEBNER, 1967)
- des propriétés d'hémagglutination (ROSEN, 1958)
- le pourcentage de bases G + C (PINA & GREEN, 1965)
- la longueur de la fibre (NORRBY, 1969b)
- le degré d'homologie des ADN (GREEN et al., 1979)

(Tableau 1)

Sous-groupes	Sérotype	ADN % d'homologie (a)	% G + C	modèle d'hémagglutination (b)	longueur de la fibre (en nm)	Oncogénicité chez le hamster nouveau-né
A	12,18,31	48-69 (8-20)	48	IV	28-31	(en 4 mois)
B	3,7,11, 14,16,21, 34,35	89-94 (9-20)	51	I	9-11	Faible (en 4 à 18 mois)
C	1,2,5,6	99-100 (10-16)	58	III	23-31	Nulle
D	8,9,10, 13,15,17 19,20,22 23,24,25 26,27,28 29,30,32 33,36,37, 38,39	94-99 (4-17)	58	II	12-13	Nulle
E	4	(4-23)	58	III	17	Nulle
F	40	n.d.	n.d.	IV	28-33	Nulle
G	41	n.d.	n.d.	IV	28-33	Nulle

n.d. : non déterminé

(a) : pourcentage d'homologie dans le sous-groupe. Les nombres entre parenthèses indiquent le pourcentage d'homologie par rapport aux membres des autres sous-groupes.

(b) : I-Agglutination complète des érythrocytes de singe. II-Agglutination complète des érythrocytes de rat. III-Agglutination partielle des érythrocytes de rat. IV-Agglutination des érythrocytes de rat, visible seulement après addition d'antisera hétérotypiques.

Tiré de WADELL, G., 1984, Molecular epidemiology of human adenovirus.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 110, 191-220

B. LA PARTICULE VIRALE

1. Structure de la capside

Les adénovirus apparaissent au microscope électronique comme des icosaèdres de 70 à 90 nm de diamètre (HORNE et al., 1959 ; VALENTINE & PEREIRA, 1965).

La capside virale est constituée par la répétition de sous-unités protéiques identiques : les capsomères.

L'adénovirus possède 240 hexons répartis sur les 20 faces de l'icosaèdre et 1 penton à chacun de ses 12 sommets.

Le virus mature a une densité de 1,34 en gradient isopycnique de chlorure de césium. L'analyse de ses protéines constitutives par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (PAGE-SDS) (MAIZEL et al., 1968) révèle que la particule est composée d'une dizaine de protéines uniques numérotées de II à XII en fonction de leur masse moléculaire apparente.

En 1975, EVERITT et al. ont proposé un modèle d'organisation de la capside décrit dans la figure 1.

2. Les protéines de structure

Nous n'examinerons dans ce paragraphe que les protéines constitutives du virion, dont les masses moléculaires apparentes (PAGE-SDS) et réelles sont données, pour l'adénovirus de type 2, dans le Tableau 2.

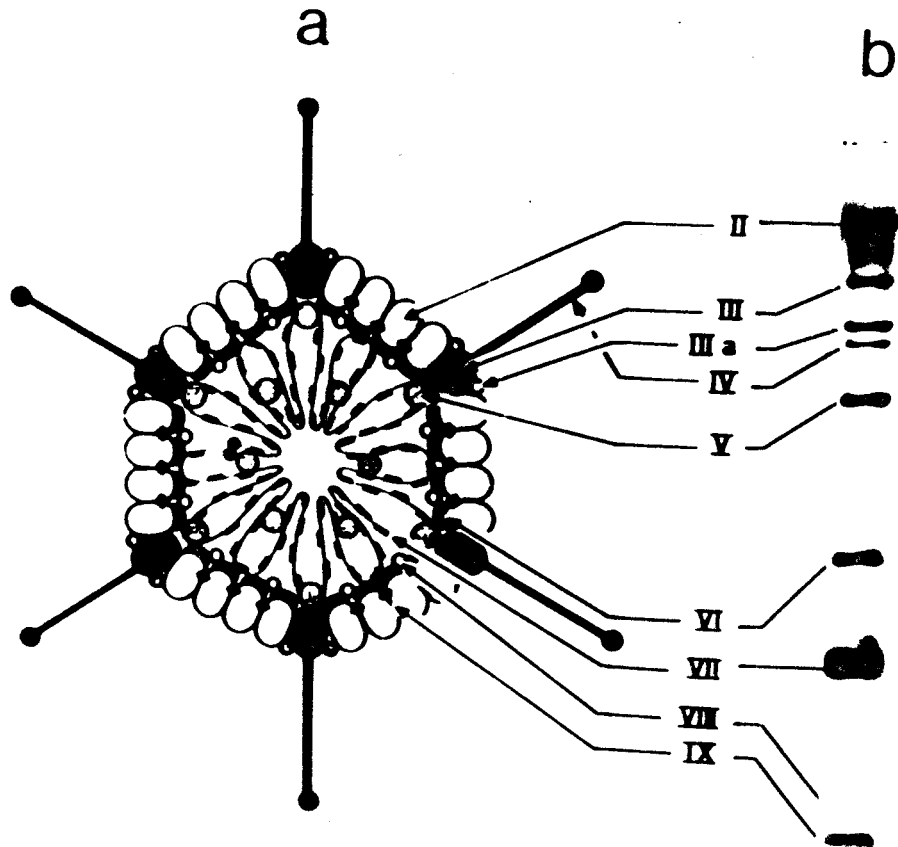
2.1. Les protéines majeures

2.1.1. L'hexon

Selon BERGER et al., (1978) il se présente comme une pyramide évidée dont la base est hexagonale et le sommet triangulaire. L'hexon sédimente à 12,9 S et a une masse apparente de 360 K. Il est en fait composé de 3 polypeptides II, identiques, qui possèdent des déterminants antigéniques de groupe, de sous-groupe et de type (NORRBY, 1969a).

2.1.2. Le penton

La fibre et la base du penton sont associées aux zones apicales de la capside, en une structure de masse réelle de 365 K appelée penton .



STRUCTURE ET COMPOSITION POLYPEPTIDIQUE DE LA PARTICULE VIRALE

Les polypeptides viraux mis en évidence par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS sont replacés dans la particule virale.

FIGURE 1

MASSE MOLECULAIRE DES POLYPEPTIDES PRESENTS DANS LA PARTICULE
D'ADENOVIRUS DE TYPE 2

Désignation	Masse moléculaire		Fonction
	Calculée ^(a)	Apparente ^(b)	
II	108 K	120 K	Hexon (capsomère)
III	63 K	85 K	Base du penton (capsomère)
IIIa(c)	65 K	66 K	Associé aux zones apicales
IV	62 K	62 K	Fibre
IVa ₂	56 K	50 K	Protéine de maturation
V	42 K	48,5 K	Protéine du nucléoïde
VI(c)	24 K	24 K	Associé à l'hexon
VII(c)	18,5 K	18,5 K	Protéine du nucléoïde
VIII(c)	17,5 K	13 K	Associé à l'hexon
IX	14,3 K	12 K	Associé à l'hexon
X-XII	5-6,5 K		Composants du virion

(a) Masse moléculaire prédite à partir de la séquence

(b) Masse moléculaire mesurée en gel d'acrylamide (PAGE-SDS)

(c) Polypeptide dérivant d'un précurseur

TABLEAU 2

2.1.2.1. La base du penton

Elle fut longtemps assimilée à un pentamère d'après sa situation topographique sur la capsid. La détermination de la masse réelle de la base, 246 K, par analyse en diffusion de neutrons (DEVAUX et al., 1982) a permis de déduire qu'il s'agit d'une association de trois polypeptides III. La base du penton isolée induit des effets cellulo-détachants précoces, qui disparaissent après traitement doux à la trypsine.

D'autre part, il faut noter la présence d'une activité endonucléasique, associée à la base du penton, vraisemblablement d'origine cellulaire (BURLINGHAM et al., 1971). Le polypeptide III possède des déterminants antigéniques de groupe, de sous-groupe, et de type.

2.1.2.2. La fibre

DEVAUX et al., (1984) ont montré que la fibre est un dimère du polypeptide IV. Le polypeptide IV a une structure hautement asymétrique, constituée d'une tige de 2 nm de diamètre et de longueur variant de 11 à 25 nm, terminée par une sphérule de 4 nm de diamètre.

Cette glycoprotéine, dont la variation de longueur selon le sérotype a conduit à une classification des adénovirus (Tableau 1), porte des déterminants antigéniques de sous-groupe et de type (NORRBY, 1969b).

2.2. Les protéines mineures

2.2.1. Le polypeptide IIIa

Au nombre de 60 copies par capsid, le polypeptide IIIa est associé au vertex dans un rapport de 5 pour un penton (BOUDIN et al., 1980 ; DEVAUX et al., 1982).

Le polypeptide IIIa de masse moléculaire 66 K en PAGE-SDS est dérivé d'un précurseur légèrement plus lourd (67 K) (BOUDIN et al., 1980). Le IIIa et le pIIIa sont 2 phosphoprotéines dont la phosphorylation se fait préférentiellement par une activité protéine kinase associée à la capsid virale (AKUSJARVI et al., 1978). Ce polypeptide est remarquablement uniforme en taille à travers les membres d'un même sous-groupe (WADELL et al., 1980).

2.2.2. Le polypeptide VI

D'une masse moléculaire de 24 K, le polypeptide VI dérive d'un précurseur de 27 K, le pVI (MAIZEL et al., 1968), après avoir perdu 33 acides aminés du côté N-terminal lors de la maturation du virus (AKUSJÄRVI & PERSSON, 1981a). Il semble associé aux faces de l'icosaèdre, puisqu'il est relâché avec les hexons lors de la dégradation de la capside (EVERITT et al., 1973).

On a également montré qu'il pourrait s'associer au polypeptide V (EVERITT et al., 1975), et qu'il a une activité DNA Binding Protein "in vitro" (RUSSELL & PRECIOUS, 1982).

2.2.3. Le polypeptide VIII

D'une masse moléculaire apparente (PAGE-SDS) de 13 K, le polypeptide VIII est présent dans le virion, associé à l'hexon. Il dérive d'un précurseur, le pVIII (ANDERSON et al., 1973 ; TREMBLAY et al., 1983).

2.2.4. Le polypeptide IX

Egalement associé à l'hexon (BOULANGER et al. 1979), mais plus fortement que le VIII, le polypeptide IX a une masse moléculaire apparente (PAGE-SDS) de 12 K.

Il existe une certaine homologie entre les séquences du polypeptide IX des différents sérotypes, surtout dans la région N-terminale (ENGLER, 1981).

2.2.5. Les polypeptides X-XII

Dès 1968, MAIZEL et al. (1968) mettent en évidence un polypeptide de faible masse moléculaire. Selon ANDERSON et al. (1973), il s'agit d'un ensemble de 3 polypeptides de masse moléculaire apparente 5 à 6,5 K. Deux de ces polypeptides seraient des produits de dégradation d'autres protéines de capside, le troisième étant le polypeptide " μ " d'HOSAKAWA et SUNG (1976) (Voir ci-dessous).

3. L'ADN et son organisation

Le chromosome d'adénovirus est une chaîne bicaténaire d'environ 35 000 paires de bases, dont la masse moléculaire varie de 20 à 30 x 10⁶, selon

le sérotype (GREEN, 1970). Par dénaturation puis renaturation à faible concentration d'ADN, des molécules circulaires monocaténares sont obtenues. Cette structure en forme de "manche de poêle" résulte de la présence d'une séquence terminale, répétitive, inversée aux deux extrémités de l'ADN (GARON et al., 1972 ; ROBERTS et al., 1974). Une structure identique est observée sur le génome d'un parvovirus défectif associé à l'adénovirus : l'AAV (KOCZOT et al., 1973).

La dissociation des particules virales par le chlorhydrate de guanidine 4 M, libère un ADN circulaire, linéarisé par traitement à la pronase : une protéine est donc responsable de la circularisation de l'ADN viral (ROBINSON et al., 1973). De masse moléculaire 55 K, cette protéine est liée par covalence à chaque extrémité 5' de l'ADN par un résidu déoxycytidine (REKOSH et al., 1977).

Ce type d'interaction existe également dans le phage ϕ 29 (ORTIN et al., 1976) et le poliovirus (FLANEGAN et al., 1977) entre autres.

Dans la particule virale, 3 protéines sont associées à l'ADN dans le nucléoïde. Après extraction de celui-ci par chauffage en présence de deoxycholate de sodium ou par la pyridine, l'ADN est clivé par la nucléase de Staphylococcus aureus en fragments de 200 paires de bases.

L'ADN viral est donc organisé de manière similaire à la chromatine des cellules eucaryotes.

Chaque nucléosome contient six polypeptides VII et un polypeptide V (CORDEN et al., 1976)

- Issu d'un précurseur, le pVII, le polypeptide VII a une masse moléculaire de 18,5 K. Il est très basique, contenant 24 % d'arginine et forme un complexe très stable avec l'ADN viral.

- Moins étroitement lié à l'ADN viral, le polypeptide V a une masse moléculaire apparente (PAGE-SDS) de 48,5 K

- Le polypeptide " μ " identifié par HOSAKAWA et SUNG (1976) a une masse moléculaire de 4 à 5 K. On estime qu'il en existe 125 copies dans la capsid, associées aux nucléosomes, et contenant 69 % d'acides aminés basiques. Sa composition l'apparente aux protamines.

C. Interactions du virus avec la cellule hôte

1. Le cycle lytique

Le cycle lytique débute par l'adsorption de la particule infectieuse sur la membrane plasmique ; il aboutit à la lyse de la cellule permissive,

accompagnée de la libération d'un grand nombre de particules virales. Il est divisé en 2 phases, l'une précoce, qui suit la pénétration du virus, l'autre tardive, qui précède la lyse cellulaire. Le démarrage de la synthèse du DNA viral ponctue le passage d'une phase à l'autre.

1.1. Pénétration du virus dans la cellule

La particule virale se fixe à un récepteur membranaire. Au cours du passage à travers la membrane cellulaire ou dès l'entrée dans le cytoplasme, la particule perd ses pentons (SUSSENBACH, 1967). Elle migre alors vers le noyau où l'ADN est injecté sous forme de nucléoïde, laissant une capsidie vide dans le cytoplasme (MORGAN et al., 1969).

Au stade précoce, l'ADN viral est organisé dans les noyaux en nucléosomes, comme la chromatine cellulaire (SERGEANT et al., 1979 ; TATE & PHILIPSON, 1979). Les protéines terminales (55K) restent attachées à l'ADN après infection (STRAUSS et al., 1979) ce qui le rend plus résistant à l'attaque des exonucléases.

1.2. La phase précoce

Nous étudierons plus en détail cette phase, dont certaines étapes sont communes aux cycles lytique, transformant et abortif.

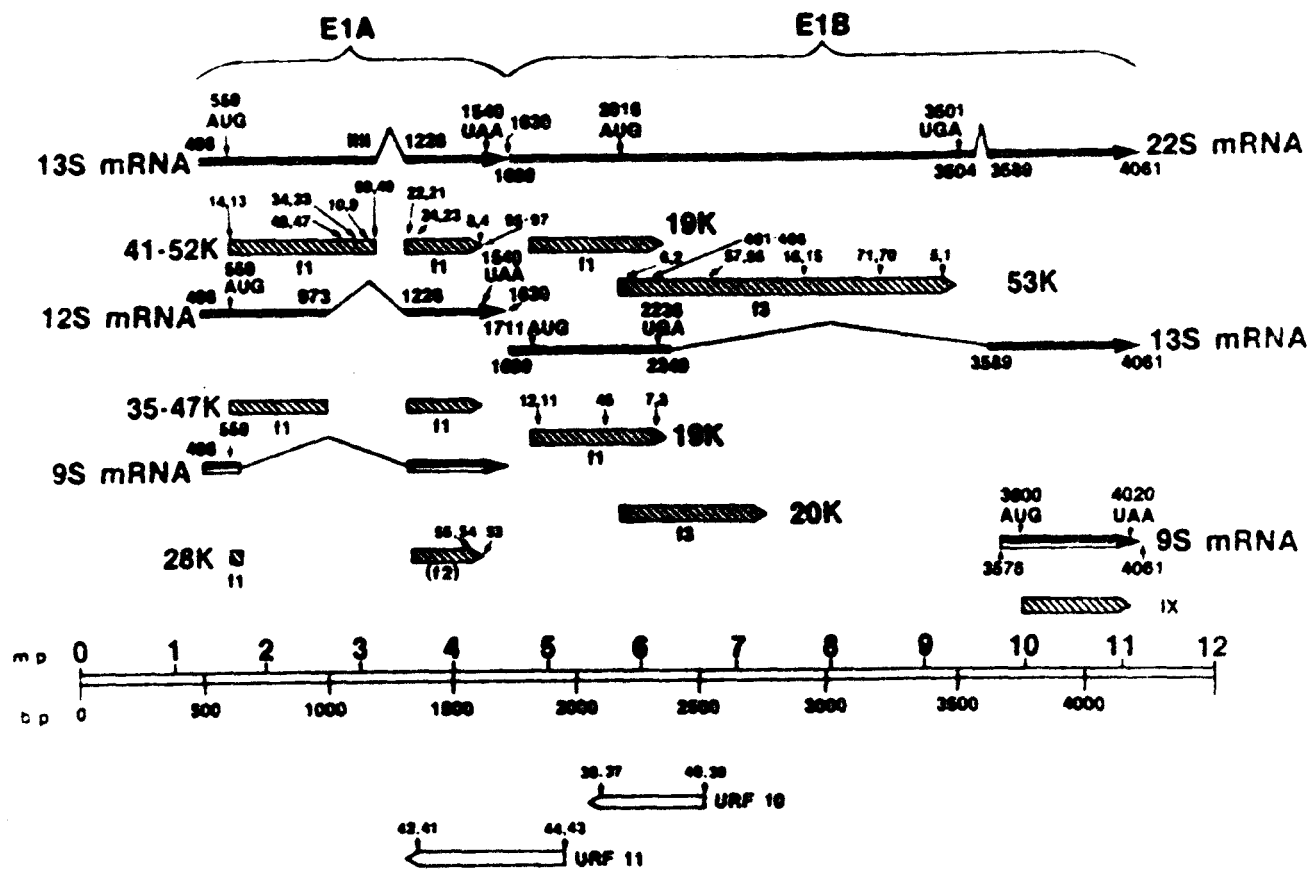
On distingue habituellement 4 zones précoces, les régions E1 et E3 transcrites sur le brin "r" (vers la droite) et les régions E2 et E4 transcrites sur le brin "l" (vers la gauche).

1.2.1. La région E1

Cette région directement impliquée dans la transformation maligne cellulaire est codée dans les 11 % de l'extrémité gauche du génome, elle contient les 3 unités de transcription suivantes :

- E1A localisée entre 1,4 et 4,5 unités génome (UG)
- E1B localisée entre 4,8 et 11,2 UG
- l'unité de transcription du polypeptide IX, entièrement recouverte par celle de la région E1B, est localisée entre 9,9 et 11,2 UG

(Tableau 3 et Figure 2)



STRUCTURE ET PRODUITS DES GENES DE LA ZONE E1

- . Les messagers sont représentés par des flèches noires interrompues de traits plus fins correspondant aux introns (ils sont désignés par leur coefficient de sédimentation)
- . Les zones hachurées représentent les polypeptides, caractérisés par leur masse moléculaire.
- . Les numéros indiquent la position des sites d'initiation, de terminaison de transcription ou de traduction ainsi que celle des sites donneur et accepteur d'épissage
- . Les caractères f1, f2, f3 indiquent la nature du cadre de lecture (tiré de GREEN et al. (1983) in *Current Topics in Microbiology and Immunology* ed. Doerfler W., Vol. 109).

FIGURE 2

Coordonnées remarquables de la zone E1

Position(a)

Séquence TATAA des ARNm de E1A	467
Site de coiffe des ARNm de E1A	498
Codon de début de traduction (AUG) des polypeptides de E1A	559
Site donneur d'épissage de l'ARNm 9 S de E1A	636
Site donneur d'épissage de l'ARNm 12 S de E1A	973
Site donneur d'épissage de l'ARNm 13 S de E1A	1 111
Site accepteur d'épissage des ARNm de E1A	1 226
Codon de terminaison (UGA) de l'ARNm 9 S	1 313
Codon de terminaison (UAA) des ARNm 12 S et 13 S	1 540
Séquence AAUAAA des ARNm de E1A	1 608
Site de polyadénylation des ARNm de E1A	1 630
Séquence TATAA des ARNm de E1B	1 669
Site de coiffe des ARNm de E1B	1 699
Codon de début de traduction du polypeptide 21 K/E1B	1 711
Codon de début de traduction du polypeptide 55 K/E1B	2 016
Codon de terminaison (UGA) du polypeptide 21 K/E1B	2 236
Site donneur d'épissage de l'ARNm 13 S/E1B	2 249
Codon de terminaison (UAG) du polypeptide 55 K/E1B	3 501
Site donneur d'épissage de l'ARN 22 S/E1B	3 504
Séquence TATAA de l'ARNm du polypeptide IX	3 545
Site de coiffe de l'ARNm du polypeptide IX	3 576
Site accepteur d'épissage des ARNm de E1B	3 589
Codon de début de traduction (AUG) du polypeptide IX	3 600
Codon de terminaison (UAA) du polypeptide IX	4 020
Séquence AAUAAA de E1B et du polypeptide IX	4 061

(a) La position indiquée est celle du premier nucléotide de chaque structure.

(b) Tiré de PETERSSON et al. (1983) dans *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1, 109, ed. DOERFLER W.

TABLEAU 3

1.2.1.1. La région E1A

a. Régulation de transcription

Dans la zone immédiatement à gauche du site de démarrage de la transcription, existe une séquence TATAA, permettant la fixation de la RNA polymérase II. La région précédant cette zone contient différentes séquences, activatrices de la transcription, localisées à partir du site de début de transcription :

- entre -141 et -305 (HEARING & SHENK, 1983)
- entre - 302 et -349 (HEN et al., 1983)
- entre -188 et -45 (IMPERIALE et al., 1983)

Ces zones, éloignées du site de début de transcription, ne semblent pas avoir d'action directe sur la RNA polymérase. Une altération de cette région provoque :

- une forte réduction de la transcription
- une utilisation de différents sites de démarrage
- la production d'ARNm très hétérogènes

Récemment OSBORNE et al. (1984) ont montré que la délétion d'une seule base, située 399 résidus après le site de début de transcription, provoque une réduction drastique du taux de transcription de E1A. Cette nouvelle zone activatrice est d'autant plus étonnante qu'elle se situe dans la séquence codante de la protéine majeure de E1A.

Une mutation ponctuelle dans cette zone induit :

- l'inactivation de la protéine principale de E1A, ce qui aboutit à une réduction au cinquième du taux de transcription de E1A.

- une anomalie agissant en cis, entraînant une réduction au dixième de la transcription de E1A. OSBORNE et al. (1984) ont donc mis en évidence une régulation de la transcription en cis, dans une séquence de bases qui est homologue de zones activatrices de SV40 et de polyome.

La présence d'une telle zone activatrice à l'intérieur d'une séquence codante peut s'expliquer par la dégénérescence du code génétique : la séquence de bases peut être modifiée sans changer beaucoup la séquence d'acides aminés.

Le nombre de zones activatrices de E1A est probablement en relation avec l'importance de la vitesse de démarrage du cycle viral, étape conférant un avantage sélectif évident.

b. Les messagers de E1A

Les techniques de localisation par la nuclease S1 (BERK & SHARP, 1978), par la microscopie électronique (CHOW et al., 1978), par le séquençage d'ADN (GINGERAS et al., 1982), et par le clonage (PERRICAUDET et al., 1979) ont mis en évidence 3 ARNm de 9 S, 12 S et 13 S possédant des caractéristiques communes :

- les mêmes extrémités 5' et 3' mais des délétions de taille variable, réalisées pendant la maturation des ARNm
- l'épissage (maturation) se fait à partir de sites donneurs différents mais sur un site accepteur commun (A1)
- le même site de "coiffe" (cap-site), précédé du motif TATAA (van ORMONDT et al., 1980)
- un site de polyadénylation commun, précédé de la séquence AATAAA comme dans les cellules eucaryotes (PROUDFOOD & BROWNLEE, 1976).

La délétion lors de la maturation a lieu dans une zone riche en A-T, contenant de nombreux codons non sens. Les polypeptides correspondant aux ARNm 12 S et 13 S ont les mêmes extrémités N et C-terminales, et une masse moléculaire apparente respective de 26 K et 32 K. Ils correspondent à deux protéines de 243 et 289 acides aminés, respectivement (PERRICAUDET et al., 1980) .

Le polypeptide codé par l'ARNm 9 S débute au même codon AUG mais voit sa phase de lecture changer au niveau du raboutage. Il a une masse moléculaire de 6,1 K (VIRTANEN & PETTERSSON, 1983).

L'utilisation de mutants de délétion dans la zone E1A (BERK et al., 1979) et de gènes clonés dans des plasmides (IMPERIALE & NEVINS, 1984 ; LEFF et al., 1984) a permis de préciser 2 niveaux de régulation de l'expression des autres zones précoces par la zone E1A.

D'une part, un ou plusieurs produit(s) de cette zone, inactiverait(ent) une protéine cellulaire dont le rôle hypothétique serait de dégrader les ARNm viraux précoces, (KATZE et al., 1981) ou d'empêcher la transcription virale (NEVINS, 1981). Cette fonction précoce est assignée au messenger 13 S puisque le mutant Ad5 hr 1, dépourvu de ce dernier, ne produit pas d'ARNm des autres zones précoces sur cellule permissive (HeLa).

De plus un autre mutant, pourvu du messenger 13 S, mais dont le messenger 12 S est délété, se réplique normalement sur ces mêmes cellules HeLa (MONTELL et al., 1982).

Ces faits sont en accord avec l'observation de l'accumulation de messagers précoces, à la suite d'une brève inhibition de la synthèse protéique cellulaire par l'anisomycine ou la cycloheximide (CROSS & DARNELL, 1983 ; KATZE et

al., 1981).

D'autre part la zone E1A régule positivement le taux de transcription des autres zones précoces. C'est le cas, par exemple, de l'action d'un produit de la zone E1A sur une séquence activatrice de la zone E2A, absolument nécessaire à l'expression de cette dernière (IMPERIALE & NEVINS, 1984, LEFF et al., 1984).

SVENSSON et al. (1983) clonent les séquences codantes des messagers 12 S ou 13 S de E1A dans des plasmides porteurs des séquences activatrices de la transcription de E1A.

Ils cotransfectent des cellules à l'aide d'un de ces 2 plasmides, et d'un second contenant soit la totalité de la zone E4 d'adénovirus soit le gène entier de la bêta-globine de lapin (SVENSSON & AKUSJARVI, 1984).

Cette étude montre que le produit du messenger 13 S (action en trans) induit une forte expression tant de la zone E4 que du gène de la bêta-globine de lapin. Cette activation est néanmoins plus forte pour la région E4 que pour le gène de la bêta-globine de lapin, ce qui implique une certaine spécificité de reconnaissance du promoteur par le produit du messenger 13 S.

Par contre, LEFF et al. (1984), montrent que le messenger 12 S, comme le 13 S, peut agir seul, sur le promoteur de la zone E2A ou de la zone E3 et en augmenter l'activité.

c. Les polypeptides de E1A

Les ARN 12 S et 13 S de la zone E1A codent plusieurs polypeptides dont la masse varie de 35 à 53 K (ESCHE et al., 1980). Mesurés à partir d'une traduction "in vitro", les masses de ces polypeptides sont de 41 K à 53 K pour le 13 S et 35 K et 47 K pour le 12 S.

Par électrophorèse bidimensionnelle, HARTER et LEWIS (1978) mettent en évidence des polypeptides supplémentaires. En fait, le 12 S comme le 13 S donne plusieurs polypeptides qui ne divergent que par leur extrémité C-terminale (RICCIARDI et al., 1981).

Plus récemment une série de 6 phosphoprotéines a été révélée par un sérum antipeptidique E1A (YEE et al., 1983).

L'analyse des 4 espèces majeures montrent qu'elles possèdent des parties communes. La masse réelle de ces polypeptides varie de 26K (243 aa) à 35 K (289 aa) ;(PERRICAUDET et al., 1979 ; 1980). Cette importante différence par rapport à la masse apparente est probablement due à leur haut contenu en proline et à leur taux de phosphorylation.

Ces protéines, en dehors de leur rôle de régulateur positif de la transcription des zones précoces, interviennent dans le mécanisme de la transformation cellulaire, que nous analyserons plus loin.

1.2.1.2. La zone E1B

a. Les messagers de E1B

Deux ARNm principaux, de 13 S et 22 S, sont transcrits dans cette région à partir d'un promoteur commun (BERK & SHARP, 1978 ; PERRICAUDET et al., 1980).

Ces 2 ARNm, vraisemblablement issus d'un même précurseur, ont des extrémités 5' et 3' communes. Un motif TATAA est localisé peu avant leur site de "coiffe" (BAKER & ZIFF, 1980 ; van ORMONDT et al., 1980). La séquence d'ADN codant pour ces ARNm contient 2 grands cadres de lecture ouverts (Bos et al., 1981) qui pourraient, dans le cas du 22 S où le codon "stop" intervient avant le site de maturation, induire la synthèse de 2 polypeptides de 21 K et 55 K. D'autre part, LUPKER et al., (1981) ont mis en évidence l'existence de 2 polypeptides de taille très différente, codés par l'ARNm 22 S. Ces constatations font de l'ARN 22 S un messager polycistronique.

Les ARNm 13 S et 22 S de E1B ont la caractéristique unique actuellement de pouvoir "choisir" entre deux sites d'induction (AUG).

Si l'utilisation des 2 sites AUG dans le cas de l'ARNm 22 S est très probable, il n'en est rien pour l'ARNm 13 S. En effet l'induction de la traduction au second AUG du 13 S, conduirait à la synthèse d'un polypeptide de 10 K, non encore détecté.

Il existerait également un ARNm 14 S, détecté lors de la traduction "in vitro", de la zone E1B (ESCHE et al., 1980).

b. Les messagers du polypeptide IX

L'ARNm du polypeptide IX présente 2 originalités :

- il est transcrit précocement, alors qu'il code pour une protéine tardive;
- il n'est pas mûré (ALESTROM et al., 1980). Son site de "coiffe" est localisé dans la zone déléetée des ARNm 13 S et 22 S de E1B, lors de la maturation (GINGERAS et al., 1982 ; van ORMONDT et al., 1980) et il recouvre une partie de ces mêmes ARNm, tout en conservant le même site de polyadénylation.

Ce polypeptide pourrait donc avoir une autre fonction que celle assumée dans la structure de la capsid. Toutefois, sa participation à l'activité transformante est improbable, malgré son expression précoce (LEWIS & MATHEWS, 1981 ; PERSSON et al., 1978).

c. Les messagers du brin "I"

KATZE et al. (1982) ont montré qu'il existait une protéine de 11 K codée sur le brin "I" au niveau de la région E1. Elle dériverait d'un ARNm 22 S codé par la région intermédiaire aux zones E1A et E1B.

d. Les polypeptides de E1B

Deux polypeptides principaux de 20 K et 55 K, sont issus du messenger 22 S. Ils sont codés par 2 séquences se chevauchant, mais n'ont pas de peptides tryptiques communs puisqu'ils ne sont pas traduits dans le même cadre de lecture (BOS et al., 1981). Une protéine majeure de 18 K (GREEN et al., 1979b) possède une séquence commune avec la 55 K. La nature de son messenger n'est pas connue. Il pourrait s'agir d'un produit de dégradation de la 55 K.

Selon BABISS et GINSBERG (1984) l'étude de mutants de la zone E1B révèle que la 55 K

- est responsable de la baisse de la synthèse protéique de la cellule hôte,
- est impliquée dans la maturation des ARNm tardifs.

La raison de ces 2 phénomènes est inconnue.

En dehors de ces fonctions, la 55 K est nécessaire à la transformation cellulaire.

On peut constater que, malgré leur appartenance à des sous-groupes d'oncogénicité très différents, l'Ad5 et l'Ad12 présentent des polypeptides de 20 K - 55 K et 21 K - 55 K respectivement, montrant une forte homologie de séquence entre ces 2 sérotypes.

Cette différence de pouvoir oncogène entre les divers sous-groupes d'adénovirus, pourrait être due à l'existence d'une catégorie de polypeptides mineurs, dont la masse moléculaire avoisine 8 K, codés par le plus petit fragment d'ADN capable d'induire la transformation cellulaire.

A leur niveau apparaît une forte hétérologie de séquence entre les adénovirus 5 et 12 (KIMURA et al., 1981).

La 55 K/E1B est une phosphoprotéine, copurifiée avec une activité protéine-kinase (MALETTE et al., 1983). Ceci la rapproche de l'antigène (Ag) moyen T (mT) du polyome, ou de la protéine pp⁶⁰ sarc du sarcome de ROUS, toutes deux impliquées dans la transformation cellulaire.

Toutefois, l'activité protéine-kinase copurifiée avec la 55 K/E1B serait contaminante, contrairement à celle présentée par l'Ag mT de polyome ou par la pp⁶⁰ sarc.

D'autre part on retrouve la 55 K/E1B en association avec une 53 K cellulaire, dans les cellules transformées (SARNOW et al., 1982). Elle s'associe également au cours du cycle lytique à une protéine de 24 K issue de la zone E4 (SARNOW et al., 1984).

Le polypeptide 20 K permet le maintien de l'intégrité de l'ADN viral et cellulaire (CHINNADURAI, 1983 ; D'HALLUIN et al., 1984 ; WHITE et al., 1984). Il est donc essentiel au cycle lytique bien que des mutants de cette zone se répliquent normalement dans des cellules permissives (FUKUI et al., 1983). Ce polypeptide est indispensable à la transformation cellulaire (BERNARDS et al., 1983 ; CHINNADURAI, 1983)

1.2.1.3. Cinétique de transcription de la zone E1

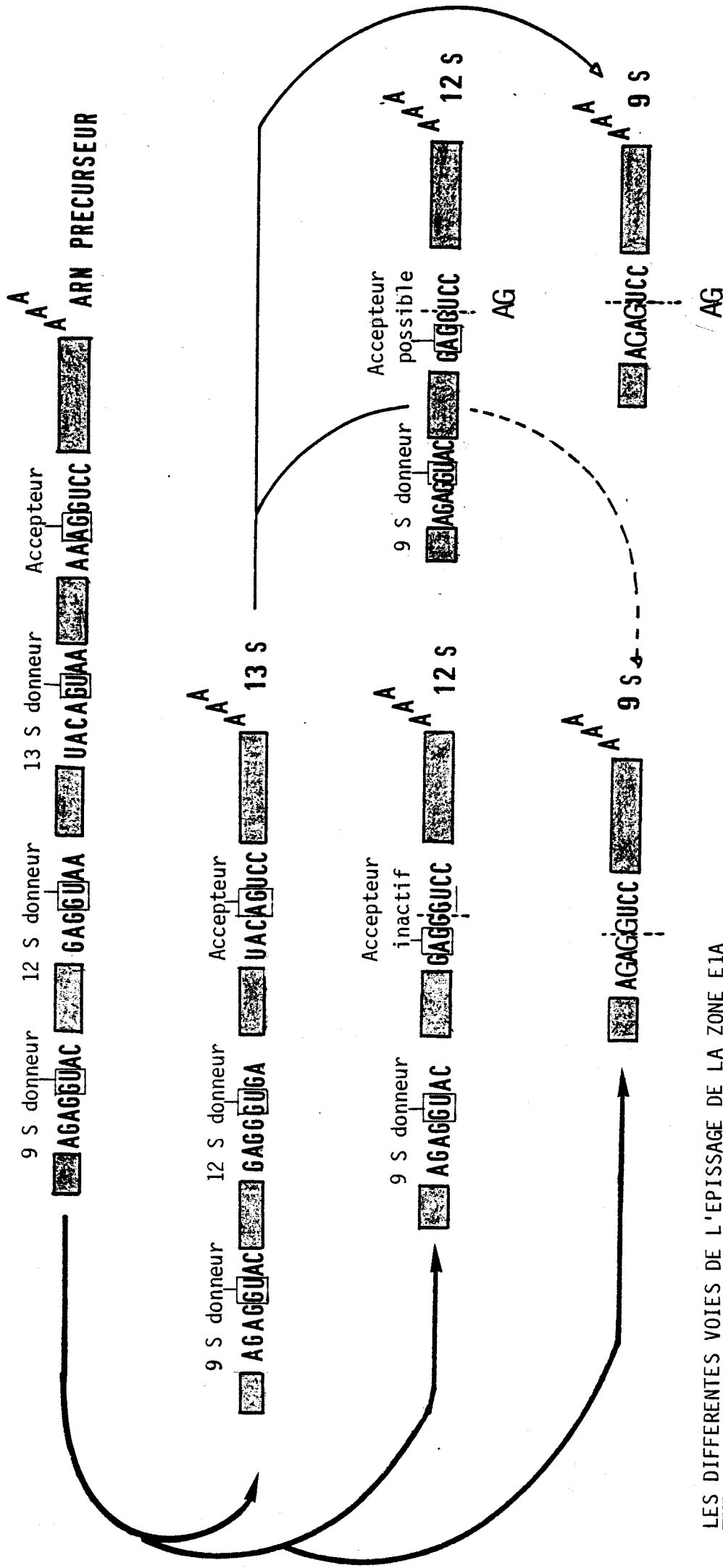
La région E1A s'exprime très tôt. Dès la première heure après l'infection, les ARNm de E1A sont détectables. Leur taux de transcription est maximal entre 3 et 4 heures p.i. puis décline légèrement.

Initialement, l'ARNm 9 S/E1A ne représente que 5 % des messagers de la zone E1A, alors qu'il devient prédominant vers la fin de la phase précoce (SPECTOR et al., 1978 ; SVENSSON et al., 1983).

Ce phénomène s'explique de 2 façons complémentaires. D'une part l'augmentation de la durée de vie des ARNm 9 S, d'autre part la modification de l'épissage permettant la production du 9 S/E1A à partir du 13 S/E1A (comme nous le détaillerons plus loin), provoque l'accumulation de ce messager en fin de phase précoce.

La région E1B transcrite plus tardivement a un taux maximal de transcription vers la 7^e heure du cycle viral. Comme la zone E1A, la zone E1B est sujette à un changement des quantités relatives de ses différentes espèces de messagers au cours du cycle.

Dès le début de la transcription de E1B les ARNm 13 S et 22 S sont en quantités semblables, bien que 20 heures après l'infection la cellule contienne 20 fois plus de 13 S que de 22 S. De nouveau, 2 mécanismes permettent



LES DIFFERENTES VOIES DE L'ÉPISSAGE DE LA ZONE E1A

Les traits pleins : les voies expérimentalement mises en évidence
 Le trait pointillé : la voie théorique d'épissage

Tiré de PETERSSON, U. (1983) Current Topics in Microbiology and Immunology. ed. DOERFLER W, Vol. 109.

FIGURE 3

d'expliquer cette évolution. Ce sont d'une part, l'augmentation de la durée de vie du messenger 13 S (de 5 à 10 fois) au cours du cycle lytique (WILSON & DARNELL, 1981) et d'autre part la modification tardive de l'épissage qui permet alors de produire des messagers 13 S à partir du 22 S (MONTELL et al., 1984).

Plus tardivement encore, le changement d'abondance des ARNm de E1B est dû à la synthèse des protéines tardives (BABICH & NEVINS, 1981).

Lors de la réplication de l'ADN viral, le taux de synthèse des ARNm précoces est amplifié de 3 à 10 fois selon les régions, par suite de l'augmentation du nombre de matrices de transcription (SHAW & ZIFF, 1980).

1.2.1.4. L'épissage de E1

La nature chevauchante ("overlapping") des ARNm de la zone E1A pose l'éventualité d'un épissage séquencé, générant des intermédiaires fonctionnels.

SVENSSON et al. (1983) étudiant le déroulement de l'épissage, en l'absence des produits des gènes viraux montrent que les ARNm 13 S, 12 S et 9 S sont issus d'un même précurseur nucléaire, mais par des voies différentes. Ils montrent également que l'ARNm 13S pourrait conduire par un épissage séquencé, à la formation de messagers 12 S et 9 S, tous deux délétés. Ce messenger 12 S délété peut néanmoins aboutir à la formation d'un ARNm 9 S normal (Figure 3).

L'évolution d'un épissage non séquencé, précoce, à un épissage séquencé tardif, permet donc d'expliquer la variation relative des messagers d'une même zone.

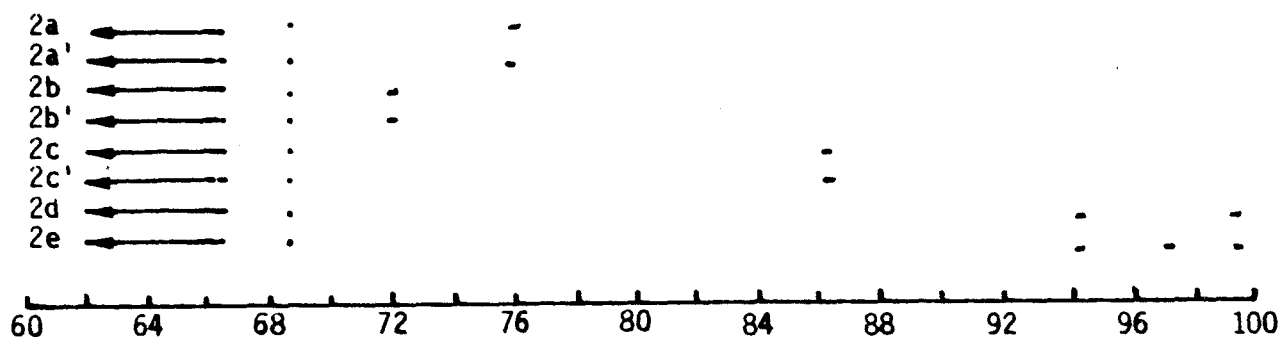
Ce schéma évolutif est corroboré par les travaux d'AKUSJÄRVI et PERSSON (1981,b) montrant des changements de mécanisme d'épissage, viro-induits, dans les unités de transcription tardive, ainsi que par ceux plus récents de MONTELL et al. (1984) concernant la zone E1B.

1.2.2. La région E2

1.2.2.1. La zone E2A

a. Les messagers de E2A

Par l'étude des hétéroduplex, en microscopie électronique, CHOW et al. (1978, 1979) ont localisé la zone E2A et ses différents promoteurs.



Représentation graphique des transcrits de la zone E2A.

Tous les messagers comprennent la séquence "leader" située à 68,6

S'y ajoute une séquence "leader" supplémentaire :

(a) pour les messagers précoces (séquence allant de 71,9 à 75,2)

(b) pour les messagers tardifs (séquence allant de 71,9 à 72,0)

(c) espèces mineures dont la séquence "leader" est située entre
86,2 et 86,7

(d), (e) espèces mineures dont les séquences "leader" sont celles
de la zone E4

Les espèces a', b', c' contiennent un site d'épissage supplémentaire
situé à 66,3.

La zone codante proprement dite se situe entre 61,6 et 66,5 UG ; s'y ajoute une courte séquence de tête ("leader") de 68 nucléotides localisée à 68,6 UG (BAKER et al., 1979).

Il existe 2 promoteurs principaux dont l'intervention est modulée au cours du temps :

- le promoteur précoce entre 75.1 et 75.2 UG (2a)
- le promoteur tardif entre 71.9 et 72.0 UG (2b) (Figure 5)

Il y a également production d'ARNm à partir d'un promoteur mineur 86,2 et 86,7 UG ainsi que des ARNm dont les séquences promotrices sont celles de la zone E4, située sur le même brin "I".

Le site de coiffe de l'ARNm précoce n'est pas précédé d'une séquence TATAA, alors que le tardif possède à -31 nucléotides un motif voisin TACAA.

A partir d'une série de mutations localisées environ de 0 à - 250 nucléotides avant le site de coiffe, ELKAIM et al. (1983) ont recherché les sites susceptibles de remplacer la séquence TATAA absente avant le promoteur précoce.

Cette étude a révélé l'importance d'une zone située entre - 94 et - 63 nucléotides sur l'efficacité du promoteur précoce.

En fait la délétion du 63^e nucléotide avant le site de coiffe empêche toute stimulation de la transcription par la zone E1A, à partir du promoteur précoce: quel que soit le promoteur en fonction, le gène est lu dans le même cadre de lecture, à partir du même codon AUG (15) appartenant au corps principal (61,6 - 66,5 UG) et non à la séquence de tête (KRUIJER et al., 1983).

IMPERIALE et NEVINS (1984) mettent en évidence une séquence activatrice de la transcription de E2A, entre -45 et -40 nucléotides avant le site d'induction de la transcription. Par l'intermédiaire de cette séquence la zone E1A stimule l'expression de la zone E2A.

Cette séquence est activatrice puisqu'elle est efficace en cis, quelles que soient son orientation et sa distance par rapport au site de coiffe (jusqu'à -4000 nucléotides de ce site).

b. Polypeptide de E2A

La protéine de la zone E2A a une masse moléculaire apparente de 72 K.

C'est une protéine possédant une haute affinité pour l'ADN simple brin (van der VLIET & LEVINE, 1973) tout comme la protéine 32 du phage T4. Bien que précoce, elle est encore synthétisée pendant la phase tardive.

L'analyse de 2 groupes de mutants indique la diversité des fonctions

remplies par la 72 K/E2A au cours du cycle lytique.

(1) la première classe de mutants, dont fait partie l'Ad5 ts 125, suggère l'implication de la 72 K à 3 niveaux différents :

- la réplication. Dès 1975, van der VLIET et SUSSENBACH, montrent le rôle de la 72 K dans le démarrage de la réplication puis dans son élongation (van der VLIET et al, 1977).

- la régulation des gènes précoces. La zone E2A régule négativement l'expression des zones précoces, y compris sa propre expression (BLANTON & CARTER, 1979 ; CARTER & BLANTON, 1978).

La 72 K semble limiter la durée de vie des ARNm de E1A et E1B, sans affecter les ARNm cellulaires (BABICH & NEVINS, 1981).

La zone E1A diminue le taux de transcription de la région E2A à partir de son promoteur tardif, mais augmente cette expression à partir de son promoteur précoce (ROSSINI, 1983).

La régulation de E2A par E1A diffère donc au cours du cycle viral.

NEVINS et WINKLER (1980) démontrent que la 72 K bloque le démarrage de la transcription de la zone E4, "in vitro".

Ces résultats ont été confirmés "in vivo" (HANDA et al., 1983) en montrant que la 72 K bloque la transcription au niveau du promoteur de la zone E4.

Néanmoins la région E2A pourrait réguler positivement les événements post-transcriptionnels de la zone E4 et donc favoriser son expression (RICHARDSON & WESTPHAL, 1981).

- la transformation. L'Ad5 ts 125 transforme plus efficacement les cellules que ne le fait l'Ad5 type sauvage, ce qui montre l'intervention de la 72 K dans ce mécanisme (peut être par son action sur la zone E1).

(2) La seconde classe comprend des mutants capables de pousser sur des cellules de singe, non permissives au virus du type sauvage (ANDERSON, 1981). Le blocage de la croissance du type sauvage se fait au niveau de la maturation de certains ARNm tardifs.

Le fait qu'une 72 K modifiée puisse contourner ce blocage, laisse penser qu'elle est impliquée dans l'expression des gènes tardifs, en dehors de son rôle dans la réplication.

Cette caractéristique la rapproche de l'antigène "grand T" (LT) de SV40 permettant la maturation des ARNm d'adénovirus sur cellules de singe.

La cartographie des 2 classes de mutants suggère que la protéine contient deux domaines fonctionnels distincts. Les mutations du groupe de l'Ad5 ts 125 sont localisées du côté C-terminal de la protéine (entre 60,2 et 63,6 UG), tandis que celles du groupe des hôtes dépendants (hr) sont du côté N-terminal

(entre 63,6 et 66,0 UG).

En 1984, RICE et KLESSIG obtiennent un double mutant, à la fois thermosensible, et capable de croître sur les cellules de singe.

La localisation de ces mutations corrobore les résultats précédents.

D'autre part un traitement doux à la chymotrypsine partage la 72 K en 2 fragments ; l'un de 44 K du côté C-terminal conserve une affinité pour l'ADN monocaténaire et peut compléter un système de répllication "in vitro" dépendant de la 72 K. La partie N-terminale ne présente pas d'activité mais contient la plupart des résidus phosphate de la 72 K.

La comparaison de la séquence en acides aminés de la 72 K des adénovirus de sérotype 7, 5, et 12 révèle (QUINN & KITCHINGMAN, 1984):

- une forte homologie dans la partie C-terminale. Notamment, on y retrouve 3 régions hautement conservées, riches en acides aminés basiques, probablement en relation avec l'affinité de cette protéine pour l'ADN monocaténaire. Le point de mutation de l'Ad5 ts 125 n'est pas retrouvé dans les 2 autres sérotypes, ce qui signifie que ce n'est pas un site de contact important, mais qu'il influe sur la structure secondaire de la protéine, la rendant thermosensible.

- une hétérologie des extrémités N-terminales, surtout entre l'Ad5 et l'Ad12.

Le point de mutation de l'Ad5 hôte dépendant (hr) est conservé pour l'Ad12 mais non pour l'Ad7.

En conclusion, nous pouvons noter que la partie C-terminale de la 72 K est bien conservée à travers les sous-groupes d'adénovirus, ce qui est en accord avec le rôle fondamental de cette protéine dans le cycle lytique.

1.2.2.2. La zone E2B

Cette zone étendue, également portée par le brin "l" code 2 protéines de masse moléculaire importante :

- le précurseur de la protéine terminale, de 80 K, localisé de 28,9 à 23,5 UG, qui donnera par clivage la protéine terminale de 55 K

- l'ADN polymérase virale, de 140 K, codée de 24,0 à 14,2 UG.

La zone E2B est sous le contrôle des promoteurs de la zone E2A et d'un promoteur propre.

Les 2 protéines codées par E2B ont un rôle essentiel dans la répllication de l'ADN viral.

1.2.3. La région E3

1.2.3.1. Les messagers de E3

Orientée vers la droite (brin r), cette unité de transcription est la seule zone précoce disposée dans une région qui est sous contrôle du promoteur tardif.

Elle est transcrite précocement à partir de son propre promoteur (EVANS et al., 1977) en une série d'ARNm de structures voisines (CHOW et al., 1979).

Ces ARNm présentent tous la même extrémité 5', et disposent de 2 sites de polyadénylation. Une séquence homologue du motif TATAA est présente, 29 nucléotides avant le site de "tête" (BAKER & ZIFF, 1981).

Plusieurs formes d'ARNm dépendent de cette organisation. Ils sont transcrits à partir d'une zone 5' localisée entre 76,6 et 77,6 UG ; celle-ci est raboutée à un fragment allant de 78,6 à 82,7 UG pour l'espèce majeure (3a).

Ce fragment peut s'étendre jusque 84,7 UG (3b) ou 86,0 UG (3c) (Figure 5). Quatre autres types d'ARNm ont une délétion de taille variable, débutant à 79,1 UG.

De toutes les zones précoces, la zone E3 est la moins sujette aux variations des taux relatifs de ses divers ARNm, au cours du cycle lytique.

Dès 13 heures post-infection, une fraction des messagers est produite à partir du promoteur majeur tardif. Ces ARNm sont identiques à ceux synthétisés précocement.

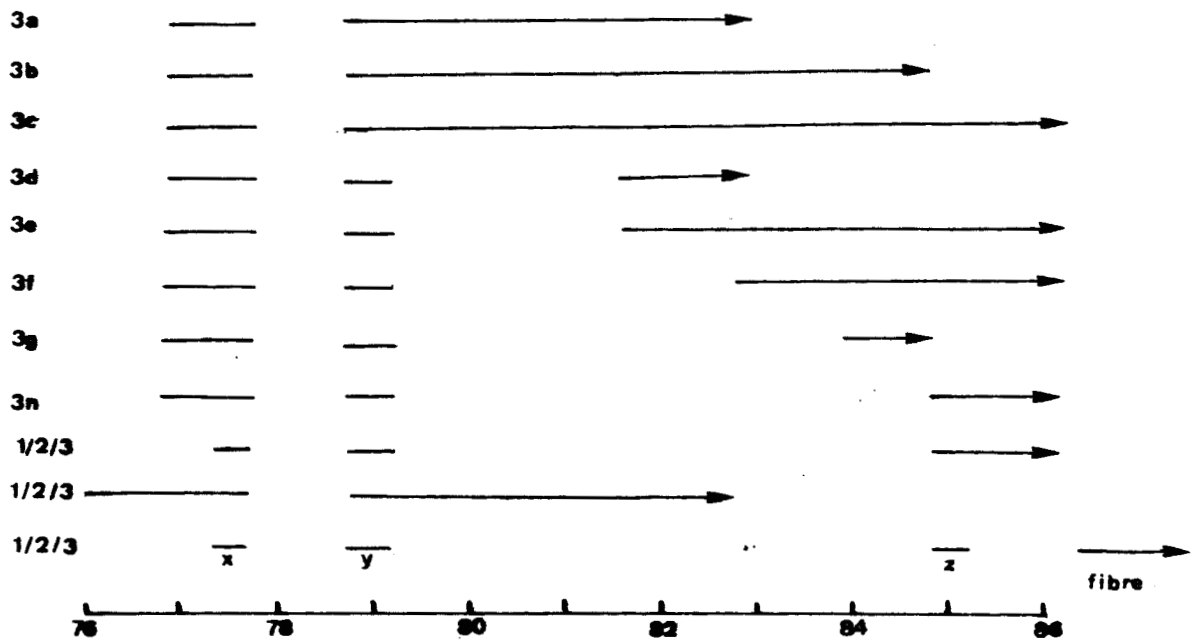
1.2.3.2. Le(s) polypeptide(s) de E3

La zone E3 code au moins pour un polypeptide de 14,5 K, précurseur d'une glycoprotéine (ISHIBASHI & MAIZEL, 1974). La glycosylation produit un intermédiaire de 17,5 K, avant d'aboutir à la forme définitive de 19 K (PERSSON et al., 1980).

Cette glycoprotéine n'a pas de rôle connu dans le cycle lytique, mais est retrouvée associée aux chaînes lourdes des antigènes d'histocompatibilité de classe I, à la surface des cellules infectées (SIGNAS et al., 1982).

La viabilité des hybrides adénovirus-SV40, constitués d'un adénovirus dont la zone E3 est substituée par tout ou partie du génome SV40, indique que cette zone n'est pas indispensable au cycle lytique (LEBOWITZ et al., 1974).

Plus récemment, les techniques de génie génétique ont permis la réalisation d'un mutant d'adénovirus de type 5, dont la zone E3 est fortement



Représentation graphique des transcrits de la zone E3 pendant la phase précoce des messagers (a à h) ont en commun :

- une séquence "leader" allant de 76,6 à 77,6
- l'extrémité 5' de la zone codante à 78,6, l'espèce (a) est l'espèce majeure
- pendant la phase tardive les messagers débutent au niveau de la séquence "leader" tripartite (messager 1/2/3)

FIGURE 5

délétée. Fait marquant de cette réalisation : le mutant, phénotypiquement semblable au type sauvage, inhibe ce dernier lors d'une coinfection. Il semble agir au niveau de la réplication (BERKNER & SHARP, 1983).

1.2.4. La zone E4

1.2.4.1. Les messagers de E4

Située sur le brin "I" à l'extrémité droite du du génome, la zone E4 est d'organisation et de régulation complexes.

Elle produit des ARNm possédant la même séquence de tête en position 99,2 UG et la même extrémité 3' située à 91,3 UG (CHOW et al., 1979).

En amont de la séquence de tête (-29 à -21) se trouve un motif TATAA sans lequel il ne peut y avoir transcription.

De -61 à -44 se situe un signal activateur du promoteur, dont la délétion provoque une diminution de la transcription d'un facteur 3.

Enfin une zone extensive de -140 à -325 (extrémité droite) induit une activation de la transcription, c'est vraisemblablement le site d'action de la 72 K/E2A (HANDA & SHARP, 1984).

Des délétions de taille et de positions variables distinguent 7 espèces d'ARNm. La plus abondante s'étend continûment de 96,8 à 91,3 UG (4a). (Figure 6).

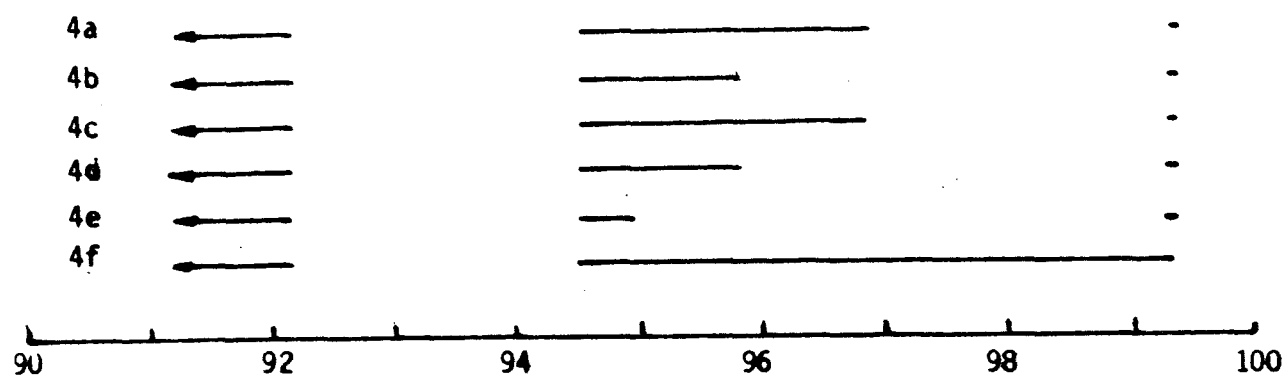
1.2.4.2. Les polypeptides de E4

Le nombre, les caractéristiques et le rôle des polypeptides de la zone E4 sont mal connus. La traduction "in vitro" de cette zone produit 16 polypeptides.

SARNOW et al. (1982) ont isolé un polypeptide de 11 K, correspondant à la zone codante comprise entre 95,5 et 96,5 UG. Cette protéine n'est pas indispensable au cycle lytique de l'adénovirus comme le prouve l'étude des mutants de cette région.

Un mutant, l'Ad2 dl 807 (CHALLBERG & KETNER, 1981) est délété de 82,5 à 95 UG. Il lui manque donc la fibre, ainsi qu'une partie des zones E3 et E4. Il se réplique normalement, mais voit son taux de traduction des protéines tardives affaibli par rapport au type sauvage. Il ne complète pas le virus associé à l'adénovirus (AAV, un parvovirus) comme le fait le type sauvage.

SARNOW et al. (1984) ont mis en évidence une protéine de 25 K coprécipitée avec la 58 K/E1B Ad5 par un sérum anti-58 K. L'étude de ce



Représentation graphique des messagers de la zone E4

- tous les messagers de cette zone possèdent une même séquence "le leader" localisée à 99,2
- une même extrémité 3' à 91,3

FIGURE 6

polypeptide a révélé qu'il ne pouvait être codé que par la zone E4.

1.3. La réplication

1.3.1. Introduction

La réplication suit un mécanisme de déplacement du brin non répliqué (SUSSENBACH et al., 1972).

La matrice préférentielle est le complexe ADN-protéine terminale 55 K (REKOSH et al., 1977). En effet, chaque déoxycytidine placée à l'extrémité 5' d'un brin est liée par un pont phosphodiester à une sérine de la protéine terminale (DESIDERIO & KELLY, 1981).

L'induction de la réplication procède par la fixation d'un déoxyribonucléotide, non pas sur une amorce d'ARN, mais directement sur la protéine terminale.

Cette réaction, ainsi que l'élongation de la future chaîne d'ADN, sont catalysées par l'ADN polymérase viro-codée (LICHY et al., 1982 ; STILLMAN et al., 1982).

La réalisation de ces 2 étapes de la réplication nécessite également la présence de la protéine 72 K/E2A possédant une affinité pour l'ADN monocaténaire (van der VLIET et al., 1977).

D'autre part des protéines cellulaires sont requises pour le bon fonctionnement des systèmes de réplication "in vitro" (NAGATA et al., 1982).

1.3.2. Démarrage de la réplication

1.3.2.1. L'origine de réplication

La séquence permettant le démarrage de la réplication est localisée dans les séquences terminales inversées répétées de l'ADN viral (ARRAND & ROBERTS, 1979).

Les séquences terminales inversées ont été retrouvées dans tous les sous-groupes d'adénovirus humains et dans certains sérotypes parasitant les animaux (TAMANOI & STILLMAN, 1983).

La comparaison de ces séquences dans les sérotypes humains révèle certaines structures communes :

(1) une zone riche en A-T, de 50 à 52 paires de bases à l'extrémité du brin.

(2) une zone riche en G-C, contiguë à la précédente, de 50 à 110 paires

de bases.

La zone "A-T" est hautement conservée parmi les sérotypes humains, contrairement à la zone G-C, qui est de taille très variable.

Les 18 nucléotides extrêmes de la zone "A-T" sont très hautement conservés, notamment les 10 compris entre le 8^e et le 18^e nucléotide. Cette séquence parfaitement conservée permet le démarrage de la réplication. A l'intérieur de la zone "GC" on trouve également des séquences telles que "GGGGGG", présentes en copies multiples, dans tous les sérotypes humains.

Ces séquences sont homologues de celles retrouvées dans les papovavirus, chez lesquels elles activent la réplication (BERGMA et al., 1982).

1.3.2.2. La protéine terminale

L'induction de la réplication a lieu au niveau du précurseur de la protéine terminale (CHALLBERG et al., 1980).

Ce précurseur de masse moléculaire 80.000, n'est clivé en un produit de 55.000 que lors de l'assemblage de la capsid virale (CHALLBERG & KELLY, 1981).

La réaction d'induction se fait à partir du complexe ADN - précurseur de la protéine terminale, en présence de Mg^{++} et d'ATP.

En dehors de ce rôle "d'amorce", la 55 K/E2B assure la protection des extrémités de l'ADN, contenant l'origine de la réplication (van BERGEN et al., 1983).

1.3.2.3. L'ADN polymérase virale

Mise en évidence par NAGATA et al. (1982), cette enzyme de masse moléculaire 140.000, catalyse la fixation de la déoxycytidine sur la protéine terminale.

Par sa sensibilité à la N-ethylmaléimide et au ddTTP, elle s'apparente à l'ADN polymérase "alpha" des eucaryotes et par sa résistance à l'aphidicoline, à l'ADN polymérase "gamma".

Néanmoins, elle ne peut utiliser les amorces d'ARN comme le ferait une polymérase cellulaire (LICHY et al., 1982).

1.3.2.4. Autres protéines

Au moins 2 autres protéines sont indispensables au démarrage de la réplication :

- une protéine cellulaire de 47.000 - le facteur I - qui stimule l'induction.

- la 72 K/E2A, qui inhibe l'induction en l'absence du facteur I alors qu'elle l'active en sa présence (NAGATA et al., 1982).

Néanmoins, l'importance de la 72 K dans l'induction est remise en cause par des travaux récents de CHALLBERG et al. (1982).

1.3.3. Elongation

1.3.3.1. Dépendance vis à vis de l'ATP

L'élongation des chaînes d'ADN d'adénovirus requiert très peu d'ATP. Sa concentration, optimale à 8 mM, peut descendre à 0,2 μ M sans affecter grandement la réplication. Dans les mêmes conditions, la réplication de l'ADN cellulaire est diminuée de 10 fois (DE JONG et al., 1983).

1.3.3.2. Sensibilité au 2' 3' dideoxynucléoside triphosphate et à l'aphidicoline

L'ADN polymérase viro-codée présente une haute sensibilité au 2' - 3' ddNTP, semblable à celle de l'ADN polymérase alpha (LICHY et al., 1982). L'élongation de l'ADN viral est donc très dépendante de ces facteurs, contrairement à la réplication de l'ADN cellulaire.

L'ADN polymérase virale est totalement insensible à l'aphidicoline. Pourtant l'élongation de l'ADN viral est affectée par cette substance, toutefois à des doses très supérieures à celles inhibant l'ADN polymérase cellulaire (LONGIARU et al., 1979).

La formation du complexe protéine terminale - dCMP n'est pas inhibée dans ces conditions, l'élongation est la phase sensible à l'aphidicoline. Il est donc probable que l'aphidicoline a une cible protéique dans la fourche de réplication, autre que l'ADN polymérase virale.

1.3.3.3. La protéine E2A/72 K ("DNA Binding protein")

La DNA binding protein (DBP) est nécessaire à l'élongation. Cette constatation est confirmée par l'observation des grandes quantités de protéines fixées à l'ADN monocaténaire, lors de la réplication (van der VLIET & LEVINE, 1973).

Elle apparaît indispensable à la phase précoce de l'élongation ainsi que l'ont montré CHALLBERG et al. (1982) à l'aide du mutant Ad5 ts 125.

Ce mutant est complétement pour cette fonction à une température non permissive, par le fragment chymotrypsique C-terminal de la 72 K, de masse moléculaire 45 K (ARIGA et al., 1980).

La partie C-terminale de la 72 K/E2A est donc impliquée dans l'induction comme dans l'élongation de la réplication.

1.3.3.4. La protéine terminale et son précurseur

Selon SUSSENBACH et van der VLIET (1983), l'addition d'un sérum anti-protéine terminale à un système de réplication "in vitro", en cours d'élongation, provoque l'arrêt de la réplication.

La protéine terminale ou (et) son précurseur a (ont) donc une influence sur l'élongation du brin d'ADN en cours de synthèse. Ces auteurs proposent un modèle d'élongation conduisant à la formation de la structure "en manche de poêle", pour le brin d'ADN non répliqué .

Cette structure due aux extrémités répétées inversées de l'ADN (STEENBERGH et al., 1977) semble être un intermédiaire de synthèse du brin complémentaire, déplacé lors de la réplication (LECHNER & KELLY, 1977).

1.4. La phase tardive

1.4.1. Transcription tardive

1.4.1.1. Généralités

L'expression des gènes tardifs débute, après la réplication de l'ADN viral, soit vers la 16^e heure du cycle lytique. A ce moment, 20 à 40 % des ARN totaux de la cellule infectée par l'Ad2, sont d'origine virale (ROSE et al., 1965). Sur les polyribosomes, les ARNm viraux ont alors complètement remplacé les ARNm cellulaires (BHADURI et al., 1972).

Tableau 4. Nature des zones codantes tardives de l'adénovirus

Famille	Protéines codées dans la famille	Coordonnée de l'extrémité 3'OH (en unités génome)
L1	IIIa, 52-55 K	39 UG
L2	III, pVII, V	49,5 UG
L3	pVI, Hexon, 23 K (protéase)	61,5 UG
L4	100 K, pVIII, 33 K	78,3 UG
L5	Fibre (IV)	91,2 UG

1.4.1.2. Expression des gènes tardifs

a. Le promoteur tardif majeur

Un ARNm, précurseur nucléaire de 28 S est transcrit à partir du promoteur tardif majeur situé à 16,6 sur le brin "r" de l'ADN viral (EVANS et al., 1977).

Les modifications post-transcriptionnelles subies par le précurseur, permettent la formation de 5 familles d'ARNm (appelés L1 à L5) (Tableau 4) ; Chaque famille est caractérisée par une extrémité 3'OH constante.

Tous ces ARNm ont en commun, une extrémité 5' non codante de 200 nucléotides. Cette région est appelée "séquence tripartite", elle est codée par trois fragments séparés (situés à 16,6 UG, 19,6 UG, 26,6 UG) de l'ADN viral. CHOW et al., en 1977, l'ont mise en évidence grâce à des expériences d'hybridation ADN-ARN.

En 1984, OSBORNE et al., montrent avec des plasmides recombinants, que la séquence "leader tripartite" augmente de 5 fois l'efficacité de traduction des ARNm au stade tardif seulement.

L'ARNm de la fibre (86,3 - 91,2 UG) a une 4^e séquence leader y (78,6 - 79,1 UG) en plus de la séquence tripartite commune (CHOW et al., 1979). Parfois, il existe une 5^e séquence x (76,9 - 77,3 UG) et une 6^e séquence z (84,7 - 85,1 UG) leaders. Ces transcrits x, y, z peuvent être des intermédiaires nécessaires au mécanisme de maturation de l'ARNm de la fibre.

b. Les ARNm ne dépendant pas du promoteur majeur tardif

Il s'agit d'une part de l'ARNm du IVa₂, seule protéine tardive codée par le brin "l". Elle possède son propre promoteur (de 16,1 à 15,7 UG), qui est situé 200 bases avant le gène du IVa₂ (de 15 à 10 UG). Il n'existe pas de TATAA box (BAKER & ZIFF, 1981).

D'autre part l'ARNm du polypeptide IX se trouve sur le brin "r", dans la zone précoce de E1B.

Cet ARNm n'est pas mûré (ALESTROM et al., 1980) ; son site de polyadénylation est confondu avec celui de l'ARNm de la E1B ; il possède une séquence "TATAA" située 30 nucléotides avant le site de coiffe (ALESTROM et al., 1980 ; van ORMONDT et al., 1980) qui se trouve dans les messagers 22 S et 13 S de E1B (ALESTROM et al., 1980 ; GINGERAS et al., 1982). Ceci suggère que l'ARNm du IX est régulé par un promoteur différent de celui de E1B.

1.4.1.3. Synthèse des ARNm précoces pendant la phase tardive

Bien que l'on retrouve à la 18^{ème} h après l'infection des séquences d'ARNm précoces dans le cytoplasme de la cellule, il est peu probable que la transcription des 4 régions précoces continue pendant la phase tardive.

LUCAS et GINSBERG (1971), définissent deux classes d'ARNm précoces ; la classe I n'est pas synthétisée pendant la phase tardive ; alors que la synthèse des ARNm de la classe II continue après la réplication de l'ADN.

Les ARNm de E2, avaient d'abord été rangés dans la classe I (CRAIG & RASKAS, 1974), mais FLINT et SHARP, montrent en 1976, grâce à des expériences de mesure de la concentration totale des ARN complémentaires de E2 à différents temps d'infection, que E2 se trouve dans la classe II. CHOW et al., (1979) trouvent différents modes de maturation de cet ARNm : une espèce possède son extrémité 5' à 72 UG, tandis qu'une 2e espèce majoritaire pendant la phase tardive a son extrémité 5' à 75 UG.

La synthèse continue des ARNm de E2, pendant la phase tardive, semble donc s'accompagner d'un changement de promoteur.

La zone à droite de 4,4 UG exprime les ARNm 22 S et 13 S de E1B pendant la phase précoce.

La synthèse de ces ARN continue après la réplication: il y a alors

synthèse d'un ARNm supplémentaire de 9 S qui code pour le polypeptide IX (SPECTOR et al., 1978).

1.4.1.4. Les VA-RNA

Les ARN associés à l'adénovirus, sont synthétisés en quantité importante lors de la phase tardive (REICH et al., 1966 ; SODERLUND et al., 1976). Il s'agit de petits ARN (de moins de 160 nucléotides), localisés à 30 UG (MATHEWS, 1975 ; PETTERSSON & PHILIPSON, 1975 ; SODERLUND, 1976).

Les gènes des VA-RNA sont transcrits par l'ARN polymérase III (WEINMAN et al., 1974). Ils contiennent des régions de contrôle transcriptionnel intragénique (FOWLKES & SHENK, 1980 ; GUILFOYLE & WEINMAN, 1981).

L'ARN VA I est synthétisé tardivement après l'infection dans un rapport 40 fois plus important que l'ARN VA II. Ces 2 ARN-VA sont dépourvus de séquence polyadénylée.

La construction de mutants sur la synthèse de l'un ou l'autre des VA-RNA (THIMMAPAYA et al., 1982) a permis de montrer, que le mutant dl330 ne transcrivant pas l'ARN VA I pousse très difficilement, alors que le mutant dl 328 n'exprimant pas l'espèce mineure VA II croît normalement. Ceci suggère que l'ARN VA I est nécessaire pour une traduction efficace des ARNm viraux tardifs.

L'ARN VA I agirait plus précisément au niveau de "l'initiation" de la traduction: il semble nécessaire à la formation d'un complexe de pénétration de 48 S (SCHNEIDER et al., 1984).

1.4.2. Assemblage

1.4.2.1. Introduction

Lors de la phase tardive, les polypeptides viraux synthétisés dans le cytoplasme, sont transportés dans le noyau de la cellule, en des temps allant de 3 à 6 mn après synthèse (HORWITZ et al., 1969 ; VELICER & GINSBERG, 1970).

Dans le noyau a lieu l'assemblage qui aboutit à la formation de particules virales matures (on compte en moyenne 10^5 particules produites pour 1 cellule HeLa infectée) capables d'aller infecter d'autres cellules.

L'assemblage des virions fait intervenir les protéines de structure

de la capside, mais aussi d'autres protéines tardives dites d'échaffaudage et de stabilisation. Les différentes étapes actuellement connues ont été principalement mises en évidence grâce à l'étude de mutants thermosensibles.

1.4.2.2. Les différentes phases

a. Assemblage des capsomères

La mise en évidence de mutants ts ne trimérisant pas le polypeptide II en hexon (LEIBOWITZ & HORWITZ , 1975), a permis d'établir que le produit d'un autre gène est nécessaire à cette opération. Ce gène code pour une 100 K, protéine tardive majeure non structurale (FROST & WILLIAMS, 1978).

La 100 K est contrôlée par le promoteur tardif majeur, son ARNm est très abondant lors de la phase tardive. Elle possède donc un rôle dans la trimérisation de l'hexon (WILLIAMS et al., 1974), mais peut-être aussi dans le transport de l'hexon du cytoplasme au noyau.

La base et la fibre, s'assemblent de façon non covalente pour former les capsomères pentons. Cet assemblage a pu être reproduit "in vitro" (BOUDIN & BOULANGER, 1982).

b. Les capsides vides

Différents types de capsides vides ont été mis en évidence à la fois chez le virion sauvage, et chez des mutants ts bloqués à des étapes précises de l'assemblage (D'HALLUIN et al., 1978). Ces populations de particules sont isolées et séparées, grâce à leur différence de densité, par des techniques d'ultracentrifugation.

Différents types de protéines interviennent dans la formation de ces capsides (EDVARDSSON et al., 1976).

- . Les protéines capsomères sont l'hexon, la base du penton, le IIIa et la fibre.
- . Les précurseurs de protéines associées aux hexons, pVI et pVIII.
- . La protéine IX, associée aux hexons des faces de l'icosaèdre, et stabilisatrice de la capside.
- . Des protéines d'échaffaudage, telles la 100 K, la 39 K, la 50 K, qui sont phosphorylées, et la 33K.

. La 33 K, phosphoprotéine tardive (RUSSELL & BLAIR, 1977) de 227 acides aminés (LEVINSON et al., 1977). Elle est codée par un ARNm qui recouvre celui de la 100 K, mais est lue dans un cadre de lecture différent (GALIBERT et al., 1979).

. Certaines espèces possèdent également le pVII, précurseur du VII, protéine de type histone associée à l'ADN (MORIN & BOULANGER, 1984).

c. Encapsidation de l'ADN viral

Seulement 10 % de l'ADN viral synthétisé est empaqueté dans les virions.

Des particules incomplètes d'Ad7 contiennent une séquence double brin correspondant à l'extrémité gauche du génome (TIBETTS, 1977), alors que dans la cellule, les 2 extrémités de l'ADN viral sont également représentées.

Il semble qu'une région de 290-300 nucléotides à l'extrémité gauche du génome soit nécessaire à l'encapsidation de l'ADN (HAMMARSKJOLD & WINBERG, 1980). Cette séquence n'agit qu'en cis et ne code pour aucune protéine.

La circularisation de l'ADN, par la protéine terminale, se fait probablement dans la capsid.

d. La maturation du virion

Après encapsidation de l'ADN viral, une population de même densité que le virion mature a été mise en évidence grâce à l'étude du mutant H2 ts 1 (WEBER, 1976).

Cette population appelée "jeunes virions", n'est pas infectieuse, car les précurseurs protéiques (pTP 87 K, pVI, pVIII, pVII) n'ont pas été clivés.

La mutation de l'H2 ts 1 (YEHKAI et al., 1983) est localisée à 61,1 UG. Cette région code pour une protéine de 23 K (60 à 62 UG) (HASSEL & WEBER, 1978), la protéase virale, qui permet le clivage des précurseurs et la formation de virions infectieux. La protéase virale a une activité de type chymotrypsique.

Les virions infectieux formés se répartissent dans le milieu après lyse de la cellule et sont capables d'infecter de nouvelles cellules, recommençant ainsi le cycle lytique.

2. La transformation

2.1. Définition

La transformation est l'acquisition de nouvelles propriétés de morphologie et de croissance. S'y associe la notion de "malignité" au sens cancérologique du terme.

2.2. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se compose de l'alternance des phases suivantes :

- l'interphase qui est l'ensemble des :
 - . phase de latence (G1)
 - . phase de synthèse de l'ADN (S)
 - . phase d'éclipse (G2)
- la mitose (M)

La durée moyenne du cycle cellulaire ou temps de génération varie de quelques heures à une centaine de jours. Cette hétérogénéité du temps de génération est due à la variabilité de la durée de la phase G1. Le point de non retour, R_0 , au delà duquel s'amorce la phase S quelles que soient les conditions de milieu dans lesquelles se trouve la cellule, se situe tardivement en phase G1. Durant la période précédant cet instant précis, toute modification du milieu peut ralentir la division cellulaire déterminant alors la phase G_0 .

2.3. Caractéristiques de la transformation

2.3.1. Introduction

La découverte de la transformation cellulaire est due à EARLE et al. (1943) sur une culture de cellules de souris, traitée au 20 méthyl-cholanthrène.

Dès les années 1950, on démontre que le virus du sarcome de ROUS induit des changements morphologiques dans les fibroblastes embryonnaires de poulet (LO et al., 1955).

Enfin, c'est en 1959 que DAWE et LAW montrent la transformation de cellules en culture par un virus à ADN (le polyome).

2.3.2. La transformation virale

2.3.2.1. Généralités

Avant d'aborder la transformation cellulaire induite par l'adénovirus nous examinerons le comportement des PAPOVAVIRIDAE, proche de celle des ADENOVIRIDAE.

En effet les virus de ces 2 familles sont semblables en quelques points importants.

- Ce sont des particules non-enveloppées, de symétrie icosaédrique, contenant un ADN bicaténaire.
- Ils se répliquent efficacement dans les cellules qui leur sont permissives.
- Lors de leur cycle lytique, ils s'expriment de façon ordonnée en une phase précoce puis en une phase tardive.
- Leur progéniture virale est assemblée dans le noyau cellulaire.
- les cellules transformées par ces virus le sont par un processus impliquant l'expression d'une série de gènes viraux. Ces cellules contiennent des antigènes viraux spécifiques, des ARNm viraux, et des séquences d'ADN viral intégrées au génome cellulaire.
- Ils induisent, au moins pour certains sérotypes d'adénovirus, des tumeurs chez les rongeurs nouveau-nés.

2.3.2.2. Les PAPOVAVIRIDAE

2.3.2.2.1. Le virus simien SV40

A. Structure

La capside du SV40 se compose des protéines VP1, VP2 et VP3 qui représentent 70 à 80 % de l'ensemble des protéines virales. Ces protéines sont phosphorylées, mais ne sont associées à aucune activité enzymatique.

Les protéines VP1, au nombre de 360 forment 60 capsomères répartis sur les 20 faces de l'icosaèdre. Ces protéines seraient unies par des ponts disulfures (WALTER & DEPPERT, 1975). Il est vraisemblable que les protéines VP2 et VP3, non reliées structurellement à VP1, forment les 12 capsomères de symétrie 5 (pentons).

Caractéristiques	Familles			
	Adenoviridae	Papovaviridae		
			Polyome	SV40
Type	non enveloppé	Non enveloppé		
Diamètre	70 à 90 nm	45 nm	45 nm	45 nm
Symétrie	icosahédrique	icosahédrique		
Nombre de capsomères	252	72	72	72
ADN	Double brin linéaire de 20 à 30 x 10 ⁶ daltons soit 35.000 pb	Circulaire double brin		
		3,4 x 10 ⁶ 52.000 pb	3,4 x 10 ⁶ 52.000 pb	5 x 10 ⁶
Masse moléculaire du virion	170 x 10 ⁶ daltons	27 x 10 ⁶	27 x 10 ⁶	40 x 10 ⁶
Composition du virion	10 polypeptides	5 à 7 polypeptides		
Hôte	vertébrés	vertébrés		

D'après "CLASSIFICATION AND NOMENCLATURE OF VIRUSES"
R.I.E.F. MATTHEWS, 17 (1-3), 1982.

COMPARAISON DES PAPOVAVIRIDAE ET DES ADENOVIRIDAE

TABLEAU 5

Selon ESTES et al. (1971), chaque penton serait composé de 10 molécules de VP2 et VP3.

B. Structure et expression du génome viral

L'ADN viral se présente sous forme d'un minicercle bicaténaire de 5200 paires de bases, organisé dans le virion en une structure voisine de celle de la chromatine cellulaire.

Cette organisation est due à son association avec les histones H2A, H2B, H3 et H4.

La réplication, bidirectionnelle, démarre en un point et se déroule jusqu'en un autre point diamétralement opposé (DANNA & NATHANS, 1972).

a) Protéines tardives

Leur transcription produit 3 ARNm, de 16 S, 18 S et 19 S codant respectivement pour les protéines VP1, VP3 et VP2.

b) Protéines précoces

Transcrites dans le sens inverse de la région tardive, à partir de zones codantes se chevauchant partiellement, ces protéines sont impliquées dans la transformation.

Elles sont essentiellement 2, l'antigène (Ag) grand T et l'Ag petit t, accompagnées de quelques autres en dérivant probablement (Les Ag U et TSTA).

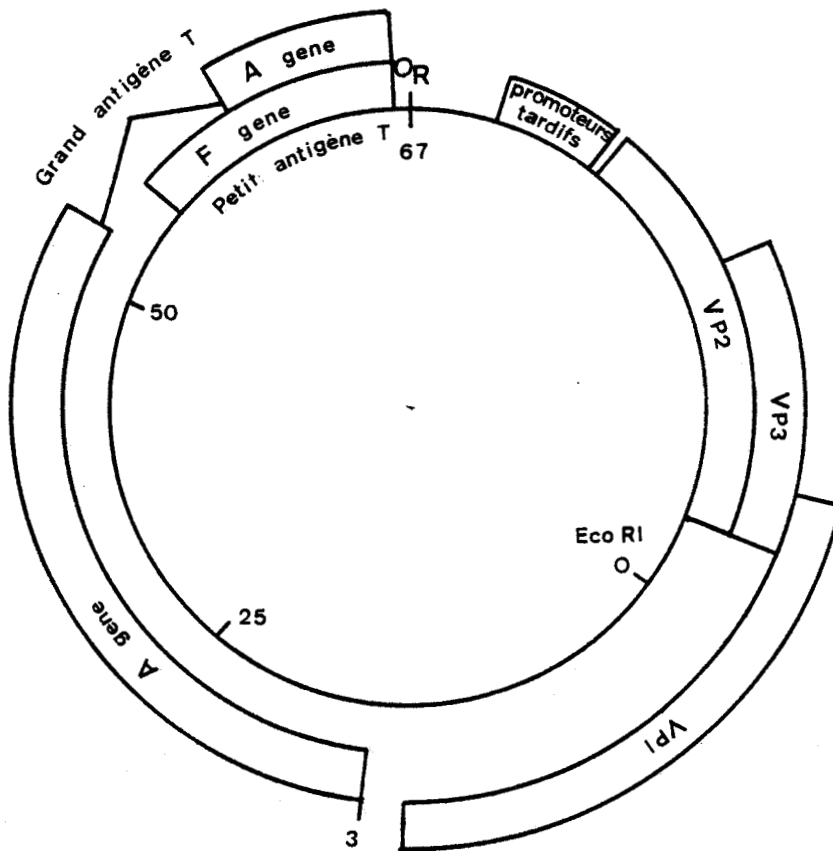
. L'Ag grand T

Cette protéine d'une masse moléculaire apparente de 80 à 100 K est phosphorylée et présente sous des formes multimériques dont le rôle est inconnu. Elle est localisée dans le noyau, et est codée par 2 zones non contiguës du gène A (0,65 - 0,59 et 0,54 - 0,17 UG).

L'Ag grand T est impliqué dans de nombreuses fonctions :

- . il régule sa propre synthèse et celle des autres produits précoces,
- . il est nécessaire à la réplication de l'ADN viral
- . il permet l'expression des gènes tardifs,
- . il est nécessaire à l'induction et au maintien de la transformation cellulaire (LEWIS et al., 1983).

L'Ag grand T aurait également une activité protéine kinase (TJIAN & ROBBINS, 1979) comme la protéine transformante du gène src.



ORGANISATION DU GENOME DE SV40

FIGURE 7

. L'Ag petit t

Sa masse moléculaire apparente est de 17 K. Sa zone codante chevauche celle de l'Ag grand T, ce qui explique qu'ils ont la même partie N-terminale (PAUCHA et al., 1978).

La fonction de cet Ag durant le cycle lytique est inconnue puisque des mutants délétés dans la partie C-terminale de l'Ag petit t, ont un cycle normal.

En revanche, cet Antigène est impliqué dans la transformation.

. L'Ag de transplantation TSTA

Il s'agit probablement d'un Ag grand T modifié, inséré dans la membrane plasmique et produit lors des infections lytiques comme lors des transformations.

2.3.2.2.2. Le polyome

L'organisation générale du génome du polyome est sensiblement identique à celle du SV40.

Néanmoins il existe quelques différences entre ces deux virus, dont la principale est la présence d'un Ag moyen T, de masse moléculaire apparente 55 à 60 K, associé à la membrane plasmique (ITO et al., 1977).

L'analyse des peptides tryptiques des 3 AgT du polyome, montre une certaine communauté entre eux.

En fait, la partie N-terminale de l'Ag moyen T est commune avec celle de l'Ag grand T, ainsi qu'avec la majeure partie de l'Ag petit t.

L'Ag moyen T induit l'immortalisation cellulaire, alors que l'Ag grand T maintient la transformation.

2.3.2.3. Caractères induits lors de la transformation par le SV40 ou le polyome

A. Introduction

Nous examinerons simultanément les caractères des transformations induites par le SV40 ou le polyome.

La transformation d'une cellule par le SV40 est le résultat d'un ensemble d'évènements intervenant avant la réplication du génome viral dans la cellule hôte et qui sont :

- . la stimulation de la synthèse d'ADN de la cellule hôte
- . l'induction de la synthèse des enzymes impliqués dans la synthèse de l'ADN
- . la production d'ARNm viraux précoces
- . la synthèse des antigènes T et TSTA
- . l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte ; le cycle viral est alors abortif puisque l'ADN viral n'est pas répliqué, les ARNm tardifs non transcrits, et les cellules non lysées.

B. Propriétés des cellules transformées par le SV40 ou le polyome

Dans ce paragraphe nous détaillerons quelques-uns des traits les plus importants des cellules transformées, l'ensemble des caractères étant présenté dans le Tableau 6.

a. Prélèvement de métabolites

La transformation provoque un fort accroissement du prélèvement de métabolites (de l'ordre de 2 à 3 fois), tels que le phosphate inorganique, l'acide aminoisobutyrique, la glutamine et le déoxyglucose (CUNNINGHAM & PARDEE, 1969).

b. Agglutination par les lectines

L'agglutinine de blé qui possède 2 sites spécifiques de liaison à la N-acétyl glucosamine, agglutine entre-elles les cellules transformées. La sensibilité de ces cellules à l'agglutinine est probablement due à une augmentation de fluidité de la membrane qui permet ainsi un rassemblement des récepteurs de lectines (NICHOLSON, 1974).

c. Distribution de la fibronectine

Cette glycoprotéine de 220 à 230 K, située à la surface externe de la membrane plasmique, voit sa répartition se modifier lors de la transformation. Ainsi elle disparaît de la surface cellulaire lors de la transformation par l'adénovirus, mais non dans le cas de celle induite par le SV40.

d. Taux de protéases

On constate que l'activité fibrinolytique augmente dans les cellules transformées. Cette activité autoprotéolytique

pourrait expliquer les changements morphologiques liés à la transformation. Le traitement de cellules saines par la trypsine provoque la formation intracytoplasmique de réseaux d'actine voisins de ceux observés dans les cellules transformées. Cette même activité protéolytique pourrait expliquer l'augmentation du taux de prélèvement de certains nutriments.

e. Le cytosquelette

La tumorigénicité des cellules transformées diminue lorsqu'on stimule leur différenciation. Leur dépendance vis à vis de la fixation au substrat augmente alors, parallèlement à leur taux de fibres de tension (Stress-fibres). La transformation réduit le nombre et l'épaisseur des fibres de tension, ainsi que l'association des microfilaments à la membrane virale.

Les fibroblastes de poulet, transformés par le virus du sarcome de ROUS contiennent le produit du gène src, une phosphoprotéine de 60 K, possédant une activité protéine kinase.

Cette activité tyrosine-kinase, phosphorylerait une protéine du cytosquelette : la vinculine (NIGG et al., 1982).

Ces faits sont à rapprocher de l'activité protéine kinase présente dans l'Ag moyen T du polyome.

C. Paramètres de la transformation

a. Notion de permissivité

Le SV40 comme le polyome ne provoquent pas de tumeurs chez leurs hôtes normaux, puisqu'ils y induisent un cycle lytique.

- Transformation d'une cellule permissive
par un virus défectif

Une cellule de singe peut être transformée par le SV40, alors qu'elle lui est normalement permissive. Cette cellule transformée présente l'Ag T de SV40 et son ADN mais ni protéines tardives ni particules virales, même lors de sa fusion avec une cellule non infectée permissive. En revanche, elle produit des particules virales, lors d'une nouvelle infection par le SV40.

Cette cellule contient 1 à 2 équivalents génome de SV40, intégré à l'ADN cellulaire, mais ne complète pas la réplication du mutant ts A de SV40 à

Tableau 6. Répertoire des caractères liés à la transformation

Après transformation, la croissance des cellules en culture devient désorganisée avec amoncellement des cellules en multicouches.

Une cellule transformée présente toujours un certain nombre de caractères la différenciant d'une cellule saine, mais rarement l'ensemble des caractères connus pour tous les types de cellules transformées.

a) Caractères liés à la transformation cellulaire

- . haute densité de population cellulaire
- . réduction du besoin en serum
- . croissance plus ou moins indépendante de la fixation au support
- . induction de tumeurs lors de l'injection de cellules transformées à des animaux sensibles
- . insensibilité à l'inhibition de contact
- . croissance désorganisée
- . chevauchement de cellules et croissance possible sur une première couche de cellules

b) Caractères liés à la surface cellulaire

- . accroissement de l'agglutination par les lectines de plantes
- . changement de la composition en glycoprotéines et en glycolipides
- . perte de "jonctions serrées" (tight-junctions)
- . présence d'antigènes foetaux
- . présence d'antigènes viraux de transplantation
- . propriétés de coloration différentes de celles des cellules saines
- . accroissement du taux de transport des nutriments
- . augmentation de la sécrétion des protéases

c) Caractères intracellulaires

- . changements des quantités de nucléotides cycliques
- . modification du cytosquelette

d) Caractères spécifiques du virus

- . antigènes viraux détectables
- . séquences d'ADN viral présentes
- . ARN messagers viraux détectés
- . induction de production virale dans certains cas

température non-permissive. Cette cellule a en fait été transformée par un mutant déficient dans sa fonction de répllication (GLUZMAN et al., 1977).

Il existe d'autres possibilités de transformation de cellules permissives telles que :

- transformation de cellules résistantes à la libération de l'ADN viral, dans lesquelles on isole des mutants hôte-dépendants capables de transformer ce même type de cellules (WILSON, 1977).

- transformation de clones de cellules de singe par un virus SV40 type sauvage, capables de produire des particules virales lors de leur fusion à d'autres cellules permissives.

- Transformation d'une cellule non permissive

Dans un tel contexte, le virus produit un cycle abortif, qui consiste en l'expression des gènes précoces sans réplication de l'ADN viral, ni production de protéines tardives.

Les cellules murines 3T3 ne sont pas permissives au SV40. Néanmoins, après infection, elles portent les antigènes spécifiques du SV40 à la surface de leur membrane. De plus, à haute multiplicité d'infection, ces mêmes cellules, quiescentes, répliquent leur ADN et font une ou plusieurs mitoses. Seules les protéines précoces de SV40 sont synthétisées dans ces cellules transformées (SMITH et al., 1971).

- b. Multiplicité d'infection

La transformation est un processus peu efficace. Sa fréquence varie de 10^{-4} à 10^{-2} par unité d'infection.

En effet on obtient 40 % de transformation des cellules 3T3 par SV40 (TODARO & GREEN, 1966) à haute multiplicité d'infection contre 5 % pour des cellules de hamster (BHK 21).

Ces résultats sont obtenus sur des clones cellulaires fraîchement isolés, ce qui écarte l'éventualité d'une hétérogénéité de comportement des cellules au sein d'une même culture (Mc PHERSON & STOCKER, 1962).

- c. Etat physiologique de la cellule

Il n'y a pas de relation évidente entre l'état physiologique de la cellule et le taux de transformation. Néanmoins, les cellules en phase exponentielle de croissance sont plus facilement transformées. D'autre part, le taux de transformation des cellules de hamster (BHK) est fonction du pH et de la concentration en ions magnésium.

Si l'état physiologique de la cellule au moment de la transformation n'influe pas directement sur le taux de transformation, il peut cependant modifier le phénotype de la cellule transformée (SEIF & CUZIN, 1977).

d. Transformation abortive de cellules permissives

Pour une cellule transformée définitivement, 10 à 100 cellules montrent transitoirement un phénotype transformé. La durée de cette transformation abortive coïncide avec celle de la synthèse de l'Ag T dans une cellule infectée (GRAESSMAN & GRAESSMAN, 1976).

Il est donc nécessaire d'obtenir au moins une division cellulaire après la transformation, de manière à fixer l'état transformé.

e. Double transformation cellulaire

Une cellule transformée par SV40 peut l'être ensuite par le polyome ou l'adénovirus, et réciproquement. La cellule contient alors les antigènes des virus co-transformants. Par exemple, des cellules de hamster transformées par des hybrides défectifs d'adénovirus de type 7 et de SV40, contiennent des antigènes de SV40 et d'adénovirus 7 (RAPP et al., 1966).

2.3.2.4. Transformation par les ADENOVIRIDAE

a. Introduction

Le pouvoir oncogène des adénovirus a été initialement mis en évidence chez le hamster nouveau-né (HUEBNER et al., 1962). Des études plus récentes ont montré l'absence de séquences génomiques d'adénovirus dans les tissus cancéreux humains (MACKEY et al., 1976 ; GREEN et al., 1979c).

Bien que largement répandus dans l'espèce humaine et dotés d'un pouvoir oncogène potentiel, les adénovirus ne semblent pas impliqués dans la cancérogénèse humaine. Ce modèle est donc particulièrement approprié à l'étude de la cancérogénèse virale.

D'autre part les adénovirus induisent la transformation, c'est à dire un changement des propriétés de morphologie et de croissance des cellules en culture.

Parmi les 41 sérotypes d'adénovirus humains actuellement caractérisés et classés en 7 sous-groupes, on peut distinguer 3 catégories de virions en

fonction de leur pouvoir oncogène "in vivo" :

- . les adénovirus hautement oncogènes appartenant au sous-groupe A et induisant un taux élevé de tumeurs chez le hamster nouveau-né en moins de 4 mois.

- . les adénovirus faiblement oncogènes appartenant au sous-groupe B et n'induisant que relativement peu de tumeurs chez le hamster nouveau-né dans une période de 4 à 18 mois.

- . les adénovirus, n'induisant pas de tumeurs chez le hamster nouveau-né, des sous-groupes C, D, E, F, G. (Tableau 2)

A la différence du pouvoir oncogène, la transformation des cellules en culture, est un comportement présenté par l'ensemble des sérotypes.

La famille des ADENOVIRIDAE constitue un ensemble homogène de virus, quant à leur organisation structurale et fonctionnelle. Cette communauté est bien conservée notamment dans l'extrémité gauche du génome, indispensable à la transformation cellulaire.

b. Les étapes de la transformation

Les cellules en culture primaire ont une durée de vie limitée. Après un petit nombre de divisions, ces cellules passent par des phases critiques, dont peu survivent.

Les cellules survivantes ont alors acquis le pouvoir de se diviser de façon illimitée. On les nomme cellules en lignée établie ou cellules immortalisées.

Les virus oncogènes ont la capacité d'induire l'immortalisation des cellules de culture primaire (BLACK & ROWE, 1963).

PETIT et al. (1983) montrent que pour le SV40 ce phénomène est réversible et nécessite l'expression continue de certains gènes viraux. Une cellule immortalisée par un mutant thermosensible du gène A de SV40, redeviendra sénescence à température non-permissive. Les gènes de l'antigène grand T du polyome ou de SV40, tout comme la zone E1A d'adénovirus, induisent l'immortalisation sans entraîner la transformation des cellules.

La transformation est donc une immortalisation suivie de l'apparition de caractères particuliers, tels que la croissance indépendante de la fixation au substrat, ou encore la capacité d'induire une tumeur chez un animal syngénique. Les gènes viraux responsables de la transformation proprement

dite, différent des gènes induisant une simple immortalisation. Ce sont notamment ceux de l'antigène moyen T de polyome, de la zone E1B d'adénovirus, ou encore le gène cellulaire T24 HARVEY ras 1 (SHIH & WEINBERG, 1982 ; TRIESMAN et al., 1982).

Ces derniers gènes ne sont pas capables, isolément, d'induire la transformation. Ils doivent pour cela agir conjointement avec d'autres gènes permettant l'immortalisation des cellules.

Par exemple les gènes de l'antigène moyen T de polyome ou de T24 HARVEY ras 1, ne peuvent pas transformer une cellule de culture primaire. Il n'y aura transformation que si ces gènes agissent sur une cellule de lignée établie (donc immortalisée), ou en coordination avec la zone E1A d'adénovirus, qui permet l'immortalisation (RULEY, 1983).

c. Nature de la région transformante d'adénovirus

La région transformante de l'adénovirus a été localisée dans les 12 % de l'extrémité gauche du génome, par 2 types de techniques :

- d'une part par la transformation de cellules par des fragments de restriction, des sérotypes 2 et 5 du sous-groupe C (GRAHAM et al., 1974 ; van der EB et al., 1977), du sérotype 12 du sous-groupe A (SHIROKI et al., 1977) et du sérotype 7 du sous-groupe B (DIJKEMA et al., 1979 ; SEKIKAWA et al., 1978.)

- d'autre part par l'analyse de la nature des ARNm viraux produits dans des cellules transformées par l'adénovirus (FLINT et al., 1976 ; GREEN et al., 1981 ; YOSHIDA & FUJINAGA, 1980).

La comparaison des régions transformantes des adénovirus des sous-groupes A, B et C révèle une étroite unité d'organisation entre ces sérotypes.

L'étude de mutants défectifs dans la fonction de transformation a mis en évidence 2 groupes de complémentation, l'un dans la zone E1A (hrI), l'autre dans la zone E1B (hrII) (HARRISSON et al., 1977 ; SOLNICK & ANDERSON, 1982).

L'existence d'un mutant hôte dépendant (Ad5 hr 440) défectif dans l'expression de E1A, mais dont la zone E1B s'exprime normalement, ne pouvant transformer les cellules de culture primaire de rat, prouve que la zone E1A n'intervient pas seulement comme un simple activateur de E1B. HOUWELING et al. (1980) montrent que la zone E1A est capable d'immortaliser des cellules de

rat en culture primaire. Plusieurs études récentes ont permis de préciser la nature des fonctions remplies par les zones E1A et E1B dans la transformation.

Contrairement au gène de l'antigène moyen T du polyome, son homologue fonctionnel dans la transformation par l'adénovirus, la zone E1B est incapable de transformer des cellule de lignée continue en l'absence de la zone E1A.

En effet la zone E1A inactiverait une fonction cellulaire, empêchant l'expression de E1B (NEVINS, 1981). Cette hypothèse est actuellement remise en cause (GAYNOR et al., 1984).

Afin de montrer que l'absence d'effet transformant de la zone E1B seule sur les cellules n'est pas due à un manque d'activation de cette zone par E1A, van den ELSEN et al. (1983,a) lui adjoignent le promoteur précoce de SV40. Dans ces conditions la zone E1B s'exprime normalement mais n'induit pas davantage une transformation des cellules de culture primaire.

BOS et al. (1983) contruisent des plasmides d'adénovirus 12 délétés dans les régions des messagers 13 S et 12 S de la zone E1A et observent leurs effets sur le pouvoir oncogène. Ces délétions occasionnent une perte totale de l'activité transformante, même dans le cas d'une simple altération du messager 13 S, ce qui empêche la pleine expression de la zone E1B.

van den ELSEN et al. (1983,b) utilisent la différence d'oncogénicité des sérotypes 5 et 12 pour étudier le rôle respectif des zones E1A et E1B. Ils transforment des cellules de culture primaire par des plasmides hybrides contenant la zone E1A/Ad12 et la zone E1B/Ad5 ou inversement.

Ils constatent alors que la morphologie des cellules transformées est celle conférée par la nature de la zone E1A présente.

Dès 1979, SCHRIER et al., suggéraient l'importance du polypeptide 19 K de la zone E1B dans le processus de la transformation.

D'autre part, CHINNADURAI (1983) isole des mutants non transformants, délétés dans la partie N-terminale de ce polypeptide. BERNARDS et al. (1983) étudient le rôle respectif des 2 polypeptides majeurs de la zone E1B en utilisant des plasmides hybrides des sérotypes 12 et 5 dans la zone E1B. Ces plasmides chimériques contiennent donc soit la 19 K/E1B d'Ad12 en plus de la 58 K/E1B d'Ad5 soit la 15 K/E1B Ad5 en plus de la 55 K/E1B/Ad12.

Les résultats obtenus par la transformation de cellules au moyen de ces plasmides, en présence de la zone E1A, ont permis de montrer que c'est la 55 K/E1B qui détermine l'efficacité de la transformation, bien que la 19 K/E1B soit nécessaire à ce phénomène.

En conclusion on peut noter que :

- la zone E1A en dehors de son caractère activateur, est absolument indispensable à la transformation et que c'est elle qui détermine la morphologie

de la cellule transformée. Les deux protéines p289 et p243 semblent nécessaires à l'obtention d'un phénotype pleinement transformé (MONTELL et al., 1984).

- la zone E1B, par l'intervention de ses 2 polypeptides majeurs, permet l'acquisition et le maintien du phénotype transformé.

- qu'il est actuellement difficile d'établir la relation existant entre les 2 phases de la transformation.

Il faut enfin rappeler que le pouvoir oncogène, qui est la capacité d'un virus à induire une tumeur chez l'animal, dépend d'autres zones que les zones transformantes de l'adénovirus. En effet, BERNARDS et al. (1984) montrent que des recombinants des sérotypes 5 et 12, infectieux sur cellules permissives (HeLa) n'induisent pas de tumeurs chez l'animal dans les conditions habituelles.

D'autre part, le polypeptide 11K/E4 d'Ad2 semble nécessaire à l'établissement des colonies de cellules transformées (SHIROKI et al., 1984).

3. Le Cycle abortif

3.1. Introduction

Le cycle abortif est le déroulement d'une fraction plus ou moins étendue du cycle lytique, n'aboutissant ni à la transformation cellulaire, ni à la production de particules virales.

Le génome viral s'exprime normalement, jusqu'à un point d'arrêt qui peut être la maturation des messagers tardifs, la réplication de l'ADN viral, l'expression des zones précoces. Ce phénomène dépend de la nature respective du virus et de la cellule hôte.

Le système le mieux connu est celui obtenu par l'infection de certaines cellules simiennes par les adénovirus humains du sous-groupe C.

Les études menées sur ce système sont diverses :

- effet auxiliaire ("helper") du SV40 en coinfection avec l'Ad2
- obtention et caractérisation d'hybrides adénovirus-SV40
- obtention et caractérisation de mutants hôte-dépendants des sérotypes 2 et 5.

3.2. Le cycle abortif des adénovirus du groupe C dans certaines lignées cellulaires simiennes.

Les lignées cellulaires dérivées des AGMK (African Green Monkey Kidney Cell) ou des RhMK (Rhesus Monkey Kidney cell) infectées par

des adénovirus du sous-groupe C produisent une quantité de virions 100 à 1000 fois inférieure à celle obtenue par l'infection de cellules permissives à l'Ad2 et la réplication de son ADN se déroule normalement dans les CV1, on note :

- une réduction drastique de la synthèse de certaines protéines tardives, en particulier de la fibre et du polypeptide IIIa (FARBER & BAUM, 1978 ; KLESSIG & ANDERSON, 1975).

- une répartition anormale des protéines ou des complexes protéiques (100 K, complexe 100 K-hexon, hexon monomère, hexon trimère, base du penton, fibre) au sein des CV1 infectées par l'Ad2 (CEPKO & SHARP, 1983).

Les cellules de singe normalement non-permissives à l'adénovirus, permettent néanmoins un cycle lytique à ce dernier lorsque ces cellules sont infectées en présence de SV40 (RABSON et al., 1964), d'un hybride adénovirus-SV40 synthétisant l'AgT de SV40 (GRODZICKER et al., 1974) ou encore d'un mutant hôte dépendant s'exprimant dans les CV1.

Le taux des messagers de la fibre (polypeptide IV) est 10 fois plus faible dans les CV1 qu'il ne l'est dans les cellules permissives. La réduction du taux de polypeptide IV par rapport à ces mêmes cellules est de 100 fois (KLESSIG & ANDERSON, 1975). Il n'y a donc pas de relation directe entre la chute des taux d'ARNm, et du polypeptide de la fibre.

Selon ZORN et ANDERSON (1981) un hybride cellulaire issu de l'union d'un noyau de cellule HeLa infectée et d'un cytoplasme de CV1 non infecté, synthétise la fibre. Par contre l'hybride constitué d'un noyau de CV1 infectée et d'un cytoplasme de HeLa non infectée, ne produit pas de fibre. Ces auteurs en déduisent que l'absence de synthèse de fibre dans les CV1 n'est pas due à la présence d'un inhibiteur de la traduction de son messenger, mais à l'absence dans le cytoplasme, d'un messenger correctement mûré. KLESSIG et CHOW (1980) montrent que la maturation de 15 % des messagers de la fibre est anormale, dans les CV1. En effet, dans ces ARNm, la partie codante est reliée au promoteur majeur tardif par une séquence normalement absente.

Pourtant les messagers d'Ad2 produit dans les CV1, conviennent parfaitement à la traduction "in vitro" (ERON et al., 1975).

D'autre part les ARNm de la fibre cosédimentent avec les polyribosomes des cellules non permissives (ANDERSON & KLESSIG, 1983).

Enfin, la microinjection des messagers de la fibre, extraits de cellules humaines, au sein du cytoplasme de CV1, permet la synthèse de la fibre. Les ribosomes reconnaissent donc ces messagers produits dans les CV1 (RICHARDSON & ANDERSON, 1984).

De tous les ARNm tardifs, -transcrits à partir du "leader tripartite", seul

celui de la fibre possède des séquences "leader" supplémentaires, dénommées "x", "y", "z". ANDERSON et KLESSIG (1984) montrent que comparativement à leur taux dans les cellules permissives, les messagers de la fibre portant les séquences "leaders" "x" ou "y" sont rares dans les CV1 infectées par l'Ad2.

L'Ad2 ND5 produit des messagers sans "x" ou "y" dans les CV1. En coinfection avec le SV40 il produit le leader "x" mais pas le leader "y", tout en produisant la fibre. Le leader "y" n'est donc pas indispensable, mais renforce l'efficacité de la traduction du messenger de la fibre. Par contre, l'absence de "x", fait chuter profondément le taux de fibre.

La présence des leaders "x" et "y" semble donc nécessaire à l'efficacité de la traduction "in vivo", puisque les messagers extraits de CV1 infectées par Ad2 sont traduits correctement "in vitro".

La partie N-terminale de la 72 K/E2A des mutants hr d'Ad2, ainsi que l'extrémité C-terminale de l'AgT de SV40, rendent permissives les CV1 à l'Ad2. Leur rôle encore inconnu, est probablement impliqué dans la maturation de certains messagers tardifs d'adénovirus.

3.3. Les hybrides adénovirus-SV40

3.3.1. Introduction

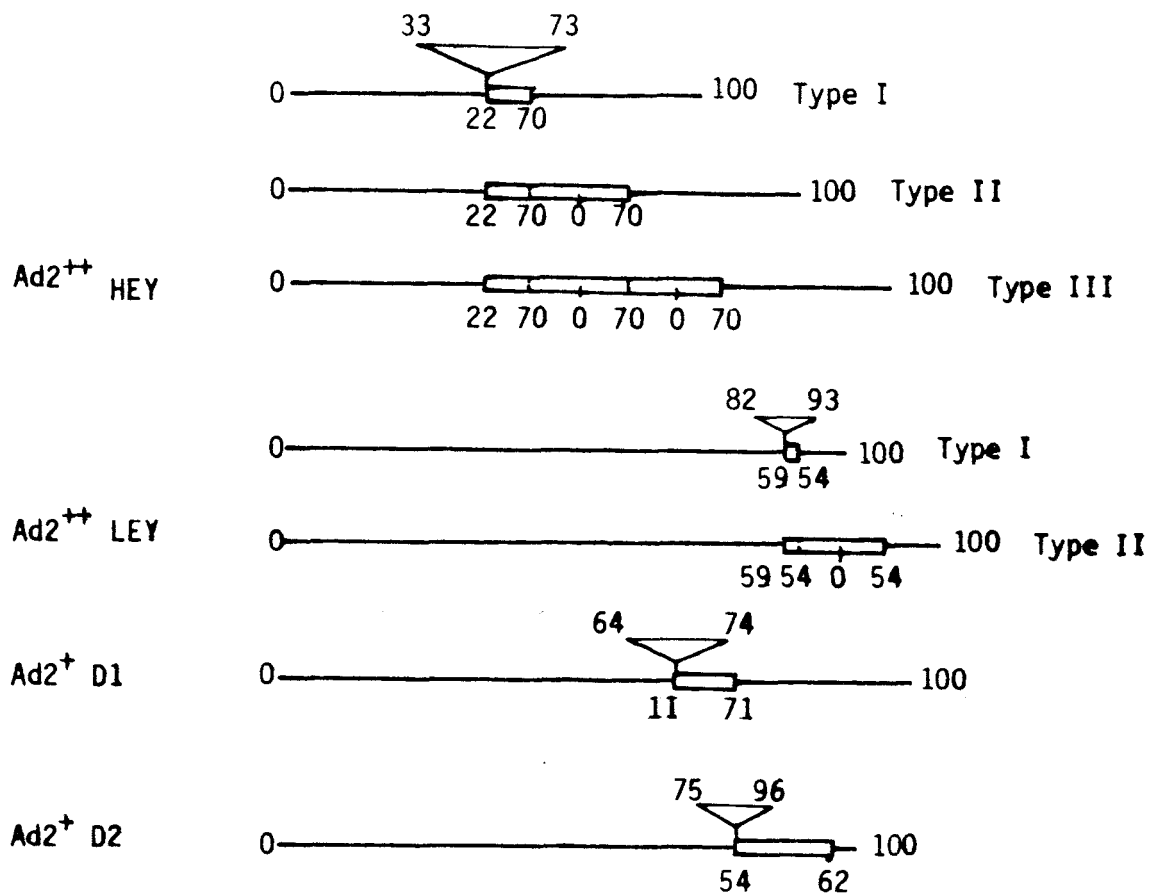
Ce sont des recombinants dans lesquels la majeure partie du génome d'adénovirus est attachée à tout ou partie du génome de SV40, et est inclus dans la capsid de l'adénovirus.

Ils furent isolés de stocks d'adénovirus 1, 2, 5 et 7, adaptés sur des cellules de singe (RhMK) (HARTLEY et al., 1956). HUEBNER et al. (1964) montrent que ces hybrides contiennent du matériel génétique de SV40 et d'adénovirus. Le segment de SV40 fournit la fonction auxiliaire (helper) nécessaire à l'expression de l'adénovirus dans les cellules de singe. Ces 2 virus n'ont pas d'homologie de séquence. Les hybrides sont donc issus de recombinaisons génétiques illégitimes.

3.3.2. Les hybrides défectifs

3.3.2.1. L'hybride d'adénovirus 7 et de SV40

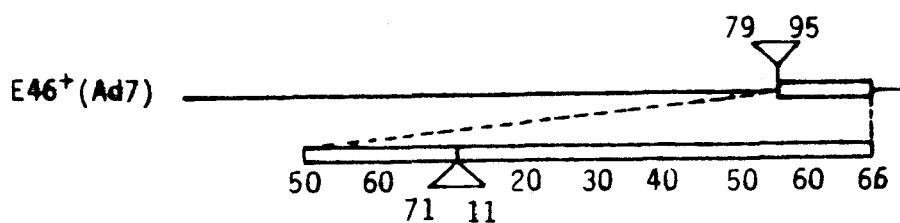
C'est le premier hybride découvert, au sein d'une culture de cellules de singe infectées par de l'Ad7, contaminée par le SV40.



STRUCTURE DU GÉNOME DES HYBRIDES ADENOVIRUS-SV40 DEFECTIFS

- Trait double : insertion de SV40
- Le triangle : délétion d'Ad2

FIGURE 9.



STRUCTURE DU GÉNOME DE L'HYBRIDE AD7-SV40

- Trait double : insertion de SV40
- Triangle : délétion de l'Ad2

FIGURE 10

Cette souche virale présente les caractéristiques suivantes :

- elle croît dans les cellules de singe, non permissives aux adénovirus.
- elle induit des tumeurs voisines de celles provoquées par le SV40 chez le hamster. Cette oncogénicité est inhibée par un sérum anti-adénovirus 7.
- Elle ne produit ni protéine tardive, ni particule virale de SV40.

Elle fût nommée PARA-Ad7 (particule aiding the replication of adenovirus) E_{46}^+ . C'est en fait un mélange d'Ad7 de type sauvage (wt) et d'un hybride défectif Ad7-SV40 (ROWE & BAUM, 1964). Dans les cellules de singe, les 2 types de particules se répliquent alors que dans les cellules humaines seul l'Ad7 se réplique. L'hybride Ad7-SV40 comprend 75 % du génome du SV40 et 84 % de celui d'Ad7 (Figure 9).

3.3.2.2. Les hybrides de SV40 et adénovirus 2 défectifs

Cette souche ($Ad2^{++}$) fût isolée à partir d'une culture d'Ad2 sur des cellules de singe (RhMK) (HARTLEY et al., 1956). Elle contient des virions de SV40, d'Ad2 et d'hybrides Ad2-SV40. Deux populations génétiquement stables furent isolées de cette lignée :

- HEY (high efficiency yielder)
- LEY (low efficiency yielder)

Ces populations sont un mélange d'Ad2, d'hybrides et d'une faible proportion de SV40.

HEY contient 3 hybrides (I, II, III) qui diffèrent par l'importance de la séquence de SV40 intégrée au génome de l'Ad2 wt. Celle-ci va de 0,4 à 2,4 génomes de SV40 insérés en tandem.

LEY ne contient que 2 hybrides contenant soit 0,04 soit 1,04 génomes de SV40.

Ces hybrides sont défectifs.

LEY n'exprime que la phase précoce du SV40, alors que HEY exprime les phases précoce et tardive.

3.3.2.2. Les hybrides défectifs $Ad2^+$ D1 et $Ad2^+$ D2

HASSELET LUKANIDIN (1978) isolent ces 2 hybrides défectifs de la population HEY. Leur stock contient nécessairement l'Ad2 wt comme "helper", mais ne renferme pas de SV40.

$Ad2^+$ D1 contient la région précoce de SV40 comme HEY. Il exprime certaines fonctions du SV40.

- production d'Antigènes petit t et grand T.

- les ARNm précoces de SV40 sont produits précocement et tardivement dans les CV1.

Ad2⁺ D2 n'a pas de séquence de SV40 transcrite précocement, car elle est sous contrôle du promoteur majeur tardif de l'Ad2.

La jonction de l'insertion de SV40 avec l'Ad2 sur la gauche se fait dans le gène de la 100 K.

Les cellules infectées par l'Ad2⁺ D2 contiennent une protéine de 115K apparentée à l'AgT :

- elle se lie spécifiquement à une séquence du génome de SV40, près de l'origine de réplication

- elle induit la réplication de l'ADN cellulaire

- microinjectée dans une cellule de singe infectée par l'Ad2 wt, elle augmente la synthèse de la fibre, et la production virale (Figure 10).

3.3.2.3. Les hybrides non défectifs

a. Structure génomique

Une famille d'hybrides non défectifs dérive du stock Ad2⁺⁺. Ce nouveau stock (B55) se développe aussi bien dans les cellules AGMK que dans les cellules humaines ; la croissance virale se déroule selon une cinétique d'ordre 1, ce qui indique l'absence d'un auxiliaire (helper) dans le stock (LEWIS et al., 1969).

Ce stock (B55) produit l'AgT de SV40 dans les cellules infectées.

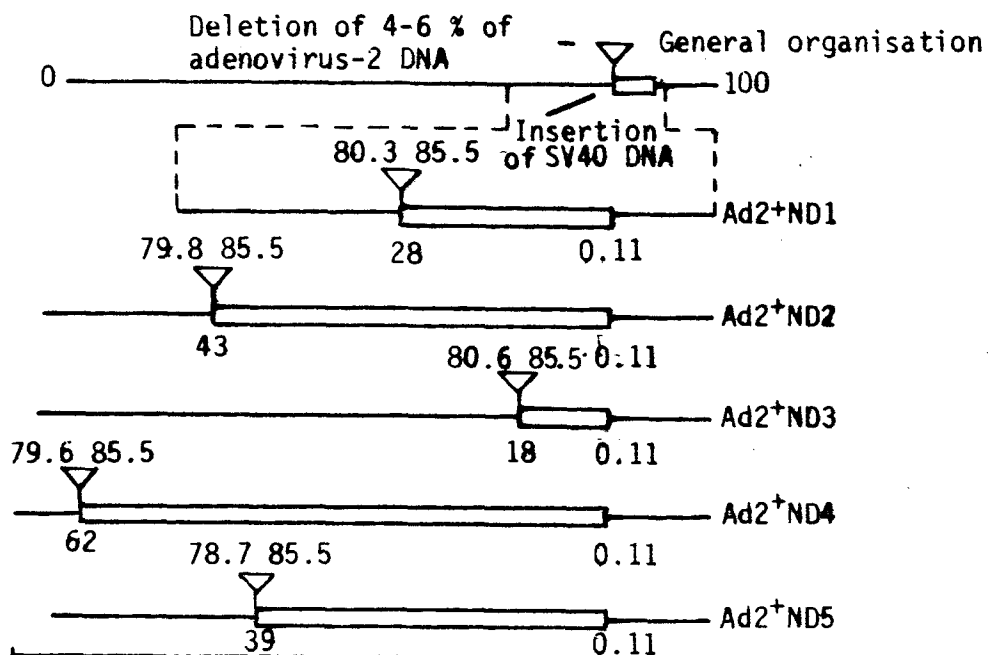
5 Hybrides en furent isolés, possédant en commun

. le point de fin de la délétion sur le génome Ad2

. le point de début de l'insertion de SV40

Les caractéristiques des délétions et des inserts figurent dans le tableau suivant et dans la figure 11.

	délétion de l'Ad2	de	Insertion de SV40	Production d'Ag de SV40
Ad2 ND1	80,3 - 85,5		0,11 - 0,28	Ag U
Ad2 ND2	79,8 - 85,5		0,11 - 0,43	Ag U
Ad2 ND3	80,6 - 85,5		0,11 - 0,18	Néant
Ad2 ND4	79,6 - 85,5		0,11 - 0,62	AgTSTA
Ad2 ND5	78,7 - 85,5		0,11 - 0,39	Néant



STRUCTURE DU GENOME DES HYBRIDES ADENOVIRUS 2-
SV40 NON DEFECTIFS :

- Le trait double indique l'insertion de SV40
- Le triangle indique la délétion correspondante de l'adénovirus 2

FIGURE 10

Seuls l'Ad2 ND1 et l'Ad2 ND2 poussent dans les cellules CV1 alors que tous les hybrides croissent normalement dans les cellules humaines. Les mutants hr 600 à 603 d'Ad2 ND3 poussent 100 fois plus que l'Ad2ND3 dans les CV1 (ANDERSON, 1981).

Ces 4 Mutants possèdent la même substitution, dans la partie N-terminale de la 72 K/E2A d'Ad2 (ANDERSON & KLESSIG, 1983) tout comme les mutants hr de l'Ad2.

L'Ad2ND4 ne croit pas dans les CV1. En fait, c'est à l'association de l'Ad2 ND4, et d'un mutant de délétion Ad2ND4 del qu'est permissive la cellule CV1 (LEWIS & WESTPHAL, 1983). L'Ad2ND4 del voit la jonction gauche de l'insertion et de l'Ad2 se modifier : l'insertion de SV40 devient plus courte.

Il est probable que cette délétion élimine les sites d'épissage du messager de l'Antigène T de SV40, qui se trouvent situés, dans l'Ad2 ND1, entre la séquence "leader" et la région codante de l'ARNm de la fibre.

Cette délétion permettrait donc une maturation normale des messagers de la fibre, en présence de l'effet auxiliaire (helper) dû au fragment C-terminal de l'AgT de SV40, porté par l'Ad2 ND4.

b. Transcription et traduction

Plus l'insertion de SV40 dans le génome d'Ad2 est grande, plus la transcription en est intense, et plus ses ARNm ressemblent à ceux du SV40.

Seule la zone précoce de SV40 est transcrite. En effet, le codon de fin de transcription de la zone précoce est situé à 0,17 UG c'est-à-dire dans l'insertion, empêchant toute transcription d'ARNm "anti-tardifs".

Les messagers ont une extrémité 5' commune, mais sont de longueur variable (FLINT et al., 1975 ; KHOURY et al., 1973).

Les messagers de la zone insérée et de la zone environnante sont des molécules hybrides d'Ad2 et de SV40. En effet, les messagers de cette zone d'Ad2 ND4 sont hybridables à l'ADN d'Ad2 et à l'ADN de SV40 (hybridation "sandwich") (DUNN & HASSEL, 1977). Enfin, les transcrits de la zone de contact entre l'Ad2 et son insertion de SV40, codent dans l'Ad2ND1 et l'Ad2ND4, respectivement, pour des protéines de 30 K et 96 K, que ces messagers soient sélectionnés à partir d'ADN d'Ad2 ou de SV40. A l'exception de l'Ad2ND3, tous les hybrides non défectifs synthétisent une ou plusieurs protéine(s) spécifique(s) du SV40. La taille de cette protéine est proportionnelle à celle de l'insertion. L'Ad2ND1 produit une 30 K, tandis que l'Ad2 ND4 synthétise 4 protéines de 60 K, 64 K, 74 K, et 96 K.

On peut constater une relation entre la dimension de l'insert de SV40, et la fonction remplie par la protéine de cet hybride (dans l'ordre croissant de taille : AgU, fonction "helper", AgTSTA, AgT). L'Ad2 ND5 code pour une protéine de 42 K, qui contient des peptides communs aux autres protéines hybrides. Pourtant elle ne remplit pas la fonction "helper". En fait, elle est très instable et rapidement dégradée (DEPPERT et al., 1977). Toutes les protéines spécifiques de SV40, issues d'un hybride Ad2-SV40, présentent des peptides communs (MANN et al., 1977). D'autre part la majeure partie des peptides tryptiques de la protéine hybride de l'Ad2 ND4 est commune à ceux de l'AgT de SV40.

c. La fonction auxiliaire ("helper")

GRODZICKER et al. (1974, 1976) isolent des mutants hôte-dépendants d'Ad2 ND1, ne se multipliant que sur les cellules humaines. Ces mutants sont défectifs dans la synthèse des protéines tardives sur CV1, comme l'Ad2 wt.

Ce sont des mutants "non-sens" qui ne synthétisent plus le peptide de 30 K, mais un peptide plus court. Ce polypeptide de 30 K est donc nécessaire à la fonction "helper". Des révertants sont obtenus en infectant à grande multiplicité des cellules de singe par le mutant "non-sens".

On distingue 2 catégories de révertants :

- . ceux portant une délétion de 50 à 400 paires de bases dans "l'insert" de SV40. Ils possèdent une protéine hybride plus courte que la 30 K.

Le révertant ayant l'insert le plus faible (0,11 à 0,22 UG) ne synthétise plus qu'un polypeptide de 18 K.

- . Ceux qui possèdent une duplication partielle.

Ils portent la duplication de la région proximale de la fibre et de la région distale de "l'insert" de SV40. Ils synthétisent un polypeptide de 10 K, reliquat du polypeptide 30 K, accompagné d'une nouvelle protéine de 58 K pour l'Ad2 ND1 dp1 et de 23 K pour l'Ad2 ND1 dp2. Cette nouvelle protéine de 23 K contient des peptides codés par le gène de la fibre, et d'autres codés par l'insert de SV40 (FEY et al., 1979).

Cette 23 K, tout comme la 115 K d'Ad2⁺ D2, micro-injectée dans une cellule CV1 infectée par l'Ad2 wt provoque l'accroissement de la production virale.

La fonction "helper" est donc portée par une grande variété de protéines, qui n'ont en commun que la partie C-terminale de l'AgT de SV40.

3.4. Autres cas de cycle abortif

Les cellules de hamster (BHK 21) sont semi-permissives à l'Ad2 wt, c'est-à-dire que leur production virale est de l'ordre de 5 % de celle obtenue sur les cellules HeLa. En revanche, l'infection de BHK par l'Ad3 wt est abortive, puisque seules les zones précoces s'expriment. La raison de l'absence de réplication de l'ADN viral est inconnue, l'expression des zones précoces semblant normale (GROFF & DANIELL, 1981).

Les lignées de cellules embryonnaires de carcinome murin sont semi-permissives à l'adénovirus de type 5 alors qu'une lignée de cellules différenciées de ce même carcinome ne permet qu'un cycle abortif.

L'expression des gènes précoces et la réplication sont réalisées au cours de ce cycle abortif. Par contre le taux des messagers tardifs est de 10 à 15 fois inférieur à celui obtenu dans les cellules HeLa, et la quantité de protéines diminuée de 200 fois.

Pourtant l'addition d'acide rétinoïque sur les cellules embryonnaires de carcinome murin, provoque en même temps que la différenciation de ces cellules semi-permissives l'augmentation de la production virale (CHENG & PRASZKIER, 1982).

L'infection de cellules Hela par l'adénovirus murin FI produit 2000 fois moins de virus que l'infection témoin de cellules murines 3T3.

Cette réduction drastique de la production virale est due à un abaissement du taux de synthèse de certaines protéines virales telles que l'hexon (ANTOINE et al., 1982). Les cellules de reins de souris (Balb C) sensibles à l'adénovirus FI, voient leur production se restreindre si elles sont auparavant transformées par l'adénovirus simien SA7. Cette transformation des cellules Balb C se traduit par une augmentation de la durée du cycle de l'adénovirus FI et par une forte réduction de sa production (DUSSAIX et al., 1982).

T R A V A U X P E R S O N N E L S

A. INTRODUCTION

Des travaux antérieurs portant sur l'étude d'un système d'obtention de mutants de délétion de l'Ad2 ND1, sont à la base de ce travail. Ce système consistait en la transfection de cellules simiennes par le génome d'Ad2ND1 portant la délétion voulue, suivie de l'infection de ces mêmes cellules par l'Ad3, ayant fonction d'auxiliaire. L'Ad3 n'accomplissant pas un cycle lytique dans les CV1, il devait être théoriquement possible d'obtenir une progéniture virale composée uniquement des mutants de délétion. Tel ne fut pas le cas. Ceci nous a conduit à étudier (1) d'une part les relations existant entre certains adénovirus et les cellules simiennes, (2) d'autre part à caractériser les interactions entre les adénovirus coinfectant une même cellule.

B. PERMISSIVITE DES CELLULES DE SINGE ET DE HAMSTER AUX DIFFERENTS SEROTYPES D'ADENOVIRUS HUMAIN

1. Production virale dans les cellules CV1 et BHK 21

Nous avons testé la capacité des cellules CV1 et BHK 21 à produire des particules virales de sérotypes 3, 4, 7, 9 et 31. Les cellules furent infectées à des multiplicités d'infection encadrant la valeur optimale déterminée dans les cellules permissives (HeLa) pour chaque sérotype : (Ad3 : 10 pfu ; Ad4 : 20 pfu ; Ad7 : 10 pfu ; Ad9 : 60 pfu ; Ad31 : 10 pfu). Des cellules non infectées ou infectées par l'Ad2 constituaient les témoins. Les cellules furent lysées dans un tampon hypotonique, 40 h post-infection. Ce lysat servit de base aux dilutions réalisées en vue des titrages de la production virale (en immunofluorescence) sur des cellules permissives. Aucune production virale ne fut mise en évidence ni dans les CV1 ni dans les BHK 21. Il fut donc nécessaire de rechercher le niveau auquel se situait le blocage de l'expression des adénovirus dans les CV1 et les BHK 21.

2. Absence de production de protéines tardives des sérotypes 3, 4, 7, 9 et 12 dans les CV1 et BHK 21

Les cellules infectées furent marquées par la méthionine ^{35}S , 20 heures post-infection (pi) et pour une durée de 4 heures. Elles furent alors lysées par un traitement aux ultrasons, puis déposées sur un gel PAGE-SDS.

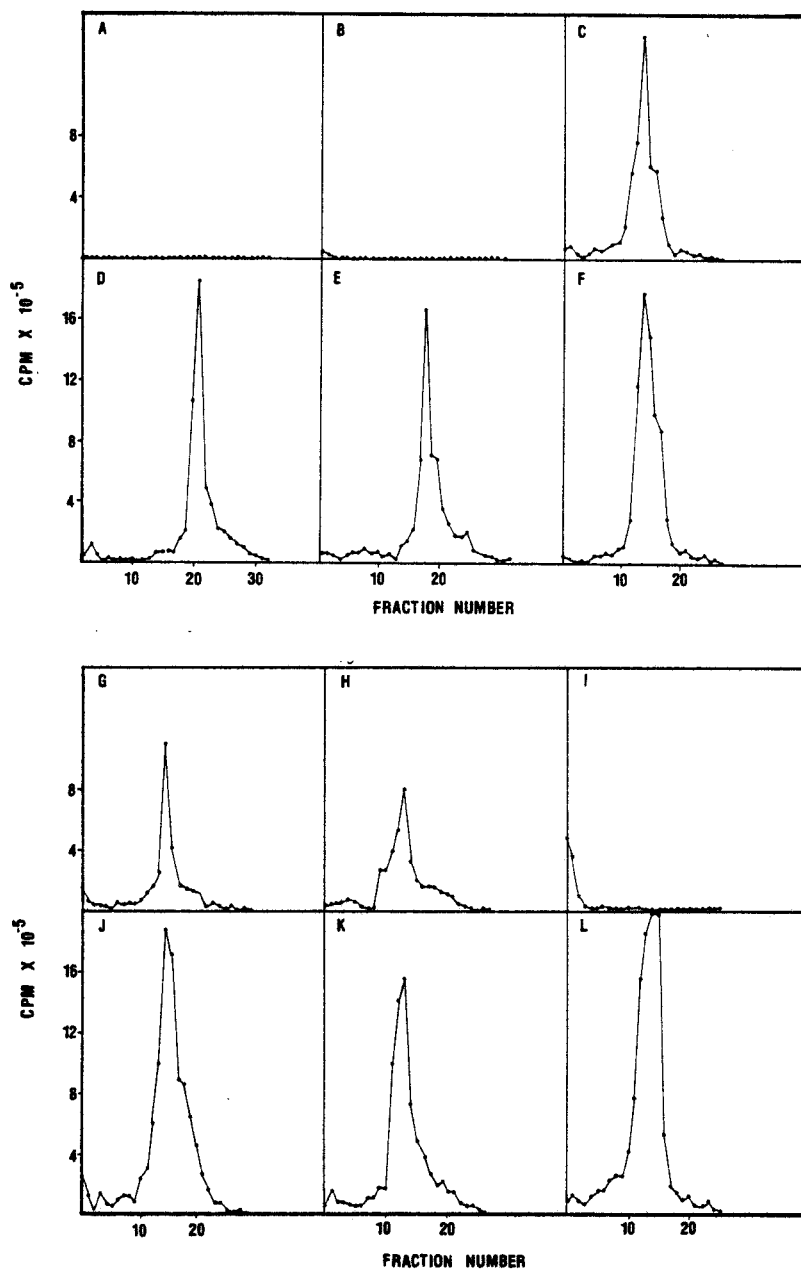


Fig. 1. Adenovirus DNA synthesis in HeLa and CV1 cells. HeLa or CV1 cells were infected with 5–50 ffu/cell of different adenovirus serotypes, labelled with [3 H]thymidine from 16 to 24 h after infection and 34 S viral DNA analyzed in alkaline sucrose gradient. A, Ad3/CV1; B, Ad31/CV1; C, Ad2/CV1; D, Ad3/HeLa; E, Ad31/HeLa; F, Ad2/HeLa; G, Ad4/CV1; H, Ad9/CV1; I, mock CV1; J, Ad4/HeLa; K, Ad9/HeLa; L, Ad2ND1/CV1. Note that the rate of DNA synthesis was similar in HeLa cells for Ad3, Ad31 and Ad2, but that there was no detectable Ad3 and Ad31 DNA synthesis in CV1 cells. The direction of sedimentation is from right to left.

SYNTHÈSE D'ADN VIRAL DANS LES CELLULES
DE SINGES CV1 ET HUMAINES HeLa.

Les résultats indiquent que l'Ad3 ne synthétise pas de polypeptides dans les CV1 (Figure 5 : pistes l et m - article). Les sérotypes 3, 4, 7, 9 et 12 ne produisent pas de polypeptides tardifs ni dans les CV1 ni dans les BHK 21. Le blocage de l'expression des adénovirus dans ces 2 lignées cellulaires intervient donc au stade de la traduction ou antérieurement.

3. Synthèse d'ADN viral dans le système simien

Dans le but de mesurer le taux de réplication de l'ADN viral, des cellules simiennes furent marquées par la thymidine tritiée de la 16e à la 20e heure pi. Leur contenu en ADN viral fut dosé par la méthode des gradients de saccharose alcalin.

Nous avons pu ainsi montrer que les sérotypes des sous-groupes A à E s'ordonnent en 2 classes :

- . Les sérotypes 4 et 9 ont un taux de réplication identique dans les CV1 et les HeLa (Figure 7 : G, J ; H, K)

- . Les sérotypes 3, 31 (Figure 7 : A, D ; B, E) et 7 ne répliquent pas leur génome dans les CV1.

Il est donc probable que l'absence de production de protéines tardives des Ad4 et 9 est due à une altération de la maturation des messagers tardifs de ces sérotypes, mécanisme démontré pour l'Ad2.

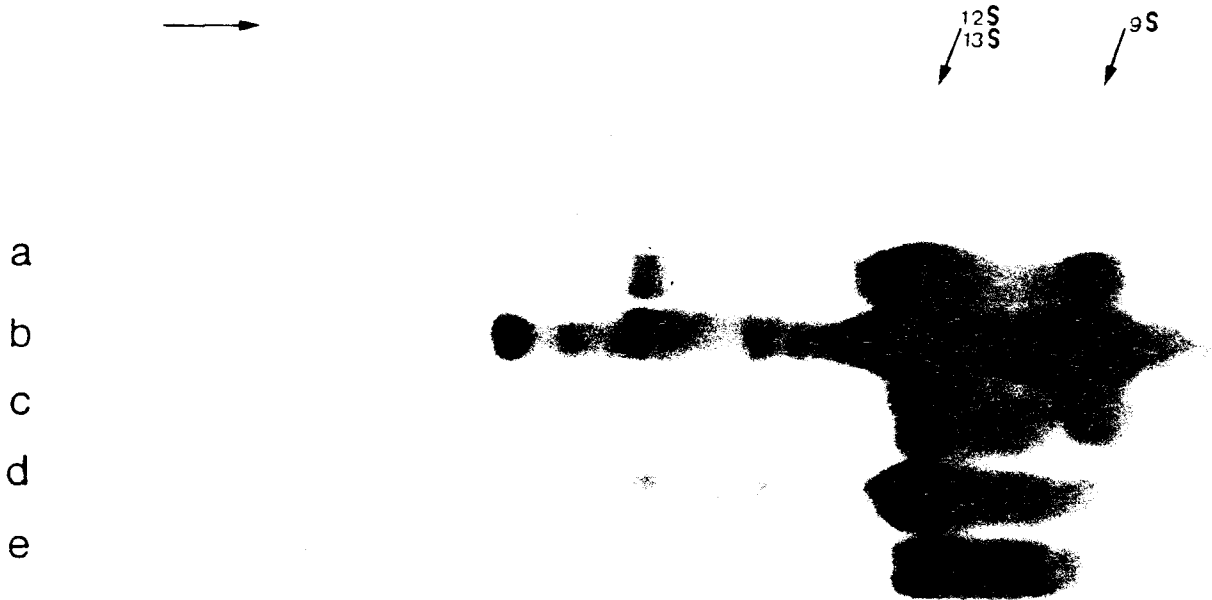
En revanche, l'absence de réplication des sérotypes des groupes A(31) et B(3) nécessitait l'étude de l'expression de leurs zones précoces.

4. Expression des zones précoces d'Ad3 dans les cellules simiennes non permissives CV1

Dans le but de comparer la nature et le taux de transcription des ARNm produits dans les cellules CV1 et KB (permissives) nous avons infecté ces 2 types de cellules par l'Ad3 (20 pfu) puis nous avons extrait, sélectionné et séparé ces ARNm selon leur masse dans un gel d'agarose. Ces ARNm ont été transférés sur une membrane Biodyne (technique des "Northern blots").

Parallèlement nous avons préparé des sondes d'hybridation spécifiques des zones E1A, E1B, E2A et E3 d'Ad3 (Matériels et méthodes).

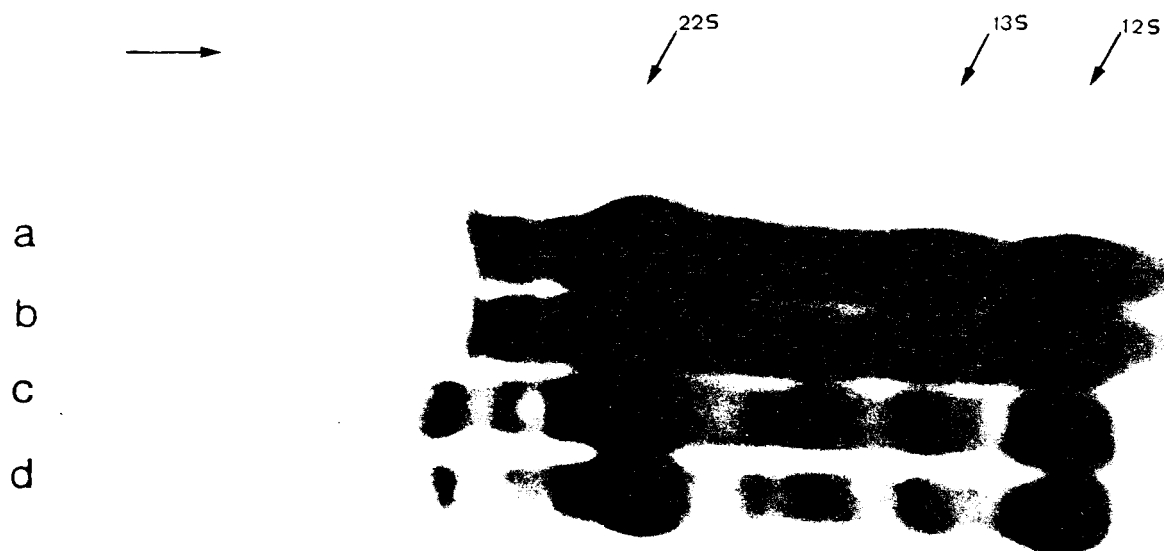
Les résultats indiquent que les messagers précoces d'Ad3 synthétisés dans les CV1 sont homologues en taille et produits en quantité analogue à ceux transcrits dans les cellules KB (Figures 8, 9, 10, 11). L'expression des zones précoces d'Ad3 dans les CV1 semble donc normale, bien qu'elle n'aboutisse pas à la réplication de son génome. -



HYBRIDATION DES ARN MESSAGERS PRECOCES D'Ad3 PRODUITS DANS LES
CELLULES KB OU CV1 AVEC UNE SONDE E1A d'Ad3

- Ligne a : ARNm d'Ad3 (20 pfu) extraits des CV1 (7 h pi)
 Ligne b : ARNm d'Ad3 (20 pfu) extraits des KB (5 h pi)
 Ligne c : ARNm d'Ad3 (20 pfu) extraits des CV1 (5 h pi)
 Ligne d : ARNm d'Ad3 (20 pfu) extraits des KB (7 h pi)
 Ligne e : ARNm d'Ad3 (20 pfu) extraits des CV1 (3 h pi)

FIGURE 8



COMPARAISON DES ARN MESSAGERS PRECOCES D'Ad3 EXTRAITS DE CELLULES KB
ET CV1 ET REVELES PAR UNE SONDE SPECIFIQUE
DE LA ZONE E1B D'Ad3

Lignes (a,b) : ARNm d'Ad3 (20 pfu) extraits de cellules CV1 (5 h pi)

Lignes (c,d) : ARNm d'Ad3 (20 pfu) extraits de cellules KB (5 h pi)

FIGURE 9

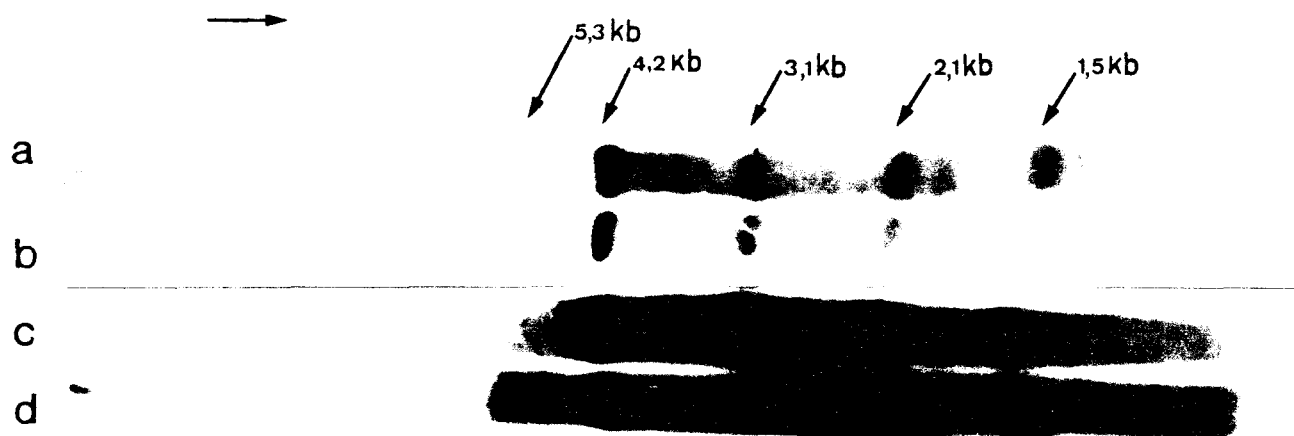


COMPARAISON DES ARN MESSAGERS PRECOCES D'Ad3 EXTRAITS DE CELLULES KB ET CV1 (5 HEURES POST-INFECTION) ET REVELES PAR UNE SONDE SPECIFIQUE DE LA ZONE E2A/Ad3

Lignes (a,b) : ARNm d'Ad3 (20 pfu) extraits des cellules KB (6 h pi)

Lignes (c,d) : ARNm d'Ad3 (20 pfu) extraits des cellules CV1 (6 h pi)

FIGURE 10



COMPARAISON DES ARN MESSAGERS PRECOCES D'Ad3 EXTRAITS DE CELLULES
KB ET CV1 ET REVELES PAR UNE SONDE SPECIFIQUE
DE LA ZONE E3 D'Ad3

Lignes (a,b) : ARNm d'Ad3 (20 pfu) extraits de cellules CV1 (5 h pi)

Lignes (c,d) : ARNm d'Ad3 (20 pfu) extraits de cellules KB (5 h pi)

FIGURE 11

5. Discussion

Nos résultats indiquent que les cellules de singe (CV1) et de hamster (BHK 21) ne sont permissives à aucun des sérotypes étudiés ici.

De plus aucun de ces sérotypes ne traduit ses polypeptides tardifs ni dans les BHK 21 ni dans les CV1.

Nous pouvons donc classer les adénovirus des sous-groupes A à E en 3 catégories :

- . Les sérotypes du sous-groupe C forment une entité à part. Ils induisent une production virale dans les BHK 21, leur réplication est normale dans les CV1 et les BHK 21. La transcription ou la maturation de certains de leurs ARN messagers tardifs est altérée dans les CV1, rendant leur traduction défectueuse.

- . Les sérotypes 9 et 4 des sous-groupes D et E, répliquent leur génome dans les CV1, mais ne produisent aucune protéine ni dans les CV1 ni dans les BHK 21.

- . Les sérotypes 31 et 3 des sous-groupes A et B ne répliquent pas leur génome dans les CV1. L'expression de leurs zones précoces semble normale, comme c'est le cas dans les BHK 21 (GROFF & DANIELL, 1981) où ils ne se répliquent pas d'avantage.

L'altération du cycle lytique de l'Ad2 dans les CV1 est due, entre autres causes, à une maturation anormale de l'ARNm de sa fibre et à une synthèse trop faible d'autres polypeptides. Ces anomalies sont liées à la nature de la partie N-terminale de la 72 K/E2A qui, modifiée par une mutation ponctuelle, devient fonctionnelle dans les CV1 (RICE & KLESSIG, 1984).

On peut estimer que l'absence totale de production des polypeptides tardifs des sérotypes 4 et 9 dans les CV1 est due à un mécanisme voisin, impliquant également la partie N-terminale de la 72 K/E2A.

Les sérotypes des sous-groupes A et B ne répliquent pas leur génome dans les CV1. Ce caractère semble donc en relation avec leur pouvoir oncogène. Il est possible qu'un produit des zones oncogènes intervienne dans ce mécanisme.

Il est également possible qu'un facteur cellulaire nécessaire à la réplication (FRIEFIELD et al., 1983) ne convienne pas à la réplication du génome de ces sérotypes. On ne peut toutefois exclure le rôle de la DBP (72 K/E2A) dans l'absence de réplication: on sait en effet que sa partie C-terminale est nécessaire à la réplication.

L'étude de ces trois populations d'adénovirus devrait permettre de mieux distinguer les différents rôles de la 72 K/E2A, impliquée dans des phénomènes aussi différents que la réplication, la transcription et la maturation des ARNm.

C. MISE EN EVIDENCE DU PHENOMENE DE TRANSDOMINANCE ENTRE SEROTYPES D'ADENOVIRUS HUMAIN

1. Observations préliminaires

Dans un premier temps nous avons voulu déterminer l'ensemble des fonctions d'Ad2 qui pouvaient être complétées par l'Ad3.

Il s'agissait à cet effet, de coinfecter des cellules humaines (HeLa) par l'Ad3 et un mutant thermosensible d'Ad2 choisi dans une série représentative des différents groupes de complémentation de l'Ad2.

. Ad2 ts 1 et Ad2 ts 4 (WEBER et al., 1975)

. Ad2 ts 103, ts 104, ts 111, ts 114, ts 118, ts 121 (MARTIN et al., 1978)

. Ad5 ts 125 (GINSBERG et al., 1974)

Des séries comparatives de boîtes de cellules furent incubées à 33° C et à 39° C. La production virale, appréciée par titrage en immunofluorescence sur des cellules de hamster (BHK 21) non permissives à l'Ad3, n'a permis de révéler aucune complémentation entre l'Ad3 et les mutants ts d'Ad2. Le même test réalisé avec l'Ad9, aboutit au même résultat. Dès lors nous avons cherché à caractériser le comportement de l'Ad3 vis à vis de l'Ad2.

2. Publication dans "Virus Research"

L'essentiel des résultats est présenté dans l'article publié dans "Virus Research".

Cf. Article ci-joint.

VRR 00129

Genetic expression of human adenoviruses in simian cells. Evidence for interserotypic inhibition of viral DNA synthesis

Claude Delsert and Jean-Claude D'Halluin *

Laboratoire de Virologie Moléculaire de l'INSERM (U.233), Place de Verdun, 59045 Lille, France

(Accepted 16 April 1984)

Summary

Most simian cells are permissive for SV40 and adenovirus-SV40 hybrids but nonpermissive for human adenoviruses, and the defect has been shown to take place at the level of processing of late viral mRNAs (Klessig and Grodzicker, 1979). Viral DNA synthesis and virus progeny production were studied in simian cells infected with different adenovirus serotypes. Adenoviruses belonging to oncogenic subgroups A and B (Ad31 and Ad3) failed to replicate their DNA in CV1 cells, whereas DNA replication occurred for all the other serotypes. Co-infection of CV1 cells with SV40 and Ad3 (or Ad31) resulted in the inhibition of SV40 DNA synthesis, as well as cellular DNA synthesis. The inhibition was not related to adenovirus DNA replication, since SV40 did not complement the Ad3/Ad31 replication defective function. Similar results were obtained in coinfecting BSC and MK2 simian cell lines.

Inhibition of Ad2ND1 DNA synthesis and gene expression also occurred in co-infection of simian cells with nondefective Ad2ND1 hybrid and defective Ad3/Ad31. In permissive human cell lines (HeLa or KB) co-infected with Ad2 and Ad3 (or Ad31), a dominant, inhibitory effect of Ad3 (or Ad31) over Ad2 was also observed. The inhibition appeared to function stoichiometrically and not catalytically, and to involve early adenovirus gene products. In both simian and human cells a hierarchy of dominance appeared between serotypes belonging to different subgroups. The degree of inhibitory effect occurred in the following decreasing order: Ad3 and Ad7 (subgroup B), Ad9 (D), Ad4 (E), Ad31 (A), Ad2 and Ad5 (C).

adenovirus, human serotype, replication, transdominance, simian cell

* To whom all correspondence should be addressed.

Introduction

Human adenoviruses are nuclear replicating viruses with a linear double-stranded DNA genome encoding for approximately 30 proteins. They have been classified into six subgroups (A–F), distinguishable from each other on the basis of immunological, biological and biochemical criteria (Wadell et al., 1980). The overall scheme of DNA replication in viruses of different subgroups has led to identical strand-displacement models (Winnacker, 1978). The DNA of all serotypes thus far examined contains inverted terminal repeats of 100–160 nucleotides in length, with highly conserved sequences (Stillman et al., 1982). Mapping of RNA transcripts has shown that the genomes of human adenoviruses are all organized in a similar fashion (Sambrook et al., 1980).

Virus replicates efficiently in cells derived from its natural host, but grows poorly in cells from different species. This is the case for human adenovirus in simian cells: except for Vero cells which are completely permissive for Ad2 (Eron et al., 1975) most of the simian cells are nonpermissive for human adenoviruses. The block to replication of human adenovirus type 2 in monkey cells can be overcome by coinfection with the simian virus SV40 (SV40) or infection with adenovirus type 2–SV40 hybrid viruses (e.g. Ad2ND1; Baum et al., 1972; Lewis et al., 1969; Rabson et al., 1964), or, in some particular systems at high multiplicity of infection (Baum, 1977). Mutants of adenovirus types 2 and 5 have been isolated which have alterations in the gene encoding the DNA-binding protein (E2A-72 K). These mutants enable wild-type adenovirus to replicate in simian cells (Klessig, 1977; Klessig and Grodzicker, 1979; Klessig and Hassell, 1978).

The restriction mechanism of human adenovirus type 2 replication in monkey cell has been assumed to be a late event, since the synthesis of several late viral proteins (IIIa and fiber) is severely reduced (Klessig and Anderson, 1975; Klessig and Chow, 1980). The present paper reports on replication of adenoviruses from different subgroups (A, 31; B, 3; C, 2; D, 9; E, 4) in monkey cells, and their interactions with SV40, and with Ad2ND1 in nonpermissive and permissive cell systems.

Materials and Methods

Cells and viruses

HeLa cells were originally obtained from J. Williams (Carnegie Mellon Institute, Pittsburgh) and simian cell lines CV1, BSC and MK-2 from M. Girard (Institut Pasteur, Paris). The cells were grown as a monolayer in Dulbecco's medium supplemented with 5% newborn calf serum. Human adenovirus type 2 (Ad2) was obtained from J. Williams, types 9 and 31 (Ad9, Ad31) from J.C. Nicolas (Hôpital Trousseau, Paris), and types 3 and 4 (Ad3, Ad4) from R. Marusyk (University of Alberta, Edmonton). SV40 was a gift from M. Girard. Adenovirus stocks were prepared and titrated by immunofluorescent assay (fluorescent focus units, ffu) as described elsewhere (D'Halluin et al., 1978). SV40 stocks were prepared by propagation in CV1 at an input multiplicity of 0.01 pfu/cell and titrated by plaque assays in

CV1 cells. The source of Ad3 incomplete particles was the top fractions of CsCl gradients, above the virion band (Sundquist et al., 1973). The number of physical particles in the virus inoculum was determined by measuring the $A_{260\text{nm}}$, assuming that one $A_{260\text{nm}}$ unit corresponds to 1×10^{12} physical particles (Philipson et al., 1968).

Labelling and analysis of viral DNA from infected cells

Virus-infected HeLa and CV1 cell monolayers in 60-mm dishes were labelled with [^3H]thymidine (20 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) at 16 h after infection. To prepare DNA, cells were scraped off and pelleted, washed once with phosphate-buffered saline and resuspended in 0.2 ml of 0.01 M Tris, pH 7.5/0.001 M EDTA. The suspension was lysed on top of an alkaline sucrose gradient. After 16 h at 4°C, the gradients were centrifuged for 5 h at 35 000 rpm and 4°C in a Beckman SW41 rotor (D'Halluin et al., 1979). For typing viral DNA, the DNA was isolated by lysing the cells in 6 M guanidinium hydrochloride, and centrifugation in sucrose gradients, and analyzed by various restriction enzymes, as previously described (D'Halluin et al., 1982).

Adenovirus-infected cell polypeptide labelling

At the time of labelling, the medium of infected cell cultures was removed, the monolayers were washed once with methionine-deprived medium, and 0.5 ml of methionine-free medium containing 20 μCi of [^{35}S]methionine was added. The cells were harvested after 1 h labelling. The radioactive polypeptides were analyzed on an SDS-polyacrylamide gel, as previously described (D'Halluin et al., 1978).

Ultraviolet inactivation of virus

Virus was suspended in cell culture medium and UV-irradiated with a Camag-Reprostar lamp at 254 nm and a distance of 5 cm. 99% of the virus infectivity, titrated by immunofluorescent assay, could be inactivated after 10 min of irradiation (Mak and Mak, 1974).

Enzymes

Restriction endonucleases Bam HI and Hind III were purchased from Boehringer (Mannheim, F.R.G.). Trypsin (TPCK-treated) was from Sigma (St. Louis, Mo., U.S.A.).

Results

Permissivity of human and simian cells for adenovirus serotypes

Human adenoviruses belonging to subgroup C induce an abortive cycle in CV1 cells. The block in the lytic cycle is likely to be a late event and results from a lack of processing of late transcripts, such as fiber and IIIa mRNAs (Klessig and Anderson, 1975; Klessig and Chow, 1980). The permissivity of monkey cells for different adenovirus serotypes was studied as follows. CV1 or HeLa cells were infected with Ad31 (subgroup A), Ad3 (B), Ad2 (C), Ad9 (D), Ad4 (E) and nondefective

TABLE 1
ADENOVIRUS PRODUCTION IN HUMAN AND SIMIAN CELLS

Human serotypes	Subgroup	HeLa	CV1	Ratio of yields		
				HeLa: CV1	CV1: CV1 + HU ^a	HeLa: HeLa + HU ^a
Ad2	C	3.5×10^{10}	1.4×10^7	2.5×10^3	0.8	3.6×10^3
Ad31	A	2.4×10^8	1.5×10^6	1.6×10^2	n.d. ^b	n.d.
Ad3	B	1.75×10^8	3.5×10^6	0.5×10^2	1.6	2.2×10^3
Ad4	E	1.05×10^9	1.4×10^5	7.5×10^3	n.d.	n.d.
Ad9	D	2.1×10^7	7.0×10^4	3.0×10^2	n.d.	n.d.
Ad2 ND1	-	7.0×10^8	2.2×10^8	0.3×10^1	n.d.	n.d.

Cells in petri dishes (3.5×10^6 cells/dish) were infected with an input moi of 10 fluorescent focus units (ffu) per cell of different adenovirus serotypes. The cells were harvested at 40 h after infection. Virus yields were expressed as number of ffu per 5×10^6 cells, as titrated on HeLa cell monolayers. The figures were average of four separate experiments. The ffu: physical particle ratios of the virus inoculum were 1:30 for Ad2, 1:400 for Ad31, 1:700 for Ad3, 1:800 for Ad9, 1:700 for Ad4, 1:50 for Ad2ND1.

^a Cells were infected at a moi of 10 ffu per cell with (or without) 10 mM hydroxyurea (HU) added during the whole cycle. The cells were harvested at 40 h and virus yields titrated by the fluorescent assay.

^b n.d., not determined.

Ad2ND1. It has been found that the growth cycle for adenoviruses belonging to subgroups C and B are quite similar (Sundquist et al., 1973); for members of subgroup A the growth cycle is slightly delayed (Pina and Green, 1969; Mak, 1969). The cells were harvested at 40 h after infection and viral progeny titrated by immunofluorescent assay on HeLa cell monolayers. The results are summarized in Table 1.

The CV1 cells appeared less permissive to human adenovirus than HeLa cells for each serotype here studied. The ratio of virus production in HeLa cells over production in CV1 cells ranged between 10^2 and 10^4 . This ratio was about 1 for Ad2ND1. Except for Ad2ND1, production of adenovirus particles by CV1 cells for all serotypes was of the same order of magnitude as that of the input virus (Table 1). In order to distinguish between a low level of virus multiplication and a survival of the input virus, 10 mM hydroxyurea (HU) was added to CV1 and HeLa cells infected with Ad2 or Ad3. In contrast to permissive human cells (HeLa), there was no significant change in virus yields by CV1 cells in the presence of HU, suggesting that the viruses found were mainly survivors (Table 1). However, since the mechanism of nonpermissivity might be different for the various serotypes, it seemed of interest to analyze the block in virus replication at the molecular level.

Synthesis of viral DNA in CV1 and HeLa cells infected with different human adenovirus serotypes

CV1 and HeLa cells were infected as described above, labelled with [³H]thymidine from 16 to 24 h after infection. Viral DNA was analyzed by centrifugation in an alkaline sucrose gradient. As shown in Fig. 1, the level of viral DNA synthesis was similar for serotypes 2, 4 and 9 in either HeLa or CV1 cells (Fig. 1, C, F; G, J; H, K). However, this level was significantly lower for Ad4 and Ad9 in CV1 and

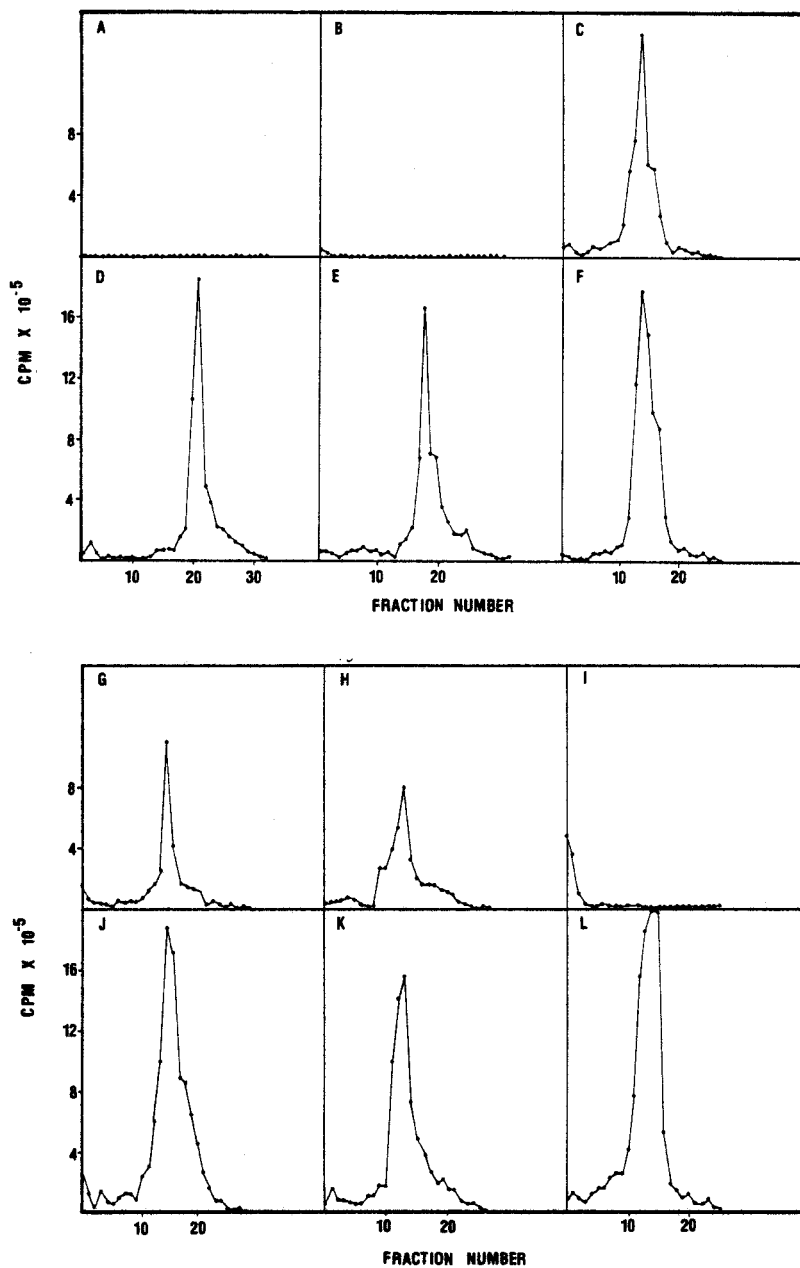


Fig. 1. Adenovirus DNA synthesis in HeLa and CV1 cells. HeLa or CV1 cells were infected with 5–50 ffu/cell of different adenovirus serotypes, labelled with [3 H]thymidine from 16 to 24 h after infection and 34 S viral DNA analyzed in alkaline sucrose gradient. A, Ad3/CV1; B, Ad31/CV1; C, Ad2/CV1; D, Ad3/HeLa; E, Ad31/HeLa; F, Ad2/HeLa; G, Ad4/CV1; H, Ad9/CV1; I, mock CV1; J, Ad4/HeLa; K, Ad9/HeLa; L, Ad2ND1/CV1. Note that the rate of DNA synthesis was similar in HeLa cells for Ad3, Ad31 and Ad2, but that there was no detectable Ad3 and Ad31 DNA synthesis in CV1 cells. The direction of sedimentation is from right to left.

HeLa cells than for Ad2. DNA synthesis occurred at the same level for Ad2, Ad3 and Ad31 in HeLa cells (Fig. 1, D, E, F). In contrast to human cells, in CV1 cells there was no detectable DNA synthesis for Ad3 and Ad31 (Fig. 1, A, B). This result strongly suggested that human adenoviruses belonging to highly or weakly oncogenic groups, behaved in simian cells differently from the other serotypes. It also suggested that the permissivity phenomenon might differ strongly for viruses presenting a closely related genetic organization. In addition, Ad3 and Ad31 inhibited the cellular DNA synthesis in CV1 cells (Fig. 1, A, B).

Absence of complementation of Ad3 and Ad31 DNA synthesis by SV40 in simian cells

SV40 is known to complement Ad2 in CV1 cells, by providing helper function(s) required for adenovirus late mRNAs processing (Baum et al., 1972; Klessig and Chow, 1980; Rabson et al., 1964). SV40 T-antigen is involved in this process, in connection with/or in place of the 72 K adenovirus DNA-binding protein. Both T-antigen and 72 K are also implicated in the replication of SV40 and adenovirus DNAs. It was therefore important to determine whether the early gene products of SV40 were capable of complementing Ad3 and Ad31 DNA replication.

CV1 cells infected at 20 ffu of SV40 per cell were superinfected with various serotypes of human adenovirus (20 ffu/cell), after 24 h of infection with SV40 (Patch et al., 1981). The cells were labelled with [3 H]thymidine from 16 to 22 h after infection with adenovirus. The viral DNAs were analyzed in alkaline sucrose

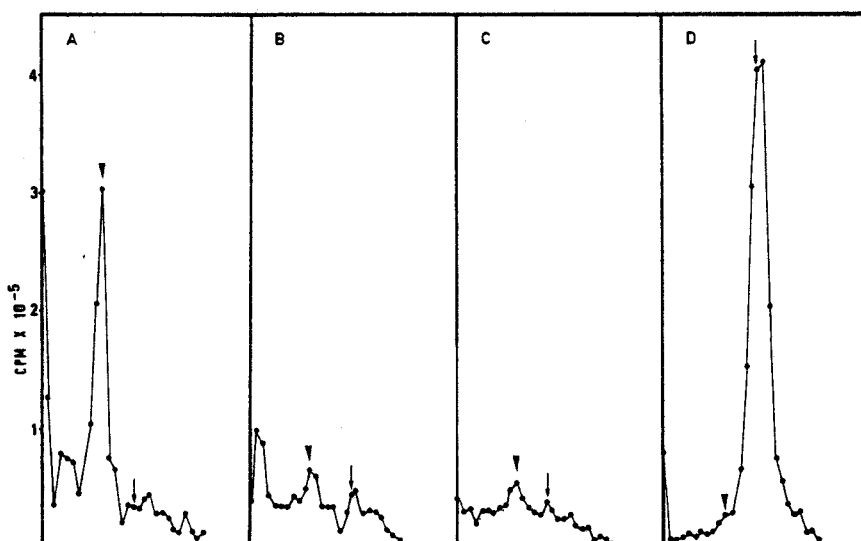


Fig. 2. Inhibition of SV40 DNA synthesis in co-infection of simian cells with Ad3 or Ad31. CV1 cells were singly infected with 20 ffu/cell of SV40 (A) or doubly infected with 20 ffu of SV40 and 20 ffu of Ad3 (B), 20 ffu Ad31 (C), or 20 ffu Ad2 (D). SV40 infection was started 24 h prior to addition of adenovirus inoculum. The cells were labelled with [3 H]thymidine for 6 h at 16 h after adenovirus infection and viral DNA was analyzed in alkaline sucrose gradient. SV40 DNA sediments at 50 S (A, arrowhead) and adenovirus DNA at 34 S (arrow). In co-infection experiments, neither SV40 nor adenovirus DNA synthesis was observed (B, C). The direction of sedimentation is from right to left.

gradient; under these conditions, the SV40 DNA sediments at about 50 S and the adenovirus DNA at 34 S. Fig. 2 shows that there was no DNA label at position 34 S for CV1 cells co-infected with SV40 and Ad3 or Ad31. In addition, there was a partial inhibition of SV40 DNA synthesis by these two serotypes. In CV1 cells co-infected with Ad2 and SV40, the SV40 DNA synthesis was also found to be depressed, as previously observed (Friedman et al., 1970; Goldman et al., 1981; Patch et al., 1981; Van Roy and Fiers, 1978), but synthesis of Ad2 DNA occurred (Fig. 2, D).

Absence of complementation of Ad3 and Ad31 DNA synthesis by Ad2ND1 in simian cells

In vitro (Stillman et al., 1982) and in vivo studies (Williams et al., 1975) have shown that certain viral gene products are capable of complementing other defective genes. This appeared to be the case for the complementation of the H5 *ts* 125 mutant by other adenovirus serotypes (McDonnough and Rekosh, 1982) and of Ad5 host-range mutants by adenovirus type 12 (Rowe and Graham, 1981). In vitro, the DNA synthesis initiation systems of Ad2 can utilize matrices from other serotypes, e.g. Ad3 (Stillman et al., 1982). It was therefore tempting to study whether Ad2ND1 was capable of complementing Ad3 and Ad31, in their DNA synthesis in monkey cells. CV1 cells were singly or doubly infected with 20 ffu/cell of Ad2ND1 and Ad3 (or Ad31) and labelled with [³H]thymidine from 16 to 24 h after infection. The viral

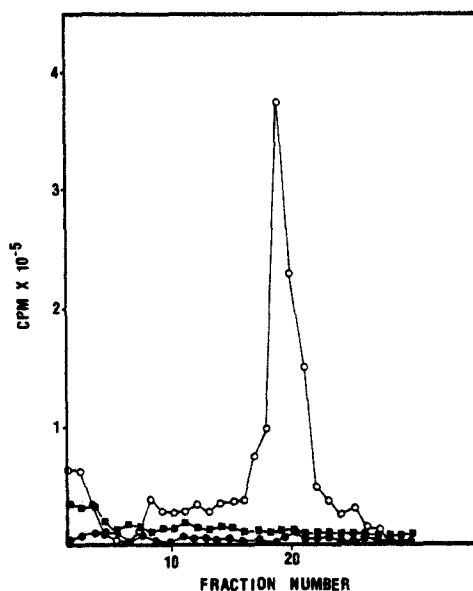


Fig. 3. Inhibition by Ad3 and Ad31 of Ad2ND1 DNA synthesis in monkey cells. CV1 cells singly infected with 20 ffu/cell of the nondefective Ad2ND1 (○) or doubly infected with 20 ffu each of Ad2ND1 and Ad3 or Ad31 were labelled with [³H]thymidine from 16 to 24 h after infection. Labeled DNA was analyzed in alkaline sucrose gradient. Note the drastic inhibition of viral DNA synthesis in cells co-infected with Ad3 (●) and Ad31 (■). Bottom of the gradient on the left.

DNA was analyzed and quantitated in an alkaline sucrose gradient. As shown in Fig. 3, there was an inhibition of the overall viral DNA synthesis in doubly infected cells, compared with cells singly infected with Ad2ND1. Ad3 and Ad31 therefore inhibited the synthesis of Ad2ND1 DNA. As shown in the following experiment (Fig. 4A) co-infection with 20 ffu each of Ad3 and Ad2 ND1 gave more inhibition than 10 ffu Ad3 and 10 ffu Ad2 ND1. The inhibition effect appeared therefore to depend more upon the multiplicity of infection (moi) of Ad3 than upon the moi ratio of Ad3:Ad2ND1.

The same inhibition effect of Ad3 and Ad31 on Ad2 ND1 (and SV40) DNA synthesis was observed in other simian cell lines tested, BSC and MK-2 (not shown).

Adenovirus gene dosage effect on the inhibition of Ad2ND1 DNA synthesis and virus production in CV1 cells

Inhibition of Ad2ND1 DNA synthesis and virus production by the other adenovirus serotypes in CV1 cells might be due to two sorts of mechanisms, catalytic or stoichiometric. These two types of mechanism can be distinguished by varying the moi of the inhibiting virus strain, the other one remaining constant: the catalytic effect would not be affected by the moi, whereas the stoichiometric effect would depend upon the moi of the inhibiting agent (Galos et al., 1979; Snustad, 1968). CV1 cells were infected with 10 ffu/cell of Ad2ND1 and co-infected with increasing input multiplicities of Ad3 (or Ad31), ranging from 1 to 50 ffu/cell. The inhibiting effect was analyzed by two different approaches: (i) synthesis of viral DNA; (ii) titration of the virus progeny at the end of the infectious cycle.

(i) *Viral DNA synthesis.* CV1 cells were labelled with [³H]thymidine for 8 h at 16 h after infection. The viral DNA was extracted and analyzed in an alkaline sucrose gradient. The results, expressed as percent of the Ad2ND1 DNA synthesized in singly infected cell culture, are shown in Fig. 4A.

(ii) *Virus particle production.* Titration of viral progeny obtained at 40 h after infection, expressed as percent of Ad2ND1 production in single infection, is shown in Fig. 4B. Both kinds of experiments suggested that Ad3 and Ad31 acted stoichiometrically on Ad2ND1 production and replication.

Virus-induced polypeptides in co-infected permissive and nonpermissive cells

HeLa and CV1 cells singly or doubly infected by Ad2ND1 and Ad3 at different moi were labelled with [³⁵S]methionine for 1 h at 16 h after infection. The virus-induced polypeptides were analyzed in SDS-polyacrylamide slab gels (Fig. 5). No synthesis of Ad3-specified polypeptides was seen in single infection in CV1 cells, and in co-infection with Ad2ND1, at ratios of moi with Ad3:Ad2ND1 lower than 1; the only polypeptides synthesized were of serotype 2 (Fig. 5, d, h, i). At a ratio of moi Ad3:Ad2ND1 equal to 1 there was a strong inhibition of Ad2ND1 polypeptide synthesis, and no visible Ad3-induced polypeptides (Fig. 5, b). In contrast to CV1 cells, in co-infected HeLa cells, the polypeptides synthesized were of type 3: the synthesis of Ad2ND1-coded polypeptides was totally inhibited whatever the moi ratio Ad3:Ad2ND1 used (Fig. 5, a, e, f, g, j). These data suggested an inhibiting

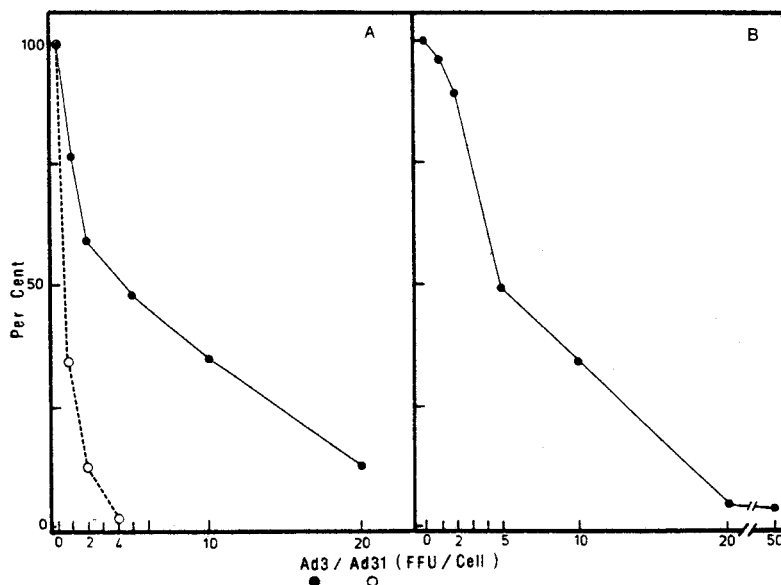


Fig. 4. Gene dosage effect by Ad3 and Ad31 on Ad2ND1 DNA synthesis and virus progeny yields in simian cells. CV1 cells were co-infected with a constant input multiplicity of infection of Ad2ND1 (10 ffu/cell) and increasing multiplicities of infection of Ad3 or Ad31. The cells were labelled with [^3H]thymidine from 16 to 24 h after infection and DNA analyzed in alkaline sucrose gradient. The level of residual viral DNA synthesis was expressed as percent of the single infection by Ad2ND1 (A). In (B), the virus progeny was titrated at 40 h after infection, and the virus yields expressed as percent of yields of single Ad2ND1 infection. ○, Ad31; ●, Ad3.

effect of Ad3 on Ad2 ND1, detectable at relatively low moi of Ad3 in HeLa cells (ratio of moi Ad3 : Ad2ND1 ranging from 0.1 to 1.0). In CV1 cells, the inhibition appeared only for moi ratio equal to 1 (Fig. 5b) or higher than 1 (not shown).

Evidence for an Ad3 virus-coded function inhibiting Ad2ND1 expression in CV1 cells

The observed inhibition by Ad3 of Ad2ND1 gene expression and virus production might be provoked by at least three possible factors: (i) the infecting virus particles and/or some of their capsid component(s); (ii) some cellular gene product(s) enhanced or activated by the virus infection; (iii) a virus-coded function. Since there was no mutant of Ad3 available, incomplete or UV-inactivated Ad3 particles were analyzed with respect to their inhibiting effect on Ad2ND1 DNA replication.

CV1 cells infected with Ad2ND1 (20 ffu/cell) were superinfected with 10 ffu per cell of Ad3, or of an equivalent number of Ad3 empty particles (determined by absorbance at 280 nm), or of UV-irradiated Ad3 particles. The cells were labelled with [^3H]thymidine from 16 to 24 h after infection and viral DNA was analyzed in alkaline sucrose gradient. There was no detectable inhibition of Ad2ND1 DNA synthesis when cells were co-infected with UV-irradiated or incomplete Ad3 particles (Fig. 6).

Since the ratio of ffu to physical particles varies from one serotype to another and ranges from 1 : 30 for members of subgroup C to about 1 : 1000 for subgroups B, D

374

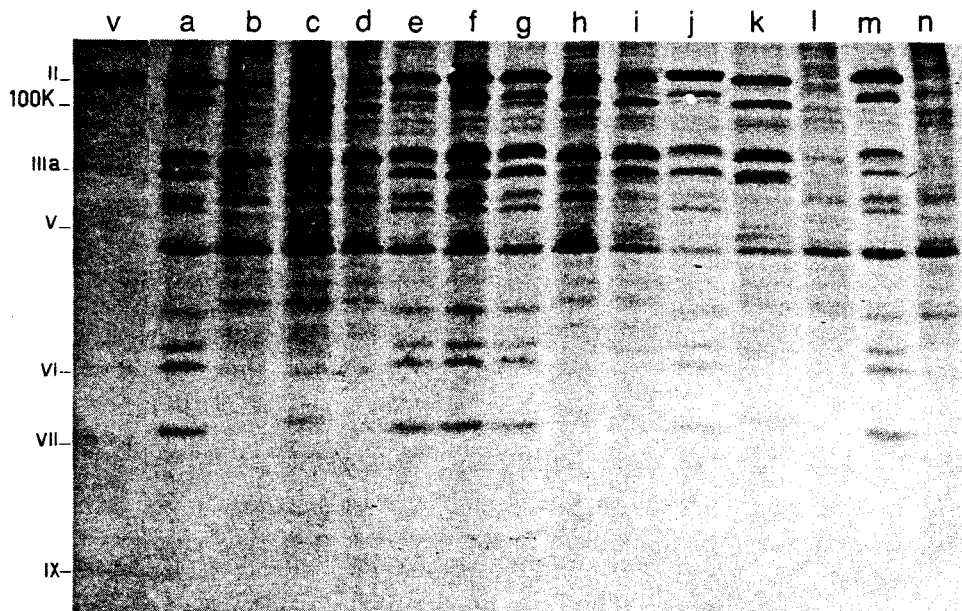


Fig. 5. Polypeptide analysis of singly- and doubly-infected simian and human cells. Infected CV1 and HeLa cells were labelled with [35 S]methionine and analyzed in SDS-polyacrylamide slab gel. a, HeLa/Ad3 + Ad2ND1 (10 ffu/cell: 10 ffu/cell); b, CV1/Ad3 + Ad2ND1 (10:10); c, CV1/Ad2ND1; d, CV1/Ad3 + Ad2ND1 (10:20); e, HeLa/Ad3 + Ad2ND1 (10:10); f, HeLa/Ad3 + Ad2ND1 (10:20); g, HeLa/Ad3 + Ad2ND1 (10:50); h, CV1/Ad3 + Ad2ND1 (10:50); i, CV1/Ad3 + Ad2ND1 (10:100); j, HeLa/Ad3 + Ad2ND1 (10:100); k, CV1/Ad2ND1 (100 ffu/cell); l, CV1/Ad3 (10 ffu/cell); m, HeLa/Ad3 (10 ffu/cell); n, mock-infected CV1 cells; v, Ad2 virion polypeptide markers. Note that there was no synthesis of Ad3-specified polypeptides in single infection in CV1 cells, and that in double infection at ratios of Ad3:Ad2ND1 lower than 1, the only polypeptides synthesized were of serotype 2 (d, h, i). At ratios of Ad3:Ad2ND1 equal to 1 (b) there was a drastic inhibition of Ad2ND1 polypeptide synthesis. In co-infected HeLa cells, the polypeptides synthesized were of type 3, whatever the ratio of Ad3:Ad2ND1 (a, e, f, g, j).

and E members (see legend to Table 1), a possible inhibitory role of some capsid component, and particularly the penton base (responsible for an early cytopathic effect; Pettersson and Höglund, 1969), cannot be excluded. To test this hypothesis, Ad3 virions were treated for 1 h at 37°C with trypsin (0.1 mg/ml in 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0) to digest the penton base. The inhibitory effect on Ad2ND1 DNA synthesis was analyzed in CV1 cells. No significant difference was observed in the inhibitory effect between control and trypsin-digested Ad3 inoculum (not shown). Taken altogether these results suggested that the expression of Ad3 genes, and most likely of early genes, was required to inhibit the DNA replication and multiplication of Ad2ND1.

Nature of the viral DNA synthesized in permissive cells doubly infected with Ad2 and Ad3

HeLa cells singly or doubly infected with Ad2 and Ad3 at different moi were

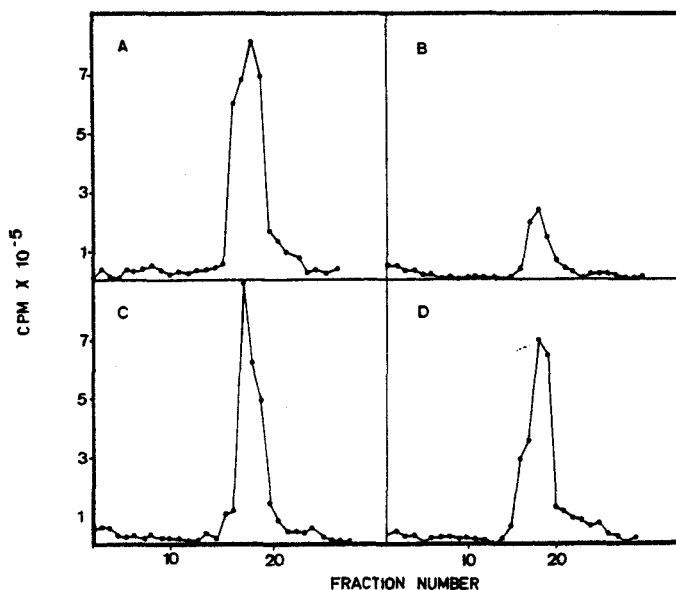


Fig. 6. Inhibition of Ad2ND1 DNA synthesis by Ad3 in simian cells is mediated by early gene products. A, control CV1 cells infected with Ad2ND1 (20 ffu/cell); B, CV1 cells co-infected with Ad2 ND1 (20 ffu/cell) and Ad3 (10 ffu/cell); C, CV1 cells co-infected with Ad2 ND1 (20 ffu/cell) and UV-irradiated Ad3 (inoculum equivalent to 10 ffu/cell); D, CV1 cells co-infected with Ad2ND1 (20 ffu/cell) and Ad3 empty particles (IM) equivalent to 10 particles per cell. Cells were labelled with [^3H]thymidine and viral DNA analyzed in alkaline sucrose gradient. UV-irradiated Ad3 particles and Ad3 IM failed to inhibit Ad2ND1 DNA synthesis in permissive cells (C, D).

labelled with [^3H]thymidine for 8 h at 16 h after infection. The viral DNA isolated in sucrose gradient was analyzed by different restriction enzymes. The agarose gel patterns revealed that even at low moi with Ad3 (5 ffu/cell) the only DNA synthesized belonged to serotype 3 (not shown). It thus appeared that some early viral function, encoded by the Ad3 genome, was responsible for the inhibition of Ad2 replication in HeLa cells. This Ad3-coded function was likely to be similar to that responsible for the inhibition of Ad2ND1 replication in CV1 cells.

Degree of interserotypic dominance in different adenovirus subgroups

CV1 and HeLa cells were doubly infected with pairs of serotypes belonging to different oncogenic subgroups (Wadell et al., 1980). Three ratios of moi were tested for each pair: 0.5, 1.0 and 2.0. In co-infected HeLa cells, the serotype of the virus polypeptide was determined by analytical electrophoresis in SDS-polyacrylamide gel of [^{35}S]methionine-labelled polypeptides. In CV1 cells, the dominant inhibitory effect of one serotype on one another was estimated by restriction analysis of viral DNA (Bam HI, Hind III). The results, summarized in Tables 2 (HeLa cells) and 3 (simian cells), suggested a hierarchy of dominance between the members of different adenovirus subgroups, similar in both cell types. The dominant inhibitory effect occurred in the following decreasing order: Ad3 and Ad7 (B), Ad9 (D), Ad4 (E),

TABLE 2
 INTERSEROTYPIC DOMINANCE BETWEEN HUMAN ADENOVIRUSES IN HUMAN HeLa CELLS

Serotypes (subgroup)	Ad31 (A)	Ad3 (B)	Ad7 (B)	Ad2 (C)	Ad5 (C)	Ad9 (D)	Ad4 (E)
Ad31 (A)	-	3	7	31	31	9	4
Ad3 (B)		-	(3+7)	3	3	3	3
Ad7 (B)			-	7	7	7	7
Ad2 (C)				-	(2+5)	9	4
Ad5 (C)					-	9	4
Ad9 (E)						-	9
Ad4 (E)							-

HeLa cells were doubly infected with pairs of serotypes belonging to different oncogenic subgroups. Three different ratios of moi were used: 0.5, 1.0, and 2.0. The dominant inhibitory effect was determined by typing the labelled polypeptides in SDS-polyacrylamide gel. The figures represent the serotypes produced by the co-infected HeLa cells.

Ad31 (A), Ad2 and Ad5 (C). This classification did not correspond to the degree of oncogenicity (A, B, C-D-E). A similar dominant effect of Ad3 on H5 ts 125 in human cells at the permissive temperature has been recently reported (McDonnough and Rekosh, 1982).

Discussion

The adenoviruses replicate with a high efficiency in cells originating from their natural host, and with a low efficiency, if any, in the other cell species. In this latter case, they induce an abortive cycle, or cell transformation. However, the cellular

TABLE 3
 INTERSEROTYPIC DOMINANCE BETWEEN HUMAN ADENOVIRUSES IN SIMIAN CELLS

Serotypes (subgroup)	Ad31 (A)	3 (B)	7 (B)	2 (C)	5 (C)	9 (D)	4 (E)
Ad2	31	3	7	-			
Ad5	31	3	7	(2+5)	-		
Ad9	n.d. ^b	n.d.	n.d.	9	9	-	
Ad4	n.d.	3	7	4	4	n.d.	-
Ad2ND1	31	3	7	2+2ND1 ^a	5+2ND1 ^a	9	4

CV1 or MK-2 cells were doubly infected with pairs of serotypes with three different ratios of moi: 0.5, 1.0, and 2.0. The dominant inhibitory effect was appreciated either by restriction analysis of viral DNA using *Bam* HI and *Hind* III endonucleases in the case of subgroups C, D, and E members, or by alkaline sucrose gradient analysis of viral DNA for members of subgroups A and B. The figures represent the dominant serotype.

^a Results obtained by Klessig et al. (1978), and their TCA-insoluble radioactivity determined as a ^bn.d., not determined.

restriction mechanism appears to differ within the adenovirus serotypes. Most of the human adenoviruses produce an abortive infection in simian cells, but addition of SV40 (Baum et al., 1972; Rabson et al., 1964) or of certain mutants of adenovirus type 2 (e.g. H2_{hr}400; Klessig, 1977) can reverse it to a lytic cycle. The host-range mutation of H2_{hr}400 responsible for the complementation of human adenoviruses in simian cells affects the gene coding for the DNA-binding protein E2A-72 K (Klessig and Grodzicker, 1979). The block to Ad2 multiplication in simian cells seems to occur at the level of maturation of certain late mRNAs, such as those for fiber and IIIa (Klessig and Chow, 1980).

DNA replication of adenovirus subgroups C, D and E members (e.g. Ad2, Ad9, Ad4) was found to take place in nonpermissive simian cells, at a level comparable with that in permissive cell systems (Fig. 1). All human adenovirus serotypes studied here inhibited both SV40 and cellular DNA synthesis in co-infection in simian cells. This inhibition was not related to the adenovirus DNA replication since DNA-negative *ts* mutants (H5 *ts* 125 and H2 *ts* 114) also inhibited the cell DNA synthesis at the restrictive temperature (D'Halluin et al., 1979). In contrast with the subgroup C, D and E serotypes, adenovirus types 3 and 31 did not replicate their DNA in simian cells, and the defect of Ad3 and Ad31 DNA replication was not complemented by SV40 (Fig. 2). They do not replicate their DNA either in BHK-21 cells, whereas serotype 2 does it efficiently (Shimojo and Yamashita, 1968). Ad3 and Ad31 belong to subgroups B and A, respectively, two subgroups defined as weakly oncogenic and highly oncogenic for newborn hamster (Huebner, 1967). In co-infection with SV40 in simian cells, Ad3 and Ad31 inhibited both cellular and SV40 DNA synthesis (Fig. 2), in spite of the absence of their own DNA synthesis. However, the mechanisms of inhibition for cellular and viral DNA synthesis might be different: the adenovirus type 2 temperature-sensitive mutant H2 *ts* 111, although inhibiting the simian cell DNA synthesis, failed to inhibit SV40 DNA synthesis (unpublished results).

Ad3 and Ad31 appear therefore to behave differently from all the other serotypes. They exert a dominant, inhibitory effect on host cell, SV40 and also Ad2ND1 DNA synthesis, in co-infection in simian cells (CV1, BSC, MK-2). The inhibition of Ad2ND1 DNA synthesis and gene expression by Ad3 and Ad31 is likely to be due to a more general mechanism since it was also observed on Ad2 in permissive cell systems (Figs. 5, 6). This inhibition seemed to function stoichiometrically and not catalytically, since it was dependent upon the multiplicity of infection with the inhibiting strain of virus (Fig. 4). In addition, since this inhibition occurred in the absence of Ad3 (or Ad31) DNA replication, it involved one (or several) early gene(s). In permissive human cell lines (HeLa or KB) a similar dominant inhibition of Ad3 and Ad31 over Ad2 and most other serotypes was also observed. The interserotypic inhibition between certain human adenoviruses occurring in both human and simian cells suggested the following decreasing order of dominance between the adenovirus subgroups: B, D, E, A, C. This order of dominance differed from the classification of the oncogenic groups and would probably involve gene(s) not directly related to the oncogenicity.

The gene product(s) responsible for the Ad3 (or Ad31) dominant inhibiting effect might be those coded by the E1 zone, or the E2A-72 K, or the products of the E2B

region, e.g. the terminal protein and/or the virus-coded DNA polymerase. These two latter gene products were unlikely to be concerned since Ad3 DNA synthesis can normally proceed *in vitro* using an Ad2-infected cell extract (Stillman et al., 1982). One of the best candidates would therefore be the 72 K DNA-binding protein (DBP): the DBP is synthesized in vast amounts and has a self-regulation function (Carter and Blanton, 1978). This hypothesis would suppose that the 72 K contains type-specific, or at least subgroup-specific domain(s) serving in the recognition of other protein(s) and/or of DNA sequences implicated in DNA replication. These domains would be different from the carboxy-terminal part of the DBP responsible for the initiation of DNA replication, since this latter one appears highly conserved in all adenovirus serotypes (Kruijer et al., 1983). However, the other early regions E3 and E4 cannot be excluded. Although E3 has been shown to be a dispensable region of the genome (Kelly and Lewis, 1973), a dominant inhibitory effect of an Ad5-E3 deletion mutant on Ad5 WT DNA replication has been recently found in HeLa cells (Berkner and Sharp, 1983). Further analysis of the Ad3/Ad31 genetic expression is required to elucidate the mechanism and nature of the virus-coded, stoichiometrically-acting, dominant function of the subgroups A and B adenovirus members.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicales (INSERM: U. 233), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS: ERA 225) and by grants from the Federation of the Groupement des Entreprises Françaises pour la Lutte contre le Cancer (FEGEFLUC). We are grateful to Pierre Boulanger for helpful advice and discussion during the realization of this work and to Chantal Cousin for virus stocks.

References

- Baum, S.G. (1977) Persistent adenovirus infections of nonpermissive monkey cells. *J. Virol.* 23, 412-420.
- Baum, S.G., Horwitz, M.S. and Maizel, J.V., Jr. (1972) Studies of the mechanism of enhancement of human adenovirus infection in monkey cells by simian virus 40. *J. Virol.* 10, 211-219.
- Berkner, K.L. and Sharp, P.A. (1983) Generation of adenovirus by transfection of plasmids. *Nucleic Acids Res.* 11, 6003-6020.
- Carter, T.H. and Blanton, R.A. (1978) Autoregulation of adenovirus type 5 early gene expression. II. Effect of temperature-sensitive early mutations on virus RNA accumulation. *J. Virol.* 28, 450-456.
- D'Halluin, J.C., Allart, C., Cousin, C., Boulanger, P.A. and Martin, G.R. (1979) Adenovirus early function required for protection of viral and cellular DNA. *J. Virol.* 32, 61-71.
- D'Halluin, J.C., Martin, G.R., Torpier, G.R. and Boulanger, P.A. (1978) Adenovirus type 2 assembly analyzed by reversible cross-linking of labile intermediates. *J. Virol.* 26, 357-363.
- D'Halluin, J.C., Cousin, C. and Boulanger, P.A. (1982) Physical mapping of adenovirus type 2 temperature sensitive mutations by restriction endonuclease analysis of interserotypic recombinants. *J. Virol.* 41, 401-413.
- Eron, L., Westphal, H., Khoury, G. (1975) Post-transcriptional restriction of human adenovirus expression in monkey cells. *J. Virol.* 15, 1256-1261.
- Friedman, M.P., Lyons, M.J. and Ginsberg, H.S. (1970) Biochemical consequences of type 2 adenovirus and simian virus 40 double infections of African green monkey kidney cells. *J. Virol.* 5, 586-597.

- Galos, R.S., Williams, J., Binger, M.H. and Flint, S.J. (1979) Location of additional early gene sequences in the adenoviral chromosome. *Cell* 17, 945-956.
- Goldman, N.D., Howley, P. and Khoury, G. (1981) Functional interaction between the early viral proteins of simian virus 40 and adenovirus. *Virology* 109, 303-313.
- Huebner, R.J. (1967) Adenovirus-directed tumor and T-antigens. In: *Perspectives in Virology*. (Pollard, M., ed.), Vol. 5, pp. 147-166. Academic Press, New York.
- Kelly, T.J. and Lewis, A.M. (1973) Use of non defective adenovirus-simian virus 40 for mapping the simian virus 40 genome. *J. Virol.* 12, 643-652.
- Klessig, D.F. (1977) Isolation of a variant of human adenovirus serotype 2 that multiplies efficiently on monkey cells. *J. Virol.* 21, 1243-1246.
- Klessig, D.F. and Anderson, C.W. (1975) Block to multiplication of adenovirus serotype 2 in monkey cells. *J. Virol.* 16, 1650-1668.
- Klessig, D.F. and Chow, L.T. (1980) Incomplete splicing and deficient accumulation of the fiber messenger RNA in monkey cells infected by human adenovirus type 2. *J. Mol. Biol.* 139, 221-242.
- Klessig, D.F. and Grodzicker, T. (1979) Mutations that allow human Ad2 and Ad5 to express late genes in monkey cells map in the viral gene encoding the 72 K DNA binding protein. *Cell* 17, 957-966.
- Klessig, D.F. and Hassell, J.A. (1978) Characterization of a variant of human adenovirus type 2 which multiplies efficiently in simian cells. *J. Virol.* 28, 945-956.
- Kruijer, W., van Schaik, F.M.A., Speijer, J.G. and Sussenbach, J.S. (1983) Structure and function of adenovirus DNA binding protein: comparison of the amino acid sequences of the Ad5 and Ad12 proteins derived from the nucleotide sequence of the corresponding genes. *Virology* 128, 140-153.
- Lewis, A.M. Jr., Levin, M.J., Wiese, W.H., Crumpacker, C.S. and Henry, P.H. (1969) A nondefective (competent) adenovirus SV40 hybrid isolated from the Ad2-SV40 hybrid population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 63, 1128-1135.
- McDonnough, J.S. and Rekosh, D.M. (1982) Differential complementation of adenovirus type 5 temperature-sensitive early mutants by adenovirus types 3 and 12. *Virology* 120, 383-398.
- Mak, S. (1969) Transcription and replication of viral deoxyribonucleic acid in cells coinfecting with adenovirus types 2 and 12. *J. Virol.* 4, 651-656.
- Mak, S. and Mak, I. (1974) Viral DNA synthesis in cells infected with ultraviolet-irradiated human adenovirus type 2. *Biochim. Biophys. Acta* 340, 117-129.
- Patch, C.T., Howley, P.M., Hauser, J. and Levine, A.S. (1981) Kinetics of inhibition of papovavirus DNA synthesis by superinfection with adenovirus 2 and non-defective adenovirus 2-simian virus 40 hybrid viruses. *J. Gen. Virol.* 55, 355-365.
- Pettersson, U. and Höglund, S. (1969) Structural proteins of adenoviruses. III. Purification and characterization of the adenovirus type 2 penton antigen. *Virology* 39, 90-106.
- Philipson, L., Lonberg-Holm, K. and Pettersson, U. (1968) Virus-receptor interaction in an adenovirus system. *J. Virol.* 2, 1064-1075.
- Pina, M. and Green, M. (1969) Biochemical studies on adenovirus multiplication. XIV. Macromolecule and enzyme synthesis in cells replicating oncogenic and monogenic human adenovirus. *Virology* 38, 573-586.
- Rabson, A.S., O'Connor, G.T., Berezsky, I.K. and Paul, F.J. (1964) Enhancement of adenovirus growth in African green monkey kidney cell cultures by SV40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116, 187-190.
- Rowe, D.T. and Graham, F.L. (1981) Complementation of adenovirus type 5 host range mutants by adenovirus type 12 in coinfecting HeLa and BHK 21 cells. *J. Virol.* 38, 191-197.
- Sambrook, J., Sleigh, M., Engler, S.A. and Broker, T.R. (1980) The evolution of the adenovirus genome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 354, 426-452.
- Shimojo, H. and Yamashita, T. (1968) Induction of DNA synthesis by adenoviruses in contact-inhibited hamster cells. *Virology* 36, 422-433.
- Snustad, D.P. (1968) Dominance interactions in *E. coli* cells mixedly infected with bacteriophage T₄D wild type and amber mutants and their possible implications as to type of gene product function: catalytic vs stoichiometric. *Virology* 35, 550-563.
- Stillman, B.W., Topp, W.C. and Engler, J.A. (1982) Conserved sequences at the origin of adenovirus DNA replication. *J. Virol.* 44, 530-537.
- Sundquist, B., Everitt, E., Philipson, L. and Höglund, S. (1973) Assembly of adenoviruses. *J. Virol.* 11, 449-459.

380

- Van Roy, F. and Fiers, W. (1978) Interference with SV40 DNA replication by adenovirus type 2 during mixed infection of monkey cells. *J. Virol.* 27, 275-287.
- Wadell, G., Hammarskjöld, M.L., Winberg, G., Varsanyi, T.M. and Sundell, G. (1980) Genetic variability of adenoviruses. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 354, 16-42.
- Williams, J., Young, H. and Austin, P. (1975) Complementation of human adenovirus type 5 *ts* mutants by human adenovirus type 12. *J. Virol.* 15, 675-678.
- Winnacker, E.L. (1978). Adenovirus DNA replication. *Cell* 14, 761-773.

(Manuscript received 19 January 1984)

3. Discussion des résultats

L'analyse en gel (PAGE-SDS) des protéines tardives synthétisées lors de la coinfection de cellules simiennes (CV1) par l'Ad2 ND1, et l'Ad3 a montré que ce dernier empêche l'expression de l'Ad2 ND1, sans exprimer lui-même ses gènes tardifs (Figure 5-article- pistes b et l).

Parallèlement, la technique des gradients de saccharose alcalin a révélé l'absence de réplication de l'Ad3 dans les cellules CV1, BSC (issues de rein de singe vert africain) et LLC-MK2 (issues de reins de singe Rhésus) tandis que la lignée Vero (issue également des reins de singe vert africain) lui était permissive. La non permissivité à l'adénovirus de certaines lignées cellulaires, est une caractéristique propre de ces lignées et non une constante des cellules de certaines espèces animales.

Des essais de complémentation de l'Ad3 par le SV40 ont établi que non seulement le SV40 ne complète pas l'Ad3 dans les CV1 mais encore que la réplication du SV40 est inhibée par l'Ad3 (figure 2 article).

L'analyse en gradient de saccharose alcalin de l'ADN synthétisé lors de la coinfection de CV1 (ou BSC ou LLC-MK2) par l'Ad2 ND1 et l'Ad3 montre que l'Ad3 n'inhibe pas seulement la synthèse des protéines tardives d'Ad2 ND1 mais également la réplication de son ADN.

Le même type d'analyse réalisé sur des cellules coinfectées par l'Ad2 et l'un des sérotypes appartenant aux autres sous-groupes (3,7,4,9, 31) montre que tous inhibent la réplication de l'Ad2 ainsi que celle du SV40 (Figure 1 - article).

En fait, l'inhibition de l'Ad2 par les autres sérotypes ne dépend pas du type de lignée cellulaire utilisée. On observe une dominance de l'Ad2 par les autres sérotypes, que la lignée cellulaire leur soit permissive ou non (tableaux 2 et 3). Il ne semble donc pas possible de compléter les mutants des sérotypes du sous-groupe C par les sérotypes d'autres sous-groupes. Pourtant certains auteurs ont montré une faible complémentation entre des mutants d'Ad5 et d'Ad12. Il s'agit à cet effet du cas le plus favorable, l'inhibition de l'Ad5 par les sérotypes du sous-groupe A (Ad31) étant particulièrement faible (résultats non montrés). La dominance de l'Ad2 par d'autres sérotypes ne nécessite ni la réplication de l'ADN, ni l'expression des gènes tardifs de ces sérotypes (cas des CV1).

On pourrait penser que l'inhibition montrée par l'Ad3 vis à vis de l'Ad2 est due à sa forte cytotoxicité. En effet au delà d'une certaine multiplicité d'infection (20 pfu par cellule), l'Ad3 voit ses propres synthèses diminuer. En fait, l'inhibition n'est pas due à cette cytotoxicité :

- des particules virales d'Ad3, traitées à la trypsine perdent leur toxicité, (par dégradation de la base du penton) mais conservent leur pouvoir dominant sur l'Ad2 (Figure 6 - article).

- des particules vides d'Ad3 ne provoquent pas l'inhibition de l'Ad2 (Figure 6 - article).

- des sérotypes peu cytotoxiques, tels que l'Ad4 ou l'Ad9 dominant l'Ad2.

En revanche, le traitement du stock d'Ad3 par les rayons ultraviolets à 254 nm (agissant spécifiquement sur les acides nucléiques) provoque en même temps qu'une baisse de pouvoir infectieux, une réduction du taux d'inhibition (Figure 6). La dominance exercée par l'Ad3 fait donc intervenir un mécanisme virocodé.

Le traitement de cellules CV1 par l'Azacytidine à des concentrations bloquant les systèmes de méthylation (jusque 12 mM) ne permet ni la réplication de l'Ad3 ni n'empêche l'inhibition de l'Ad2 ND1 par l'Ad3 (non montré). La modification des taux de méthylation des gènes n'intervient donc pas dans le phénomène de dominance.

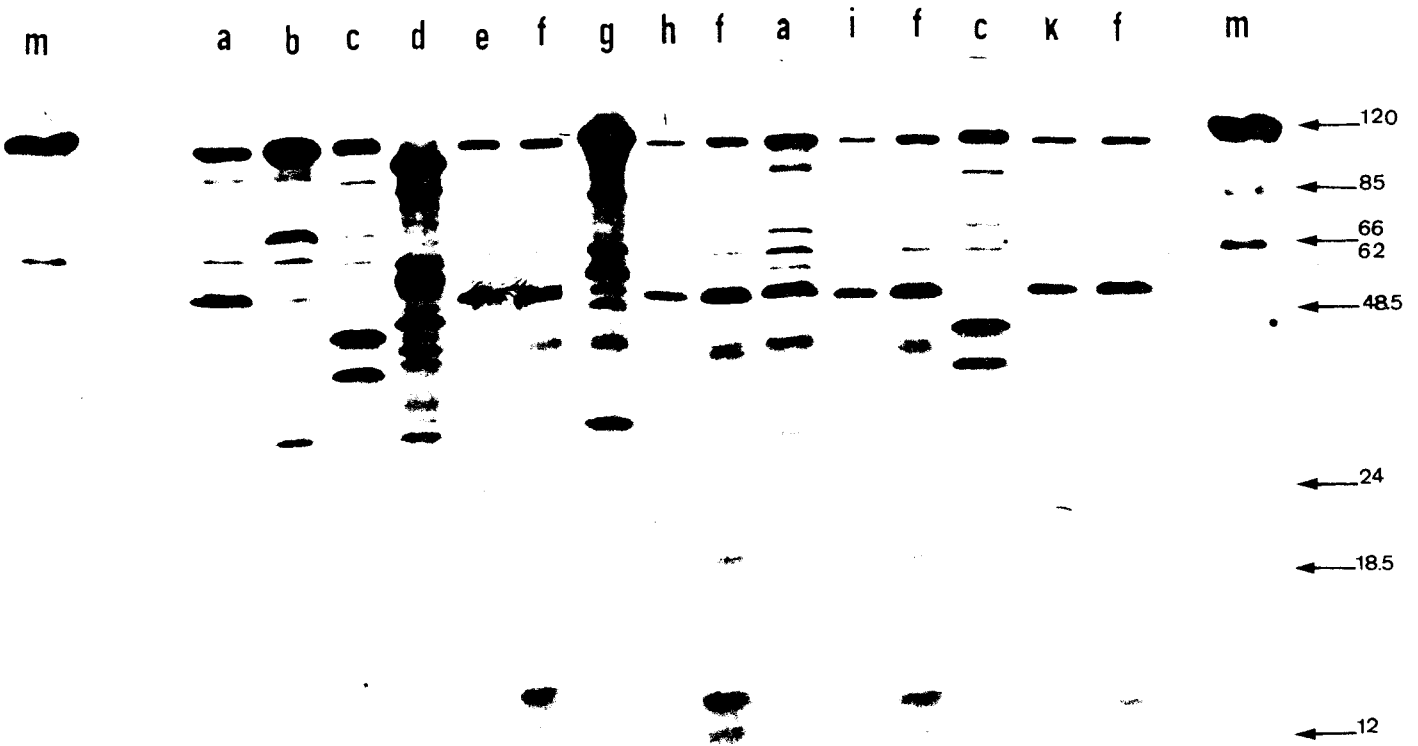
Des tests de coinfection réalisés à multiplicité d'infection constante d'Ad3 et variable d'Ad2 ou vice et versa, indiquent :

- une baisse de la synthèse d'ADN d'Ad2 proportionnelle à la multiplicité d'infection d'Ad3 (Figure 4A - article)

- une diminution de la production de protéines tardives et de particules virales (Figure 5 et 4B - article) également proportionnelle à la multiplicité d'infection d'Ad3.

L'inhibition de l'Ad2 par l'Ad3 est donc un phénomène compétitif, qui s'exprime au niveau des fonctions précoces de l'Ad3 puisque se produisant en dehors de la réplication et de la traduction des protéines tardives.

Enfin, nous avons mis en évidence un phénomène de dominance plus général existant entre les sérotypes des différents sous-groupes, manifeste au niveau de la synthèse des protéines tardives (Tableau 2 - article, et Figures 12 et 13) et de la réplication (Tableau 3 - article). L'ordre décroissant de dominance est le suivant : Ad3 et 7 (B), Ad9 (D), Ad4 (E), Ad31 (A), Ad2 et 5 (C). Cet ordre différent de celui classant les sérotypes selon leur pouvoir transformant (de A à E), permet d'affirmer qu'il n'existe pas de relation directe entre l'oncogénicité des adénovirus et leur pouvoir dominant.

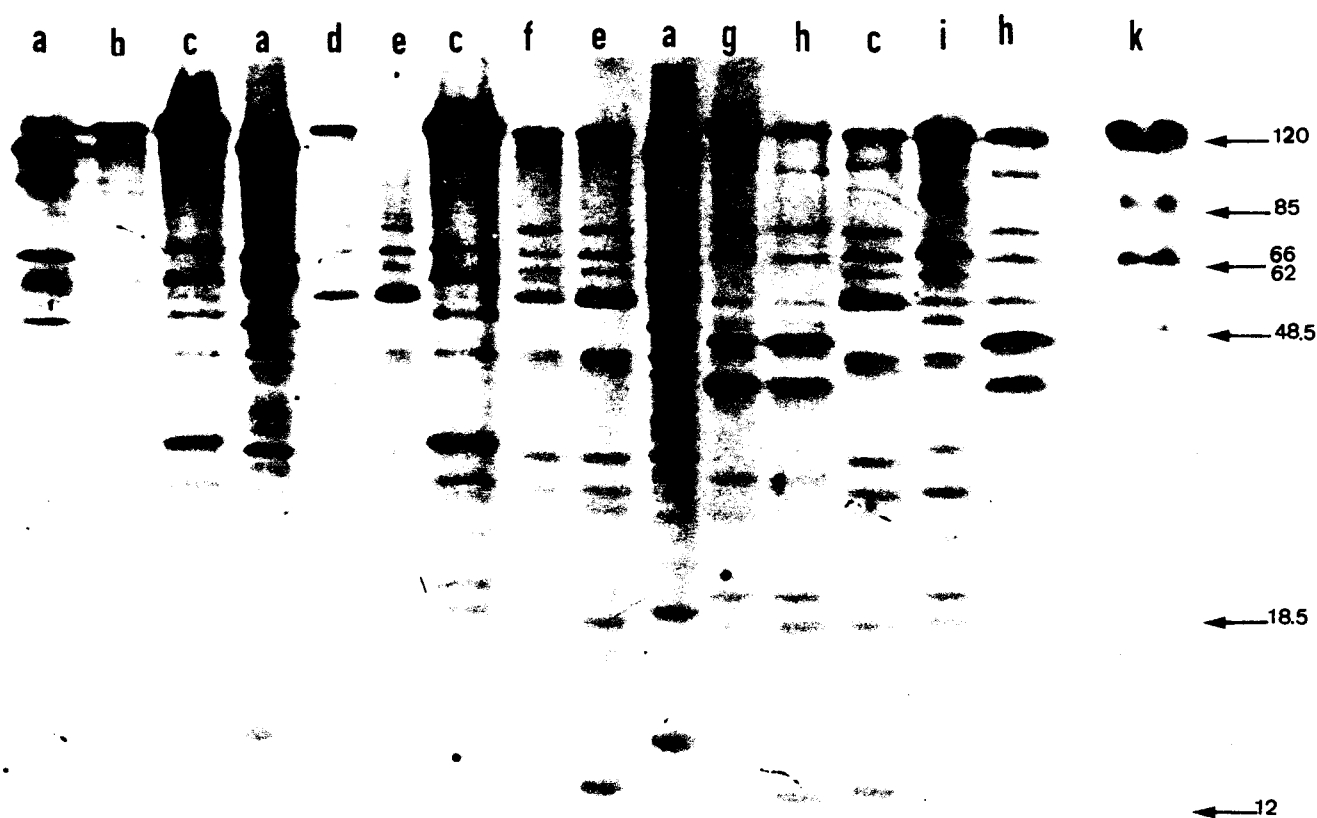


DOMINANCE INTERSEROTYPIQUE DANS LES CELLULES PERMISSIVES
HeLa AU STADE TARDIF

Polypeptides viraux extraits des cellules infectées par

- Ligne a : Ad7
- b : Ad4 + Ad7
- c : Ad 4
- d : Ad31
- e : Ad3 + 31
- f : Ad3
- g : Ad9
- h : Ad3 + 9
- i : Ad3 + 7
- k : Ad3 + 4
- m : Virus témoin Ad2 ^{14}C Formiate

FIGURE 12



DOMINANCE INTERSEROTYPIQUE DANS LES CELLULES PERMISSIVES
HeLa AU STADE TARDIF

Polypeptides viraux extraits des cellules infectées par

- Ligne a : Ad31
 b : Ad9 + 31
 c : Ad 9
 d : Ad7 + Ad31
 e : Ad7
 f : Ad7 + 9
 g : Ad4 + 31
 h : Ad4
 i : Ad4 + 9
 k : Virus témoin Ad ^{14}C Formiate

FIGURE 13

D. ANALYSE DU PHENOMENE DE TRANSDOMINANCE INTERSEROTYPIQUE

1. Introduction

Afin d'identifier la ou les zone(s) précoce(s) d'Ad2 affectée(s) par la co-infection avec l'Ad3, il était nécessaire d'une part d'isoler les ARN messagers transcrits lors des co-infections puisque l'inhibition d'Ad2 est due à l'expression d'un ou de plusieurs gènes précoces d'Ad3, seuls exprimés dans les CV1.

L'inhibition de la réplication d'Ad2 par l'Ad3 permettait de penser que la zone E2A (codant pour une protéine de 72 K impliquée dans la réplication) voyait son expression inhibée, directement par un produit de l'Ad3 ou indirectement par l'intermédiaire des zones d'expression plus précoces la régulant (E1A, E1B).

2. Résultats

2.1. Diminution de l'expression de la zone E2A d'Ad2

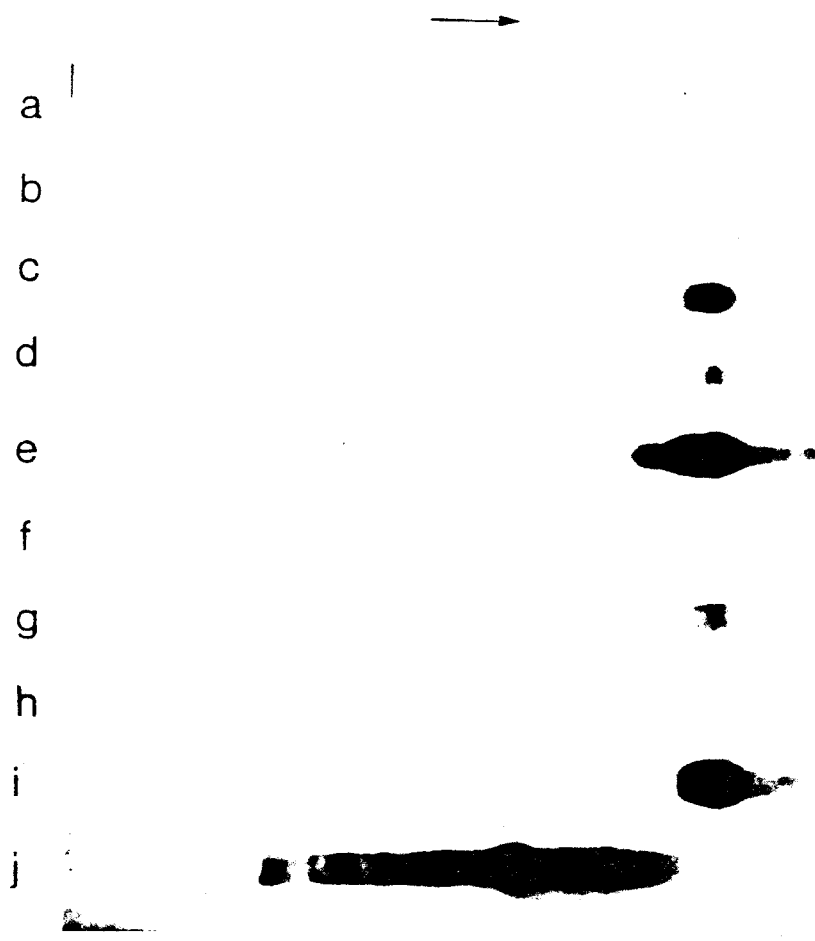
Dans le but de vérifier l'action inhibitrice de l'Ad3 sur la zone E2A d'Ad2 nous avons essayé de caractériser la baisse de transcription de cette zone, à partir d'une sonde spécifique de la zone E2A d'Ad2.

Nous avons d'abord sélectionné un fragment de la zone E2A d'Ad2 s'hybridant de la manière la plus spécifique possible avec les ARN messagers de E2A d'Ad2, c'est à dire sans interaction avec les ARN messagers de E2A d'Ad3.

Pour cela nous avons réalisé un test consistant à hybrider la zone E2A totale (61,5 à 66,6 UG), la partie C-terminale de la zone E2A (61,5 à 63,6 UG), et la partie N-terminale (63,6 à 65,9 UG) d'Ad2 avec la zone E2A d'Ad3 marquée à l'alpha ³²P-dCTP. Le résultat de cette hybridation montre que seule la partie N-terminale de la zone E2A/Ad2 ne s'hybride pas avec la sonde E2A/Ad3.

Nous avons donc utilisé la partie N-terminale de la zone E2A/Ad2 afin de révéler spécifiquement les ARN messagers d'E2A/Ad2 produits lors des coinfections par Ad2 et Ad3.

En vue de la production d'ARNm, les cellules étaient infectées par l'Ad2 (20 pfu), par l'Ad3 (20 pfu), ou à la fois par l'Ad2 (20 pfu) et l'Ad3 (5 ou 10 pfu). 6 heures après infection les cellules KB étaient récoltées par centrifugation puis les ARNm-extraits ainsi qu'il est décrit dans la partie "Matériels et Méthodes".



MISE EN EVIDENCE DES ARN MESSAGERS DE LA ZONE E2A/Ad2 LORS DE
COINFECTIONS DE CELLULES KB PAR L'Ad2 et l'Ad3
PAR HYBRIDATION AVEC UNE SONDE SPECIFIQUE DE LA ZONE E2A D'Ad2.

Ligne a : ADN d'Ad3/Xba I

Lignes (b,f) : ARNm d'Ad3 (10 pfu)

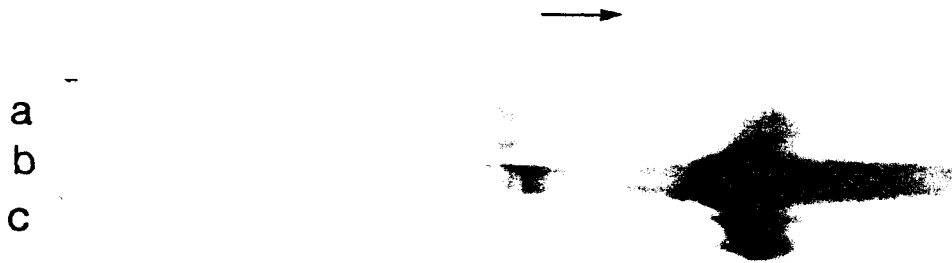
Lignes (c,g) : ARNm d'Ad2 + Ad3 (10 pfu/5 pfu)

Lignes (d,h) : ARNm d'Ad2 + Ad3 (10 pfu/10 pfu)

Lignes (e,i) : ARNm d'Ad2 (10 pfu)

Ligne j : ADN d'Ad2/Eco RI

FIGURE 14



DIMINUTION DE L'EFFET INHIBITEUR DE L'Ad3 SUR L'EXPRESSION DE LA
ZONE E2A D'Ad2 PAR TRAITEMENT A LA CYCLOHEXIMIDE

Ligne a : ARNm d'Ad3 extraits des cellules KB

Ligne b : ARNm de cellules KB coinfectées par l'Ad2 (10 pfu) et l'Ad3 (10
pfu) et traitées 3 heures post-infection à la cycloheximide (20 µg/ml)

Ligne c : ARNm de cellules KB coinfectées par l'Ad2 (10 pfu) et l'Ad3 (10
pfu)

FIGURE 15

Les ARNm polyadénylés sélectionnés par chromatographie sur oligo-dT cellulose, étaient ensuite séparés selon leur taille par électrophorèse en gel d'agarose (1,4 %) puis transférés sur une membrane biodyne (Northern blot) avant d'être mis en contact avec une sonde spécifique des ARNm de la zone E2A/Ad2.

Nous avons vérifié que cette sonde ne s'hybridait ni avec les fragments de restriction du génome d'Ad3, ni avec les ARNm de la zone E2A/Ad3 (Figure 14 pistes a, b, f). La coinfection des cellules provoque une réduction de la transcription de la zone E2A/Ad2 (Figure 14 pistes i, h ou d, e).

Cette réduction est proportionnelle à la multiplicité d'infection de l'Ad3. (Figure 15 pistes c-g, h-d).

Des essais de coinfection de cellules en présence de cycloheximide (additionnée 3 heures post-infection) à des concentrations inhibant toute traduction (25 µg/ml) montrent une très nette réduction de l'inhibition de la zone E2A/Ad2 par l'Ad3 (Figure 15 - pistes b et c).

2.2. Diminution de l'expression de la zone E1 d'Ad2

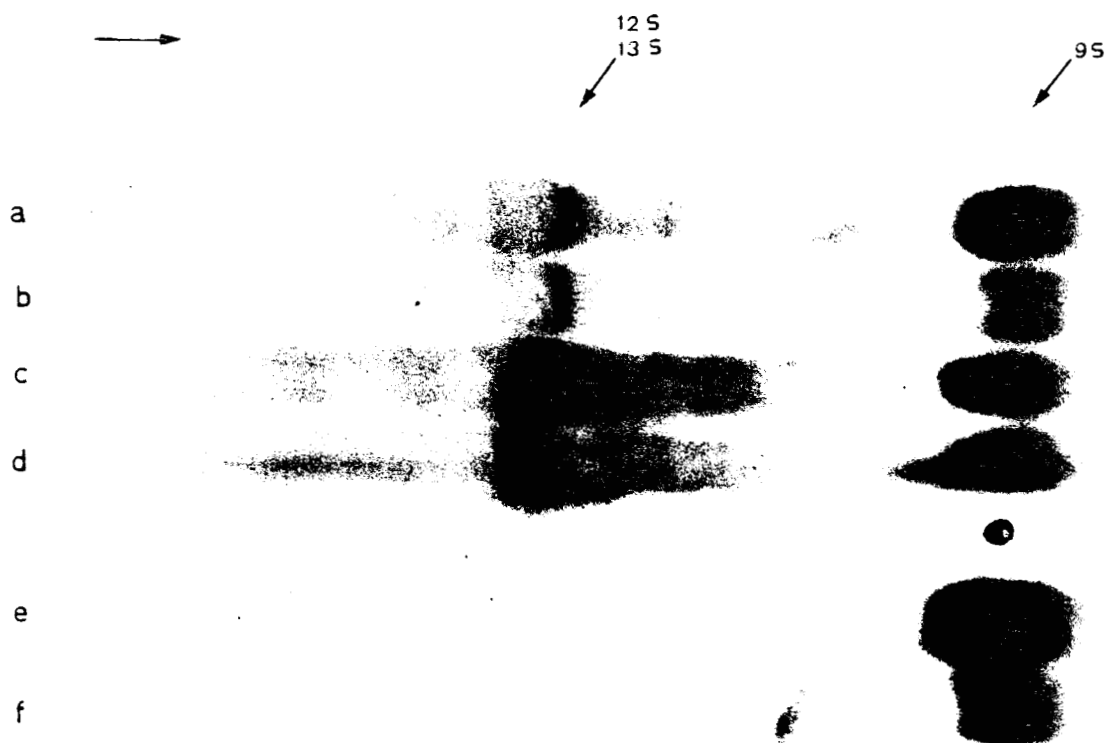
Le taux d'expression de la zone E2A d'Ad2 étant affecté par la présence d'Ad3, il était important de savoir si l'Ad3 agissait directement sur le promoteur de la zone E1A ou E1B. Nous avons tenté d'hybrider divers fragments des zones E1A et E1B d'Ad2 avec une sonde spécifique d'Ad2. Le fragment 2,6 à 4,5 UG de la zone E1A et le fragment 9,4 à 11,1 UG de E1B semblait s'hybrider faiblement respectivement avec la zone E1A et la zone E1B d'Ad3.

Nous avons réalisé l'extraction, la sélection et la séparation des ARNm selon leur masse et leur transfert sur une membrane biodyne, comme il est décrit dans la partie "matériels et méthodes". Les résultats de l'hybridation des ARN messagers ainsi préparés avec la sonde de la zone E1A d'Ad2, montrent que cette dernière n'est pas spécifique, révélant tant les ARNm d'Ad2 (Figure 16 pistes e et f), que les ARNm d'Ad3 (Figure 16 pistes c et d).

Il n'est donc pas possible par cette voie de connaître l'origine des ARNm mis en évidence dans les cellules lors des coinfections par Ad2 et Ad3 (Figure 16 pistes a et b).

La même expérience d'hybridation réalisée avec une sonde d'E1B/Ad2 et des ARNm précoces obtenus lors d'une coinfection par l'Ad2 et l'Ad3, montre que cette sonde n'est pas très spécifique des ARN messagers d'E1B/Ad2.

Toutefois, on peut observer que le test révèle surtout un ARNm 9 S dans



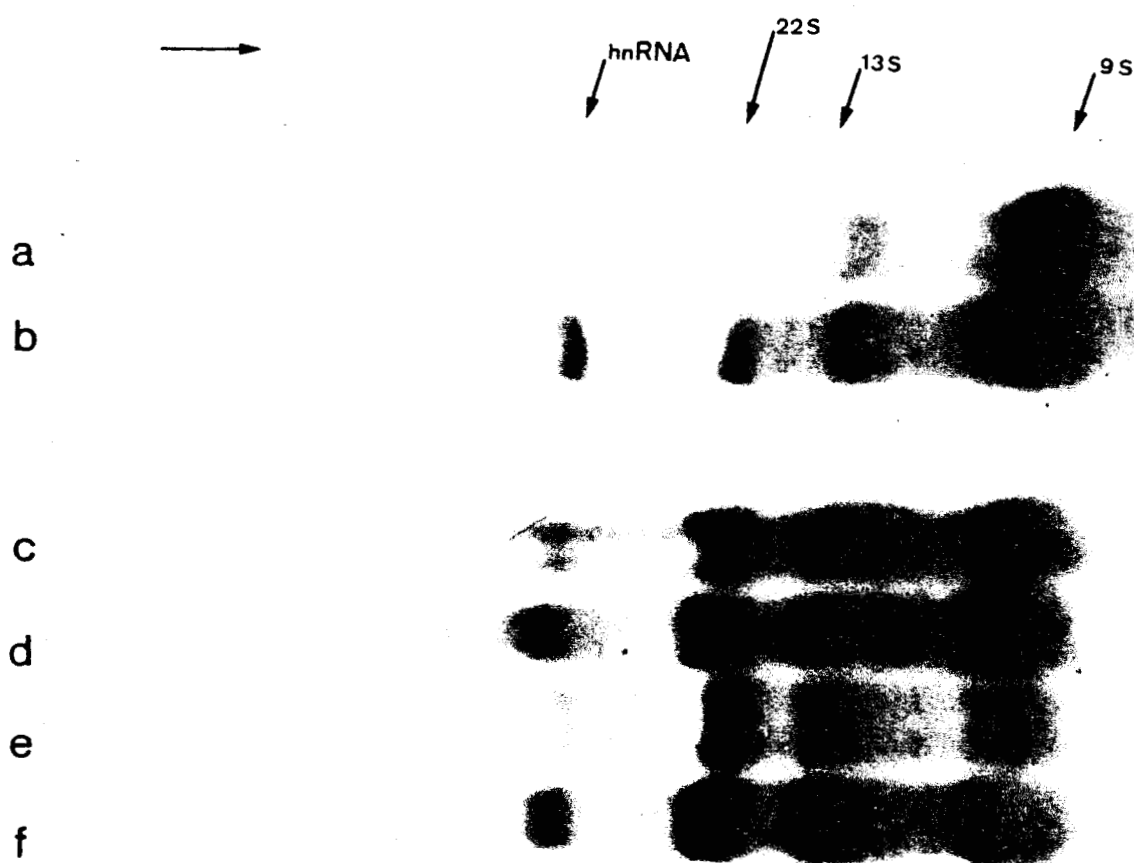
HYBRIDATION DE LA ZONE E1A (2,6 - 4,5 UG) D'Ad2 AVEC LES ARN MESSAGERS
PRECOCES D'Ad2 et d'Ad3

Lignes (a,b) : ARNm d'Ad2 + d'Ad3 extraits des cellules KB (5 h pi)

Lignes (c,d) : ARNm d'Ad3 extraits des cellules KB (5 h pi)

Lignes (e,f) : ARNm d'Ad2 extraits des cellules KB (5 h pi)

FIGURE 16



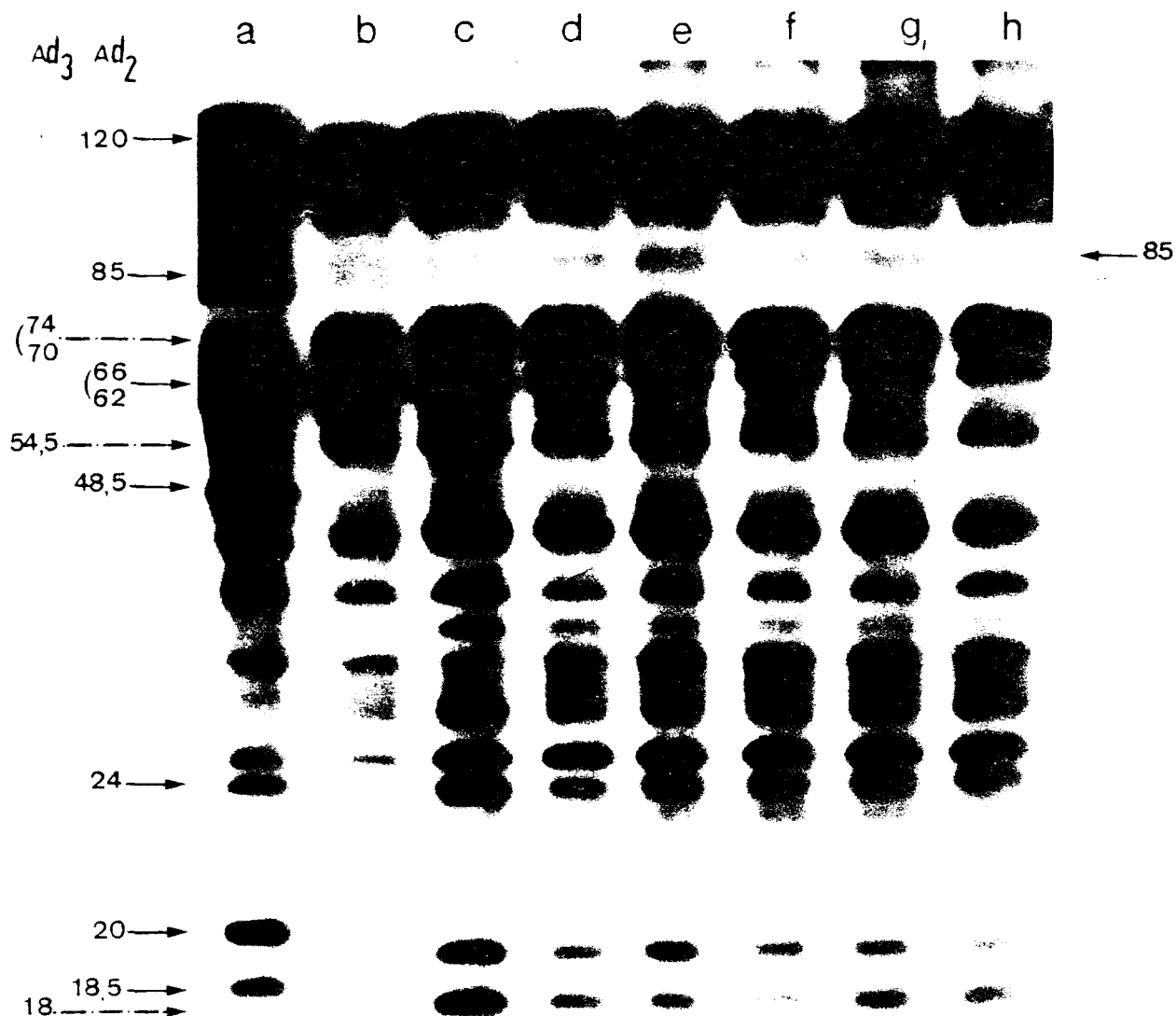
HYBRIDATION DE LA ZONE E1B' d'Ad2 AVEC LES ARN MESSAGERS PRECOCES
D'Ad2 et D'Ad3

Lignes (a,b) : ARNm d'Ad2 extraits des cellules KB (5 h pi)

Lignes (c,d) : ARNm d'Ad3 extraits des cellules KB (5 h pi)

Lignes (e,f) : ARNm d'Ad2 + d'Ad3 extraits des cellules KB (5 h pi)

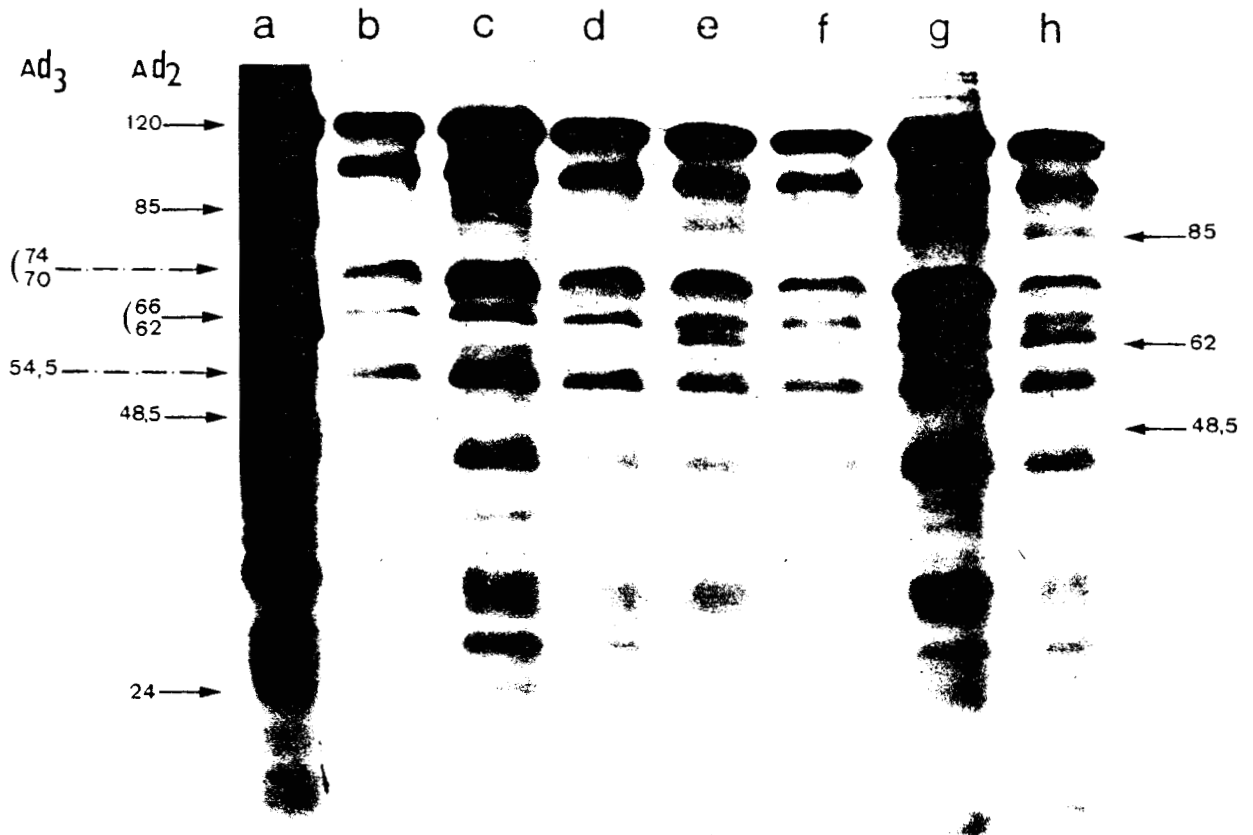
FIGURE 17



CINETIQUE D'INHIBITION DE L'Ad2 PAR L'Ad3 DANS DES CELLULES Hep II
 (la coinfection par Ad3 est réalisée à des temps (t) de 0 à 5 heures). LA LEVEE DE
 L'INHIBITION EST MISE EN EVIDENCE PAR ANALYSE DES PROTEINES PRESENTES A
 20 HEURES POST INFECTION

- Ligne a : polypeptides d'Ad2 (→)
 Ligne b : polypeptides d'Ad3 (←→)
 Ligne c : polypeptides d'Ad2 coinfecté simultanément par l'Ad3
 Ligne d : polypeptides d'Ad2 coinfecté au temps t = 1 heure par l'Ad3
 Ligne e : polypeptides d'Ad2 coinfecté au temps t = 2 heure par l'Ad3
 Ligne f : polypeptides d'Ad2 coinfecté au temps t = 3 heure par l'Ad3
 Ligne g : polypeptides d'Ad2 coinfecté au temps t = 4 heure par l'Ad3
 Ligne h : polypeptides d'Ad2 coinfecté au temps t = 5 heure par l'Ad3

FIGURE 18



CINETIQUE D'INHIBITION DE L'Ad2 PAR L'Ad3 DANS DES CELLULES HEK 293
 (la coinfection par Ad3 est réalisée à des temps (t) de 0 à 5 heures). LA LEVEE DE
 L'INHIBITION EST MISE EN EVIDENCE PAR ANALYSE DES PROTEINES PRESENTES A
 20 HEURES POST INFECTION

- Ligne a : polypeptides d'Ad2 (—→)
 Ligne b : polypeptides d'Ad3 (·-·-·-→)
 Ligne c : polypeptides d'Ad2 coinfecté simultanément par l'Ad3
 Ligne d : polypeptides d'Ad2 coinfecté au temps t = 1 heure par l'Ad3
 Ligne e : polypeptides d'Ad2 coinfecté au temps t = 2 heure par l'Ad3
 Ligne f : polypeptides d'Ad2 coinfecté au temps t = 3 heure par l'Ad3
 Ligne g : polypeptides d'Ad2 coinfecté au temps t = 4 heure par l'Ad3
 Ligne h : polypeptides d'Ad2 coinfecté au temps t = 5 heure par l'Ad3

On note la réapparition de la base du penton et de la fibre d'Ad2 dès la 2ème heure.

les pistes d'Ad2 infectant des KB (Figure 17, pistes a et b) alors qu'il révèle surtout un ARNm 22 S dans le cas de l'Ad3 (Figure 17, pistes c et d).

Le type de profil obtenu dans les pistes contenant des ARNm de cellules coinfectées par Ad2 et Ad3, (Figure 17, pistes e et f) correspond à celui observé dans les pistes contenant uniquement les ARNm d'Ad3.

La baisse du taux d'ARN messager 9 S et l'augmentation du taux d'ARN messager 22 S dans les pistes (e) et (f) par rapport aux pistes (a) et (b) (Figure 17) tend à prouver la synthèse préférentielle des ARNm d'Ad3 dans ces conditions. Il est donc probable que l'Ad3 inhibe l'expression de la zone E1B/Ad2 soit directement soit en inhibant la zone E1A d'Ad2.

D'autres expériences indiquent indirectement la participation de la zone E1A d'Ad2 au phénomène de dominance. Une cinétique d'inhibition, consistant en une première infection de cellules Hep II par l'Ad2 (20 pfu), suivie d'une surinfection par l'Ad3 (20 pfu) à des temps variables après la première infection montre un début de levée de la dominance sur l'Ad2. En effet, quand la surinfection a lieu 2 heures ou plus de 2 heures après l'infection, il y a synthèse de la base du penton de l'Ad2 (Figure 18, pistes e, f, g, h).

Une cinétique identique réalisée sur des cellules HEK 293 exprimant constitutivement la zone E1 d'Ad5 (capable de compléter les mutants d'Ad2 ayant une mutation dans cette zone) permet de constater une synthèse de la base du penton d'Ad2 plus nette, que dans le cas précédent et surtout la synthèse d'une protéine supplémentaire de 62 K, la fibre d'Ad2, migrant près d'une protéine d'Ad3 de 68 K, cette dernière appartenant à l'ensemble des polypeptides III, IIIa, et IV d'Ad3 (de masse moléculaire 68 K, 70 K, et 74 K) (Figure 19, pistes e, f, g, h, i) si la surinfection a lieu 2 heures ou plus après l'infection.

2.3. Transdominance et expression de gènes exogènes. Analyse préliminaire à l'aide d'un vecteur d'expression (système "CAT").

L'étude de l'inhibition de la zone E1A a été réalisée par une équipe de notre laboratoire (J.P. Leite) à l'aide du vecteur d'expression "chloramphénicol acétyl transférase" (GORMAN et al., 1982).

Ce vecteur consiste en un plasmide contenant le gène de résistance au chloramphénicol codant pour une protéine permettant de détoxifier cet antibiotique en l'acétylant. Le promoteur bactérien de ce gène a été remplacé par le promoteur de la zone E3 d'Ad2, lequel est sous le contrôle de la zone E1A d'Ad2.

La co-transfection de cellules humaines par ce vecteur et un plasmide contenant la zone E1A d'Ad2 permet la transcription du gène "CAT". L'expression du gène "CAT" dans ces conditions constitue la base du système, permettant de détecter l'influence de l'Ad3 sur la zone E1A d'Ad2.

Les cellules furent donc soumises à une transfection ou une co-transfection suivie d'une infection par l'Ad3. 40 heures post-transfection les cellules furent lysées et le surnageant de centrifugation du lysat fut incubé en présence de chloramphénicol radio-actif, dans le but de détecter le produit du gène "CAT". Des aliquotes de cette solution furent chromatographiées sur gel de silice. Le gel fut mis en impression durant 3 jours à - 70°C.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

	Gène "CAT" Précédé du promoteur de la zone E3/Ad2	Plasmide HE4 contenant la zone E1A/Ad2	Ad3	Activité "acétyl transférase"
(1)	+	0	0	+
(2)	+	+	0	+++
(3)	+	+	+	+
(4)	+	0	+	++
(5)	0	+	0	0

En l'absence de la zone activatrice E1A/Ad2 le gène "CAT" flanqué du promoteur de la zone E3 est peu actif (1).

Son activité est forte en présence de la zone E1A/Ad2, si l'Ad3 n'est pas présent (2)

L'Ad3 empêche l'activation du promoteur de la zone E3 d'Ad2, puisque sa présence en compagnie du plasmide HE4 (portant la zone E1A/Ad2) n'active pas le gène "CAT" (3)

En revanche l'Ad3 seul active légèrement le promoteur de la zone E3 d'Ad2 (4)

Ces résultats sont donc ambigus puisqu'ils présentent une activation directe du promoteur de la zone E3 par l'Ad3 et une inhibition indirecte de ce même promoteur par l'intermédiaire de la zone E1A d'Ad2. Cette expérience utilisant un vecteur d'expression de gène exogène ne permet donc pas d'affirmer le rôle de la zone E1A d'Ad2 dans le mécanisme d'inhibition de ce



sérotype par l'Ad3. D'autres études seront nécessaires à la détermination précise de la zone cible de l'inhibition provoquée par l'Ad3.

2.4. Discussion

Comme nous l'avons montré auparavant l'Ad3 inhibe de façon stochiométrique l'Ad2, par le biais de l'expression d'une ou de plusieurs de ses zones précoces.

L'inhibition de l'Ad2 par l'Ad3 agissant non seulement au niveau de la traduction des protéines tardives mais également au niveau de la réplication du génome viral, il fallait rechercher la cible de l'activité inhibitrice de l'Ad3 au niveau des zones précoces d'Ad2. La protéine 72 K/E2A étant directement impliquée dans la réplication du génome viral, il nous a semblé important d'étudier le taux d'expression de la zone E2A d'Ad2 au cours d'une coinfection avec l'Ad3.

L'expression des messagers de la zone E2A d'Ad2 s'est révélée inhibée de façon stochiométrique lors d'une coinfection avec l'Ad3 (Figure 14).

L'inhibition de la synthèse protéique par la cycloheximide empêche la réduction de l'expression de la zone E2A par l'Ad3 (Figure 15). Le phénomène de dominance a donc pour intermédiaire soit une protéine virale d'Ad3 soit une protéine cellulaire induite par l'Ad3 ou encore l'association de ces deux types de protéines.

L'inhibition de la transcription de la zone E2A/Ad2 par l'Ad3 nous a conduit à rechercher le médiateur de cette inhibition. Le produit d'une zone précoce d'Ad3 a-t-il une action directe sur le promoteur de la zone E2A/Ad2 ou bien inhibe-t-il une zone précoce régulant la zone E2A d'Ad2 ?

Les essais d'hybridation des ARN messagers obtenus dans les cellules KB coinfectées par l'Ad2 et l'Ad3, avec les sondes les plus spécifiques d'Ad2, ne fournissent pas de renseignement pour la zone E1A. En effet la sonde de la zone E1A/Ad2 révèle autant les ARNm d'Ad3 que ceux d'Ad2 (Figure 16). Il n'est donc pas possible par cette voie de savoir si la zone E1A d'Ad2 est réprimée par l'Ad3. En revanche les mêmes essais réalisés, avec une sonde de la zone E1B montrent que, même si cette dernière s'hybride autant avec les ARNm d'Ad3 qu'avec ceux d'Ad2, le profil des bandes révélées est différent dans les pistes contenant des ARNm d'Ad2 de celui des pistes contenant des ARNm d'Ad3. En effet, les ARNm 9 S prédominent dans le cas de l'Ad2, alors que c'est l'ARNm 22 S qui est le plus abondant dans le cas de l'Ad3

(Figure 17). On peut donc en déduire que vraisemblablement l'expression de la zone E1B d'Ad2 est inhibée par l'Ad3.

Les cinétiques d'inhibition de l'Ad2 par l'Ad3, montrent que l'Ad2 échappe au contrôle de l'Ad3, si la surinfection a lieu plus de 2 heures après la première infection (Figure 18). Ce résultat est encore plus net quand cette expérience est réalisée dans des cellules HEK - 293 exprimant constitutivement la zone E1 d'Ad5 (qui peut compléter l'Ad2). L'échappement de l'Ad2 est ici à la fois plus prompt et plus fort (Figure 19).

Ces résultats indiquent indirectement que la cible de l'Ad3 est la zone E1A. En effet seule la zone E1A est capable de s'exprimer quantitativement durant les 2 ou 3 premières heures de l'infection.

BERNARDS et al. (1983), montrent que la zone E1B d'Ad5 peut être remplacée dans le génome lors d'une recombinaison, par la zone E1B d'Ad12 sans altérer le cycle lytique de ce virus. D'autre part des travaux menés dans notre laboratoire, par J.P. Leite, au moyen du système "chloramphénicol acétyl transférase" indiquent une légère activation du promoteur de la zone E2A/Ad2 par le produit de la zone E1A/Ad3 (action en trans).

Cela nous incite à penser que la zone E2A/Ad2 n'est inhibée ni directement par le produit de la zone E1A/Ad3, ni par l'intermédiaire de la zone E1B/Ad2, mais plutôt par manque de synthèse de l'activateur de E2A, un produit de la zone E1A, dont l'expression serait inhibée par l'Ad3.

Dès lors il était nécessaire de connaître l'expression des zones précoces d'Ad3 dans les cellules simiennes CV1 afin de savoir si l'inhibition de l'Ad2 par un produit précoce de l'Ad3 était un phénomène général indépendant de la lignée cellulaire. Nous avons vérifié, par comparaison avec les messagers obtenus dans les cellules permissives KB, que les ARNm synthétisés par l'Ad3 dans les CV1 qui se sont révélés normaux en espèces et en taux de transcription pour les zones E1A, E1B, E2A et E3 (Figures 8, 9, 10, 11).

L'Ad3 accomplit donc un cycle abortif dans les CV1, de nature semblable à celui mis en évidence par GROFF et DANIELL (1981) dans les cellules de hamster (BHK 21). En effet, ces auteurs ont montré une expression normale des principaux messagers des zones précoces d'Ad3 (E1,E2,E3,E4) dans les BHK 21 en l'absence totale de répllication de son ADN.

Nos résultats (Virus Research 1, 1984, 365-380) indiquent l'absence de répllication des sérotypes du sous-groupe A (Ad31) et du sous-groupe B (Ad3 et Ad7) dans les cellules de singe CV1.

Le même type de comportement des membres du sous-groupe A (Ad12) (ORTIN et al., 1976) et du sous-groupe B (Ad3) a été observé dans les BHK 21. Il n'est donc pas exclu que l'absence de répllication des Ad3, Ad7, et

Ad31, Ad12 dans les CV1 et les BHK 21, ne soit liée en partie au pouvoir oncogène de ces sérotypes.

D'autres travaux réalisés dans le but de caractériser les types de relations existant entre les adénovirus des sous-groupes A à E et certaines lignées cellulaires ont permis de les ordonner en 3 classes.

- les sérotypes 4 (sous groupe E) et 9 (D) répliquent leur génome ni dans les cellules CV1 (Figure 1 - article). Ils ne synthétisent pas de polypeptide tardif que ce soit dans les cellules simiennes CV1 ou dans les BHK 21 (résultats non montrés).

- le sérotype 3, 7 (B) et 12,31 (A) ne répliquent leur génome ni dans les cellules CV1 ni dans les BHK 21.

- le sérotype 2 (C) réplique son génome efficacement dans les CV1 et les BHK 21, produit des polypeptides tardifs dans les CV1, et des particules virales dans les BHK 21.

Il semble donc que le comportement des adénovirus ne dépendent pas de l'espèce animale à laquelle appartient la cellule hôte, dans les cas présentés (comportement voisin dans les CV1 et les BHK 21 comportement très différent entre les Vero et les CV1 issues de la même espèce) mais surtout du sous-groupe auquel appartient le sérotype.

On observe en effet une gradation dans l'expression du génome d'adénovirus dans les CV1, entre les sous-groupes A et B ne répliquant pas leur génome, les sous-groupes D et E répliquant leur ADN sans produire de protéines tardives et le sous-groupe C capable de produire des protéines tardives, mais pas de particule virale.

C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S

Nous avons mis en évidence un phénomène de dominance de l'Ad2 par l'Ad3. Cette dominance initialement perçue au niveau de la production virale, de la traduction des protéines tardives, et de la réplication du génome d'Ad2, s'est avérée impliquée dans l'inhibition stoechiométrique des zones précoces E1B, E2A et probablement E1A d'Ad2.

Le mécanisme de cette dominance fait intervenir un produit d'expression précoce de l'Ad3, puisqu'il agit en dehors de la réplication de l'Ad3, mais dans le cadre d'une traduction cellulaire normale.

Un phénomène de dominance plus général, se manifeste entre les sérotypes des sous-groupes étudiés (A à E) sans qu'il existe de relation évidence entre le pouvoir transformant et le pouvoir dominant de ces sérotypes.

Nous avons également caractérisé le comportement des adénovirus des sous-groupes A à E vis à vis de différentes lignées cellulaires.

Nous avons ainsi pu montrer que les adénovirus ont 3 types de cycle dans les cellules simiennes CV1 :

- les sérotypes 31 (A) et 3,7 (B) n'y répliquent pas leur ADN;
- les sérotypes 9 (D) et 4 (E) répliquent leur ADN mais n'y synthétisent pas de protéines tardives;
- le sérotype 2 (C) y synthétise des protéines tardives.

Un comportement voisin est retrouvé dans les cellules de hamster BHK 21 où seul l'Ad2 synthétise des protéines tardives, et produit des particules virales.

La nature du cycle viral d'un sérotype dépend donc du sous-groupe auquel il appartient, de la lignée cellulaire hôte et non obligatoirement de l'espèce animale dont cette lignée est issue.

Nos résultats permettent d'envisager plusieurs voies d'étude à court et à moyen termes.

Dans un proche avenir il faudrait déterminer le taux d'inhibition de la zone E1A/Ad2 par l'Ad3, que ce soit par une technique d'hybridation plus fine que celle utilisée jusqu'alors ou par le système d'expression du gène "chloramphénicol acétyl transférase". Les transfections géniques massives de cellules n'ayant rien de physiologique, sur le plan des relations hôte-virus, ces deux types d'approche seront sans doute complémentaires.

A plus long terme, il serait souhaitable de découvrir la nature précise du produit de la zone E1A d'Ad3 agissant sur l'expression de l'Ad2. Il est vraisemblable que la protéine d'Ad3, inhibant l'Ad2 agit sur le promoteur de la

zone E1A d'Ad2. Une protéine se fixant spécifiquement sur ce promoteur ne peut être qu'une protéine de régulation de la zone E1A d'Ad3, c'est-à-dire se fixant sur le promoteur de cette zone. Une telle protéine pourrait correspondre à l'un des produits majeurs de E1A d'Ad3, dont on sait qu'il se fixe sur le promoteur de cette zone. Un des candidats à cette fonction serait donc la protéine équivalente à celle de 289 aa codée par E1A d'Ad2 et qui effectue sa propre activation (OSBORNE et al., 1984). Il conviendrait donc de cloner l'ADN complémentaire du messenger de cette protéine, qui flanqué du promoteur de E1A, permettrait de vérifier son activité sur l'expression de l'Ad2 dans le système "chloramphénicol acétyl transférase".

Dans ce même cadre il serait souhaitable d'identifier la cible de la protéine inhibitrice d'Ad3. Il est probable que cette zone d'action est le promoteur ou une séquence activatrice ("enhancer") de la zone E1A d'Ad2, bien qu'il soit difficile de comprendre pourquoi la protéine d'Ad3 active son propre promoteur et inhibe celui de la zone E1A d'Ad2. Il faudrait vérifier que l'Ad3 ne stimule pas en fait, l'expression d'une protéine de E1A régulant négativement les autres zones précoces de l'Ad2, ce qui rendrait caduques les hypothèses précédentes.

Enfin, il serait bon de connaître la nature du blocage de la transcription ou de la traduction des zones tardives des sérotypes 4 et 9 dans les CV1. A cet effet, il faudrait obtenir des mutants de la partie N-terminale de la 72 K/E2A semblables à ceux autorisant la production normale des protéines tardives d'Ad2 dans les CV1.

A P P E N D I C E T E C H N I Q U E

M A T E R I E L S E T M E T H O D E S

1. Cultures cellulaires et virales (Cf. article)
2. Marquage et analyse de l'ADN des cellules infectées (Cf. article)
3. Marquage des polypeptides de cellules infectées (Cf. article)
4. Utilisation d'enzymes (Cf. article)
5. Purification des ARN messagers des cellules infectées (GLISIN et al., 1974)

Les cellules infectées sont centrifugées. Le culot cellulaire est lavé dans l'eau physiologique, puis centrifugé. Les cellules sont lysées dans un tampon.

- chlorhydrate de guanidine 6 M
- acétate de sodium/acide acétique (pH = 5) 0,1 M
- EDTA 5 mM

Le lysat cellulaire est déposé sur une couche de 4 ml du tampon suivant :

- chlorure de césium de densité finale $d = 1,7$
- acétate de sodium/acide acétique (pH = 5) 0,1 M
- EDTA 5 mM

La centrifugation a lieu dans un rotor SW41, à 28 000 tours/mn, pendant 18 h à 20°C.

Le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est repris dans un tampon

- Tris-HCl 10 mM (pH 7)
- EDTA 1 mM

Après précipitation à l'éthanol, les messagers poly A⁺ sont sélectionnés sur oligo-dT-cellulose (SIGMA) puis reprécipités à l'éthanol. Le culot des messagers est alors dénaturé dans les conditions suivantes : (Mc MASTER & CARMICHAEL, 1977).

- . glyoxal 6M 17 %
- . Diméthylsulfoxyde 50 %
- . Phosphate Na/Na₂ (pH = 7) 0,1 M 10 %
- . Solution d'ARN 23 %

La solution d'ARN messagers est agitée puis incubée à 50° C pendant 1 heure.

6. Electrophorèse

Les messagers sont séparés selon leur taille par une électrophorèse en gel d'agarose 1,4 %. La cuve d'électrophorèse doit permettre la circulation du tampon (0,01 M phosphate) nécessaire à la stabilité du pH.

7. "Northern blot"

Les messagers sont transférés du gel d'agarose à une membrane Biodyne A (Pall) par la méthode de Thomas (1980). La membrane Biodyne est ensuite soumise à une température de 80° C pendant 1 heure afin d'y fixer par covalence les ARN messagers transférés.

8. Préparation des sondes d'hybridation

a) préparation des fragments d'Ad3

- Zone E1A (0 à 4,5 UG) à partir du fragment Eco RI - Bgl II (0 - 4,5) du pVM 303 dont l'insertion (0,15 à 17,5 UG) est introduite dans la délétion Cla I - Sal I du pKH 47 (VERCAMER, 1984).

- Zone E1B (4,5 à 11,2 UG) à partir du fragment Bgl II (4,5 - 11,2 UG) du pVM 303.

- Zone E2A (61,5 à 66,6 UG) à partir du fragment Kpn I (59,9 - 68,9 UG) du pVM302 dont l'insertion (59,9 - 85,4 UG) a lieu dans la délétion Eco RI - Kpn I du pSM 804 (VERCAMER, 1984).

- Zone E3 (76 à 86 UG) à partir du fragment Bst EII - Eco RI (75,4 - 85,4 UG) du pVM 302.

- Zone E4 (91 à 99 UG) à partir du fragment B d'Eco RI sur le génome d'Ad3 (87 - 100 UG).

b) Préparation des fragments d'Ad2

- Zone E1A (0 à 4,5 UG) à partir du fragment Sma I - Hpa I (2,6 à 4,5 UG) du pVM 526. Le pVM 526 contient une insertion de 0 à 17,2 UG de l'ADN d'Ad2 entre les sites Pst I et Pvu I du pBR 322. Ce plasmide a été construit par l'insertion du fragment Xba I (3,8 UG), Pvu I (17,2 UG) dans le plasmide HE4.

- Zone E1B (4,7 à 11,2 UG) à partir du fragment Bgl II - Sma I (9,4 à 11,1 UG) du pVM 520 dont l'insertion (9,4 à 17,0 UG d'Ad5 et 42 à 45,3 UG d'Ad2) est dans la délétion Bam HI - Hind III du pKH 47.

- Zone E2A (61,5 à 66,6 UG) à partir du fragment Bgl II - Eco RI (63,6 à 65,9 - 75,8 à 17,9 UG) du pVM 509 dont l'insertion (59,5 à 65,9 - 75,8 à 75,9 UG) a lieu dans la délétion Bam HI - Eco RI du pKH 47 (D'HALLUIN et al., 1984).

c) Marquage des sondes

Les fragments d'ADN sont marqués à l'alpha ^{32}P dCTP (NEN) à partir d'un kit de marquage par "nick translation" (Amersham) puis purifiés par gel filtration (résine G50) (MANIATIS et al., 1975).

9. Hybridation

Le "blot" subit une préhybridation de 12 heures à 42° C dans le tampon suivant :

- . 5 XSSPE (1)
- . 5 X Denhardt's (2)
- . 0,3 % SDS
- . 250 µg d'ADN non homologue dénaturé thermiquement
- . 50 % de formamide

(1) tampon SSPE X 20 : 3,6 NaCl

0,2 M phosphate Na/Na₂ pH 8,3

0,02 M EDTA

(2) tampon Denhardt's X 100 2 % ficoll

2 % polyvinylpyrrolidone

2 % de sérum albumine bovine

L'hybridation a lieu dans le même tampon auquel on ajoute la sonde marquée à l'alpha ^{32}P -dCTP, dénaturée thermiquement.

10. Utilisation du vecteur d'expression "CAT gene"

Les cellules sont transfectées selon la méthode de GRAHAM et al. (1974) à raison de 10 µg de chaque plasmide par boîte de 5 millions de cellules. 40 heures post-transfection les cellules sont lysées aux ultra-sons dans les 100 µl de tampon Tris 25 mM (pH = 7,8). Le lysat est centrifugé et une fraction du surnageant est incubée dans les conditions suivantes : (selon GORMAN et al., 1982).

- 20 µl de surnageant
- 70 µl de Tris 1 M (pH = 7,8)
- 35 µl d'H₂O
- 20 µl d'acétyl-coenzyme A (Boehringer)
- 5 µl de chloramphenicol ¹⁴C (NEN)

L'incubation dure 30 mn à 37° C et est suivie d'une extraction du chloramphénicol par l'acétate d'éthyl.

Après évaporation de la phase organique, le chloramphénicol est redissous dans 20 µl d'acétate d'éthyl et déposé sur un gel de silice (Merck) et la chromatographie ascendante a lieu dans le solvant CHCl₃/Ethanol (95 V/5V).

Le gel est mis au contact d'une plaque photo pendant 3 jours à - 70°C avant révélation.

B I B L I O G R A P H I E

AKUSJARVI, G. and PERSSON, H. (1981a).

Gene and mRNA for precursor polypeptide VI from adenovirus type 2.

J. Virol., 38, 469.

AKUSJARVI, G. and PERSSON, H. (1981b).

Controls of RNA splicing and termination in the major late adenovirus transcription unit.

Nature, 292, 420.

AKUSJARVI, G., PHILIPSON, L. and PETTERSSON, U. (1978).

A protein kinase associated with adenovirus type 2.

Virology, 87, 276.

ALESTROM, P., AKUSJARVI, G., PERRICAUDET, M., MATHEWS, M.B., KLESSIG, D.F., and PETTERSSON, U. (1980).

The gene for polypeptide IX of adenovirus type 2 and its unspliced messenger RNA.

Cell, 19, 671.

ANDERSON, C.W. (1981).

Spontaneous mutants of the adenovirus simian virus 40 hybrid. Ad2⁺ND3 that grow efficiently in monkey cells.

Virology, 111, 263.

ANDERSON, C.W., BAUM, P.R., and GESLELAND, R.F. (1973).

Processing of adenovirus 2 induced proteins.

J. Virol., 12, 241.

ANDERSON, C.W., HARDY, M.H., DUNN, J.J., and KLESSIG, D.F. (1983).

Independent, spontaneous mutants of adenovirus type 2-SV40 hybrid Ad2⁺ND3 that grow efficiently in monkey cells possess identical mutations in the adenovirus type 2 DNA Binding Protein gene.

J. Virol., 48, 31.

ANDERSON, K.P., and KLESSIG, D.F. (1984).

Altered mRNA splicing in monkey cells abortively infected with human adenovirus may be responsible for inefficient synthesis of the virion fiber polypeptide.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4023.

ANDERSON, K.P., and KLESSIG, D.F. (1983).

Post-transcriptional block to synthesis of a human adenovirus capsid protein in abortively infected monkey cells.

J. Appl. Gen., 2, 31.

ANTOINE, G., ALESTROM, P., SCHILLING, P., PETTERSSON, U., and WINNACKER, E.L. (1982).

Defective expression of mouse adenovirus FI in human cells.

EMBO Journal, 1, 453.

ARIGA, H., KLEIN, H., LEVINE, A.J., and HORWITZ, M.S. (1980).

A cleavage product of the adenoviral DNA Binding Protein is active in DNA replication in vitro.

Virology, 101, 307.

ARRAND, J.R., and ROBERTS, R.J. (1979).

The nucleotide sequence of the termini of adenovirus-2 DNA.

J. Mol. Biol., 128, 577.

BABICH, A., and NEVINS, J.R. (1981).

The stability of early adenovirus mRNA is controlled by the viral 72 K DNA Binding Protein.

Cell, 26, 371.

BABISS, L.E., YOUNG, C.S.H., FISHER, P.B., and GINSBERG, H.S. (1983).

Expression of adenovirus E1A and E1B gene products and the E. coli XGPRT gene in KB cells.

J. Virol., 46, 454.

BABISS, L.E., and GINSBERG, H.S. (1984).

Adenovirus type 5 early region 1B gene product is required for efficient shut off of host protein synthesis.

J. Virol., 50, 202.

BAKER, C.C., HERISSE, J., COURTOIS, G., GALIBERT, F. and ZIFF, E. (1979).

Messenger RNA for the Ad2 DNA Binding Protein : DNA sequences encoding the first leader and heterogeneity at the mRNA 5' end.

Cell, 18, 569.

BAKER, C.C., and ZIFF, E.B. (1980).

Biogenesis, structures and sites encoding the 5'-termini of adenovirus 2 mRNAs.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 44, 415.

BAKER, C.C., and ZIFF, E.B. (1981).

Promoters and heterogeneous 5' termini of the messenger RNAs of adenovirus serotype 2.

J. Mol. Biol., 149, 189.

BERGER, J., BURNETT, R.M., and FRANKLIN, R.M., and GRUTTER, M. (1978).

Small angle X-ray scattering studies on adenovirus type 2 hexon.

Biochem. Biophys. Acta, 535, 233.

BERGMA, D.J., OLIVE, D.M., HARTZELL, S.W., and SUBRAMANIAN, K.N. (1982).

Territorial limits and functional anatomy of the SV40 replication origin.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 79, 381.

BERK, A.J., LEE, F., HARRISON, T., WILLIAMS, J., SHARP, P.A. (1979).

Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs.

Cell, 17, 1935.

BERK, A.J., and SHARP, P.A. (1978).

Structure of adenovirus 2 early mRNAs.

Cell, 14, 695.

BERKNER, K.L., and SHARP, P.A. (1983).

Generation of adenovirus by transfection of plasmids.

Nucl. Acids Res., 11, 6003.

BERNARDS, R., LEEUW, M.G.W., VAESSEN, J.J., HOUWELING, A., and Van der EB, A.J. (1984).

Oncogenicity by adenovirus is not determined by the transforming region only.

J. Virol., 50, 847.

BERNARDS, R., SCHRIER, P.I., BOS, J.L., and van der EB, A.J. (1983).

Role of adenovirus types 5 and 12 early region 1B tumor antigens in oncogenic transformation.

Virology, 127, 45.

BHADURI, S., RASKAS, H.J., and GREEN, M. (1972).

Procedure for the preparation of milligram quantities of adenovirus messenger RNA.

J. Virol., 10, 1126.

BLACK, P.H., and ROWE, W. (1963).

SV40 induced proliferation of tissue culture cells of rabbit mouse and porcine origin.

Proc. Soc. Exp. Biol., 114, 721.

BLANTON, R.A., and CARTER, T.H. (1979).

Autoregulation of adenovirus type 5 early gene expression. III. Transcription studies in isolated nuclei.

J. Virol., 29, 458.

BOS, J.L., JOCHEMSEN, A.G., BERNARDS, R., SCHRIER, P.I., van ORMONDT, H., and van der EB, A.J. (1983).

Deletion mutants of region E1A of Ad12 E1 plasmids : effect on oncogenic transformation.

Virology, 129, 393.

BOS, J.L., POLDER, L.J., BERNARDS, R., SCHRIER, P.I., van den ELSEN, P.J., van der EB, A.J., and van ORMONDT, H. (1981).

The 2.2 Kb E1B mRNA of human adenovirus 12 and Ad5 codes for 2 tumor antigens starting at different AUG triplets.

Cell, 27, 121.

BOUDIN, M.L., and BOULANGER, P. (1982).
Assembly of adenovirus penton base and fiber.
Virology, 116, 589.

BOUDIN, M.L., D'HALLUIN, J.C., COUSIN, C., and BOULANGER, P. (1980).
Human adenovirus type 2 protein IIIa. II. Maturation and encapsidation.
Virology, 101, 144.

BOULANGER, P., LEMAY, P., BLAIR, G.E., and RUSSELL, W.C. (1979).
Characterization of adenovirus protein IX.
J. Gen. Virol., 44, 783.

BURLINGHAM, B.T., DOERFLER, W., PETTERSSON, U., and PHILIPSON, L. (1971).
Adenovirus endonuclease : Association with the penton of adenovirus type 2.
J. Mol. Biol., 60, 45.

CARTER, T.H., and BLANTON, R.A. (1978).
Autoregulation of adenovirus type 5 early gene expression. II. Effect of temperature sensitive. Early mutations on virus RNA accumulation.
J. Virol., 28, 450.

CEPKO, C.L., and SHARP, P.A. (1983).
Abberant distribution of human Ad2 late proteins in monkey kidney cells.
J. Virol., 46, 302.

CHALLBERG, M.D., DESIDERIO, S.V., and KELLY, T.J.Jr. (1980).
Adenovirus DNA replication in vitro : characterization of a protein covalently linked to nascent DNA strands.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 505.

CHALLBERG, M.D., and KELLY, T.J. (1981).

Processing of the adenovirus terminal protein.

J. Virol., 38, 272.

CHALLBERG, M.D., OSTRONE, J.M., and KELLY, T.J. Jr. (1982).

Initiation of adenovirus DNA replication : detection of covalent complexes between nucleotide and 80 KD of terminal protein.

J. Virol., 41, 195.

CHALLBERG, S.S., and KETNER, G. (1981).

Deletion mutants of adenovirus 2 : isolation and initial characterization of virus carrying mutations near the right end of the viral genome.

Virology, 114, 196.

CHENG, C., and PRASZKIER, J. (1982).

Regulation of type 5 adenovirus replication in murine teratocarcinoma cell lines.

Virology, 123, 45.

CHINNADURAI, G. (1983).

Adenovirus 2 $1p^+$ locus codes for a 19 K tumor antigen that plays an essential role in cell transformation.

Cell, 33, 759.

CHOW, L.T., BROKER, T.R., and LEWIS, J.B. (1978).

The spliced structures of adenovirus 2 fiber message and the other late mRNAs.

Cell, 15, 497.

CHOW, L.T., and BROKER, T.R. (1979).

Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus 2.

J. Mol. Biol., 134, 265.

CHOW, L.T., GELINAS, R.E., BROKER, T.R., and ROBERTS, R.J. (1977).

An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus messenger RNA.

Cell, 12, 1.

CORDEN, J., ENGELKING, H.M., and PEARSON, G.D. (1976).

Chromatin like organization of the adenovirus chromosome.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 401.

CRAIG, E.A., and RASKAS, H.J. (1974).

Two classes of cytoplasmic viral RNA synthetised early in productive infection with Ad2.

J. Virol., 14, 751.

CROSS, F.R., and DARNELL, J.E. Jr. (1983).

Cycloheximide stimulates early adenovirus transcription if early gene expression is allowed before treatment.

J. Virol., 45, 683.

CUNNINGHAM, D.D. and PARDEE, A.B. (1969).

Transport charges rapidly initiated by serum addition to "contact inhibited" cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64, 1049.

DANNA, K.J. and NATHANS, D. (1972).

Studies of SV40 DNA. IV. Bidirectional replication of SV40 DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 3097.

DAWE, C.J., and LAW, L.W. (1959).

Morphologic changes in salivary gland tissue of the new-born mouse exposed to parotid-tumor agent in vitro.

J. Natl. Cancer Inst., 23, 1157.

DE JONG, P.J., KWANT, M.M., van DRIEL, W., JANSZ, H.S., and van der VLIET, P.C. (1983).

The ATP requirements of adenovirus type 5 DNA replication and cellular DNA replication.

Virology, 124, 45.

DEPPERT, W., WALTER, G., and LINKE, H. (1977).

SV40 tumor-specific proteins : subcellular distribution and metabolic stability in HeLa cells infected with non defective Ad2-SV40 hybrid viruses.

J. Virol., 21, 1170.

DESIDERIO, S.V., and KELLY, T.J. Jr (1981).

Structure of the linkage between adenovirus DNA and the 55,000 molecular weight terminal protein.

J. Mol. Biol., 145, 319.

DEVAUX, C., BERTHET-COLOMINAS, C., TIMMINS, P.A., BOULANGER, P.A. and JACROT, B. (1984).

Crystal packing and stoichiometry of the fibre protein of adenovirus type 2.

J. Mol. Biol., 174, 729.

DEVAUX, C., ZULAUF, M., BOULANGER, P.A., and JACROT, B. (1982).

Molecular weight of adenovirus serotype 2 capsomers : a new characterization.

J. Mol. Biol., 156, 927.

D'HALLUIN, J.C., COUSIN, C., NIEL, C., and BOULANGER, P.A. (1984).

Characterization of an early temperature sensitive and cytotoxic double mutant of an adenovirus type 2.

J. Gen. Virol., 65, 1305.

D'HALLUIN, J.C., MARTIN, G.R., TORPIER, G., BOULANGER, P. (1978).

Adenovirus type 2 assembly analyzed by reversible cross-linking of labile intermediates.

J. Virol., 26, 357.

DIJKEMA, R., DEKKER, B.M.M., van der FELTZ, M.J.M., and van der EB, A.J. (1979).

Transformation of primary rat kidney cells by DNA fragments of weakly oncogenic adenovirus.

J. Virol., 32, 943.

DUNCAN, S.J., GORDON, F.C.A., GREGORY, D.W., Mc PHIE, J.L., POSTLETHWAITE, R., WHITE, R., and WILLCOX, H.N.A. (1978).

Infection of mouse liver by human adenovirus type 5.

J. Gen. Virol., 40, 45.

DUNN, A.R., and HASSEL, J.A. (1977).

A novel method to map transcripts : evidence for homology between an adenovirus mRNA and discrete multiple regions of the viral genome.

Cell, 12, 23.

DUSSAIX, E., FAUCON-BIGUET, N., SAMOLYK, D., BONI, C., TOURNIER, P. (1982).

Restricted replication of mouse adenovirus strain FL in mouse Balb/c cells transformed by simian adenovirus 7.

Virology, 116, 641.

EARLE, W.R., SCHILLING, E.L., STARK, T.H., STRAUSS, N.P., BROWN, M.F., and SHELTON, E. (1943).

Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells.

J. Natl. Cancer Inst., 4, 165.

EDVARDSSON, B., EVERITT, E., JORNVALL, H., PRAGE, L., and PHILIPSON, L. (1976).

Intermediates in adenovirus assembly.

J. Virol., 19, 533.

ELKAIM, R., GODING, C., and KEDINGER, C. (1983).

The adenovirus-2 E2A early gene promoter : sequences required for efficient in vitro and in vivo transcription.

Nucl. Acids Res., 11, 7105.

ENGLER, J.A. (1981).

The nucleotidic sequence of the polypeptide IX gene of human adenovirus type 3.

Gene, 13, 387.

ERON, L., WESTPHAL, H., and KHOURY, G. (1975).

Post-transcriptional restriction of human adenovirus expression in monkey cells.

J. Virol., 15, 1256.

ESCHE, H., MATHEWS, M.B., and LEWIS, J.B. (1980).

Proteins and messenger RNAs of the transforming region of wild-type and mutant adenoviruses.

J. Mol. Biol., 142, 399.

ESTES, M.K., HUANG, E., and PAGANÓ, J. (1971).

Structural polypeptides of SV40.

J. Virol., 7, 635.

EVANS, R.M., FRASER, N., ZIFF, E., WEBER, J., WILSON, M., and DARNELL, J.E.Jr. (1977).

The initiation sites for RNA transcription in Adenovirus 2 DNA.

Cell, 12, 733.

EVERITT, E., LUTTER, L., and PHILIPSON, L. (1975).

Structural proteins of adenoviruses XII. Location and neighbor relationship among proteins of adenovirus type 2 as revealed by enzymatic iodination, immunoprecipitation and chemical cross-linking.

Virology, 67, 197.

EVERITT, E., SUNDQUIST, B., PETTERSSON, U., and PHILIPSON, L. (1973).

Structural proteins of adenoviruses. X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2.

Virology, 52, 130.

FADEN, H., GALLAGHER, M., OGRA, P. and Mc LAUGHLIN, S. (1978).

Nosocomial out-break of pharyngo-conjunctival fever due to adenovirus, type 4.

New-York Morb. Mort. Week. Rep., 27, 49.

FARBER, M.S., and BAUM, S.G. (1978).

Transcription of adenovirus RNA in permissive and non permissive infections.

J. Virol., 27, 136.

FEY, G., LEWIS, J.B., GRODZICKER, T., and BOTHWELL, A. (1979).

Characterization of a fused protein specified by the Ad2-SV40 hybrid Ad2 ND1 dp2.

J. Virol., 30, 201.

FLANEGAN, J.B., PETTERSSON, R.F., AMBROS, U., HEWLETT, M.J. and BALTIMORE, D. (1977).

Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 961.

FLEWETT, T.H., BRYDEN, A.S., DAVIES, H., and MORRIS, C.A. (1975).

Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward.

Lancet, 4, 5.

FLINT, S.J., SAMBROOK, J., WILLIAMS, J.F., and SHARP, P.A. (1976).

Viral nucleic acid sequences in transformed cells. IV. A study of the sequences of adenovirus type 5 DNA and RNA in four lines of adenovirus 5 transformed rodents cells using specific fragment of the viral genome.

Virology, 72, 456.

FLINT, S.J., WEWERKA-LUTZ, Y., LEVINE, A.J., SAMBROOK, J., and SHARP, P.A. (1975).

Adenovirus transcription. II. RNA sequences complementary to SV40 and Ad2 DNA in Ad2⁺ ND1, and Ad2⁺ ND3 infected cells.

J. Virol., 16, 662.

FLINT, S.J., and SHARP, P.A. (1976).

Adenovirus transcription. V. Quantitation of viral RNA sequences in Ad2 infected and transformed cells.

J. Mol. Biol., 106, 749.

FOWLKES, D.M., and SHENK, T. (1980).

Transcriptional control regions of the adenovirus VA1 RNA gene.

Cell, 22, 405.

FREEMAN, A.E., BLACK, P.H., VANDERPOOL, E.A., HENRY, P.H., AUSTIN, J.B., and HUEBNER, R.J. (1967).

Transformation of primary rat embryo cells by adenovirus type 2.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58, 1205.

FRIEDFIELD, B.R., LICHY, J.H., FIELD, J., GRONOSTAJSKI, R.M., GUGGENHEIMER, R.A., KREVOLIN, M.D., NAGATA, K., HURWITZ, J., and HORWITZ, M.S. (1984).

The in vitro replication of adenovirus DNA.

Current Topics in Microbiology and Immunology, 110, 221, ed by W. Doerfler.

FROST, E., and WILLIAMS, J. (1978).

Mapping temperature sensitive and host-range mutations of Adenovirus type 5 by marker rescue.

Virology, 91, 39.

FUKUI, Y., SAITO, I, SHIROKI, K., SHIMOJO, H., TAKEBE, Y., KAZIRO, Y. (1983).

The 19 K protein encoded by early region 1B of adenovirus type 12 is synthesized efficiently in E. Coli only as fused protein.

Gene, 23, 1.

GALIBERT, F., HERISSE, J., COURTOIS, G. (1979).

Nucleotide sequence of the Eco RI-F fragment of adenovirus 2 genome.

Gene, 6, 1.

GARON, C.F., BERRY, K.W., and ROSE, J.A. (1972).

A unique form of terminal redundancy in adenovirus DNA molecules.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2391.

GAYNOR, R.B., HILLMAN, D., and BERK, A.J. (1984).

Adenovirus early region 1A protein activates transcription of a non-viral gene introduced into mammalian cells by infection or transfection.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1193.

GINGERAS, T.R., SCIACKY, D., GELINAS, R.E., BING-DANG, J., YEN, C., KELLY, M., BULLOCK, P., PARSONS, B., O'NEILL, K., ROBERTS, R.J. (1982).

Nucleotide sequence from the adenovirus 2 genome.

J. Biol. Chem., 257, 13475.

GINSBERG, H.S., ESINGER, M.J., KAUFFMAN, R.S, MAYER, A.J. and LUNDHOLM, U. (1974).

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 39, 419.

GLISIN, V., CRKVENJAKOV, R. and BYUS (1974).

Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation.

Biochemistry, 13, 2633.

GLUZMAN, Y., DAVISON, J., OREN, M. and WINOCOUR, E. (1977).

Properties of permissive monkey cells transformed by UV-irradiated SV40.

J. Virol., 22, 256.

GOLDBERG, S., WEBER, J., and DARNELL, J.E.Jr. (1977).

The definition of a large viral transcription unit late in Ad2 infection of HeLa Cells : mapping by effects of UV irradiation.

Cell, 10, 617.

GORMAN, C.M., MOFFART, L.F., HOWARD, B.H. (1982).

Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl-transferase in mammalian cells.

Mol. Cell. Biol., 2, 1044.

GRAHAM, F.L., ANDERSON, P.J., MULDER, C., HEIJNEKER, H.L., WARNAAR, S.O., de VRIES, F.A.J., FIERS, W., and van der EB, A.J. (1974).

Studies on in vitro transformation by DNA and RNA fragments of human adenoviruses and SV40.

Cold Sprin Harbor Symp. Quant. Biol., 39, 637.

GRAHAM, F.L., HEIJNEKER, H.L., van der EB, A.J. (1974).

Size and location of the transforming region in human adenovirus type 5 DNA.

Nature, 251, 687.

GRAESSMANN, M. and GRAESSMANN, A. (1976).

"Early" SV40 specific RNA contains information for the tumor antigen formation and chromatin replication.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 366.

GREEN, M. (1970).

Oncogenic viruses.

Ann. Rev. Biochem., 39, 701.

GREEN, M., BRACKMANN, K.H., LUCHER, L.A., and SYMINGTON, J.S. (1983).

Antibodies to synthetic peptides targeted to the transforming genes of human adenoviruses : an approach to understanding early viral gene function.

In Current Topics in Microbiology and Immunology, 109, 167, ed. by W. Doerfler.

GREEN, M., MACKEY, J.K., WOLD, W.S.M., and RIGDEN, P. (1979a).

Thirty-one human adenovirus serotypes (Ad1-Ad31) form five groups (A-E) based upon DNA genome homologies.

Virology, 93, 481.

GREEN, M., WOLD, W.S.M., BRACKMANN, K.H., CARTAS, M.A. (1979b).

Identification of families of overlapping polypeptides coded by early region 1 of human adenovirus type 2.

Virology, 97, 275.

GREEN, M., WOLD, W.S.M., and BÜTTNER, W. (1981).

Integration and transcription of groupe C human adenovirus sequences with DNA of five lines of transformed rat cells.

J. Mol. Biol., 151, 337.

GREEN, M., WOLD, W.S.M., MACKEY, J.K., and RIGDEN, P. (1979c).

Analysis of human tonsil and cancer DNAs and RNAs for DNAs sequences of group C (serotypes 1, 2, 5, 6) human adenoviruses.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 6606.

GRODZICKER, T., ANDERSON, C., SHARP, P.A., SAMBROOK, J. (1974).

Conditional lethal mutants of adenovirus 2-SV40 hybrids. I. Host-range mutants of Ad2 ND1.

J. Virol., 13, 1237.

GRODZICKER, T., LEWIS, J.B., and ANDERSON, C.W. (1976).

Conditional lethal mutants of adenovirus type 2 SV40 hybrids. II. Ad2⁺ ND1 host-range mutants that synthesize fragments of the Ad2⁺ ND1 30 K protein.

J. Virol., 19, 559.

GROFF, D.E., and DANIELL, E. (1981).

Early RNA of adenovirus type 3 in permissive and abortive infections.

J. Virol., 40, 620.

GUILFOYLE, R., and WEINMANN, R. (1981).

The control region for Adenovirus VA RNA transcription.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3378.

HAMMARSKJOLD, M.L., and WINBERG, G. (1980).

Encapsidation of Ad16 DNA is directed by a small DNA sequence at the left end of the genome.

Cell, 20, 787.

HANDA, H., KINGSTON, R.E., and SHARP, P.A. (1983).

Inhibition of adenovirus early region IV transcription in vitro by a purified viral DNA Binding Protein.

Nature, 302, 545.

HANDA, H., and SHARP, P.A. (1984).

Requirement for distal upstream sequences for maximal transcription in vitro of early region IV of adenovirus.

Mol. Cell. Biol., 4, 791.

HARRISON, T., GRAHAM, F., WILLIAMS, J.F. (1977).

Host-range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells.

Virology, 77, 319.

HARTER, M.L., and LEWIS, J.B. (1978).

Adenovirus type 2 early proteins synthesized in vitro and in vivo : identification in infected cells of 38,000 to 50,000 molecular weight-protein encoded by the left end of adenovirus type 2 genome.

J. Virol., 26, 736.

HARTLEY, J.W., HUEBNER, R.J., and ROWE, W.P. (1956).

Serial propagation of adenoviruses (APC) in monkey kidney tissue cultures.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 92, 667.

HASSEL, J.A., and LUKANIDIN, E. (1978).

The structure and expression of two defective adenovirus 2 SV40 hybrids.

J. Mol. Biol., 120, 209.

HASSEL, J.A., and WEBER, J. (1978).

Genetic analysis of Adenovirus type 2. VIII. Physical locations of temperature sensitive mutations.

J. Virol., 28, 671.

HEARING, P., and SHENK, T. (1983).

The Adenovirus type 5 E1A transcription control region contains a duplicated enhancer element.

Cell, 33, 695.

HEN, R., BORELLI, P., SASSONE-CORSI, P., and CHAMBON, P. (1983).

An enhancer element is located 340 base pairs upstream from the Adenovirus-2 E1A cap site.

Nucl. Acids. Res., 11, 8747.

HORNE, R.W., BRENNER, S., WATERSON, A.P., and WILBY, P. (1959).

The icosahedral form of an adenovirus.

J. Mol. Biol., 1, 84.

HORWITZ, M.S., SHARFF, M.D., and MAIZEL, J.V. Jr. (1969).

Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis assembly of capsomers and morphogenesis of the virion.

Virology, 39, 682.

HOSAKAWA, K., and SUNG, M.T. (1976).

Isolation and characterization of an extremely basic protein from adenovirus type 5.

J. Virol., 17, 924.

HOUWELING, A., van den ELSEN, P.J., and van der EB, A.J. (1980).

Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4,5 % fragment of adenovirus 5 DNA.

Virology, 105, 537.

HUEBNER, R.J. (1967).

Adenovirus-directed tumor and T-antigens.

In perspectives in Virology, Vol. 5. Acad. Press. New York, 147, ed by Pollard, M.

HUEBNER, R.J., CHANOCK, R.M., RUBIN, B.A., CASEY, M.J. (1964).

Induction by adenovirus type 7 of tumors in hamsters having the antigenic characteristics of the SV40 virus.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 52, 1333.

HUEBNER, R.J., ROWE, W.P., and LANE, W.T. (1962).

Oncogenic effects in hamsters of adenovirus type 12 and 18.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48, 2051.

IMPERIALE, M.J., FELDMAN, L.T., and NEVINS, J.R. (1983).

Activation of gene expression in DNA transfection by adenovirus and herpes virus regulatory genes acting in trans and by a cis-acting adenovirus enhancer element.

Cell, 35, 127.

IMPERIALE, M.J., and NEVINS, J.R. (1984).

Ad5 E2 transcription unit : an E1A inducible promoter with an essential element that functions independently of position or orientation.

Mol. Cell. Biol., 4, 875.

ISHIBASHI, M., and MAIZEL, J.V.Jr. (1974).

The polypeptides of adenovirus. VI. Early and late glycopolypeptides.

Virology, 58, 345.

ITO, Y., BROCKLHURST, J.R., and DULBECCO, R. (1977).

Virus-specific proteins in the plasma membrane of cells lytically infected or transformed by polyoma virus.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 4666.

KATZE, M.G., PERSSON, H., and PHILIPSON, L. (1981).

Control of adenovirus early gene expression : post-transcriptional control mediated by both viral and cellular gene products.

Mol. Cell. Biol., 1, 807.

KATZE, M.G., PERSSON, H., and PHILIPSON, L. (1982).

A leftward reading transcript from the transforming region of adenovirus DNA encodes a low molecular weight polypeptide.

EMBO Journal, 1, 783.

KHOURY, G., LEWIS, A.M., OXMAN, N.M., and LEVINE, A.J. (1973).

Strand orientation of SV40 transcription in cells infected by non-defective adenovirus 2-SV40 hybrid viruses.

Nat. New. Biol., 246, 202.

KIMURA, T., SAWADA, Y., SHINAWAWA, M., SHIMIZU, Y., SHIROKI, K., SHIMOJO, H., SUGISAKI, H., TAKANAMI, M., UEMIZU, Y. and FUJINAGA, K. (1981).

Nucleotide sequence of the transforming early region E1B of adenovirus type 12 DNA : structure and gene organisation and comparison with those adenovirus type 5 DNA.

Nucl. Acids. Res., 9, 6571.

KLESSIG, D.F. (1977).

Two adenovirus mRNAs have a common 5' terminal leader sequence encoded at least 10 kb upstream from their main coding region.

Cell, 12, 9.

KLESSIG, D.F., and ANDERSON, C.W. (1975).

Block to multiplication of adenovirus serotype 2 in monkey cells.

J. Virol., 16, 1650.

KLESSIG, D.F., and CHOW, L.T. (1980).

Incomplete splicing and deficient accumulation of the fiber messenger RNA in monkey cells infected by human adenovirus type 2.

J. Mol. Biol., 139, 221.

KOCZOT, F.J., CARTER, B.J., GARON, C.F., ROSE, J.A. (1973).

Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus associated virus DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 215.

KRUIJER, W., van SHAIK, F.M.A., SPEIJER, J.G., and SUSSENBACH, J.S. (1983).

Structure and function of adenovirus DNA-Binding Protein : comparaison of the amino acid sequences of the Ad5 and Ad12 proteins derived from the nucleotide sequence of the corresponding genes.

Virology, 128, 140.

LEBOWITZ, P., KELLY, T.J.Jr., NATHANS, D., LEE, T.N.H., and LEWIS, A.M. (1974).

A colinear map relating the simian virus 40 (SV40) DNA segments of six adenovirus-SV40 hybrids to the DNA fragments produced by restriction endonuclease cleavage of SV40 DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 441.

LECHNER, R.L., and KELLY, T.J.Jr. (1977).

The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules.

Cell, 12, 1007.

LEFF, T., ELKAIM, R., GODING, C.R., JALINOT, P., SASSONE-CORSI, P., PERRICAUDET, M., KEDINGER, C., CHAMBON, P. (1984).

Individual products of the adenovirus 12 S and 13 S E1A mRNAs stimulate viral E1a and E1II expression at the transcriptional level.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4381.

LEIBOWITZ, J., and HORWITZ, M.S. (1975).

Synthesis and assembly of adenovirus polypeptides. III. Reversible inhibition of hexon assembly in adenovirus type 5 temperature sensitive mutants.

Virology, 66, 10.

LEVINSON, A.D., POSTEL, E.H., and LEVINE, A.J. (1977).

In vivo and in vitro phosphorylation of the adenovirus 5 single-strand specific DNA Binding Protein.

Virology, 79, 144.

LEWIS, F.D., CHEN, S., KUMAR, A., BLANCK, G., POLLACK, R.E. and MANLEY, J.L. (1983).

A frameshift mutation affecting the carboxyl terminus of the SV40 large tumor antigen results in a replication and transformation defective virus.

Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 7065.

LEWIS, A.M., LEVIN, M.J., WIESE, W.H., CRUMPACKER, C.S., and HENRY, P.H. (1969).

A non defective (competent) adenovirus-SV40 hybrid isolated from the Ad2-SV40 hybrid population.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63, 1128.

LEWIS, A.M., and WESTPHAL, H. (1983).

The adenovirus type 2-SV40 hybrid virus Ad2⁺ ND4 requires deletions variants to grow in monkey cells.

J. Virol., 47, 344.

LEWIS, J.B., and MATHEWS, M.B. (1981).

Viral messenger RNAs in six lines of adenovirus transformed cells.

Virology, 115, 345.

LICHY, J.H., FIELD, J., HORWITZ, M.S., and HURWITZ, J. (1982).

Separation of the adenovirus terminal protein precursor from its associated DNA polymerase : role of both proteins in the initiation of adenovirus DNA replication.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5225.

LINDBERG, U., and SUNDQUIST, B. (1974).

Isolation of messenger ribonucleoproteins from mammalian cells.

J. Mol. Biol., 86, 451.

LO, W.H.Y., GEY, G.O., and SHAPRAS, P. (1955).

The cytopathogenic effect of the Rous sarcoma virus on chicken fibroblasts in tissue cultures.

Bull. Johns Hopkins Hosp., 97, 248.

LONGIARU, M., IKEDA, J., JARKOVSKY, Z., HORWITZ, J.B., and HORWITZ, M.S. (1979).

The effect of aphidicolin on adenovirus DNA synthesis.

Nucl. Acids. Res., 6, 3369.

LUCAS, J.J., and GINSBERG, H.S. (1971).

Synthesis of virus specific RNA in KB cells infected with Ad2.

J. Virol., 8, 203.

LUPKER, J.H., DAVIS, A., JOCHEMSEN, H., and Van der EB, A.J. (1981).
In vitro synthesis of adenovirus type 5 antigens. I. Translation of early
region 1 specific RNA from lytically infected cells.

J. Virol., 37, 524.

MACKEY, J.K., RIGDEN, P.M., and GREEN, M. (1976).

Do highly oncogenic group A human adenoviruses cause human cancer ?
Analysis of human tumors for adenovirus 12 transforming DNA sequences.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 4657.

Mc MASTER, G.K., and CARMICHAEL, G.G. (1977).

Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and
agarose gels by using glyoxal and acridine orange.

Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 4835.

Mc PHERSON, I., and STOCKER, M. (1962).

Polyoma transformation of hamster cell clones. An investigation of genetic
factors affecting cell competence.

Virology, 16, 147.

MAIZEL, J.V. Jr, WHITE, D.O., and SCHARFF, M.D. (1968).

The polypeptides of Adenoviruses. I. Evidence for multiple protein
components of the virion and a comparison of Adenovirus types 2, 7 and 12.

Virology, 36, 115.

MALETTE, P., YEE, S.P., and BRANTON, P.E. (1983).

Studies on the phosphorylation of the 58,000 dalton early region 1B protein of
human adenovirus type 5.

J. Gen. Virol., 64, 1069.

MANIATIS, T., JEFFREY, A. and KLEID, D.G. (1975).

Nucleotide sequence of the right word operator of phage .

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 72, 1184.

MANN, K., HUNTER, T., WALTER, G., and LINKE, H. (1977).

Evidence for SV40 coding for SV40 T-antigen and the SV40-specific proteins
in HeLa cells infected with non-defective adenovirus type 2-SV40 hybrid
viruses.

J. Virol., 24, 151.

MARTIN, G.R., WAROCQUIER, R., COUSIN, C., D'HALLUIN, J.C., BOULANGER, P.A. (1978).

Isolation and phenotypic characterization of human adenovirus type 2 temperature sensitive mutants.

J. Gen. Virol., 41, 303.

MATHEWS, M.B. (1975).

Genes for VA-RNA in adenovirus 2.

Cell, 6, 223.

MATTHEWS, R.E.F. (1982).

Classification and nomenclature of viruses.

Intervirology, 17, 4.

MONTELL, C., FISHER, E.F., CARUTHERS, M.H., and BERK, A.J. (1982).

Resolving the functions of overlapping viral genes by site-specific mutagenesis at a mRNA splice site.

Nature, 295, 380.

MONTELL, C., FISHER, E.F., CARUTHERS, M.H., and BERK, A.J. (1984).

Control of adenovirus E1B mRNA synthesis by a shift in the activities of RNA splice sites.

Mol. Cell. Biol., 4, 966.

MORGAN, C., ROSENKRANZ, H.S., and MEDNIS, B. (1969).

Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. X. Entry and uncoating of adenovirus.

J. Virol., 4, 777.

MORIN, N., and BOULANGER, P.A. (1984).

Morphogenesis of human adenovirus type 2 : sequence of entry of protein into previral and viral particles.

Virology, 136, 153.

NAGATA, K., GUGGENHEIMER, R., ENOMOTO, T., LICHY, J., and HURWITZ, J. (1982).

Adenovirus DNA replication in vitro : identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6438.

NEVINS, J.R. (1981).

Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene products.

Cell, 26, 213.

NEVINS, J.R., and WINKLER, J.J. (1980).

Regulation of early adenovirus transcription. A protein product of early region 2 specifically represses region 4 transcription.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1893.

NICHOLSON, G.L. (1974).

Factors influencing the dynamic display of lectin-binding sites a normal and transformed cell surfaces.

Cold. Spring Harbor Conf. Cell. Prolif., 1, 251.

NIGG, E.A., SEFTON, B.M., HUNTER, T., WALTER, G., and SINGER, S.J. (1982).

Immunofluorescent localization of the transforming protein of Rous sarcoma virus with antibodies against a synthetic SRC peptide.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5322.

NORRBY, E. (1969a).

The structural and functional diversity of adenovirus capsid component.

J. Gen. Virol., 5, 221.

NORRBY, E. (1969b).

The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. IV. Immunological complexity of soluble components.

Virology, 37, 565.

ORTIN, J., SCHEIDTMANN, K.H., GREENBERG, R., WESTPHAL, M. and DOERFLER, W. (1976).

Transcription of the genome of adenovirus type 12. III. Maps of stable RNA from productively infected human cells and abortively infected and transformed cells.

J. Virol., 20, 355.

OSBORNE, T.F., ARVIDSON, D.N., TYAU, E.S., DUNSWORTH-BROWNE, M., and BERK, A.J. (1984).

Transcription control region within the protein-coding portion of adenovirus E1A genes.

Mol. Cell. Biol., 4, 1293.

PAUCHA, E., MELLOR, A., HARVEY, R., SMITH, A.E., HEWICK, R.M., and WATERFIELD, M.D. (1978).

Large and small tumor antigens from SV40 have identical amino termini mapping at O,65 map units.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2165.

PERRICAUDET, M., AKUSJARVI, G., VIRTANEN, A., and PETTERSSON, U. (1979).

Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses.

Nature, 281, 694.

PERRICAUDET, M., LE MOULLEC, J.M., and PETTERSSON, U. (1980).

The predicted structure of two adenovirus T-antigens.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3778.

PERSSON, H., JANSSON, M., and PHILIPSON, L. (1980).

Synthesis and genomic site for an adenovirus type 2 early glycoprotein.

J. Mol. Biol., 136, 375.

PERSSON, H., PETTERSSON, U., MATHEWS, M.B. (1978).

Synthesis of a structural adenovirus polypeptide in the absence of viral DNA replication.

Virology, 90, 67.

PETIT, C.A., GARDES, M., and FEUNTEUN, J. (1983).

Immortalization of rodent embryo fibroblast by SV40 is maintained by the A gene.

Virology, 127, 74.

PETTERSSON, U., and PHILIPSON, L. (1975).

Location of sequences on the Adenovirus genome coding for the 5,5 S RNA.

Cell, 6, 1.

PETTERSSON, U., VIRTANEN, A., PERRICAUDET, M., AKUSJARVI, G. (1983).

The messenger RNAs from the transforming region of human adenoviruses.
In Current Topics in Microbiology and Immunology, 109, 107, ed. by W. Doerfler.

PINA, M., and GREEN, M. (1965).

Biochemical studies on adenovirus multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenoviruses.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 54, 547.

PROUDFOOT, N.J., and BROWNLEE, G.G. (1976).

Non-coding region sequences in eucaryote messenger RNA.

Nature, 263, 211.

QUINN, C.O., and KITCHINGMAN, G.R. (1984).

Sequence of the DNA-Binding Protein gene of a human subgroup B adenovirus (type 7).

J. Biol. Chem., 259, 5003.

RABSON, A.S., O'CONNOR, G.T., BEREZESKY, R.K., and PAUL, F.J. (1964).

Enhancement of adenovirus growth in african green monkey kidney cell cultures by SV40.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 116, 187.

RAPP, F., BUTEL, J.S., TEVETHIA, S.S., KATZ, M., and MELNICK, J.L. (1966).

Antigenic analysis of tumors and sera from animals inoculated with para-adenovirus populations.

J. Immunol., 97, 833.

REDDY, V.B., THIMMAPAYA, B., DHAR, R., SUBRAMANIAN, K., ZAIN, B., PAN, J., GHOSH, M., CELMA, M., and WEISSMAN, S.M. (1978).

The genome of SV40.

Science, 200, 494.

REICH, P.R., ROSE, J.A., FORGET, B., and WEISSMAN, S.M. (1966).
RNA of low molecular weight in KB cells infected with Ad2.
J. Mol. Biol., 17, 428.

REKOSH, D.M.K., RUSSELL, W.C., BELLETT, A.J.D. and ROBINSON, A.J.
(1977).
Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA.
Cell, 11, 283.

RICCIARDI, R.P., JONES, R.L., CEPKO, C.L., SHARP, P.A., and
ROBERTS, B.E. (1981).
Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic
polypeptide.
Proc. Natl. Acids Sci. USA, 78, 6121.

RICE, S.A., and KLESSIG, D.F. (1984).
The function(s) provided by the adenovirus-specified, DBP required for viral
late gene expression is independent of the role of the protein in viral DNA
replication.
J. Virol., 49, 35.

RICHARDSON, C.W., and ANDERSON, C.W. (1984).
Translation in cultured african green monkey kidney cells.
J. Virol., 51, 559.

RICHARDSON, W.D., and WESTPHAL, H. (1981).
A cascade of adenovirus early functions is required for expression of AAV.
Cell, 27, 133.

ROBERTS, R.J., ARRAND, J.R., and KELLER, W. (1974).
The lenght of the terminal repetition in adenovirus 2 DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 3829.

ROBINSON, A.J., YOUNGHUSBAND, H.B., and BELLETT, A.J.D. (1973).
A circular DNA protein complex from adenoviruses.
Virology, 56, 54.

ROSE, J.A., REICH, P.R., and WEISSMAN, S.M. (1965).

RNA production in adenovirus infected KB cells.

Virology, 57, 571.

ROSEN, L. (1958).

Hemagglutination of adenovirus.

Virology, 5, 574.

ROSSINI, M. (1983).

The rôle of adenovirus early region 1A in the regulation of early regions 2A and 1B expression.

Virology, 131, 49.

ROWE, W.P., HUEBNER, R.J., GILLMORE, L.K., PARROTT, R.H. and WARD, T.G. (1953).

Isolation of a cytogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 84, 570.

ROWE, W.P., and BAUM, S.G. (1964).

Evidence for possible genetic hybrid between adenovirus type 7 and SV40 viruses.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 52, 1340.

RULEY, H.E. (1983).

Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture.

Nature, 304, 602.

RUSSELL, W.C., and BLAIR, G.E. (1977).

Polypeptide phosphorylation in Adenovirus infected cells.

J. Gen. Virol., 34, 19.

RUSSELL, W.C., and PRECIOUS, B. (1982).

Nucleic Acid binding properties of adenovirus structural polypeptides.

J. Gen. Virol., 63, 69.

SARNOW, P., HEARING, P., ANDERSON, C.W., HALBERT, D.N., SHENK, T., and LEVINE, A.J. (1984).

Adenovirus early region 1B-58,000 dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4-25,000 daltons protein in productively infected cells.

J. Virol., 49, 692.

SARNOW, P., SHIH-HO, Y., WILLIAMS, J., and LEVINE, A.J. (1982).

Adenovirus E1B-58 Kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 Kd cellular protein in transformed cells.

Cell, 28, 387.

SCHNEIDER, R.J., WEINBERGER, C., and SHENK, T. (1984).

Adenovirus VAI RNA facilitates the initiation of translation in virus infected cells.

Cell, 37, 291.

SCHRIER, P.I., van den ELSEN, P.J., HERTOOGHS, J.J.L., van der EB, A.J. (1979).

Characterization of tumor antigens in cells transformed by fragments of adenovirus type 5 DNA.

Virology, 99, 372.

SEIF, R., and CUZIN, F. (1977).

Temperature sensitive growth regulation in one type of transformed rat cells induced by ts A mutant of polyoma virus.

J. Virol., 24, 721.

SEKIKAWA, K., SHIROKI, K., SHIMOJO, H., OJIMA, S., FUJINAGA, K. (1978).

Transformation of a rat cell line by an adenovirus 7 DNA fragment.

Virology, 88, 1.

SERGEANT, A., TIGGES, M., and RASKAS, H.J. (1979).

Nucleosome like structural subunit of intranuclear parental adenovirus 2 DNA.

J. Virol., 29, 888.

SHAW, A.R., and ZIFF, E.B. (1980).

Transcripts from the adenovirus 2 major late promoter yield a single early family of a 3'coterminal mRNAs and five late families.

Cell, 22, 905.

SHIH, C., and WEINBERG, R.A. (1982).

Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line.

Cell, 29, 161.

SHIROKI, K., HANDA, H., SHIMOJO, H., YANO, S., OJIMA, S., and FUJINAGA, K. (1977).

Establishment and characterization of rat cell lines transformed by restriction endonuclease fragments of adenovirus 12 DNA.

Virology, 82, 462.

SHIROKI, K., HASHIMOTO, S., SAITO, I., FUKUI, Y., FUKUI, Y., KATO, H., and SHIMOJO, H. (1984).

Expression of the E4 gene is required for establishment of soft agar colony-forming rat cell lines transformed by the adenovirus 12, E1 gene.

J. Virol., 50, 854.

SIGNAS, C., KATZE, M.G., PERSSON, H., and PHILIPSON, L. (1982).

An adenovirus glycoprotein binds heavy chains of class I transplantation antigens from man and mouse.

Nature, 299, 175.

SMITH, H.S., SCHER, C.D., and TODARO, G.J. (1971).

Induction of cell division in medium lacking serum growth factors by SV40.

Virology, 44, 359.

SODERLUND, H., PETTERSSON, U., VENNSTROM, B., PHILIPSON, L., and MATHEWS, M.B. (1976).

A new species of virus coded low molecular weight RNA from cells infected with Ad2.

Cell, 7, 585.

SOLNICK, D., and ANDERSON, M.A. (1982).

Transformation-deficient adenovirus mutant defective in expression of region 1A but not region 1B.

J. Virol., 42, 106.

SPECTOR, D.J., Mc GROGAN, M., and RASKAS, H.J. (1978).

Regulation of the appearance of cytoplasmic RNAs from region 1 of adenovirus genome.

J. Mol. Biol., 126, 395.

STARZINSKI-POWITZ, A., SCHULZ, M., ESCHE, H., MUKAI, N., and DOERFLER, W. (1982).

The adenovirus type 12-mouse cell system : permissivity and analysis of integration patterns of viral DNA in tumor cells.

EMBO Journal, 1, 493.

STEENBERGH, P.H., MAAT, J., Van ORMONDT, H., and SUSSENBACH, J.S. (1977).

The nucleotide sequence at the termini of adenovirus 5 DNA.

Nucl. Acids Res., 4, 4371.

STILLMAN, B.W., TAMANOI, F., and MATHEWS, M.B. (1982).

Purification of an adenovirus-coded DNA polymerase that is required for initiation of DNA replication.

Cell, 31, 613.

STRAUS, S.E., SERGEANT, A., TIGGES, M.A., and RASKAS, H.J. (1979).

Parental adenovirus type 2 genome recovered early or late in infection possess terminal proteins.

J. Virol., 29, 828.

SUSSENBACH, J.S. (1967).

Early events in the infection process of adenovirus type 5 in HeLa cells.

Virology, 33, 567.

SUSSENBACH, J.S., and van der VLIET, P.C. (1983).

The mechanism of adenovirus DNA replication.

Current Topics in Microbiology and Immunology, 109, 53 (Ed by W. Doerfler).

SUSSENBACH, J.S., van der VLIET, P.C., ELLENS, D.J., and JANSZ, H.S. (1972).

Linear intermediates in the replication of adenovirus DNA.

Nature, 239, 47.

SVENSSON, C., and AKUSJÄRVI, G. (1984).

Adenovirus 2 early gene region 1A stimulates expression of both viral and cellular genes.

EMBO Journal, 3, 789.

SVENSSON, C., PETTERSSON, U., AKUSJARVI, G. (1983).

Splicing of adenovirus 2 early region 1A mRNAs is non-sequential.

J. Mol. Biol., 165, 475.

TAMANOI, F., and STILLMAN, B.W. (1983).

The origin of adenovirus DNA replication.

Current topics in Microbiology and Immunology, 109, 75 (Ed by W. Doerfler).

TATE, V.E., and PHILIPSON, L. (1979).

Parental adenovirus DNA accumulates in nucleosome-like structures in infected cells.

Nucl. Acids Res., 6, 2769.

TEICH, N.M., WEISS, R.A., MARTIN, G.R., and LOWY, D.R. (1978).

Virus infection of murine teratocarcinoma stem cell lines.

Cell, 12, 973.

THIMMAPAYA, B., WEINBERGER, C., SCHNEIDER, R.J., and SHENK, T. (1982).

Adenovirus VAI RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection.

Cell, 31, 543.

THOMAS, P.S. (1980).

Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose.

Proc. Natl. Acad. Sci., 71, 4579.

TIBETTS, C. (1977).

Viral DNA sequences from incomplete particles of human Adenovirus type 7.
Cell, 12, 243.

TJIAN, R. (1978).

The binding site on SV40 for a T-antigen related protein.
Cell, 13, 165.

TJIAN, R., and ROBBINS, A. (1979).

Enzymatic activities associated with purified SV40 T-antigen-related protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 610.

TODARO, G.J., and GREEN, M. (1966).

High frequency of SV40 transformation of mouse cell line 3T3.
Virology, 28, 756.

TREMBLAY, M.L., DERY, C.V., TALBOT, B.C., WEBER, J. (1983).

In vitro cleavage specificity of the adenovirus type 2 protease.
Biochem. Biophys. Acta, 743, 239.

TRENTIN, J.J., YABE, Y., and TAYLOR, G. (1962).

The quest for human cancer viruses.
Science, 137, 835.

TRIESMAN, R., NOVAK, U., FAVALORO, J., and KAMEN, R. (1982).

Transformation of rat cells by an altered polyomavirus genome expressing only the middle-T protein.
Nature, 292, 595.

VALENTINE, R.C., and PEREIRA, H.G. (1965).

Antigens and structure of the adenovirus.
J. Mol. Biol., 13, 13.

van BERGEN, B.G.M., van der LEY, P.A., van VRIEL, W., van MANSFELD, A.D.M., and van der VLIET, P.C. (1983).

Replication of origin containing adenovirus DNA fragments that do not carry the terminal protein.
Nucl. Acids. Res., 11, 1975.

van der EB, A.J., MULDER, C., GRAHAM, F.L., and HOUWELING, A. (1977).

Transformation with specific fragments of adenovirus DNAs. I. Isolation of specific fragment with transforming activity of adenovirus 2 and 5 DNA.

Gene, 2, 115.

van den ELSEN, P.J., HOUWELING, A., and van der EB, A.J. (1983a).

Expression of region E1B of human adenoviruses in the absence of region E1A is not sufficient for complete transformation.

Virology, 128, 377.

van den ELSEN, P.J., HOUWELING, A., and van der EB, A.J. (1983b).

Morphological transformation of human adenoviruses is determined to a large extent by gene products of region E1A.

Virology, 131, 242.

van der VLIET, P.C., and LEVINE, A.J. (1973).

DNA binding proteins specific for cells infected by adenovirus.

Nature New Biol., 246, 170.

van der VLIET, P.C., and SUSSENBACH, J.S. (1975).

An adenovirus type 5 gene function required for initiation of viral DNA replication.

Virology, 67, 415.

van der VLIET, P.C., ZANDBERG, J., and JANSZ, H.S. (1977).

Evidence for a function of the adenovirus DNA-Binding Protein in initiation of DNA synthesis as well as in elongation of nascent DNA chains.

Virology, 80, 98.

van ORMONDT, H., MAAT, J., and van BEVEREN, C.P. (1980).

The nucleotide sequence of the transforming region E1 of adenovirus type 5 DNA.

Gene, 11, 299.

VELICER, L.F., and GINSBERG, H.S. (1970).

Synthesis, transport and morphogenesis of type 5 adenovirus capsid proteins.

J. Virol., 5, 338.

VERCAMER, C. (1984).

Construction de vecteurs contenant les régions d'expression précoce de l'adénovirus.

DEA de Biochimie, USTL.

VIRTANEN, A., and PETTERSSON, U. (1983).

The molecular structure of the 9 S mRNA from early region 1A of adenovirus 2.

J. Mol. Biol., 165, 496.

WADELL, G. (1984).

Molecular epidemiology of human adenovirus.

Curr. Top. Microbiol. Immunol., 110, 191 (Ed. by W. Doerfler).

WADELL, G., HAMMARSKJOLD, M.L., WINBERG, G., VARSANYI, T.W., and SUNDELL, G. (1980).

Genetic variability of adenoviruses.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 354, 16.

WALTER, G., and DEPPERT, W. (1975).

Intramolecular disulfide bonds : An important structural feature of the polyoma virus capsid.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 39, 255.

WEBER, J. (1976).

Genetic analysis of adenovirus type 2 temperature sensitivity of processing of viral protein.

J. Virol., 17, 462.

WEBER, J., BEGIN, M. and KHITTOO, G. (1975).

Genetic analysis of adenovirus type 2. II. Preliminary phenotypic characterization of temperature sensitive mutants.

J. Virol., 15, 1049.

WEINMANN, R., RASKAS, H.J. and ROEDER, R.G. (1974).

Role of DNA dependent RNA polymerase II and III in transcription of the adenovirus genome late in productive infection.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 3436.

WHITE, E., GRODZICKER, T., and STILLMAN, B.W. (1984).

Mutations in the gene encoding the adenovirus E1B-19 K tumor antigen cause the degradation of chromosomal DNA.

J. Virol., 52, 410.

WILLIAMS, J.F., YOUNG, C.S., and AUSTIN, P.E. (1974).

Genetic analysis of human adenovirus type 5 in permissive and non permissive cells.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 39, 427.

WILSON, J.H. (1977).

Genetic Analysis of host-range mutant viruses suggests an uncoating defect in SV40 resistant monkey cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3503.

WILSON, M.C., and DARNELL, J.E. (1981).

Control of mRNA concentration by differential cytoplasmic half-life : adenovirus mRNAs from transcription units 1A, 1B.

J. Mol. Biol., 148, 231.

YEE, S.P., ROWE, D.T., TREMBLAY, M.L., Mc DERMOTT, M., and BRANTON, P.E. (1983).

Identification of human adenovirus early region 1 products by using antisera against synthetic peptides corresponding to the predicted carboxy termini.

J. Virol., 46, 1003.

YEHKAI, L., AKUSJARVI, G., ALESTROM, P., PETTERSSON, U., TREMBLAY, M., and WEBER, J. (1983).

Genetic identification of an endoproteinase encoded by the Adenovirus genome.

J. Mol. Biol., 167, 217.

YOSHIDA, K., and FUJINAGA, K. (1980).

Unique species of mRNA from adenovirus 7 early region 1 in cells transformed by Ad-7 DNA fragment.

J. Virol., 36, 337.

ZORN, G.A., and ANDERSON, C.W. (1981).

Adenovirus type 2 expresses fiber in monkey-human hybrids and reconstructed cells.

J. Virol., 37, 759.

