

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

50376
1988
167

50376
1988
167

Année 1988

N° d'ordre : 236

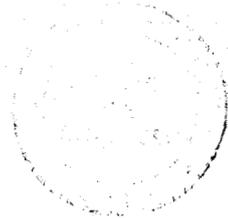
THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE

Diplôme Présenté pour l'Obtention du Grade de

DOCTEUR EN BIOCHIMIE

par

José Paulo GAGLIARDI LEITE



LA REGION E1A DES SEROTYPES 2, 3 ET 12 DE L'ADENOVIRUS:
TRANSDOMINANCE ET REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

présentée le 27 mai devant la Commission d'Examen

MM. J.MONTREUIL	Président
S.BALL	Rapporteurs
M.PERRICAUDET	
P.A.BOULANGER	Examineurs
J.C.D'HALLUIN	
H.G.PEREIRA	

A mes parents, Nair et Hélió.

A mon épouse Paola et nos enfants
Leonardo et Leandro.

A mes frère et soeurs, Nélio, Lucia,
Neide et Angela.

A Peggy, José Roberto et Vieira, mes amis
que j'ai laissés en partant et que je
ne retrouverai pas en rentrant.

A tous les miens en témoignage de mon
affection.

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Virologie Moléculaire, U. 233 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, dirigée par Monsieur le Pr. P.A. Boulanger.

Monsieur le Dr. J.C. D'Halluin a assuré la direction intérimaire de l'unité d'avril 1985 à septembre 1987.

Nous remercions toutes les personnalités de ce Jury d'avoir accepté de juger ce mémoire.

Notre arrivée à Lille a été "marquée" par un accueil chaleureux de toute l'équipe. Les "gens du Nord" ont bien le "coeur en plus". Nous avons beaucoup appris non seulement sur le plan professionnel mais aussi humain, ces deux aspects ne devant jamais être séparés.

Ce travail a bénéficié de plusieurs collaborations et nous voulons exprimer notre gratitude à :

- Monsieur le Professeur P.A. Boulanger, vous nous avez accueilli dans votre équipe, votre cordialité, disponibilité et enthousiasme au travail m'ont beaucoup touché. Nous vous en remercions sincèrement.

- Quant à toi, Jean-Claude, tu n'as pas seulement été le "promoteur" et le guide de ce travail mais également un ami sincère. Nous te remercions pour tous nos échanges sympathiques.

- Aux membres de l'équipe qui m'ont apporté conseils et encouragements, et particulièrement à Bernadette Hennache, Chantal Cousin, Christian Niel, Didier Petite, Jean-François Collard, Marie-Thérèse Belin, Michèle Milleville et Sylvia Kocialkowski pour leurs enseignements, amitié et collaborations lors de ce travail.

- A Virginie Delecroy pour la dactylographie et à Philippe Verwaerde et Pierre Lemay pour les illustrations.

- Aux membres de l'équipe du "Departamento de Virologia" de l'Institut Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brésil, et plus spécialement les Dr. Hélio G. Pereira, Hermann G. Schatzmayr, Jussara P. Nascimento, Mitiko Fujita et Selma A. Gomes, pour leur présence stimulante malgré l'éloignement.

- Au "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil - CNPq, au Ministère des Relations Extérieures, à l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale et à la Fondation pour la Recherche Médicale pour leurs subsides.

LEXIQUE1) CELLULES

- A-549 : Lignée établie de cellules de carcinome de poumon humain
 BHK-21 : Lignée établie de cellules de rein de hamster nouveau-né
 BRK : Cellules primaires de rein de rat Wistar nouveau-né
 COS : Cellules CV-1 transformées par le virus SV40, exprimant l'Antigène T (Ag T)
 CV-1 : Lignée établie de cellules de rein de singe vert africain
 F-9 : Cellules de carcinome embryonnaire de souris
 HEK : Lignée établie de cellules embryonnaires de rein humain
 HEK-293 : Cellules HEK transformées par les 11,5 % de l'extrémité gauche du génome de l'Ad5 (nt 270-4123) (Graham et al., 1977)
 HeLa : Lignée établie de cellules de carcinome du col utérin humain
 KB₃ : Lignée établie de cellules de carcinome du plancher buccal humain
 KB₈ : KB₃ exprimant la région E1A de l'Ad5 (Babiss et al., 1983)
 KB₁₆ : KB₃ exprimant les régions E1A et E1B de l'Ad5 (Babiss et al., 1983)
 KB₁₈ : KB₃ exprimant la région E1B de l'Ad5 (Babiss et al., 1983)
 LLC-MK2 : Lignée établie de cellules de rein de singe Rhésus
 NIH-3T3 : Lignée établie de fibroblastes de souris
 Vero : Lignée établie de cellules de rein de singe vert africain
 WI-38 : Lignée établie de fibroblastes de poumon humain
 143-B : Lignée établie de cellules d'ostéosarcome humain (tk⁻)

2) Gènes

- cat : Gène codant pour la chloramphénicol acétyl transférase
myb : Oncogène de la leucémie myoblastique aviaire
myc : Oncogène de la leucémie myélo-monocytaire
néo : Gène de résistance à la néomycine
ras : Oncogène du sarcome murin de Harvey
sarc : Oncogène du sarcome de Rous
tc : Gène de résistance à la tétracycline
tk : Gène codant pour la thymidine kinase

3) Virus

Ad : Adénovirus
AD2ND1 : Hybride d'adénovirus de type 2 et de SV40
SV40 : Papovavirus dont l'hôte naturel est le singe

4) Réactifs

BBØ : Bleu de bromophénoï
bluo-gal : Indolyl- β -D-galactoside halogéné
BrET : Bromure d'éthidium
CsCl : Chlorure de césium
Cs₂SO₄ : Sulfate de césium
G418 : Généticine
HEPES : Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-éthanesulfonique
IPTG : Isopropyl- β -D-galactopyranoside
NP40 : Nonidet P40
PIPES : Acide pipérazinediéthane-sulfonique-1,4
SDS : Dodécyl sulfate de sodium

5) Autres Abreviations

AA : Aminoacides
dl : Délétion
E : Early - précoce
hr : Host range - mutant hôte dépendant
kDa : Kilodalton
L : Late - tardif
nt : Nucléotide(s)
ORF : Open reading frame - phase de lecture ouverte
pb : Paire(s) de bases
PFU : Plaque forming unit - unité formant plaque (unité de titre infectieux viral)
p.i. : Post infection
pm : Punctual mutation - mutation ponctuelle
R : Résidus
S : Coefficient de SVEDBERG
ts : Thermosensible
UG : Unité génome
var : Variant

T A B L E D E S M A T I E R E S

<u>I N T R O D U C T I O N</u>	p13
<u>G E N E R A L I T E S</u>	p16
I- <u>H I S T O R I Q U E</u>	p17
II- <u>C L A S S I F I C A T I O N</u>	p17
III- <u>S Y S T E M E S H O T E S</u>	p19
IV- <u>E P I D E M I O L O G I E D E L ' A D E N O V I R U S</u>	p19
V- <u>L A P A R T I C U L E V I R A L E</u>	p19
1- <u>L a c a p s i d e</u>	p19
2- <u>L e s p r o t e i n e s s t r u c t u r a l e s</u>	p22
2.1- <u>L e s p r o t e i n e s m a j e u r e s</u>	p22
2.1.1- L'hexon	p22
2.1.2- Le penton	p22
2.1.2.1- la base du penton	p22
2.1.2.2- la fibre	p24
2.2- <u>L e s p r o t e i n e s m i n e u r e s</u>	p25
2.2.1- Le polypeptide IIIa	p25
2.2.2- Le polypeptide VI	p25
2.2.3- Le polypeptide VIII	p25
2.2.4- Le polypeptide IX	p25
2.2.5- Les polypeptides X, XI et XII	p26
VI- <u>L ' A D N V I R A L</u>	p26
VII- <u>L E S C Y C L E S V I R A U X</u>	p27
1- <u>L e c y c l e a b o r t i f</u>	p27
2- <u>L e c y c l e t r a n s f o r m a n t</u>	p29
3- <u>L e c y c l e l y t i q u e</u>	p29
3.1- <u>L a p h a s e p r e c o c e</u>	p29
3.1.1- La région E1	p31

1.3.2.1-	la transactivation transcriptionnelle	p74
1.3.2.2-	la répression de la transcription par le(s) produit(s) de la région E1A	p70
1.3.2.3-	les produits des gènes ayant les mêmes fonctions que les produits de E1A	p72
1.3.3-	Les différents domaines des protéines de la région E1A	p74
1.3.3.1-	les sites de phosphorylation	p74
1.3.3.2-	définition des immunodomains à l'aide d'anticorps monoclonaux	p74
1.3.3.3-	la localisation des domaines	p75
2-	<u>La région E1B</u>	p77
3-	<u>La transformation cellulaire par la région E1</u>	p78

T R A V A U X P E R S O N N E L S . p82

I- INTRODUCTION p83

II- CHAPITRE I : LA STIMULATION DES PROMOTEURS PRECOQUES DES REGIONS E2A ET E3 DE L'AD5 p86

1-	<u>Par les virus appartenant aux différents sous-groupes A,B,C,D et E (annexe 1)</u>	p86
2-	<u>Par la transfection ou la cotransfection de plasmides (annexes 1 et 2)</u>	p88
2.1-	<u>En présence de la région E1A des Ad2 ou Ad3 (annexe 1)</u>	p88
2.1.1-	Stimulation de type "trans"	p88
2.1.2-	Stimulation de type "cis" et "trans"	p89
2.2-	<u>Par les produits des ARNm 12 S et 13 S de la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3 (annexe 2)</u>	p90

III- CHAPITRE II : LA TRANSDOMINANCE INTERSEROTYPIQUE p93

1-	<u>Par l'Ad3</u>	p93
2-	<u>Par la transfection ou cotransfection de plasmides (annexes 1, 2 et 3)</u>	p94
2.1-	<u>Le rôle de la région E1A de l'Ad3 dans le phénomène de trandominance (annexes 1 et 2)</u>	p94
2.2-	<u>Le rôle des produits des ARNm 12 S et 13 S de l'Ad2 et de l'Ad3 dans la transdominance (annexe 2)</u>	p95
2.3-	<u>Les promoteurs de la région E1A de l'Ad2 et de l'Ad3 (annexes 1, 2 et 3)</u>	p96

IV- <u>CHAPITRE III : COMPARAISON DE LA PARTIE NON-CODANTE DE LA REGION E1A DES ADENOVIRUS TYPE 2, 3, et 12</u>	p101
1- <u>Les plasmides hybrides Ad2/Ad3 et Ad2/Ad12 (annexe 3)</u>	p108
1.1- <u>Les plasmides hybrides Ad2/Ad3</u>	p108
1.1.1- L'activité CAT	p108
1.1.2- L'activité "NEO"	p111
1.2- <u>Les plasmides hybrides Ad2/Ad12</u>	p112
1.2.1- L'activité CAT	p112
1.2.2- L'activité "NEO"	p114
2- <u>La transformation des cellules BRK (annexe 3)</u>	p114
3- <u>Le rôle des différentes séquences "enhancers" (annexe 3)</u>	p116
3.1- <u>L'activité CAT</u>	p116
3.2- <u>L'activité "NEO"</u>	p120
4- <u>La distance entre les deux séquences de l'élément "enhancer B" (annexe 3)</u>	p120
5- <u>La séquence "poison"</u>	p122

DISCUSSION p131

I- <u>LA STIMULATION DES PROMOTEURS PRECOSES DES REGIONS E2A ET E3 DE L'AD5</u>	p132
II- <u>LA TRANSDOMINANCE INTERSEROTYPIQUE</u>	p139
III- <u>COMPARAISON DE LA PARTIE NON-CODANTE DE LA REGION E1A DES ADENOVIRUS TYPE 2,3 ET 12</u>	p148
1- <u>Le rôle des éléments "enhancers"</u>	p148
1.1- <u>Dans la transactivation et la "transrépression"</u>	p148
1.2- <u>Dans le processus de transformation cellulaire</u>	p154
2- <u>La séquence "poison"</u>	p157

CONCLUSION GENERALE * PERSPECTIVES p159

APPENDICE TECHNIQUE p162

I- <u>CULTURE CELLULAIRE</u>	p163
1- <u>Cellules en culture monocouche (Culture stationnaire)</u>	p163
1.1- <u>Lignées continues</u>	p163

1.2- <u>Cultures primaires</u>	p163
2- <u>Cellules en suspension</u>	p163
II- <u>OBTENTION DES PARTICULES VIRALES ET TITRAGE PAR NOMBRE DE FOYERS FLUORESCENTS</u>	p164
III- <u>ENZYMES UTILISES</u>	p164
IV- <u>TRANSFORMATION BACTERIENNE</u>	p165
1- <u>Transformation sur HB101</u>	p165
2- <u>Infection sur JM107</u>	p165
3- <u>Sélection de clones</u>	p166
3.1- <u>Méthode des "tailles"</u>	p166
3.2- <u>Méthode de dénaturation par la chaleur</u>	p166
3.3- <u>Isolement et sélection des phages</u>	p166
V- <u>PURIFICATION DES PLASMIDES</u>	p167
VI- <u>HYBRIDATION</u>	p167
1- <u>Obtention de l'ARNm 13 S de l'adénovirus type 3</u>	p167
2- <u>Préparation, obtention et purification de l'ADN simple brin à partir du phage M13</u>	p168
3- <u>Hybridation ADN-ARN et ARN-ARN</u>	p168
4- <u>Méthode de transfert d'ARN (Northern), d'ADN (Southern) et d'hybridation sur membrane</u>	p169
5- <u>Préparation de sonde par "nick translation"</u>	p170
VII- <u>CONSTRUCTION DU PLASMIDE N'EXPRIMANT QUE L'ARNm 12 S DE LA REGION E1A DE L'ADENOVIRUS TYPE 3</u>	p170
VIII- <u>TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES</u>	p171
1- <u>Electrophorèse en gel d'agarose</u>	p171
2- <u>Electrophorèse en gel de polyacrylamide non dénaturant</u>	p171
2.1- <u>Pour l'analyse de l'ADN</u>	p171
2.2- <u>Pour la séparation des brins d'ADN</u>	p171
3- <u>Gel de polyacrylamide dénaturant pour le séquençage, la cartographie S1 et l'ARN protection</u>	p171
4- <u>Electro-élution de l'ADN</u>	p172

IX- <u>SEQUENCAGE DE L'ADN</u>	p172
X- <u>CARTOGRAPHIE A LA NUCLEASE S1</u>	p172
XI- <u>ARN PROTECTION</u>	p173
XII- <u>TRANSFECTION DES PLASMIDES DANS LES CELLULES HeLa, KB8, KB16, KB18 ET HEK- 293</u>	p173
XIII- <u>DOSAGE DE L'ACTIVITE CHLORAMPHENICOL ACETYL TRANSFERASE</u>	p174
XIV- <u>SELECTION DES CLONES RESISTANTS A LA GENETICINE</u>	p174
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p175
<u>ANNEXE 1</u>	p218
<u>ANNEXE 2</u>	p228
<u>ANNEXE 3</u>	p255

I N T R O D U C T I O N

Les 35 ans écoulés depuis l'isolement des adénovirus ont été marqués par plusieurs événements. En 1962, Huebner et al. ont mis en évidence le pouvoir oncogène "in vitro" de ces virus. Flewett et al. (1975) ont identifié les adénovirus "fastidieux" qui ont été isolés en culture cellulaire (HEK-293) par Takiff et al. (1981). En 1977, les études réalisées avec l'Ad2 ont permis de mettre en évidence l'épissage des ARNm (Chow et al., 1977) et en 1980 le mécanisme de la transformation cellulaire en deux étapes : immortalisation et transformation phénotypique (Houweling et al., 1980).

La biologie moléculaire a réellement débuté avec l'isolement des endonucléases de restriction par Arber et Dussoix (1962), et a sans aucun doute mis un terme à la distinction entre les deux concepts : le fondamental et l'appliqué. La recherche fondamentale a mis en valeur la recherche appliquée. "Comme le noyau et le cytoplasme interagissent pour la maturation et le transport des ARNm", il existe un échange des besoins et des connaissances de l'une par rapport à l'autre. La "biologie humaine", en général, y a beaucoup gagné.

Cette collaboration fructueuse n'est malheureusement pas quotidiennement suivie. Prenons pour exemple la destinée d'un médicament interdit dans un pays industrialisé mais commercialisé librement dans un pays sous-développé par une entreprise (ou "trust") de ce premier. A l'origine se trouvent les intérêts de certains groupes indigènes mais plus encore le rapport de "force économique" entre pays industrialisé ou non. La rentabilisation des recherches oblige la commercialisation des produits "médicamenteux" en dépit des principes éthiques.

Les années 80 ont été frappées par "l'épidémie du SIDA", un problème extrêmement grave qui justifie la mobilisation générale entreprise ; et pourtant des intérêts économiques mesquins ont été jusqu'à remettre en cause la découverte du virus. Mais il faut savoir également que dans le tiers-monde il y a, annuellement, 4,5 milliards de cas de gastroentérite chez les enfants âgés de moins de 5 ans. Ceci provoque la mort de 5 à 10 millions d'entre eux. Parmi les agents étiologiques retenus, les virus sont responsables de 30 % des cas (rotavirus, adénovirus, coronavirus ...). Bien évidemment, ni les virus, ni les bactéries ne sont les premiers responsables de la mort de ces enfants, le véritable problème étant la famine.

Le SIDA est-il plus important que la famine ?

Un changement du "rapport de force" entre pays industrialisé et pays sous-développé est nécessaire afin qu'il soit le plus proche possible de celui existant entre deux nations de même potentiel économique. Ceci devrait permettre aux pays sous-développés de progresser par eux-mêmes, avec leurs propres capacités, idées et traditions.

Ces virus, "organismes" que l'on dit à la frontière du vivant, seraient-ils plus aptes à servir de modèle pour l'Homme que l'homme pour lui-même?

GENERALITES

I- HISTORIQUE

Rowe et al. (1953) ont isolé pour la première fois un agent infectieux à partir de tissus adénoïdes humains maintenus en culture "in vitro". Une année plus tard, Hilleman et Werner ont isolé en culture cellulaire d'origine humaine (carcinome épidermoïde humain) un agent cytopathogène provenant de sécrétions de la gorge de malades atteints d'infections respiratoires aiguës.

Initialement, ils ont reçu les dénominations suivantes : "Adenoïd Degeneration Agent" (Rowe et al., 1953), "Acute Respiratory Disease Agent" (Hilleman and Werner, 1954) et "Adenoidal-Pharyngeal Conjunctival Agent" (Huebner et al., 1954). Enders et al. (1956) ont proposé le nom d'adénovirus à ces agents isolés de différents spécimens cliniques possédant des caractéristiques similaires.

II- CLASSIFICATION

Les adénovirus font partie de la famille Adenoviridae. Celle-ci comprend les genres Mastadénovirus (adénovirus des mammifères), Aviadénovirus (adénovirus aviaires) et les adénovirus isolés chez les poïkilothermes (Wigand et al., 1982 ; Wigand et al., 1987) (Tableau 1). Cette classification est fondée sur des différences morphologiques et sur l'absence de protéines montrant une antigénicité croisée. Très peu d'homologies existent entre les génomes de ces genres.

Chez l'homme, quarante-deux sérotypes ont été identifiés (Wigand et al., 1987). Plusieurs classifications ont été proposées en fonction de :

- leurs propriétés d'hémagglutination (Rosen, 1960)
- leur pourcentage en bases G+C (Pina and Green, 1965)
- la longueur de leur fibre (Norrby and Skaaret, 1967)
- leur pouvoir oncogène chez le hamster nouveau-né (Huebner, 1967)
- la migration électrophorétique de quelques polypeptides de structure en gel de polyacrylamide-SDS (Wadell, 1978)
- du degré d'homologie de leur ADN (Green et al., 1979)
- l'analyse du génome par des endonucléases de restriction (Wadell et al., 1980).

Tableau 1 :

Nombre de sérotypes d'adénovirus isolés chez les différentes espèces animales hôtes

(d'après Wigand et al., 1982, 1987)

Genre	Hôte	Nombre		Nomenclature
		Identifié	Probable	
Mastadénovirus	Homme	42	-	h1 - h42
	Primate non humain	24	-	sim1 - sim24
	Bovin	9	-	bos1 - bos9
	Cochon	4	1	sus1 - sus4
	Mouton	6	1	ovi1 - ovi6
	Cheval	2	-	equ1 - equ2
	Chien	2	-	can1 - can2
	Chèvre	-	1	cap1
	Souris	1	1	mus1
	Peromyscus	-	1	
	Opossum	-	1	
	Tupaia	1	-	tup1
Aviadénovirus	Volaille	9	3	gal1 - gal9
	Dinde	3	-	mel1 - mel3
	Oie	3	-	ans1 - ans3
	Faisan	-	1	pha
	Canard	-	1	ana
		Grenouille	-	1
	Truite	-	1	

Les 42 sérotypes d'adénovirus ont été répartis en six sous-groupes (Tableau 2). Le sous-groupe F contient les adénovirus "fastidieux", décrits pour la première fois par Flewett et al. (1975).

III- SYSTEMES HOTES

Les adénovirus ont été isolés chez l'homme et certains animaux. Ils se multiplient facilement en culture cellulaire humaine primaire ou en lignée continue. Les cellules épithéliales sont plus permissives que les cellules de type fibroblastique (Pereira et al., 1963).

Quand les adénovirus se répliquent, ils produisent une augmentation du volume cellulaire, puis les cellules deviennent rondes et agrégées - "grappes de raisins" - phénomène caractéristique de l'effet cytopathique de l'adénovirus.

IV- EPIDEMIOLOGIE DE L'ADENOVIRUS

Les adénovirus ont été retrouvés dans le monde entier. Ils sont associés aux maladies du tractus respiratoire supérieur et inférieur, kératoconjunctivites, méningoencéphalites et gastroentérites (Wadell, 1984; Wigand et al., 1987) (Tableau 3).

V- LA PARTICULE VIRALE

1- La capside

Le virion, dépourvu d'enveloppe, possède une capside à symétrie icosaédrique, de 65 à 80 nm de diamètre (Horne et al., 1959) et composée de 252 capsomères : 240 hexons forment les 20 faces triangulaires de l'icosaèdre et 12 pentons sont localisés aux sommets. Un penton est constitué d'une base et d'une projection : la fibre (Valentine and Pereira, 1965 ; Ginsberg et al., 1966).

La particule complète du virus a une densité de 1,34 en gradient isopycniqne de CsCl. Les adénovirus contiennent 11,6 à 13,5 % d'ADN et 88,4 à 86,5 % de protéines (Green and Pina, 1963).

Tableau 2 :

Classification des adénovirus humains avec leurs principales caractéristiques (d'après Pettersson and Wadell, 1985 ; Wigand et al., 1987).

Sous-groupe	Type	Degré d'homologie du DNA		Teneur en base G+C	Nombre de fragments de restriction obtenus avec <u>Sma</u> I	Masse moléculaire apparente des polypeptides majeurs internes			Longueur de la fibre (en nm)	Oncogénicité chez le hamster nouveau-né	Sous-groupe d'hémagglutination
		intra sous-groupe	inter sous-groupe			V	VI	VII			
A	12,18,31	48-69 %	8-20 %	basse : 47-49 %	4-5	51-51,5 K [*]	25,5-26 K	17,5-18 K	28-31	Haute	IV
B	3,7,11,14,16, 21,34,35	89-94 %	9-20 %	Moyenne : 49-52 %	8-10	53,5-54,5 K	24 K	17,8-18 K	9-11	Faible	I
C	1,2,5,6	99-100 %	10-16 %	Haute : 57-59 %	10-12	48,5 K	24 K	18,5 K	23-31	Aucune	III
D	8,9,10,13,15, 17,19,20,22,23 24,25,26,27,28 29,30,32,33,36 37,38,39,42	94-99 %	4-17 %	Haute : 57-59 %	14-18	50-50,5 K	23,2 K	18,2 K	12-13	Aucune	II
E	4		4-23 %	Haute : 57 %	19	48 K	24,5 K	18 K	17	Aucune	III
F	40,41	62-69 %	15 %	Moyenne 49-52 %	9-12	46-43,5 K	25,5 K	17,2-17,7 K	28-33	Aucune	IV

* K = kDa

Tableau 3 :
Epidémiologie des adénovirus humains
(Wadell, 1984 ; Wigand et al., 1987).

Sous-groupe	Sérotypes	Pathologie
A	12,18,31	Non définie
B	3,7,11,14 16,21,34 35	Infection respiratoire Conjonctivite Gastroentérite
C	1,2,5,6	Infection respiratoire Infection latente
D	8,9,10,13 15,17,19 20,22,23 24,25,26 27,28,29 30,32,33 36,37,38 39,42	Ad37 Conjonctivite sporadique Ad8-9 épidémies
E	4	Infection respiratoire Conjonctivite
F	40,41	Gastroentérite

2- Les protéines structurales

La particule d'adénovirus a été présentée, à l'origine, comme étant composée de deux types de protéines, hexon et penton, en plus du "core". Mais, les protéines de l'adénovirus ayant été analysées par gel de polyacrylamide-SDS, une complexité considérable a été révélée (Maizel et al., 1968). Actuellement la particule contient au moins neuf polypeptides différents (II-IX et IIIa). De plus, sont observées, des bandes mineures qui correspondent à des peptides viraux, mais qui présentent un nombre de copies par virion très réduit.

2.1- Les protéines majeures

2.1.1- L'hexon

L'hexon, trimère du polypeptide II (Boulanger and Puvion, 1973), possède une masse moléculaire de 324 kDa et un coefficient de sédimentation de 12,9 S (pour l'Ad2) (Jörnvall et al., 1981). Berger et al. (1978) décrivent l'hexon comme une pyramide évidée dont la base est hexagonale et le sommet triangulaire (12,5 nm de hauteur et 8,0 - 8,5 nm de diamètre). Il possède des déterminants antigéniques groupe spécifique (α), sous-groupe et type spécifiques (ϵ) (Norrby et al., 1969 ; Willcox and Mautner, 1976).

2.1.2- Le penton

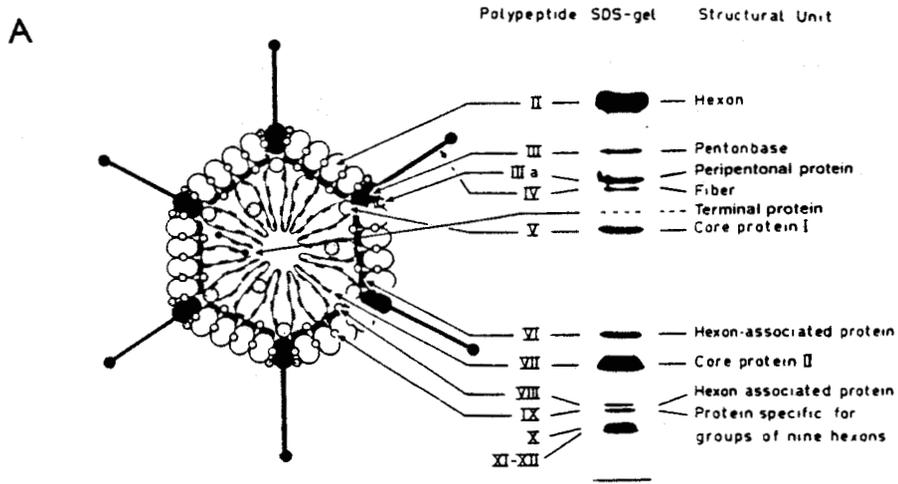
Les pentons sont composés de deux unités structurales, la base et la fibre. Ils occupent les douze sommets de l'icosaèdre viral, possèdent un coefficient de sédimentation de 11 S (Ad2 et Ad5) et une masse totale de 365 kDa (Valentine and Pereira, 1965 ; Devaux et al., 1982).

2.1.2.1- la base du penton

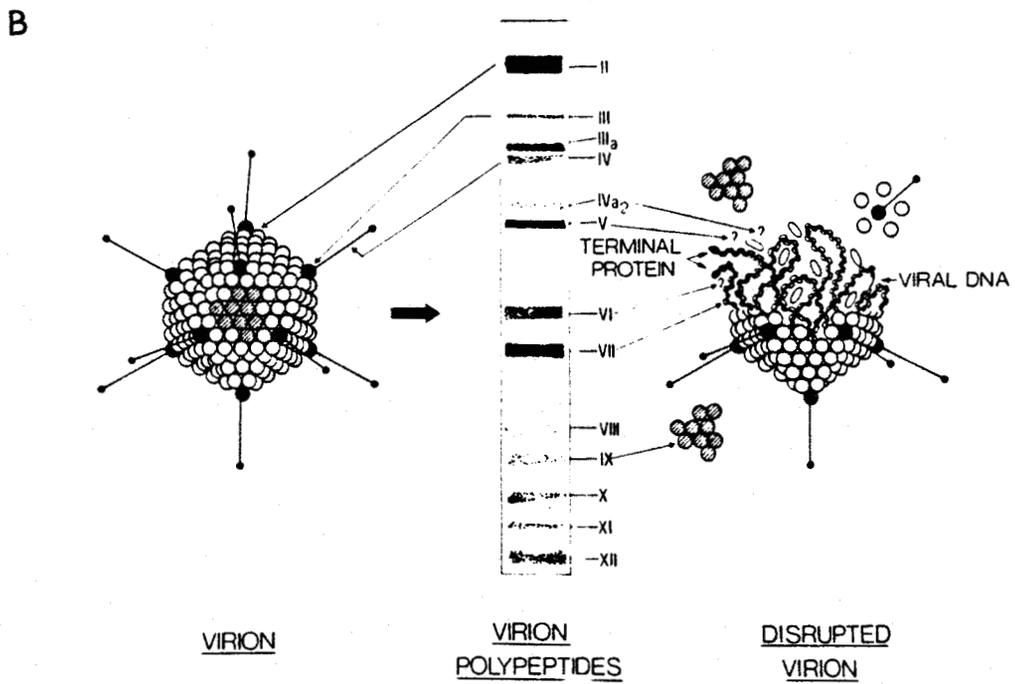
Devaux et al. (1982), en utilisant la diffusion de neutrons, ont déterminé que la masse réelle de la base est de 246 kDa, et qu'il s'agit d'une association de trois polypeptides III, celui-ci ayant une masse apparente de 85 kDa (Anderson et al., 1973).

Figure 1 :

Modèle structural et localisation des protéines de l'adénovirus type 2.



Les protéines du virion et leur localisation (Everitt et al., 1975)



Modèle structural schématique (Russell and Precious, 1982)

Le virus produit un effet cytotoxique sur les cellules infectées dû à la base du penton (Pereira, 1958 ; Pettersson and Höglund, 1969 ; Boudin et al., 1980).

La base du penton possède des déterminants antigéniques de groupe (β), de sous-groupe et de type spécifiques (Norrby et al., 1969).

La base du penton et la fibre s'unissent par des liaisons non covalentes, qui peuvent être dissociées par traitement avec le chlorhydrate de guanidine (Norrby and Skaaret, 1967), la formamide (Neurath et al., 1968), la pyridine (Pettersson and Höglund, 1969) ou avec le désoxycholate de sodium (Boudin et al., 1979).

2.1.2.2- la fibre

La fibre reconnaît les récepteurs cellulaires et joue un rôle dans l'attachement du virion à la cellule hôte. Elle a une structure hautement asymétrique, de 2 nm de diamètre, fortement allongée (10 à 33 nm) et se termine par une petite sphérule (4 nm). Sa longueur varie selon le sous-groupe du virus. Les adénovirus aviaires possèdent deux fibres de longueur différente insérées en deux points distincts sur la base du penton (Gelderblom and Maichle-Lauppe, 1982).

Le monomère de la fibre, le polypeptide IV, possède une masse moléculaire apparente en gel de polyacrylamide-SDS de 62 kDa (Maizel et al., 1968), un coefficient de sédimentation de 6 S et un pHi de 5,3 à 6,6 (Lemay and Boulanger, 1980). Des études structurales suggèrent que la fibre présente une structure dimérique (Devaux et al., 1982). Cependant, l'hypothèse d'une structure trimérique ne peut être écartée (van Oostrum and Burnett, 1985 ; Devaux et al., 1987).

La fibre est la seule protéine de structure glycosylée de l'adénovirus. Elle porte des déterminants antigéniques de sous-groupe (δ) et de type spécifiques (δ) (Norrby et al., 1969).

2.2- Les protéines mineures

2.2.1- Le polypeptide IIIa

Le polypeptide IIIa, de masse moléculaire 65 kDa, est traduit sous la forme d'un précurseur N-acétylé, le pIIIa, de masse moléculaire 67 kDa (Boudin et al., 1980). Le polypeptide IIIa et le pIIIa sont deux phosphoprotéines, dont la phosphorylation se fait préférentiellement par une activité protéine kinase "in vitro", associée à la capsid virale (Akusjärvi et al., 1978). Le IIIa a un rôle de stabilisation ; avec un nombre de 74 copies par capsid, il renforce les liaisons entre les pentons, les polypeptides V, VII et les hexons péripentonaux (Devaux et al., 1982 ; van Oostrum and Burnett, 1985). Le IIIa pourrait aussi jouer un rôle important pendant l'assemblage (D'Halluin et al., 1978a).

2.2.2- Le polypeptide VI

Le polypeptide VI est issu d'un précurseur, le pVI de 27 kDa, mûré par protéolyse en polypeptide de 24 kDa (Maizel et al., 1968 ; Akusjärvi and Persson, 1981). Associé à l'hexon (Everitt et al., 1973), il existerait sous forme dimérique ou trimérique dans le virus (Everitt and Philipson, 1974 ; Lemay and Boulanger, 1980). Récemment, Russell et Precious (1982) lui ont trouvé, "in vitro", une affinité pour l'ADN.

2.2.3- Le polypeptide VIII

Dérivé d'un précurseur, le pVIII, d'une masse moléculaire réelle de 24,7 kDa (Hérissé et al., 1980), le polypeptide VIII a une masse moléculaire de 17,5 kDa. Dans le virion, il est associé aux hexons des zones apicales et possède un rôle de stabilisation de la capsid (Everitt et al., 1975).

2.2.4- Le polypeptide IX

Associé plus fortement aux groupes de 9 hexons que le VIII, le polypeptide IX a une masse moléculaire de 14,3 kDa (Boulanger et al., 1979 ; Aleström et al., 1980). Le polypeptide IX est exprimé dès la phase précoce du cycle viral mais c'est une protéine structurale tardive, dont le rôle principal est l'assemblage des groupes de 9 hexons. Colby et Shenk (1981) ont construit un virus délété de ce polypeptide (H5 dl 313) et ont observé que ce

virion était un peu moins stable thermodynamiquement que le virus de type sauvage. Ce polypeptide IX, localisé en dehors de la région minimale nécessaire à la transformation, doit jouer un rôle purement structural. En général, il n'a pas été retrouvé dans les lignées cellulaires transformées par l'adénovirus (Lewis and Mathews, 1981). Mais, récemment, Grand et al. (1987b) ont mis en évidence le polypeptide IX dans certaines lignées cellulaires de rat, transformées par l'Ad12.

2.2.5- Les polypeptides X, XI et XII

Maizel et al. (1968) ont mis en évidence des petits polypeptides de faible masse moléculaire (entre 5 et 7 kDa); ni la localisation de leur séquence codante, ni leur rôle ne sont connus. Deux de ces polypeptides seraient des produits de dégradation d'autres protéines de la capsid, le troisième étant le polypeptide "μ" (Anderson et al., 1973 ; Hosakawa and Sung, 1976).

VI- L'ADN VIRAL

Le génome de l'adénovirus est un ADN double brin ; sa masse moléculaire est comprise entre $20-25 \times 10^6$ (Mastadénovirus) et 30×10^6 kDa (Aviadénovirus) (Green et al., 1967 ; van der Eb et al., 1969). La constante de sédimentation de l'ADN des adénovirus a été déterminée : 31 S pour le type 5 (Harpst et al., 1977) et de 32 S pour le type 2 (Black and Center, 1979). A chacune des extrémités existe une séquence terminale répétée inversée, que l'on retrouve très conservée pour les différents sérotypes (Wolfson and Dressler, 1972 ; Shinagawa et al., 1987).

Une protéine de 55 kDa, la protéine terminale (TP), est fixée à chaque extrémité 5' de l'ADN par liaison covalente entre un groupement β -OH d'une sérine de la protéine et un résidu désoxycytidine (Rekosh et al., 1977 ; Desiderio and Kelly, 1981). Cette protéine possède un précurseur (pTP) de 87 kDa qui sert d'amorce à la réplication.

Dans la capsid, l'ADN est associé à trois protéines. Cette structure nucléoprotéique, nommée "core", possède une organisation similaire à celle de la chromatine des cellules eucaryotes. Les protéines majeures du "core" sont :

- (a) Le polypeptide VII, d'une masse moléculaire de 18 kDa, est très basique; il contient 24 % d'arginine et dérive d'un précurseur, le

pVII. Chaque particule virale en possède environ 1000 copies.

- (b) Le polypeptide V est la protéine mineure du "core", il a une masse moléculaire de 45,5 kDa et est présent sous forme monomérique, à raison de 180 copies par virion.

Le polypeptide VII est plus fortement associé au génome viral que le polypeptide V (Laver et al., 1968 ; Russell et al., 1971 ; Brown et al., 1975 ; Corden et al., 1976).

- (c) La protéine basique "μ", identifiée par Hosakawa et Sung (1976), est très riche en arginine ; de masse moléculaire de 4 à 5 kDa, il en existe 125 copies dans la capsid. Elle pourrait être liée à l'ADN entre deux structures du type nucléosomique (Vayda et al., 1983). La protéine "μ" pourrait maintenir la structure du "core" dans le virion, en interagissant avec les protéines qui sont associées à l'ADN (Chatterjee et al., 1986).

VII LES CYCLES VIRAUX

Quand la particule virale se fixe aux récepteurs membranaires spécifiques, elle peut pénétrer dans le cytoplasme, soit par endocytose (Chardonnet and Dales, 1970), soit par pénétration directe à travers la membrane cytoplasmique (Lonberg-Holm and Philipson, 1969) (Fig.2). Elle migre alors vers le noyau où l'ADN est injecté sous forme nucléoïde, laissant une capsid vide dans le cytoplasme (Morgan et al., 1969).

Au stade précoce, l'ADN viral est organisé dans le noyau en nucléosome, comme la chromatine cellulaire (Tate and Philipson, 1979). La TP (55 kDa) reste attachée à l'ADN après infection, ce qui le rend plus résistant aux exonucléases (Strauss et al., 1979).

Plusieurs cycles sont alors possibles :

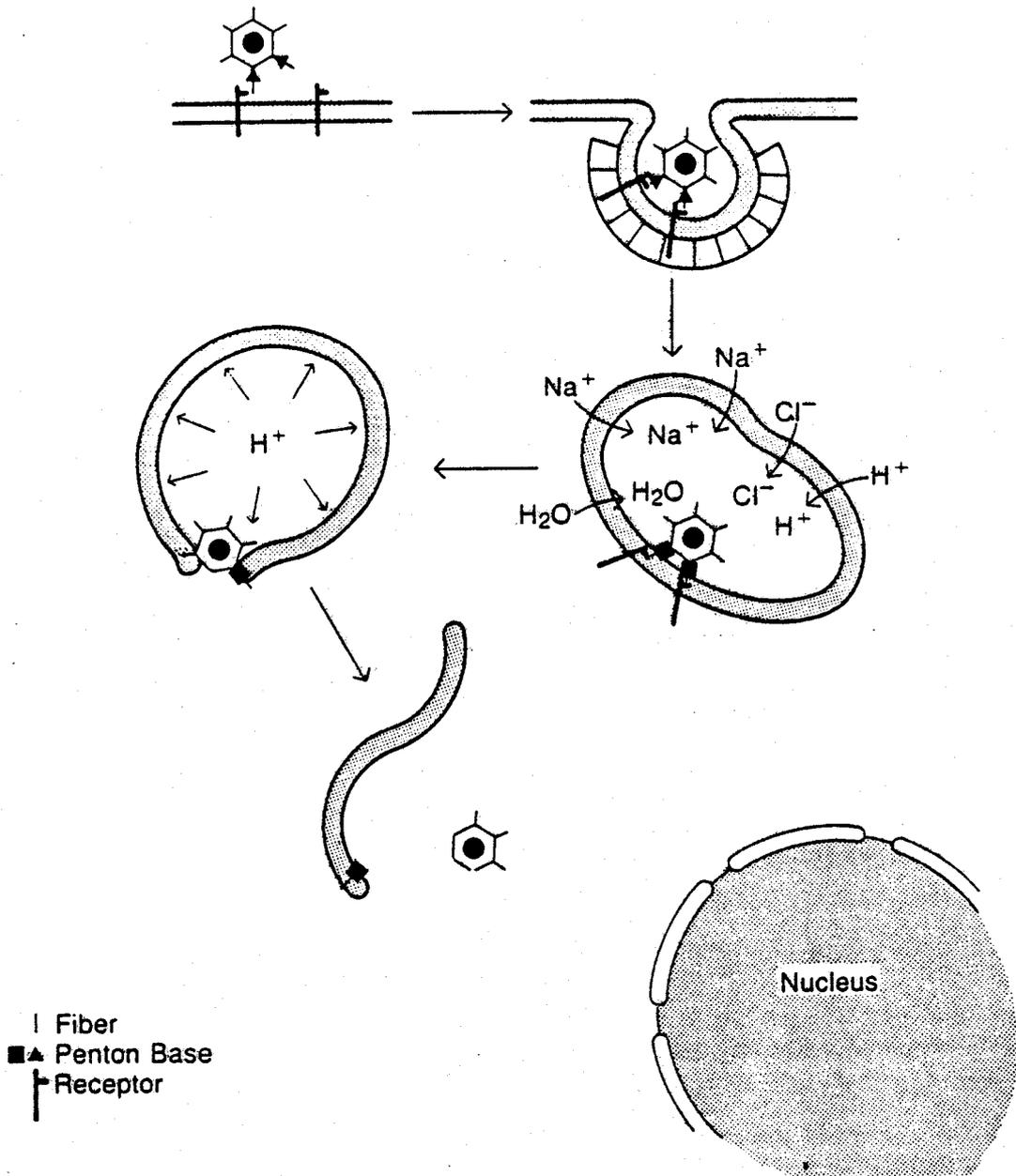
- 1- le cycle abortif
- 2- le cycle transformant
- 3- le cycle lytique

1- Le cycle abortif

Le virus exprime partiellement son information. En général, il y a synthèse de protéines précoces, mais le déroulement du cycle étant incomplet, il n'y a pas de progéniture virale. Ce cycle est dépendant de la nature du virus et de la cellule hôte (pour une revue, voir Delsert, 1985).

Figure 2 :

Adsorption, pénétration et décapsulation de la particule virale dans la cellule hôte (Seth et al., 1986).



2- Le cycle transformant

Huebner et al. (1962), Trentin et al. (1962) ont mis en évidence que certains adénovirus sont oncogènes chez le hamster nouveau-né. Ces adénovirus de sous-groupes A (Ad12, 18, 31) et B (Ad3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35) sont capables d'induire des tumeurs.

Toutefois, tous les sérotypes d'adénovirus humains peuvent transformer les cellules primaires de rein de rat. Les cellules acquièrent des caractères phénotypiques nouveaux et, entre autres propriétés : variation des quantités de nucléotides durant le cycle cellulaire, modification du cytosquelette, changement de la composition en glycolipides et en glycoprotéines, présence d'antigènes foetaux, la sécrétion des protéases est fortement augmentée, possibilité de culture en milieux nutritifs carencés en Ca^{++} , induction de tumeurs lors d'injection de cellules transformées à des animaux sensibles. Les antigènes et les ARNm viraux sont détectés et des séquences d'ADN viral sont retrouvées (pour une revue, voir Delsert, 1985).

La région transformante de l'adénovirus est située dans les 12 % de l'extrémité gauche du génome (régions E1A et E1B) (revues générales : Bernard and van der Eb, 1984 ; Branton et al., 1985a) (cf. chapitre VIII).

3- Le cycle lytique

Le cycle viral dure environ 40 h, il commence avec l'adsorption du virus au niveau des récepteurs cellulaires et se termine par la lyse de la cellule hôte, suivie de la libération d'une grande quantité de particules virales infectieuses.

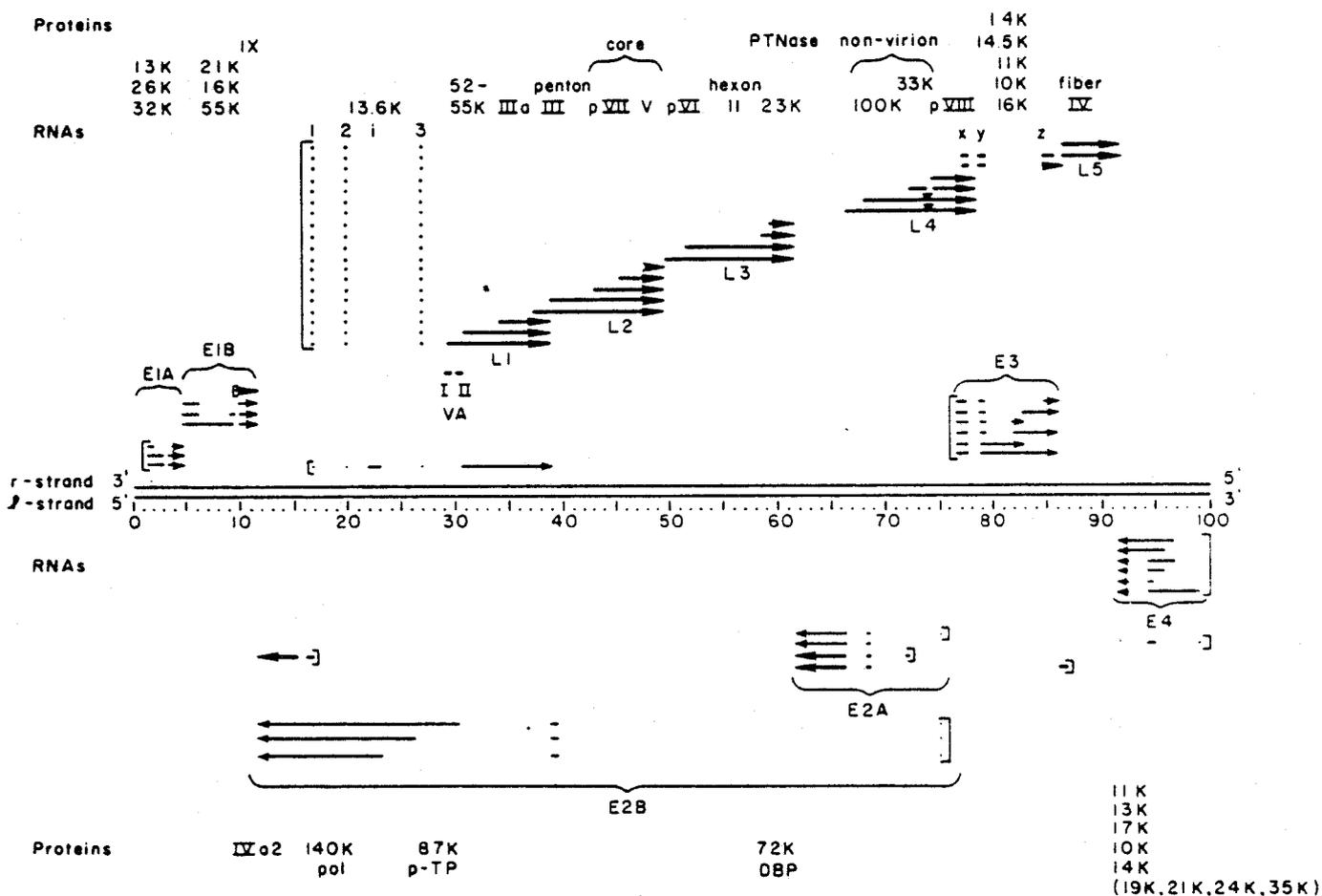
Il est divisé en plusieurs phases : précoce, intermédiaire et tardive. Lors de la phase intermédiaire c'est le début de la réplication de l'ADN qui détermine le passage entre la phase précoce et la phase tardive.

3.1- La phase précoce

Durant cette phase, sont retrouvées certaines étapes communes aux cycles abortif, transformant et lytique ; c'est pourquoi elle est particulièrement étudiée chez les adénovirus. Quatre zones précoces sont transcrites : a) les régions E1 et E3 sur le brin "r" (de gauche à droite) ; (b) les régions E2 et E4 sur le brin "l" (de droite à gauche).

Figure 3 :

Carte génétique de l'adénovirus type 2 (Broker et al., 1984).



Les flèches noires représentent les ARNm.

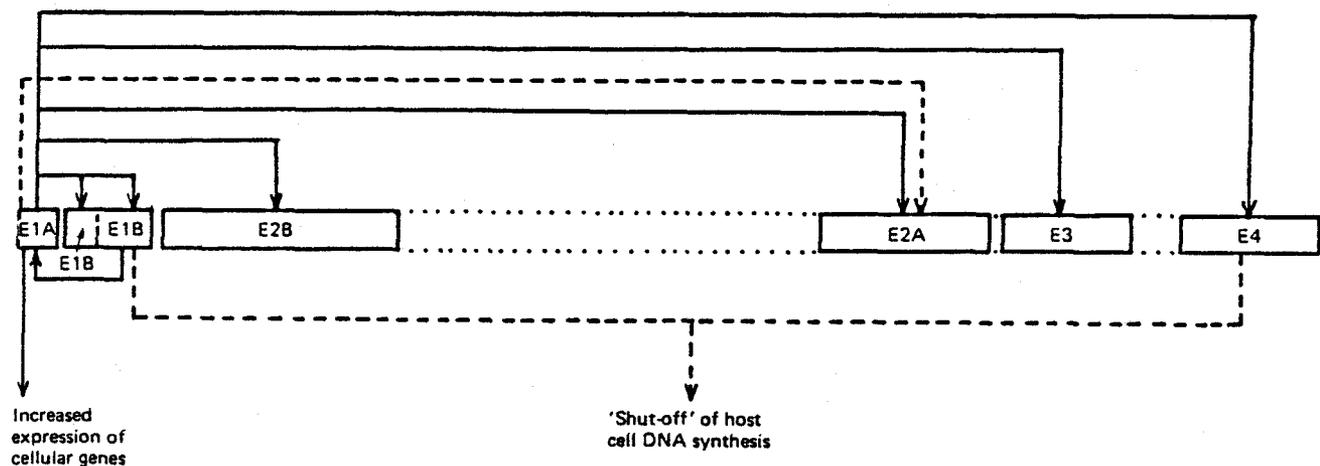
Les protéines assignées aux différentes régions sont indiquées.

3.1.1- La région E1

Elle est sous-divisée en E1A et E1B. Cette région fera l'objet d'une étude plus approfondie au chapitre VIII. Une figure est présentée ci-contre pour faciliter la compréhension, en particulier, du processus de stimulation de tous les promoteurs précoces : E1B, E2A, E3 et E4, par les produits de la région E1A.

Figure 4 :

Rôles des protéines de la région E1A dans la régulation et l'expression des gènes viraux et cellulaires (Grand, 1987a).



3.1.2- La région E2

Elle est transcrite à partir du brin "I" du génome viral; elle se situe entre 75,4 et 11,3 UG et contient deux unités transcriptionnelles, E2A et E2B. Tout au début du cycle viral le principal promoteur activé est localisé à 75,4 UG (E2A-E). Lors de la transition : phase précoce - phase tardive, il y a changement de promoteur et les ARNm sont transcrits préférentiellement à partir du promoteur localisé à 72,2 UG (E2A-L) (Chow et al., 1979).

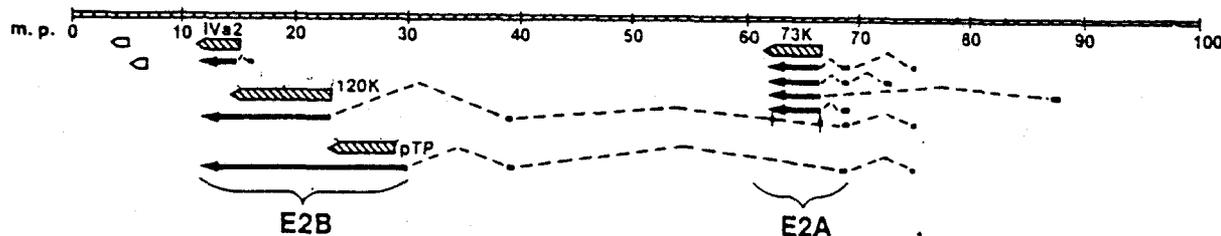
3.1.2.1- la région E2A

Les ARNm, transcrits de la région E2A, sont présents dans le cytoplasme 2 h à 3 h après l'infection (Nevins et al., 1979). Le promoteur de cette région, qui n'est pas précédé d'un motif "TATAA", est stimulé par les produits de la région E1A. Ces produits agissent sur des séquences bien définies (Elkaim et al., 1983 ; Imperiale and Nevins, 1984b).

Une séquence située entre -79 nt et le site de coiffe (+1) est nécessaire à la transcription et à la transactivation par les produits de la région E1A. Cette séquence ressemble à l'élément activateur de la région E1A, et peut fonctionner indépendamment de son orientation et de sa position (en aval ou en amont du promoteur) (Imperiale and Nevins, 1984b).

Figure 5 :

Représentation graphique des transcrits de la région E2 de l'Ad2 (d'après Green et al., 1983).



Les ARNm sont représentés par les flèches noires et les protéines par celles hachurées.

Les points noirs représentent le site de démarrage de la transcription.

Récemment, Zajchowski et al. (1987) ont mis en évidence l'existence de trois éléments impliqués dans la transactivation du promoteur E2A, par les produits de la région E1A : (a) l'élément I, localisé entre -13 nt et +62 nt ; (b) l'élément II localisé entre -71 nt et -29 nt ; (c) l'élément III localisé entre -146 nt et -86 nt. Individuellement chaque élément est incapable d'être transactivé, par contre des combinaisons entre I et II ou II et III, sont suffisantes à la transactivation. Les auteurs ont conclu que l'élément II semble être d'une importance capitale pour la transactivation du promoteur E2A.

La région E2A code pour une protéine (DNA Binding Protein - DBP) possédant une grande affinité pour l'ADN simple brin. Elle a une masse moléculaire apparente de 72 kDa et réelle de 58 kDa (Kruijer et al., 1982). La DBP est une protéine multifonctionnelle : elle est autorégulée (Carter and Blanton, 1978) ; elle régule négativement la transcription de la région E4 "in vitro" (Handa et al., 1983) et "in vivo" (Nevins and Wrinkler, 1980) ; elle régule la stabilité des ARNm de la région E1 (Babich and Nevins, 1981) ; elle est nécessaire à l'initiation de la réplication de l'ADN et à son élongation (van der Vliet et al., 1977). La 72 kDa joue un rôle au niveau de l'assemblage des particules virales (Nicolas et al., 1983).

Des études réalisées avec les mutants H5 ts 125 (Horwitz, 1978), H5 ts 107 (Kruijer et al., 1983) et H5 hr 404 (Kruijer et al., 1981) ont permis d'observer deux domaines fonctionnels principaux dans la protéine 72 kDa. Dans les mutants ts cette protéine présente des modifications du côté C-terminal, extrémité qui possède une affinité pour l'ADN simple brin et est impliqué dans l'expression des gènes précoces. La 72 kDa du mutant hr présente une modification du côté N-terminal phosphorylé. La séquence modifiée ne se lie pas à l'ADN simple brin, elle est impliquée dans l'expression des gènes tardifs et est responsable de l'attachement de la protéine à la membrane nucléaire (Klessig et al., 1986).

Quinn et Kitchingman (1984) ont comparé la séquence d'acides aminés de la 72 kDa des adénovirus de sérotypes 5, 7 et 12 et ont pu constater :

- a) l'existence de trois régions hautement conservées dans la partie C-terminale. Ces régions sont riches en acides aminés basiques. Ceci peut expliquer l'affinité de cette partie pour l'ADN simple brin ;
- b) une hétérogénéité de l'extrémité N-terminale, principalement pour l'Ad5 et l'Ad12.

3.1.2.2- la région E2B

Trois ARNm différents sont identifiés à partir de la région E2B. Ils possèdent en commun un ensemble d'exons - séquences de tête - situés à 76 UG, 68,5 UG et 39 UG, associés à la partie principale des ARNm localisée respectivement à 30 UG, 26 UG, 23 UG et se terminant à 11,2 UG .

Le plus grand des ARNm englobe une ORF située entre 29,3 et 23,9 UG. Elle code pour le précurseur de la protéine terminale (pTP-87 kDa), qui donnera par clivage la protéine terminale de 55 kDa (Smart and Stillman, 1982). Le plus petit des ARNm code pour l'ADN polymérase virale de 140 kDa (Nagata et al., 1982) et son ORF est située entre 24 et 14,2 UG. Aucune protéine n'a été jusqu'à présent identifiée pour l'ORF située entre 25,1 et 23,3 UG.

Les deux protéines codées par E2B jouent un rôle prépondérant dans la réplication de l'ADN viral.

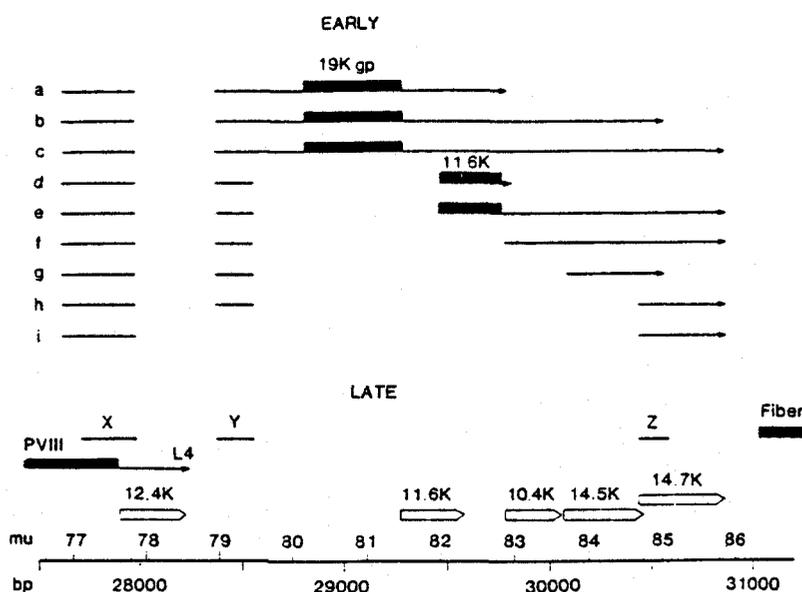
3.1.3- La région E3

Elle est transcrite à partir du brin "r" et est située entièrement dans la région sous le contrôle du promoteur majeur tardif (Berk and Sharp, 1978). Le promoteur propre à cette région comporte une séquence homologue au motif "TATAA". Les ARNm de la région E3 sont produits à partir de deux précurseurs majeurs. Ils possèdent un site de coiffe commun localisé à 76,8 UG et disposent de deux sites de terminaison différents du côté 3' : le plus utilisé est situé à 85,9 UG, il est précédé par l'hexanucléotide AAUAAA ; le deuxième, localisé à 82,9 UG, est utilisé moins fréquemment et a pour séquence de polyadénylation AUUAAA (Baker and Ziff, 1981 ; Stalhandske et al., 1983).

Au moins neuf ARNm sont produits par épissage des précurseurs. Il faut souligner que plusieurs sites d'épissage, utilisés par les "leaders" supplémentaires "x", "y" et "z" présents dans l'ARNm de la fibre, coïncident avec ces jonctions (Chow and Broker, 1978 ; Uhlén et al., 1982).

Figure 6 :

Représentation graphique des transcrits de la région E3 de l'Ad2 (d'après Akusjärvi et al., 1986).



Les flèches noires représentent les ARNm et les flèches blanches et rectangles noirs les protéines.

Pendant la phase précoce, les ARNm (a à i) ont en commun une séquence "leader" allant de 76.6 à 77.6 UG.

Pendant la phase tardive, les ARNm débutent au niveau de la séquence "leader tripartite" (x,y,z).

Huit ORFs capables de coder pour des protéines de plus de 100 AA sont présentes dans cette région (Hérissé et al., 1980), mais seulement une glycoprotéine de 19 kDa et un polypeptide de 11,6 kDa sont indubitablement codées par la région E3 (Persson et al., 1980).

Des études, dans les cellules normalement permissives à la souche sauvage, avec des adénovirus recombinants ayant une délétion partielle ou totale de la région E3, ont montré que cette région n'est pas nécessaire à la réplication, (Lewis et al., 1974 ; Thimmapaya et al., 1982 ; Berkner and Sharp, 1983). Puisque la région E3 est bien conservée entre différents sérotypes d'adénovirus humains, elle possède sans doute des fonctions très importantes pour l'infection de leurs hôtes naturels, mais encore méconnues.

La protéine 19 kDa forme un complexe avec les chaînes lourdes des antigènes majeurs d'histocompatibilité de classe I (MHC I) (Kämpe et al., 1983). Schrier et al. (1983) ont proposé que pendant l'infection lytique cette protéine joue un rôle similaire à celui des produits de la région E1A de l'Ad12 durant la transformation de cellules primaires de rat. Récemment, Severinsson et Peterson (1985) ont trouvé que la formation du complexe 19 kDa - Ag du MHC I abaisse l'expression de ces antigènes à la surface cellulaire et, en conséquence, empêche la reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T.

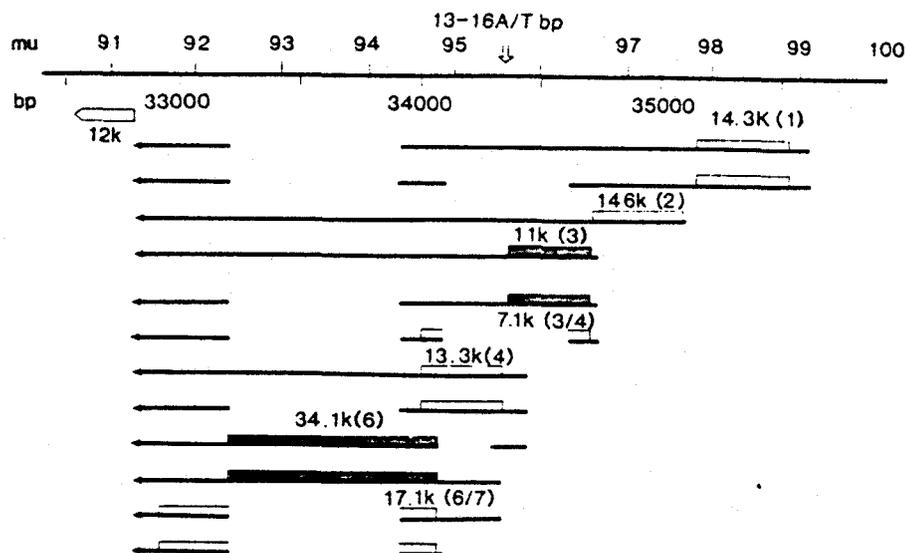
3.1.4- La région E4

Elle est transcrite à partir du brin "I", et est localisée à l'extrémité droite du génome viral (Berk and Sharp, 1978 ; Chow et al., 1979). Le promoteur, localisé à 99,1 UG, initie la transcription de façon hétérogène, à l'intérieur d'une région de sept nucléotides (Baker and Ziff, 1981 ; Hashimoto et al., 1981). Cette région possède une organisation et une régulation assez complexe.

Le promoteur de la région E4 représente un système très intéressant pour étudier l'action positive et négative des facteurs transactivateurs. La transcription est stimulée par les produits de la région E1A. Cependant, elle est réprimée par la 72 kDa (E2A-E) (Blanton and Carter, 1979 ; Nevins and Wrinkler, 1980).

Figure 7 :

Représentation graphique des transcrits de la région E4 de l'Ad2
(d'après Akusjärvi et al., 1986).



Les flèches noires représentent Les ARNm.

Les protéines sont représentées par Les rectangles noirs et blancs.

Dans la région E4, trois motifs sont importants pour une transcription "maximale" : a) une séquence "TATA-like" à la position -25 nt par rapport au site de coiffe (+1) ; b) un élément localisé entre les positions -44 nt et -58 nt ; c) un élément situé entre les positions -325 nt et -140 nt.

Ce dernier élément est particulièrement important, car s'il est supprimé le taux de transcription baisse d'au moins dix fois. Il est aussi un site de répression par la 72 kDa (Handa et al., 1983). Gilardi et Pérricaudet (1984) ont trouvé un domaine régulateur entre les positions -158 nt et -179 nt. Ce domaine contient une séquence 5' GGGAAGTGAC 3' qui est homologue au "core" de la séquence activatrice présente dans la région E1A de l'Ad2. Elle est aussi retrouvée dans la région E2A entre les positions -80 nt et -67 nt. Récemment, les mêmes auteurs ont démontré que les régions situées entre -239 nt et -218 nt, -179 nt et -158 nt sont nécessaires au processus de transactivation par les produits de la région E1A de l'Ad2 (Gilardi and Pérricaudet, 1986).

9 à 14 ARNm sont transcrits par la région E4 (Berk and Sharp, 1978 ; Chow et al., 1979 ; Tigges and Raskas, 1982) et maturés par un mécanisme d'épissage à partir d'un précurseur nucléaire commun. Ils possèdent donc la même séquence de tête à la position 99,2 UG et la même extrémité 3' située à 91,3 UG (Chow et al., 1979).

Weinberg et Ketner (1986) ont mis en évidence que la région E4 est nécessaire à une réplication efficace de l'ADN viral, et à l'expression des gènes tardifs.

Les fonctions des protéines de la région E4 sont très peu connues. Des études avec plusieurs mutants de délétion dans cette région ont montré que celles-ci n'affectent pas la réplication de l'ADN. Mais quelques mutants (H5 dl 341, H5 dl 355, H5 dl 366) produisent une quantité très réduite de protéines tardives. La production virale est diminuée d'un facteur 50 par rapport à celle du type sauvage. Ces observations indiquent que pour quelques protéines, au moins, codées par la région E4, un rôle est possible dans la régulation du niveau d'expression des protéines au cours de la phase tardive du cycle viral (Halbert et al., 1985).

3.2- La phase intermédiaire

3.2.1- La réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN viral détermine le passage de la phase précoce à la phase tardive du cycle viral. Son taux est très élevé dans les cellules permissives et pendant le cycle d'infection il y a synthèse d'une quantité d'ADN viral comparable à la quantité d'ADN chromosomique de la cellule infectée. La réplication peut débuter à chaque extrémité du génome viral. Elle se produit par la séparation et le déplacement du brin non répliqué (Sussenbach et al., 1972 ; Younghusband and Maundrell, 1982).

3.2.1.1- le rôle de la séquence terminale répétée inversée (ITR)

La réplication de l'ADN viral est initiée dans l'ITR. Celui-ci peut être divisé en deux régions : (a) une région terminale riche en AT ; (b) une région interne riche en GC. Pour l'ADN des adénovirus humain, la région riche en AT est constituée de 52-59 pb et la région GC de

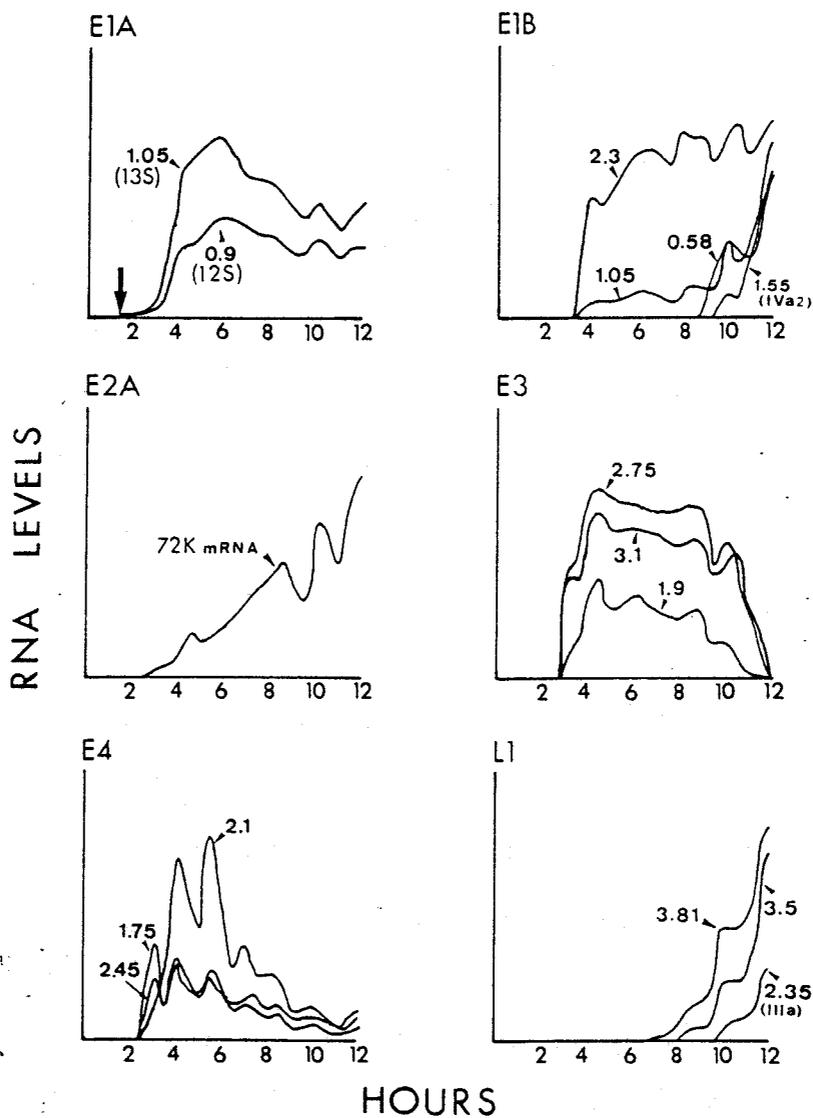
Tableau 4 :

Les protéines précoces et leurs principales fonctions (d'après Caillet-Boudin, 1987).

Région	Cordonnées sur la carte génomique	mRNA		Protéines	Fonctions
		5' -- 3'	Taille		
E1A	1,3 - 4,6	r	13 S	53 kDa	- régulation de la transcription
		r	12 S	47 kDa	. des autres zones précoces
		r	11 S	35 kDa	. des VA-RNA
			10 S	30 kDa	. autorégulation
			9 S	28 kDa	- transformation cellulaire (immortalisation)
					- effet de trans-dominance interséro-typique
					- activation des gènes cellulaires codant pour la protéine majeure induite par choc thermique et pour la β -tubuline
E1B	4,6 - 11,2	r	22 S	55 kDa	- transformation cellulaire
				19 kDa	- liaison à la protéine cellulaire de transformation (p53)
			13 S	19 kDa	- activité protéine kinase
					- transport et maturation des mRNA tardifs
					- maintien de l'intégrité de l'ADN viral et cellulaire
E2A	61,7 - 66,6	l	22 S	72 kDa	- réplication
					- régulation des gènes précoces
					- transformation
					- épissage des mRNAs tardifs
E2B	11 - 31	l			- réplication virale
				87 kDa	. précurseur de la protéine terminale
				140 kDa	. ADN polymérase
E3	76,6 - 99	r		19 kDa	- association aux antigènes d'histo-compatibilité
				11,6 kDa	
E4	91,3 - 99	l		11 kDa	- stimulation de la transcription des zones E2 et E1B
				34 kDa	
				14 kDa	- fonction requise pour la multiplication du virus associé à l'adénovirus (AAV)
					- arrêt des synthèses cellulaires
					- expression des gènes tardifs

Figure 8 :

Représentation graphique de l'apparition et du taux des transcrits des régions précoces de l'Ad5 (Glenn and Ricciardi, 1988).



50-110 pb. La première région (AT) est extrêmement conservée entre tous les adénovirus humains et l'est partiellement chez les adénovirus de singe, de chien, de cheval, de souris, et les aviadénovirus. En outre, il existe une séquence de 10 pb (ATAATATACC) présente dans tous les sérotypes. L'ITR est le site de fixation du complexe pTP-ADN polymérase (Stillman et al., 1982 ; Rijnders et al., 1983) (Fig. 9). Les nucléotides 17 à 48 seraient nécessaires à la fixation "in vitro" du facteur nucléaire I (Guggenheimer et al., 1984). Une autre séquence : GGGCGG, présente en plusieurs copies dans la région riche en GC est similaire à la séquence GGGXGGAG localisée à l'origine de réplication du virus du polyome et du SV40 (Papovaviridae). Elle est indispensable à l'activation de la réplication de tous ces virus (Bergma et al., 1982).

3.2.1.2- L'initiation de la réplication

L'ADN polymérase virale (Nagata et al., 1982) catalyse la fixation covalente d'un résidu désoxycytidilique à une sérine du précurseur de la protéine terminale (Désidério and Kelly, 1981 ; Stillman et al., 1982). Le complexe pTP-dCMP ainsi formé permet d'amorcer la réaction d'initiation. L'induction est stimulée par le facteur nucléaire I (47 kDa), ainsi que par une protéine d'origine virale, la DBP-72 kDa (van der Vliet and Sussenbach, 1975 ; Nagata et al., 1982).

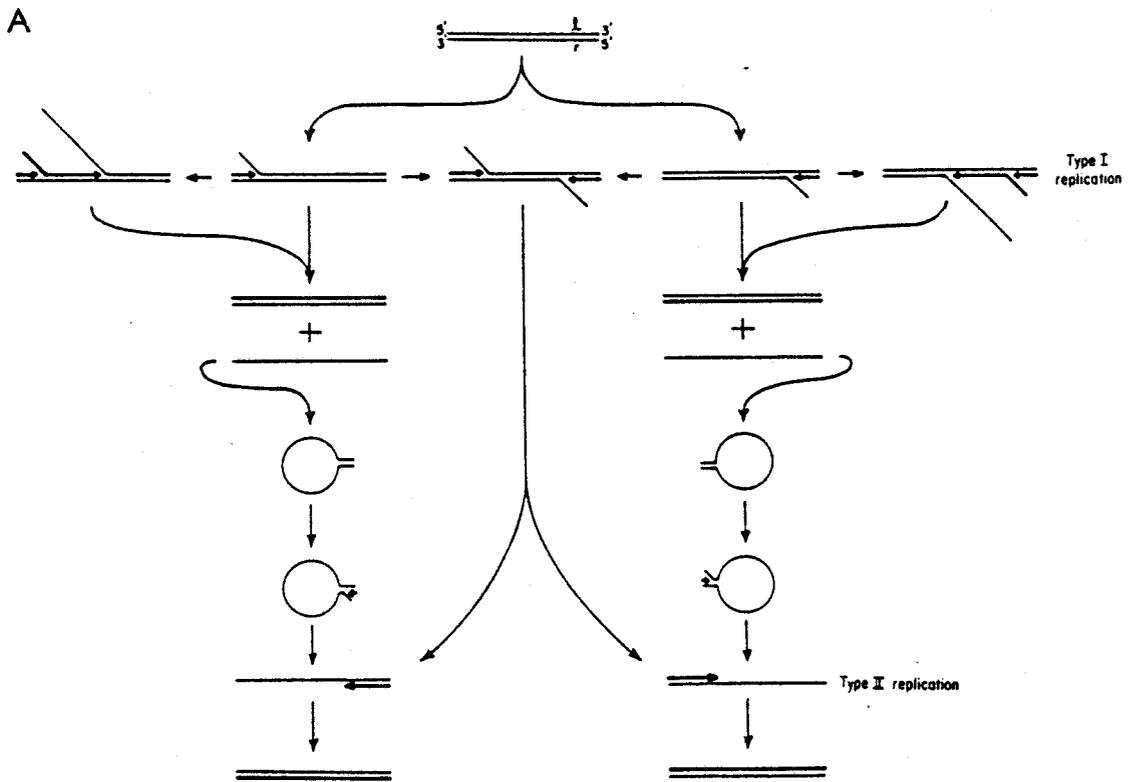
Pour l'élongation de l'ADN la DBP et une autre protéine cellulaire, le facteur nucléaire II (14,5 - 30,5 kDa) sont nécessaires (Nagata et al., 1983). Friedfeld et al. (1983) ont démontré que seulement la partie C-terminale de la 72 kDa est indispensable à la réaction d'élongation. Le brin parental non répliqué est déplacé, il pourrait alors se circulariser par hybridation avec l'ITR et ainsi être répliqué à son tour (Lechner and Kelly, 1977) (Fig.10A). Guggenheimer et al. (1984) ont décrit un modèle de réplication de l'ADN et du rôle des différentes protéines cellulaires et virales (Fig.10B).

3.2.2- Les gènes exprimés pendant la phase intermédiaire

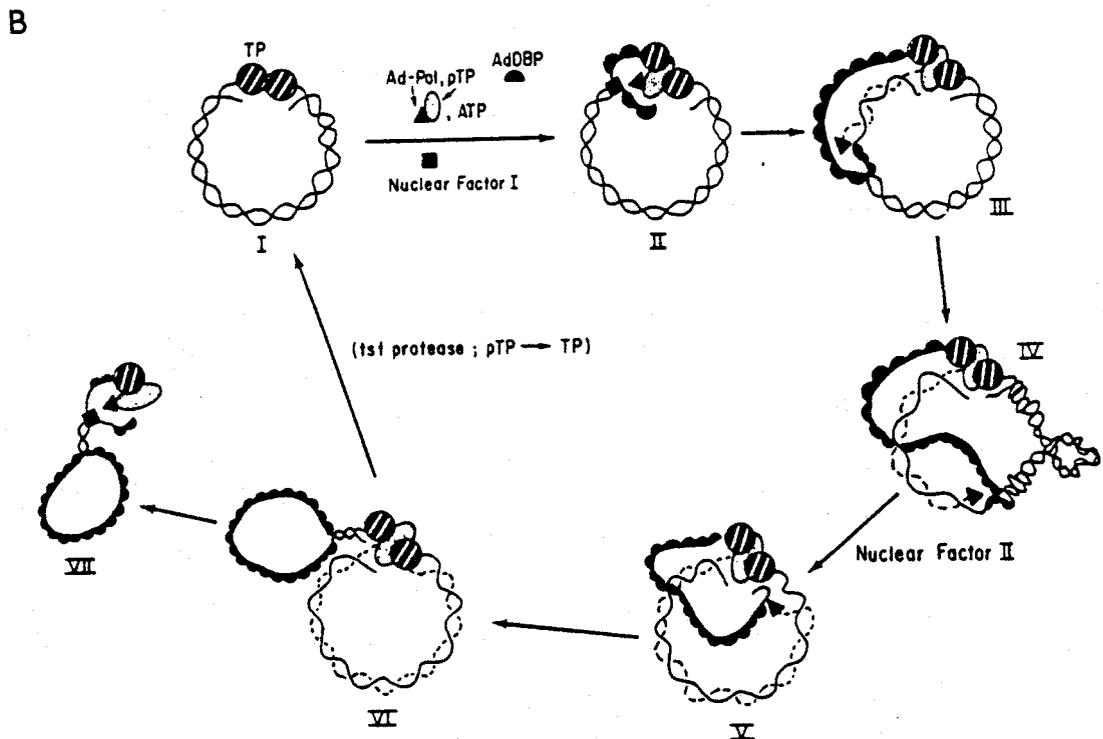
Après le démarrage de la réplication de l'ADN, plusieurs régions du génome viral sont transcriptionnellement actives. En plus

Figure 10 :

Modèles de réplication de l'ADN de l'adénovirus type 2.



Modèle de Lechner et Kelly (1977) expliquant le mécanisme de déplacement du brin non répliqué.



Modèle de Guggenheimer et al. (1984) montrant le rôle des protéines cellulaires et virales dans la réplication.

des gènes précoces, deux nouvelles unités de transcription sont activées, celles qui codent pour : (a) le polypeptide IX; (b) le polypeptide IVa₂. Une faible quantité d'ARNm peut être détectée avant la réplication de l'ADN mais la synthèse de ces deux ARNm est efficace uniquement après le début de la réplication (Crossland and Raskas, 1983).

3.2.2.1- l'unité de transcription du polypeptide IX

La synthèse du polypeptide IX est contrôlée par une unité de transcription située sur le brin "r", dans la région E1B. Le promoteur est localisé à 9,9 UG. L'ARNm n'est pas épissé, son site de polyadénylation est identique à celui des ARNm de la région E1B (Aleström et al., 1980).

3.2.2.2- l'unité de transcription du polypeptide IVa₂

L'ARNm du polypeptide IVa₂ est transcrit à partir du brin "l". Le contrôle est assuré au niveau d'un promoteur situé à 16,2 UG. Celui-ci n'a pas de "TATA box" (Baker and Ziff, 1981) et est en compétition avec le promoteur majeur tardif pour un site de fixation de l'ARN polymérase II. Le polypeptide possède une masse moléculaire de 51 kDa (Natarajan et al., 1984).

3.3- La phase tardive

Elle est caractérisée par une transcription prédominante à partir du MLP localisé à 16,8 UG, sur le brin "r". La quantité d'ARNm transcrits à partir du MLP représente 30 % du total des ARNm synthétisés pendant cette phase (Lucas and Ginsberg, 1971).

3.3.1- Le promoteur majeur tardif (MLP)

Le MLP possède une séquence "TATA box" et une autre séquence située de -97 nt à -34 nt, par rapport au site de coiffe (+1), celle-ci est indispensable pour une transcription efficace (Hen et al., 1982). Les ARNm contrôlés par le MLP codent pour huit polypeptides distincts, présents dans le virion.

Le MLP permet la transcription d'un ARN précurseur nucléaire de 28 S à partir de son promoteur situé à 16,6 UG sur le brin "r" de l'ADN viral. Celui-ci subit des modifications post-transcriptionnelles qui entraînent la formation de cinq familles d'ARNm, dénommées L1, L2, L3, L4 et L5. Ces ARNm possèdent tous à leur extrémité 5' une séquence non codante de 200 nt qui est appelée "séquence tripartite" ("tripartite leader"). Dans cette séquence existe, au moins, 15 sites accepteurs d'épissage et les "leaders" sont au nombre de trois : aux positions 16,6 , 19,6 et 26,6 UG (Chow et al., 1977). Chaque ARNm d'une même famille possède un site accepteur d'épissage différent mais le même signal d'addition de poly (A). Osborne et al. (1984) montrent que le "tripartite leader" stimule cinq fois l'efficacité de traduction des ARNm au stade tardif.

Les ARNm de la fibre (L5) peuvent posséder, en plus, trois autres séquences "leader". Elles sont situées aux positions 73,3-76.9 UG (x); 78,6-79,1 UG (y) et 84,1-85,1 UG (z) (Chow et al., 1979).

Tableau 5 :

Nature des zones codantes tardives de l'adénovirus.

Famille	Protéines codées dans la famille	Coordonnées de l'extrémité 3'OH (en unités génome)
L1	IIIa, 52-55 kDa	39,00 UG
L2	III, pVII, V	49,50 UG
L3	pVI, Hexon, 23 kDa (protéase)	61,50 UG
L4	100 kDa, pVIII, 33 kDa	78,30 UG
L5	Fibre (IV)	91,20 UG

3.3.2- Les ARNm précoces présents à la phase tardive

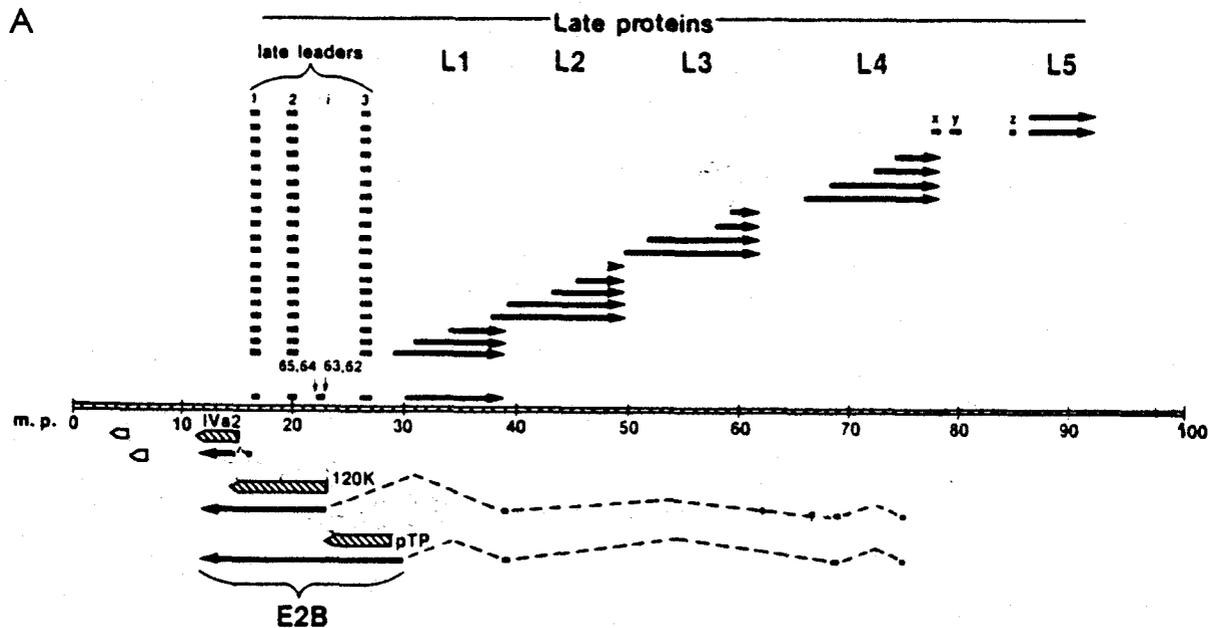
Quelques promoteurs ne s'expriment que pendant la phase précoce, d'autres seulement à la phase tardive (ARNm Classe I). Mais certains promoteurs sont capables de s'exprimer pendant les deux phases (ARNm Classe II) (Lucas and Ginsberg, 1971).

Spector et al. (1978) ont démontré que le promoteur de la région E1B exprime les ARNm 22 S et 13 S en très grande quantité pendant la phase précoce. Ces ARNm sont aussi présents pendant la phase tardive, mais avec un taux de 13 S plus important que celui de 22 S.

En ce qui concerne la région E2A, l'ARNm 22 S est présent pendant la phase précoce, mais son taux d'expression le plus élevé se situe à 18 h p.i. (phase tardive) (Flint and Sharp, 1976).

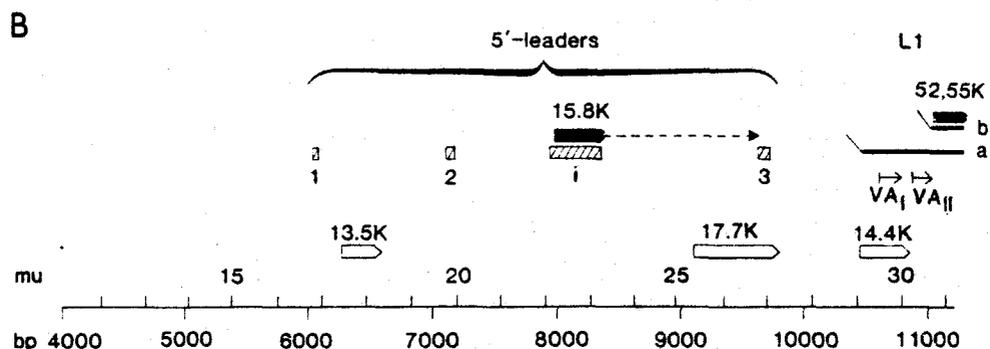
Figure 11 :

Représentation graphique des transcrits des phases intermédiaire et tardive du cycle viral (d'après Akusjärvi *et al.*, 1986).



Les flèches noires représentent les ARNm.

Les protéines sont représentées par les flèches hachurées.



Localisation des VA-RNA.

3.3.3- Les ARN associés au virus (VA-RNA)

Deux petits ARNm (VA-RNA I et II) sont transcrits à partir du brin "r" à 30 UG (Mathews, 1975) (Fig. 11B). Ils possèdent moins de 160 nt et sont décelés en quantité plus importante pendant la phase tardive. Les VA-RNA I et VA-RNA II sont transcrits par l'ARN polymérase du type III (Weinman et al., 1974) ; ils ne subissent aucune modification post-transcriptionnelle et le premier est synthétisé quarante fois plus que le deuxième pendant le cycle viral (Soderlund et al., 1976).

Thimmapaya et al. (1982) ont construit deux mutants de délétion : le premier (H5 dl 330) ne transcrit pas le VA-RNA I ; le deuxième (H5 dl 328) le VA-RNA II. Ils ont observé que le H5 dl 330 a un taux de production de virus très inférieur à celui du type sauvage. Par ailleurs, le H5 dl 328 s'exprime de façon normale. Schneider et al. (1984) ont démontré que les VA-RNA I interviennent au niveau de l'initiation de la traduction.

Reichel et al. (1985) ont établi que le facteur cellulaire eIF2 (facteur d'échange de la guanosine) devient inactif dans les cellules infectées par un adénovirus mutant qui n'exprime pas le VA-RNA I. Celui-ci inhibe l'activité d'une protéine kinase qui vient phosphoryler le facteur eIF2. Cette protéine kinase est dépendante de l'ARN double brin et est induite par l'interféron (O'Malley et al., 1986).

3.3.4- L'assemblage

Pendant la phase tardive du cycle de l'adénovirus, les ARNm viraux sont préférentiellement traduits au détriment de la synthèse protéique de la cellule hôte. Les polypeptides viraux sont immédiatement libérés des polyribosomes et transportés vers le noyau. Le temps de transport est de 3 à 6 min et l'assemblage a lieu dans le noyau (Horwitz et al., 1969).

L'assemblage est assuré par les protéines de structure de la capsid, mais d'autres protéines dites de stabilisation et d'échafaudage sont nécessaires à la formation de la particule virale complète.

Chaque cellule HeLa infectée par l'Ad2 produira à la fin du cycle lytique 10^5 particules virales infectieuses. Ce chiffre est relativement élevé, mais paradoxalement il est très faible, car si nous évaluons la quantité de protéines et d'ADN viral produits, elle est comparable à celle de la cellule hôte. Cependant, plusieurs particules virales sont produites de façon incomplète (particules défectives). Ces particules possèdent des densités différentes et ont été séparées par des méthodes d'ultracentrifugation. Cela a permis de mieux étudier quels sont leurs composants viraux structuraux.

Sundquist et al. (1973) ont établi que les protéines du "core" marquées radioactivement, se retrouvaient immédiatement dans le virion complet. Ceci suggère que ces derniers sont formés par l'insertion de l'ADN et des protéines du "core" dans les capsides vides pré-assemblées.

D'Halluin et al. (1978b), en étudiant les formes intermédiaires d'assemblage des adénovirus, ont suggéré que l'ADN peut pénétrer dans la capside vide avant d'être associé aux protéines du "core". C'est dans la capside que se fait la circularisation de l'ADN par la protéine terminale. L'identification en microscopie électronique d'un intermédiaire d'assemblage directement associée à l'ADN est venue corroborer cette hypothèse (Moncany et al., 1980) .

Le cycle lytique est terminé lorsque les virions infectieux lysent la cellule-hôte.

Figure 12 :

Schéma d'assemblage de la particule infectieuse (D'Halluin, 1980).

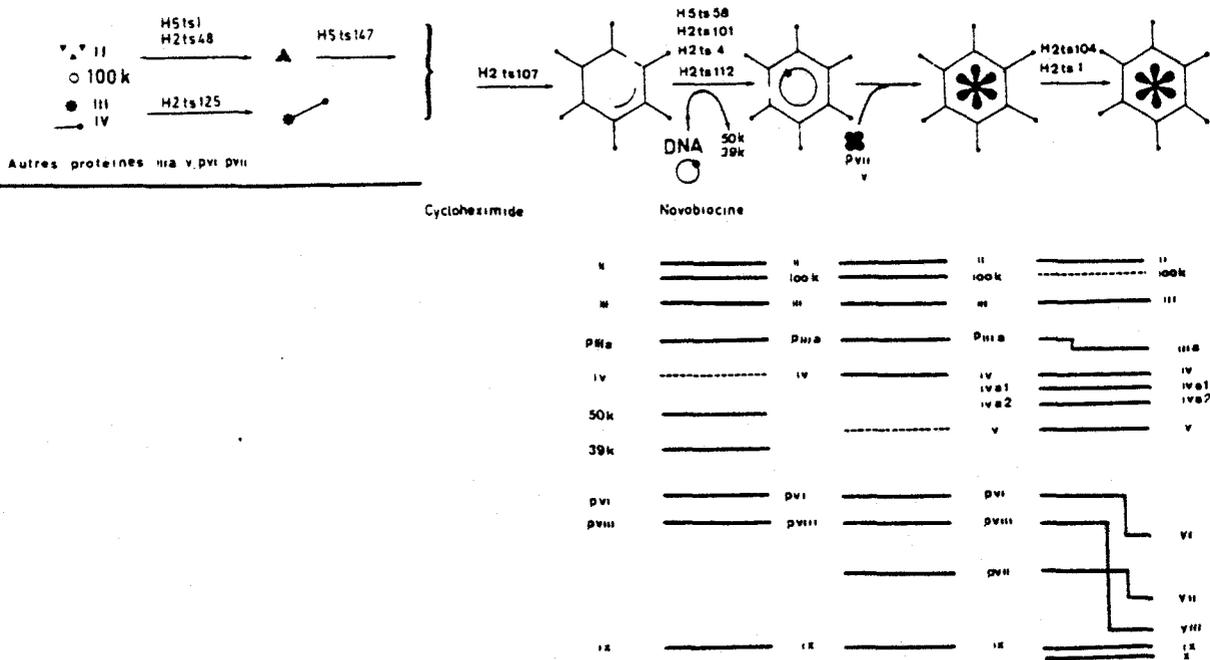
PROTEINES DE
STRUCTURE

Intermédiaire
léger
d = 1.315

Intermédiaire
d = 1.37

Jeune virion
d = 1.345

Virion mature
d = 1.345



La composition en polypeptides est indiquée en dessous des diverses particules. Les mutants inscrits au-dessus des flèches d'évolution des particules indiquent les étapes non réalisées dans les cellules infectées par ces divers mutants. Les particules isolées de ces cellules sont donc du type de celles situées à gauche du mutant mentionné.

VIII- LA REGION E1

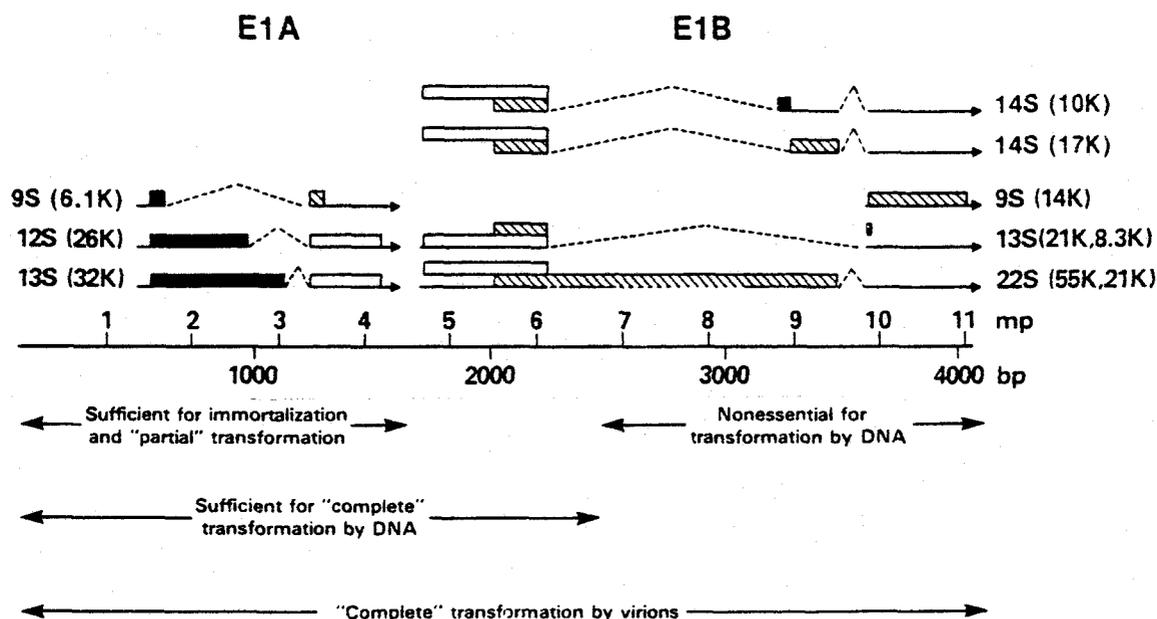
La région E1 est située dans les 11,2 % de l'extrémité gauche du génome viral. Cette région joue un rôle clé dans le cycle viral car elle est directement impliquée dans l'activation des autres régions précoces, la régulation et l'expression des gènes homologues et hétérologues, et lors du processus de transformation cellulaire. Il s'agit donc d'une région très intéressante pour étudier les mécanismes de régulation de l'expression des gènes de la cellule eucaryote.

Cette région est sous-divisée en trois unités de transcription :

- E1A, localisée entre 1,4 et 4,5 UG ;
 - E1B, localisée entre 4,8 et 11,2 UG ;
 - l'unité de transcription du polypeptide IX localisée entre 9,9 et 11,2 UG.
- (revues par Berk, 1986a,b ; Flint, 1986 ; Grand, 1987a).

Figure 13 :

Représentation graphique de la région E1 de l'Ad2 (Branton et al., 1985a)



Les ARNm sont représentés par les flèches noires.

Les protéines de E1A par les rectangles noirs et celles de E1B par les rectangles hachurés.

Les tracés pointillés représentent les introns.

Les unités de transcription E1A et E1B sont impliquées respectivement dans les phénomènes d'immortalisation et de transformation cellulaire. L'étude de ces deux unités sera développée ensuite avec plus de détails.

1- La région E1A

Après l'infection des cellules humaines par l'adénovirus, les premières protéines virales synthétisées sont celles de la région E1A (Nevins et al., 1979 ; Lewis and Mathews, 1981). Les protéines de la région E1A sont associées à un nombre étendu de fonctions importantes pour la multiplication du virus. Sans aucun doute, l'activation de la transcription des autres gènes précoces : E1B, E2, E3 et E, est la plus étudiée des fonctions de cette région (Berk et al., 1979 ; Jones and Shenk, 1979 ; Nevins, 1981 ; Ricciardi et al., 1981).

Ces protéines peuvent aussi stimuler la transcription de gènes cellulaires : (a) gène de la protéine de choc-thermique (hsp-70 kDa) ; (b) gène de la β -tubuline ; (c) gène de la α et β -globine ; (d) gène de la pro-insuline (Allan et al., 1984 ; Gaynor et al., 1984 ; Stein and Ziff, 1984). Les protéines de E1A sont aussi capables d'inhiber la transcription d'autres gènes quand les séquences activatrices sont proches du site de coiffe, tels que : (a) celui du SV40 ; (b) du virus du polyome ; (c) de la chaîne lourde des immunoglobulines (Borrelli et al., 1984 ; Hen et al., 1985 ; Velcich and Ziff, 1985).

Outre la régulation de l'expression des gènes, les protéines de E1A peuvent jouer un rôle très important dans la synthèse de l'ADN des cellules non permissives. Ces fonctions sont, jusqu'à présent, partiellement élucidées ; elles comprennent l'induction des protéines spécifiques du cycle cellulaire et la sécrétion des facteurs de croissance (Spindler et al., 1985 ; Stabel et al., 1985 ; Quinlan et al., 1987b ; Zerler et al., 1987).

Les protéines de la région E1A sont exprimées très précocement : 45 min p.i.. Elles atteignent une concentration "maximale" entre 3 et 4 h p.i.. Leur demi-vie est très courte : 35 à 55 min dans les cellules infectées et 80 à 90 minutes dans les cellules transformées (Spindler and Berk, 1984 ; Branton and Rowe, 1985b).

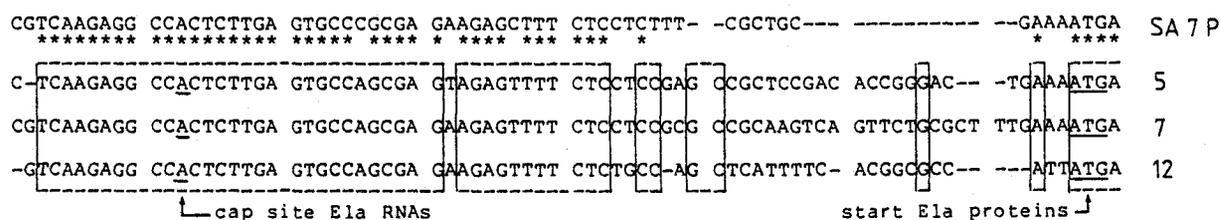
1.1- Le promoteur de la région E1A

Le promoteur de la région E1A est constitué par :

- la séquence nécessaire pour l'empaquetage de l'ADN dans le virion ;
- les séquences activatrices de la transcription ;
- les séquences "TATA box" et "CAAT box" ;
- une séquence de 47 nt hautement conservée entre tous les adénovirus humains et même le SA-7 (singe) (Fig.14).

Figure 14 :

Représentation de la séquence hautement conservée entre les adénovirus (Dekker et al., 1984).



1.1.1- Le motif "TATAA" ("TATA box")

Grosschedl et Birnstiel (1980), en étudiant les séquences en amont du promoteur du gène de l'histone H2A, ont déterminé que le motif "TATAA" est un site de positionnement important pour le démarrage de la transcription. Il est aussi le site de reconnaissance pour le facteur de transcription de l'ARN polymérase II de la cellule hôte (Parker and Topol, 1984).

Les sites majeurs d'initiation de la transcription sont situés au nt 498 (Ad2), nt 510 (Ad3) et nt 455 (Ad12) ; ils sont précédés par un motif "TATAA" situé à -30 nt par rapport au site de coiffe (+1) (van Ormondt et al., 1980). Mais d'autres sites existent, ils sont singularisés par la présence de motifs "TATAA like". Ces sites sont situés, pour l'Ad2, à -160 nt, -185 nt et -230 nt du site majeur de démarrage de la transcription utilisé au cours de la

phase précoce du cycle lytique (Osborne et al., 1982). Après le démarrage de la réplication de l'ADN viral, de nouveaux sites mineurs d'initiation de la transcription apparaissent à -300 nt, -325 nt, -360 nt, -375 nt du site majeur (Osborne and Berk, 1983).

Les sous-groupes d'adénovirus humains possèdent un motif "TATAA" différent (Tableau 6).

Tableau 6 :

Les motifs "TATAA" des différents sous-groupes d'Adénovirus humains.

Ad type	Sous-groupe	Séquence	Localisation (nt)
12	A	TA TTT AAT	414
3	B	TA TTT AAA	480
7	B		478
2	C	TA TTT ATA	467
5	C		468
4	E	TA TTT AAA	479
40	F	TA TTT AAA	388
41	F	TA TTT AAA	411

Green et al. (1983) ont démontré qu'une mutation dans le motif "TATAA" du gène de la β -globine humaine diminue de cinq fois le taux de transcription du gène transfecté dans des cellules HEK-293. Une délétion de 6 pb, dans laquelle les deux premières pb du motif "TATAA" de l'Ad2 sont incluses, entraîne une baisse de la transcription des ARNm de la région E1A de huit fois (Hearing and Shenk, 1983b). Wu et al. (1987) ont mis en évidence la nécessité de deux éléments, pour la régulation du promoteur de la région E1B de l'Ad2 : (a) le motif "TATAA" ; (b) un site de liaison pour le facteur de transcription Sp1. Ils ont observé qu'une mutation dans le motif "TATAA" interfère avec la transactivation par les produits de E1A. De plus, ils suggèrent que la région E1A interagit sur ce promoteur par l'intermédiaire du facteur de transcription Sp1 se liant sur un site proche de la "TATA box".

1.1.2- Les éléments activateurs de la transcription ("enhancers")

Les séquences "enhancers" ont été décrites pour la première fois chez le SV40 (Banerji et al., 1981 ; Benoist and Chambon, 1981 ; Gruss et al., 1981). Ces séquences peuvent stimuler la transcription indépendamment de leur distance et de leur orientation par rapport à la région codante (Moreau et al., 1981 ; Fromm and Berg, 1983). Elles stimulent la transcription non seulement de leur propre promoteur, mais aussi des promoteurs hétérologues (Banerji et al., 1981).

Des études comparatives n'ont pas révélé de séquence "consensus" entre les différents "enhancers", à l'exception des séquences situées au niveau du "core" de l'"enhancer" (Weither et al., 1983). Cette différence pourrait peut être expliquer une activité spécifique de l'hôte présentée par plusieurs "enhancers" (de Villiers et al., 1982 ; Laimins et al., 1982). Des molécules spécifiques de la cellule hôte pourraient agir, directement ou indirectement, sur les séquences "consensus" du "core" de plusieurs éléments "enhancers" (Tableau 7 et Fig. 15).

Tableau 7 :

Séquences du "core" des éléments "enhancers" (Laimins et al., 1983).

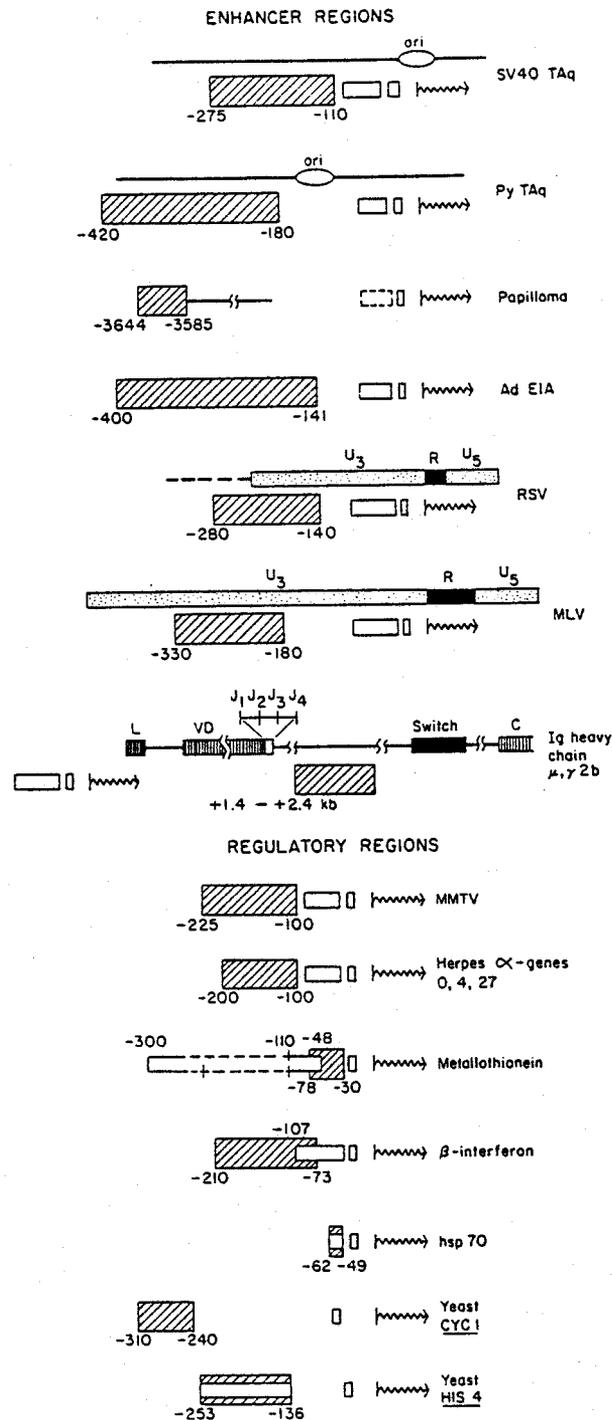
	Séquences
SV40	GTGTGGAAAGT
Virus du sarcome simien	GTGTGCTAAGC
Bakulovirus	TCATCGTTTGG
Virus du papillome bovin	GAGTGGTGTGT
Virus du polyome	GTGTGCTTTTG
	GCCTGGAATGT
Virus du sarcome de Rous	AGGTGGTACGA
Virus de la tumeur mammaire de la souris	ACTTGGTTTGG
E1A de l'Ad5	AGGAAGTGAAA ⁽¹⁾
E1A de l'Ad2	GGATGTGCTAA ⁽²⁾
Chaîne lourde des Ig de rat	CTGTGCTTTGA
Gène tk	GGCGGGTTTGT
Gène de la β -globine de lapin	CCCTGGTCTTG

(1) Hearing and Shenk, 1983a

(2) Hen et al., 1983.

Figure 15 :

Séquences "enhancers" et régions régulatrices de différents génomes viraux et eucaryotes (d'après Gluzman, 1983).



Les rectangles hachurés et blancs représentent, respectivement, les séquences "enhancers" et les promoteurs.

Les flèches indiquent le lieu de démarrage de la transcription.

Il est possible de classer les phénomènes de régulation observés avec les "enhancers" en deux catégories : (a) éléments sensibles aux modifications de l'environnement ("enhancers inductibles") ; (b) éléments spécifiques de l'hôte ("enhancers tissus-spécifiques") (revue par Maniatis et al., 1987).

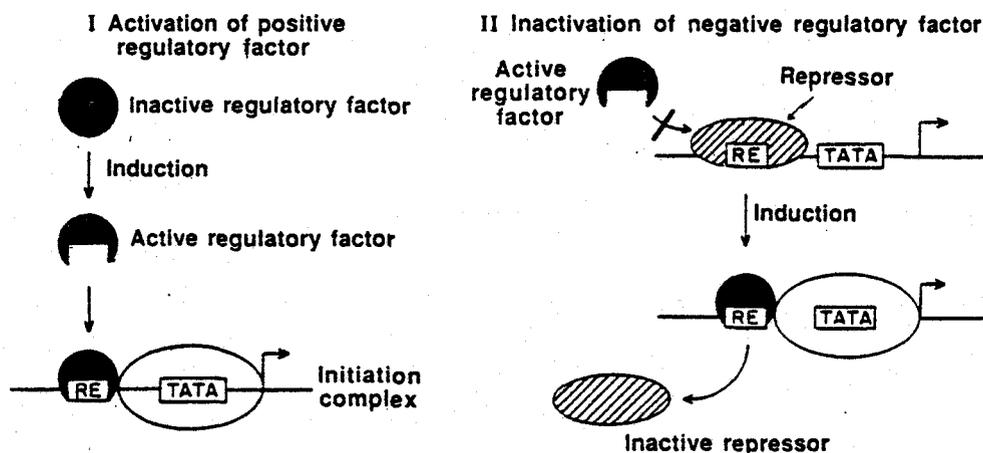
Ces sujets étant extrêmement vastes, une partie seulement des études concernant les "enhancers inductibles" sera exposée.

1.1.2.1- les "enhancers inductibles"

Ces "enhancers" sont localisés à une certaine distance ou intimement associés à leurs promoteurs ; ils sont activés en réponse à des facteurs de croissance ou à des stéroïdes (régulation positive). Des études effectuées à l'aide de la mutagenèse dirigée ont révélé qu'une séquence extrêmement courte d'ADN est nécessaire à la régulation de l'expression des gènes, pour plusieurs espèces différentes. Chaque gène possède plus d'une copie de cette séquence, et l'induction a un effet synergique en fonction du nombre de copies. Il est possible que le nombre de ces éléments nécessaires à une induction efficace varie en fonction des types cellulaires. Autrement dit, les différences proviennent soit de l'espèce, soit de la quantité des facteurs de transactivation (revue par Maniatis et al., 1987).

Figure 16 :

Modèles d'activation inductible des séquences "enhancers" (Maniatis et al., 1987).



Les "enhancers" inductibles sont capables d'activer des promoteurs hétérologues, donc de manière générale agissent positivement. Des mécanismes d'activation ont été proposés : (a) synthèse ou activation d'un facteur transcriptionnel positif ; (b) inactivation d'un facteur protéique de régulation négative ; (c) l'ensemble : activation d'un facteur transcriptionnel et inactivation d'un répresseur (revue par Maniatis et al., 1987) (Fig. 16).

1.1.2.2- les éléments "enhancers" de l'Ad2 (Ad5)

Weeks et Jones (1983) ont introduit le fragment 0-2,5 UG de l'Ad5 dans un plasmide contenant l'unité de transcription du gène tk du virus de l'herpès simplex (HSV-1). Le taux de transformation de cellules tk⁻ en tk⁺ augmente de six fois. Ils ont avancé l'hypothèse que la séquence en amont du site de coiffe possédait une séquence "enhancer" qui peut activer la transcription en "cis" de gènes hétérologues.

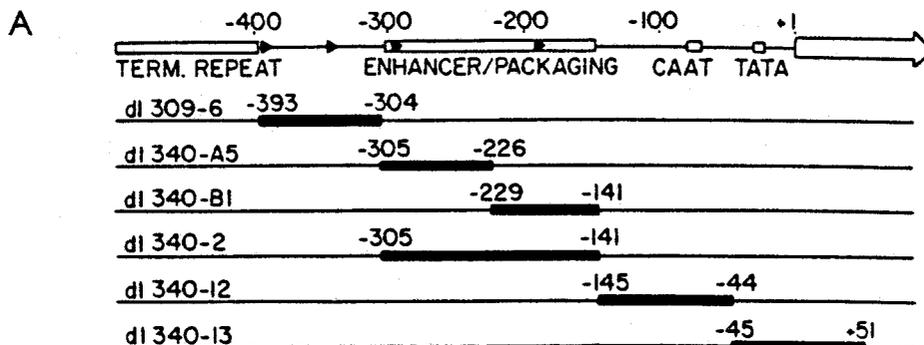
Imperiale et al. (1983) ont cloné la séquence située entre -188 nt et -45 nt, par rapport au site de coiffe (+1) de l'Ad2, en amont du promoteur précoce de la région E2A-E du même virus. Ils ont décelé une augmentation du taux de transcription des ARNm de la 72 kDa de 10 fois. Cette séquence est capable de stimuler indépendamment de son orientation ou de sa localisation en 5' ou 3'.

Une analyse du promoteur de la région E1A a été réalisée par Hearing et Shenk (1983a, b) en utilisant une série de mutants de l'adénovirus type 5 : les délétions sont situées entre -393 nt et +51 nt (Fig. 17).

La délétion entre -305 nt et -226 nt réduit de trois fois le taux de transcription, mesuré 5 h p.i., des ARNm de la région E1A par rapport au type sauvage. Une délétion entre -229 nt et -141 nt donne un résultat similaire. Cependant une délétion de la région entre -305 nt et -141 nt entraîne une baisse du taux de transcription de 15 à 20 fois par rapport au type sauvage. Dans cette région, se trouvent deux séquences hautement conservées : (a) -299 GCGAAGTGACA -289 et (b) -201 AGGAAGTGAAA -191. Elles possèdent une forte homologie avec les régions promotrices d'autres virus à ADN et, en particulier, avec la séquence "enhancer" du virus du polyome (Tableau 8) (Hearing and Shenk, 1983a).

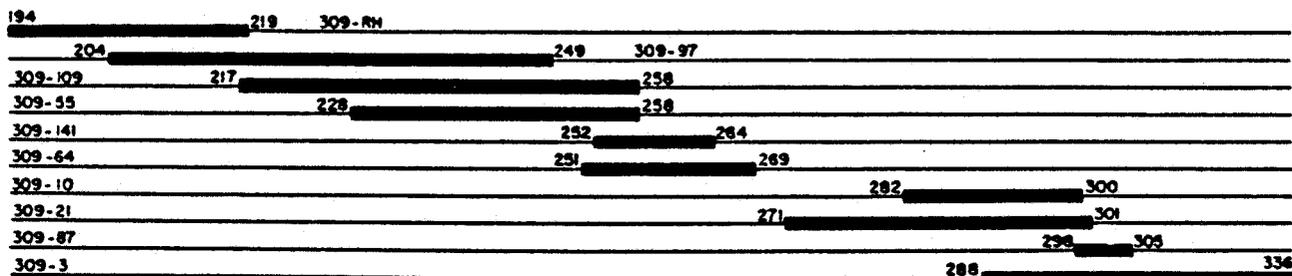
Figure 17 :

Représentation de la partie non-codante de la région E1A de l'Ad5 (Hearing and Shenk, 1983a,b, 1985).



Les différents mutants de délétion dans la partie non-codante du virus, ainsi que les principaux composants de cette région sont représentés.

B



Mutants de délétion dans la séquence "enhancer".

Tableau 8 :

Séquences homologues au "core" de la séquence "enhancer" de la région E1A de l'Ad5 (Hearing and Shenk, 1983a).

Transcription Unit	Homology	Position
Ad5 E1A	AGGAAGTGAAA	-200
Ad5 E1A	AGGAAGTGACA	-300
Ad7 E1A	AGGAAGTGAAT	-200
Ad7 E1A	CGGAAGT ^A GACA	-300
Ad12 E1A	CGGAAGTGAAA	-200
Ad12 E1A	CGGATGTGACG	-300
Ad5 E4	CGGAAGTGACG	-150
Ad2 major late	AGGAA ^G GTGATT	-90
Polyoma early	AGGAAGTG ^G ACT	-340
ASV LTR	AGGAAG-GCAA	-100
MMTV LTR	AGGATGTGAGA	-160
Friend SFFV LTR	AGGACCTGAAA	-110
BKV 68 bp repeat	AGGAA ^A GTGCAT	-90, -140, -210

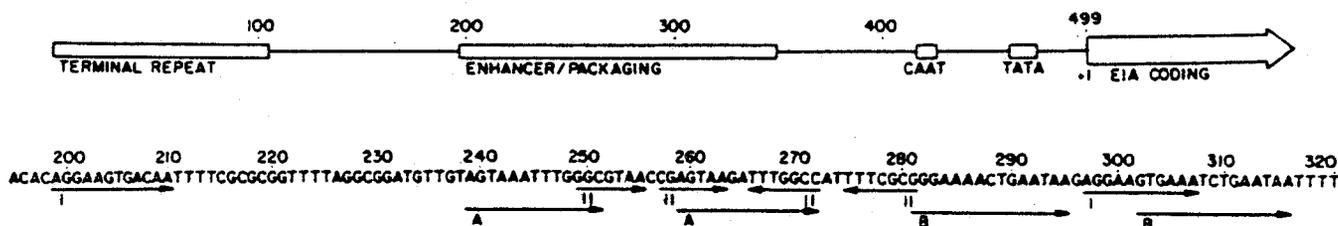
consensus sequence 5'- $\overset{A}{C}$ GGAAAGTGA $\overset{A}{C}$ -3'

La région entre -304 nt et -142 nt peut stimuler la transcription de E1A et aussi celle du gène tk du HSV-1, quelles que soient son orientation et sa localisation (Hearing and Shenk, 1983b). Ils ont constaté également qu'une discrète augmentation du taux des ARNm résulte d'une délétion entre -136 nt et -76 nt. Une délétion entre -349 nt et -302 nt permet par ailleurs un taux normal de transcription (Hearing and Shenk, 1983a,b).

Récemment les mêmes auteurs ont trouvé deux domaines fonctionnels distincts dans la séquence "enhancer" de E1A : (a) le domaine I spécifique de l'activation de la transcription de E1A ; (b) le domaine II qui module la transcription de toutes les autres unités précoces (E1B, E2, E3 et E4)(Hearing and Shenk, 1986) (Fig. 18).

Figure 18 :

Les deux principaux domaines de la séquence "enhancer" de la région E1A de l'Ad5 (Hearing and Shenk, 1986).



Par transfection de plasmides contenant l'extrémité gauche (5') du génome de l'Ad2, Sassone-Corsi et al. (1983) ont déterminé que la séquence située entre -498 nt et -318 nt possédait une activité "enhancer like". Elle est capable de stimuler, en "cis", le MLP de l'Ad2, ainsi que d'autres promoteurs hétérologues. Par ailleurs, une délétion entre -231 nt et -145 nt ne diminue pas le taux de transcription de E1A.

L'analyse de cette région par Hen et al. (1983) a montré l'existence d'une séquence : -342 GGATGTGTAA -333, ayant une forte homologie avec le "core" de la séquence "enhancer" du SV40 (Tableau 9). Cette séquence est capable de stimuler, en "cis", le MLP de l'Ad2, comme d'autres promoteurs hétérologues. Elle est conservée dans les Ad2, Ad7 et Ad12, mais elle présente la particularité d'avoir un effet activateur dépendant de son orientation (5'--> 3').

Tableau 9 :

Séquences homologues au "core" de la séquence "enhancer" de la région E1A de l'Ad2 (Hen et al., 1983).

AD7	GCAAGTTAT	¹⁷⁰ TGCGG	TAAATGTGACGTAA
AD12	CGCGCCGGAT	¹⁵⁷ TGTGAC	GTTTTAGACGCCA
AD2	AGCGCCGGAT	¹⁵⁸ TGTGG	TAAAAGTGACGTTT
SV40	CAGTTAGGG	TGTGG	AAAGTCCCCAGGCT
BPV 1	AAGCGATGAT	TGTGG	ACCCTGCTGTTCCG
BPV 2	TCGGAGTGG	TGTGT	ACCTTGGTGATCCA
PY	CAGAGGGCG	TGTGG	TTTTGCAAGAGGAA
MSV	CAGGATATCT	TGTGG	TAAAGCAGTTCCTGC
IG 1	ACTTGTAGCT	TGTGG	TTTGAAGAAGTGGT
IG 2	AGCAGGTCAT	TGTGG	CAAGGCTATTTGGG
CONSENSUS	GX	TGTGG	TTT AAA

1.1.2.3- les facteurs cellulaires qui agissent sur les séquences "enhancers"

Kovesdi et al. (1986, 1987) ont isolé un facteur - E2F - se liant au promoteur E2A dans les cellules HeLa infectées par l'Ad5. Il stimule la transcription du promoteur de la région E2A. Ils ont caractérisé ce facteur E2F comme ne possédant pas de sites de reconnaissance pour les promoteurs des régions E1B, E3, E4 et MLP, ainsi que pour les promoteurs de la hsp 70-kDa, de la β -globine et du promoteur précoce du virus SV40. Par contre, l'E2F reconnaît deux séquences, (a) -287 TTTCGCCG -280 ; (b) -224 TTTCGCCG -217, situées entre les deux éléments I décrits par Hearing et Shenk (1986) (Fig. 19). Ils concluent qu'une seule de ces séquences est suffisante pour stimuler le promoteur E2A et que l'E2F n'intervient pas dans la stimulation des autres promoteurs précoces (E1B, E3 et E4) par E1A.

Figure 19 :

Les séquences reconnues par les facteurs E2F et E4F1 dans la partie non-codante de la région E1A de l'Ad5.



- + Séquences reconnues par le facteur nucléaire E2F.
- T Séquence reconnue par le facteur nucléaire E4F1.

Dans les cellules HeLa non infectées, Barrett et al. (1987) ont trouvé qu'une protéine nucléaire était capable de se lier entre -344 nt et -336 nt de la région E1A de l'Ad2. La séquence qui est protégée de l'action de la désoxyribonucléase I est : -344 GATGTGGTA -336, celle-ci correspond au "core" de l'élément "enhancer" décrit par Hen et al. (1983). Cette séquence existe aussi en amont des promoteurs précoces E2A, E3 et E4 de l'Ad2. La protéine nucléaire pourrait donc interagir avec ces promoteurs (Fisch et al., 1987).

Lee et Green (1987) ont identifié, toujours dans des cellules HeLa, un autre facteur - E4F1 - qui reconnaît la séquence : -44 ACGTAAC -53, située en amont du promoteur précoce de la région E4. Cette séquence est aussi présente dans l'élément II décrit par Hearing et Shenk (1986) de la région E1A de l'Ad5 (Fig. 19).

Ces travaux, sur la région E1A de l'adénovirus, ont permis, par exten-

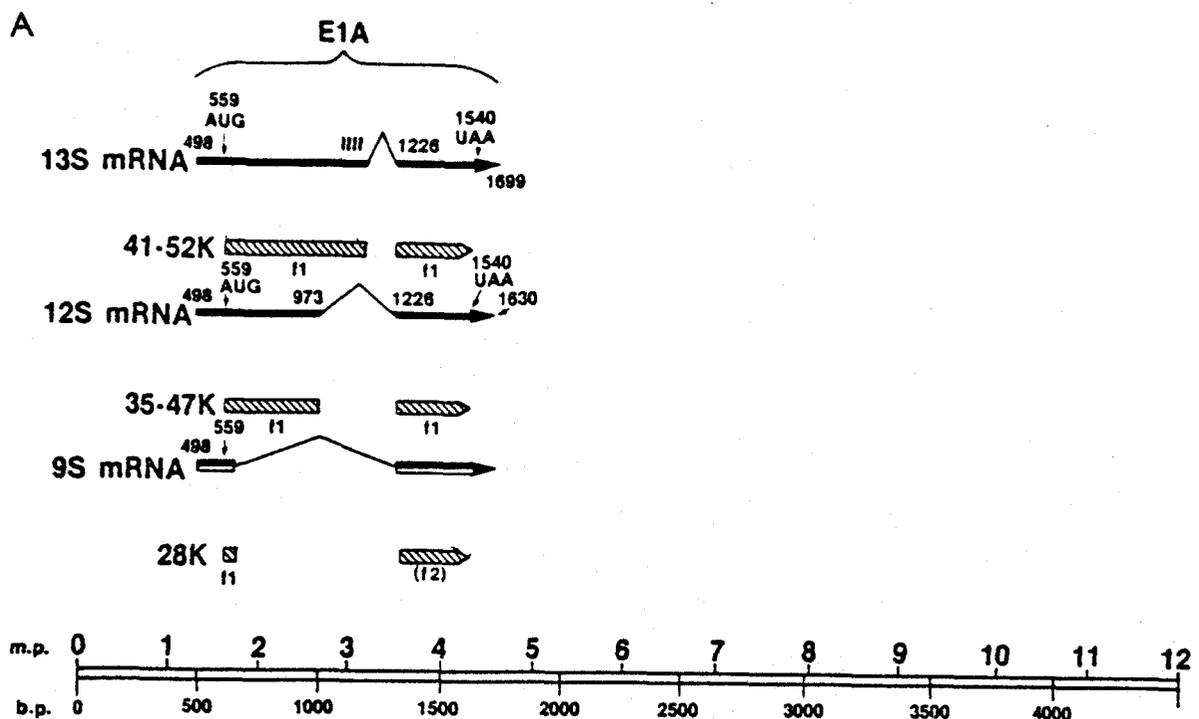
sion, une meilleure compréhension de l'organisation du génome de la cellule eucaryote.

1.2- Les ARNm de la région E1A et leur épissage

Les ARNm transcrits de la région E1A de l'adénovirus types 2 et 5 ont été étudiés par de nombreuses techniques telles que : le clonage moléculaire des ADNc (Perricaudet et al., 1979 ; Perricaudet et al., 1980) ; la cartographie à la nucléase S1 (Chow et al., 1979). De ces études, il apparaît que trois ARNm (13 S, 12 S et 9 S) sont synthétisés à partir de la région E1A (Fig. 20A). Récemment, Stephens et Harlow (1987), Ulfendahl et al. (1987) ont décrit l'existence de deux nouveaux ARNm dans la région E1A. Ils présentent un coefficient de sédimentation de 10 S et 11 S et sont formés par un double épissage différentiel (Fig. 20B).

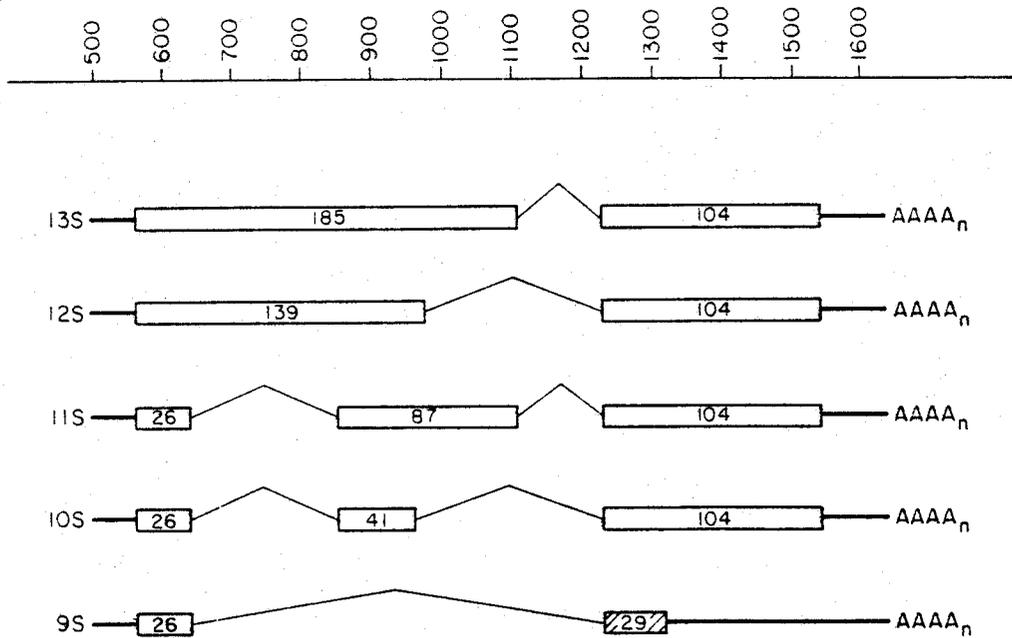
Figure 20 :

Représentation graphique des ARNm et des protéines de la région E1A de l'Ad2 (Green et al., 1983 ; Stephens and Harlow, 1987).



Les ARNm sont représentés par les flèches noires.
 Les protéines par les flèches hachurées.
 Les traits fins représentent les introns.

B



Les protéines sont indiquées par les rectangles.

Les introns par les traits fins.

L'épissage s'effectue, de manière alternative, avec un accepteur commun et trois sites donneurs. Les ARNm 10 S et 11 S possèdent, en plus, deux sites donneurs et accepteurs. Un premier site donneur est commun aux ARNm 9 S ; le deuxième site est commun soit à l'ARNm 12 S (10 S) soit à l'ARNm 13 S (11 S) (Fig. 20).

L'épissage qui produit les ARNm 12 S et 13 S entraîne l'élimination d'une région riche en AT. Les polypeptides traduits à partir du 12 S et du 13 S possèdent, respectivement, 243 AA et 289 AA (pour l'Ad2 et l'Ad5) et les mêmes extrémités N et C-terminales. Ils diffèrent par une délétion de 46 AA dans la protéine de 289 AA. Le produit de l'ARNm 9 S démarre au même AUG que les deux produits des ARNm précédents (Perricaudet et al., 1979 ; Perricaudet et al., 1980).

Les ARNm sont accumulés au cours du cycle viral selon une cinétique différente. Les ARNm 13 S et 12 S sont plus abondants pendant la phase précoce, alors que l'ARNm 9 S n'est présent qu'en très faible quantité. Lors de la phase tardive, la situation est inversée et l'ARNm 9 S est l'espèce la plus abondante (Chow et al., 1979).

1.2.1- Le mécanisme général d'épissage

Berget et al. (1977) en étudiant les ARNm tardifs de l'adénovirus transcrits à partir du MLP ont mis en évidence le phénomène d'épissage.

Les ARN nucléaires hétérogènes (ARNnh), transcrits de gènes cellulaires ou viraux, possèdent des "introns" qui sont excisés par un processus d'épissage lors de leur maturation. Ce phénomène permet de rabouter une "séquence de tête" ("leader"), commune à plusieurs ARNm, à des "séquences de corps" ("body sequences") variables. Jusqu'à présent nous ne connaissons pas les signaux nécessaires pour préciser la (les) séquence(s) qui doi(ven)t être excisée(s).

La séquence consensus pour l'épissage du côté 5' est constituée seulement de six nucléotides (AG : GUAAGU) présents dans l'intron, tandis que du côté 3' une séquence CAG (U/C16 NCAG) est conservée (Sharp, 1981). Les séquences consensus de sites d'épissage des gènes viraux ne sont pas différentes de celles de gènes cellulaires. Ceci suggère un mécanisme d'épissage identique (Sharp, 1984, 1986).

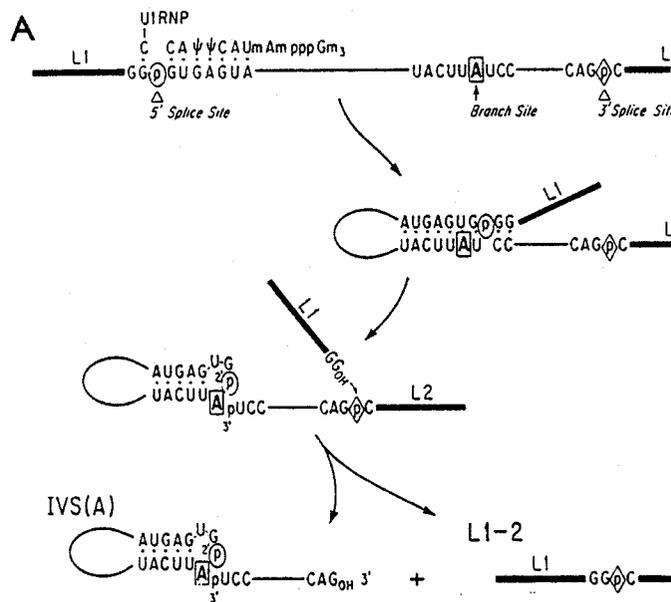
Plusieurs composants cellulaires sont nécessaires à l'épissage, tels deux petits complexes ribonucléotidiques : U₁RNP et U₂RNP (Black et al., 1985 ; Krainer and Maniatis, 1985). Grabowski et al. (1985) ont proposé le mécanisme d'épissage suivant : la première étape de la réaction est la formation d'une "structure en lasso" ("spliceosome") de 60 S. A partir de cette structure les ARN intermédiaires sont produits après clivage du site donneur du côté 5' et formation d'un ARN auxiliaire. Ces intermédiaires sont soumis aux facteurs d'épissage de l'ARN et la séquence interposée est excisée. L'ARN épissé est transporté vers le cytoplasme (Fig. 21).

1.2.2- Application à la région E1A

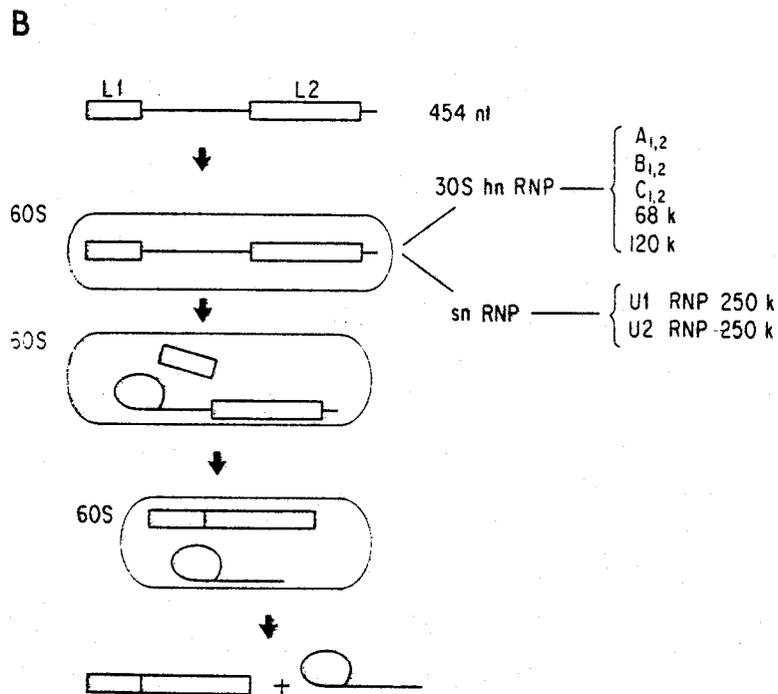
Les ARNm 13 S, 12 S, 11 S, 10 S et 9 S de la région E1A sont produits à partir d'un même précurseur nucléaire mais par des processus de maturation différents (Chow et al., 1979 ; Svensson et al., 1983) (Fig. 22). Des explications similaires ont été avancées pour les ARNm 11 S et 10 S (Stephens and Harlow, 1987 ; Ulfendahl et al., 1987).

Figure 21 :

Mécanisme d'épissage.



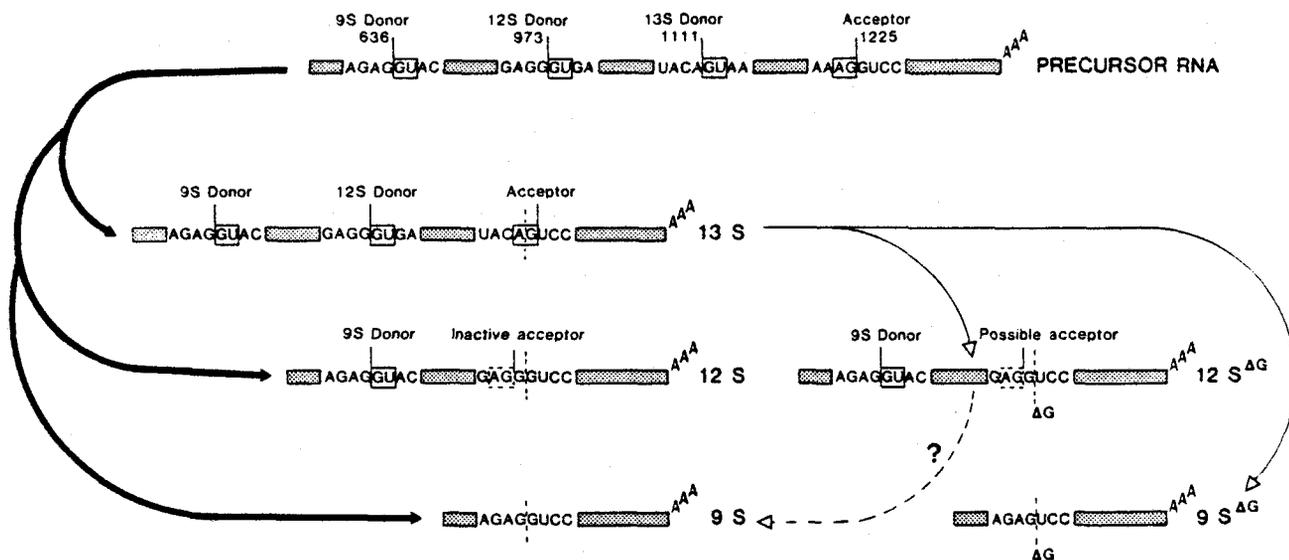
Il y a excision de l'intron (en trait fin) et épissage des deux séquences de tête L1 et L2 (en trait épais) (d'après Padgett et al., 1985).



Les facteurs d'épissage et la formation de la "structure en lasso" (d'après Grabowski et al., 1985).

Figure 22 :

Différentes possibilités d'épissage de la région E1A de l'Ad2
(Pettersson et al., 1983).



Les traits pleins représentent les voies expérimentalement mises en évidence.
Le trait pointillé la voie probable d'épissage.

1.3- Les polypeptides de la région E1A

1.3.1- Généralités

Les polypeptides spécifiques aux ARNm 12 S et 13 S possèdent respectivement 243 AA (243R) et 289 AA (289R), une masse moléculaire réelle de 26,5 kDa et de 31,9 kDa, mais une masse moléculaire apparente de 35 à 47 kDa et de 41 à 53 kDa. Cette différence peut être expliquée par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation) et une composition inhabituelle en acides aminés. Les côtés C-terminaux sont particulièrement riches en proline et acide glutamique (Harter and Lewis, 1978 ; Smart et al.,

1981 ; Lupker et al., 1981 ; Feldman and Nevins, 1983 ; Spindler and Berk, 1984).

Les deux protéines sont retrouvées dans le noyau des cellules infectées ou transfectées (Shiroki et al., 1980 ; Feldman and Nevins, 1983). Elles sont particulièrement acides : la protéine de 289 AA a un pHi de 5,0 et la protéine de 243 AA un pHi de 4,5. Une homologie statistiquement significative entre ces protéines (et en particulier celle de l'Ad2) et les protéines des gènes "myc" et "myb" a été trouvée (Ralston and Bishop, 1983). Branton et al. (1985a) ont comparé l'hydrophobicité de la protéine de 289 AA de l'Ad5 et de la protéine du gène "myc". Des ressemblances structurales expliqueraient les mécanismes d'action similaires que peuvent avoir ces protéines nucléaires. Les protéines des gènes "myb" et "myc" ont été retrouvées associées à l'ADN mais non la protéine de 289R de la région E1A (Ferguson et al., 1985). Comme les protéines des gènes "myc" et "myb", celles de la région E1A possèdent une demi-vie très courte (Spindler and Berk, 1984). Toutefois, McLachlan et Boswell (1985), par analyse statistique, n'ont pas trouvé de relation entre les protéines des gènes "c-myc" et E1A.

Les protéines de 289R et 243R de l'Ad2 ont été synthétisées chez E. coli (Ferguson et al., 1984 ; Kimelman et al., 1984 ; Ko and Harter, 1984). Après leur microinjection dans le cytoplasme cellulaire, elles subissent des modifications post-traductionnelles et sont transportées vers le noyau (Krippel et al., 1985 ; Richter et al., 1985). C'est la région la plus proche du côté C-terminal qui est responsable du transport (Krippel et al., 1985).

Les protéines sont remarquablement stables car, après 5 minutes d'incubation à 100° C suivie d'une microinjection, aucune perte de leur fonction n'a été remarquée (Krippel et al., 1984).

Le polypeptide codé par l'ARNm 9 S possède 55 résidus d'AA ; il démarre au même AUG que les deux précédents, mais utilise un cadre de lecture différent au delà du site d'épissage. Il possède donc 29 AA spécifiques du côté C-terminal tandis que du côté N-terminal 26 résidus d'AA sont communs avec les produits du 12 S et du 13 S. Sa masse moléculaire est de 6,1 kDa mais les traductions "in vitro" de son ARNm lui donnent une valeur de 28 kDa (Esche et al., 1980 ; Spector et al., 1980 ; Virtanen and Pettersson, 1983). Aucune fonction ne lui a été attribuée (Moran et al., 1986).

Les polypeptides des ARNm 10 S et 11 S possèdent respectivement 171 AA et 217 AA et une masse moléculaire de 18,6 kDa et 24 kDa. Ils diffèrent des polypeptides 289 AA et 243 AA par une délétion de 72 AA, toujours dans le même cadre de lecture (Fig. 20). De façon analogue aux protéines de 289R et 243R, ces deux protéines possèdent une taille et une masse moléculaire apparente plus grandes que celles déduites de leur séquence nucléotidique. L'étude par immunoprécipitation des produits de l'ARNm 10 S montre des masses moléculaires apparentes de 30 kDa et de 35 kDa pour le produit de l'ARNm 11 S (Stephens and Harlow, 1987 ; Ulfendahl et al., 1987).

1.3.2- Le rôle des protéines de la région E1A

Les fonctions des protéines de la région E1A sont exhaustivement étudiées, quoique les résultats publiés soient un peu contradictoires.

1.3.2.1- la transactivation transcriptionnelle

Les protéines majeures de E1A (289R, 243R) stimulent la transcription des promoteurs précoces : E1A, E2A, E3 et E4. A l'aide de virus mutés dans la région E1A il a été montré que la transactivation est d'environ 50 fois. Par contre, la transcription de E1A est stimulée seulement 5 fois par ses propres produits (Berk et al., 1979 ; Jones and Shenk, 1979 ; Nevins, 1981 ; Osborne et al., 1984). Des questions se posent :

- Quel(s) est(sont) le(s) produit(s) de la région E1A responsable(s) de cette transactivation ?
- Comment agit(ssent) il(s) ?
- Enfin, est-il (sont-ils) indispensable(s) à la transactivation ?

Les adénovirus délétés dans la région E1A (Ex. H5 dl 312) peuvent infecter normalement les cellules HeLa, mais la transcription des gènes viraux précoces est fortement retardée par rapport aux cellules infectées avec le virus de type sauvage. Les transcriptions précoces ne sont donc pas absolument dépendantes des produits de la région E1A (Nevins, 1981 ; Gaynor and Berk, 1983). Ce retard peut être diminué lors de l'infection à haute multiplicité avec ce mutant (Gaynor and Berk, 1983).

Les adénovirus défectifs dans la région E1A peuvent être complétés, au cours d'une co-infection, par le virus pseudorabies (Herpetoviridae). Le produit

précoce du virus pseudorabies complémente le mutant H5 dl 312 (Feldman et al., 1982 ; Imperiale et al., 1983). Everett et Dunlop (1984) ont démontré, par transfection, que les produits de la région E1A de l'Ad2 peuvent activer les gènes précoces du virus de l'herpès. Ces résultats indiquent que les produits précoces de l'adénovirus et du virus de l'herpès possèdent des activités identiques. Comme les protéines de la région E1A, la protéine précoce du virus de l'herpès (EIP4) est une phosphoprotéine ; elle a une masse moléculaire de 180 kDa (Ihara et al., 1983). Il est très peu probable que les produits précoces de l'adénovirus et du virus de l'herpès puissent stimuler directement la transcription grâce à leur interaction avec des séquences spécifiques proches des sites de coiffe puisque, par ailleurs, il y a très peu d'homologie entre ces deux promoteurs.

D'autres observations démontrent que le(s) produit(s) de la région E1A ne stimulent pas directement la transcription : les cellules qui expriment la région E1A (HEK-293) sont capables d'augmenter 20 fois l'expression des gènes de β -globine et ϵ -globine humaines (Allan et al., 1984). Cependant, les gènes de pré-proinsuline de rat et de globines endogènes ne sont pas induits par l'infection virale (Green et al., 1983 ; Gaynor et al., 1984). Babich et al. (1983), en étudiant six gènes spécifiques s'exprimant dans les cellules HeLa non infectées, ont observé que le taux de transcription de ces gènes reste inchangé après infection par l'adénovirus. La capacité, par conséquent, des protéines de la région E1A à stimuler les gènes cellulaires est limitée aux gènes transfectés.

Deux exceptions sont décrites : (a) Kao et Nevins (1983), et (b) Stein et Ziff (1984) ont démontré que la transcription, respectivement, du gène de la protéine hsp-70 kDa et du gène de la β -tubuline est stimulée par l'Ad2, mais non par le H5 dl 312. Au contraire, Grand et Gallimore (1986) ont observé, que dans les cellules HEK, les taux de transcription de la hsp-70 kDa et de la β -tubuline ne sont pas modifiés après infection par l'Ad12. Par contre, l'activité thymidine kinase, elle, est stimulée.

Ces résultats indiquent que les produits de la région E1A ne fonctionnent pas de la même façon que les régulateurs positifs de transcription du système procaryote. L'"AMPC-Binding-Protein" de E. coli (de Combrugghe et al., 1984) ou le facteur "sigma-like" du bactériophage SPO1 (Losick and Pero, 1981) interagissent avec des séquences spécifiques de l'ADN à proximité du site d'initiation ; et, en conséquence de cette interaction, stimulent l'initiation par

l'ARN polymérase. Les protéines de E1A semblent stimuler la transcription plus indirectement, c'est-à-dire par l'intermédiaire de facteurs (protéines) cellulaires.

L'expression des gènes fusionnés aux promoteurs des régions précoces (E1B, E2A, E3 et E4) de l'adénovirus est stimulée par cotransfection du gène E1A (Bos and ten Wolde-Kraamwinkel, 1983 ; Imperiale et al., 1983 ; Weeks and Jones, 1983). Ces résultats démontrent que les fonctions de E1A stimulent l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II, à partir des cinq promoteurs de l'adénovirus activés pendant la phase précoce du cycle viral. La région E1A peut aussi stimuler plus de 20 fois les gènes transcrits par l'ARN polymérase III (VA-RNA I et II) (Berger and Folk, 1985 ; Gaynor et al., 1985)

Jusqu'à présent la question reste ouverte quant aux produits responsables de la transactivation. Certains auteurs : Carlock et Jones, 1981 ; Leff et al., 1984 ; Winberg et Shenk, 1984 ; Ferguson et al., 1985, ont démontré que la stimulation des promoteurs précoces E2A et E3 de l'adénovirus de type 2 ou 5 est réalisée efficacement par les produits des ARNm 12 S et 13 S ; tandis que d'autres auteurs : Ricciardi et al. (1981), Bos et ten Wolde-Kraamwinkel (1983), Montell et al. (1984), Svensson et Akusjarvi (1984), relatent une activation due au seul produit de l'ARNm 13 S.

Par microinjection, les produits des ARNm 13 S ou 12 S des adénovirus du sous-groupe C (Ad2 ou Ad5) fusionnés à des protéines de E. coli (Ferguson et al., 1984) entraînent la synthèse d'ADN en cellules NIH-3T3 (Kaczmarek et al., 1986). Par contre, la protéine de 289 AA délétée de 169 AA dans sa partie C-terminale, devient incapable d'induire la réplication. Zerler et al. (1987), à l'aide de mutants de délétion dans la partie N-terminale commune 12 S et 13 S (Ad2), ont observé que la suppression de 85 AA dans cette partie empêche la stimulation de la synthèse de l'ADN dans les cellules BHK-21. Quinlan et Grodzicker (1987a), en utilisant un mutant qui n'exprime que le polypeptide codé par l'ARNm 12 S (Ad5-12 S), ont décelé que ce dernier est capable d'induire la synthèse de l'ADN. Il provoquera aussi la prolifération des cellules épithéliales BRK entre 24 et 36 h après l'infection ; prolifération due à la production de facteur(s) de croissance (Quinlan et al., 1987b).

Schneider et al. (1987) ont construit plusieurs mutants ponctuels ou de délétion dans les domaines 1, 2 et 3 du premier exon, ainsi que dans le

deuxième exon de l'Ad5 et ont observé que : les domaines 1 et 2 ne sont pas importants pour la transactivation, par contre le domaine 3, spécifique à l'ARNm 13 S et les trois résidus communs aux ARNm 12 S et 13 S du deuxième exon, le sont. Ils ont conclu que, non seulement la protéine de 289R, mais aussi celle de 243R (moins fortement) sont responsables de la transactivation. Lillie et al. (1987), à l'aide de mutants dans ces mêmes domaines, ont décelé que la transactivation est due à la protéine de 289R. Cependant, ils ont proposé que la protéine de 243R peut stimuler, elle aussi, mais par un mécanisme différent.

Par cotransfection de plasmides contenant les gènes c-fos, c-myc, c-Ha-ras avec E1A de l'Ad2, dans les cellules HeLa et NIH-3T3, Sassone-Corsi et Borrelli (1987) ont démontré que les deux premiers sont stimulés par la région E1A, en particulier par le produit de l'ARNm 13 S. Par contre, l'activité du gène c-Ha-ras n'est pas modifiée.

1.3.2.2- la répression de la transcription par le(s) produit(s) de la région E1A

Les protéines de la région E1A sont capables de réprimer la transcription du promoteur précoce du SV40 (Borrelli et al., 1984 ; Velcich and Ziff, 1985). Quand les gènes de E1A sont cotransfectés avec le gène précoce de SV40 dans les cellules HeLa, la production d'ARNm précoces de SV40 est diminuée. Cette répression n'est pas due à l'AgT car elle persiste quand la région du promoteur est fusionnée à d'autres gènes structuraux. Borrelli et al. (1984), en clonant la séquence "enhancer" de 72 pb répétées de SV40 en amont d'autres promoteurs hétérologues, ont observé que, lors de cotransfections de plasmides contenant la région E1A de l'Ad2, le phénomène d'inhibition persiste. Cependant, en ajoutant la séquence répétée ("enhancer"), par un processus de compétition, le taux de transcription augmente. Les produits de la région E1A pourraient donc agir directement ou indirectement sur la séquence "enhancer" et diminuer le taux de transcription.

Les produits de la région E1A peuvent aussi réprimer leur propre promoteur ou celui du virus du polyome. Les deux protéines majeures (289 AA et 243 AA) présentent une activité de répresseur (Borrelli et al., 1984 ; Velcich and Ziff, 1985). Les protéines de E1A répriment aussi l'expression de la région E1A dans les cellules COS (Smith et al., 1985).

Hen et al. (1985) ont observé que les protéines de E1A peuvent inhiber l'expression de l'"enhancer" de la chaîne lourde des immunoglobulines de souris dans les cultures de lymphocytes murins. Cependant, elles sont capables de stimuler la même séquence "enhancer" dans les cellules NIH-3T3 (Borrelli et al., 1986).

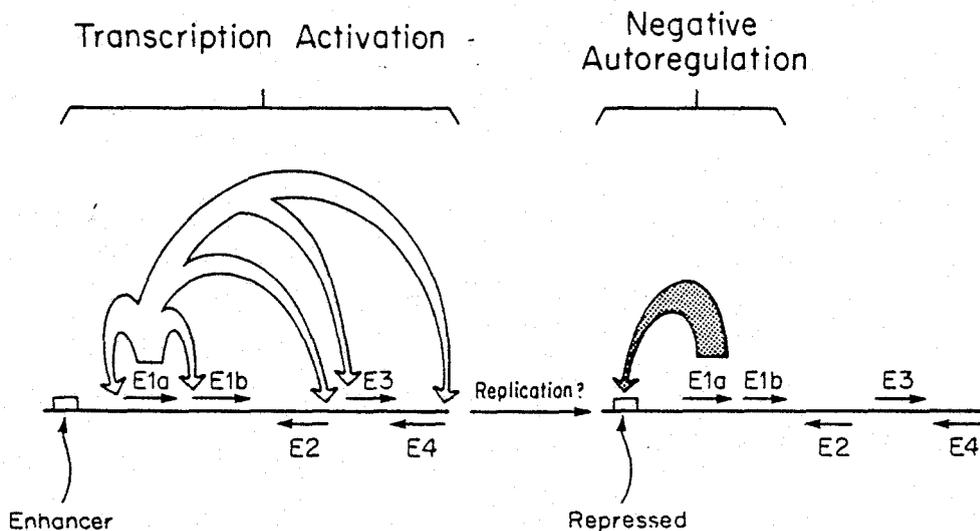
Le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les produits de E1A répriment l'expression des gènes n'est (ne sont) pas encore connu(s). Les protéines de E1A de l'Ad12 répriment la synthèse d'antigènes majeurs d'histocompatibilité de classe I (MHC I) dans les cellules de rat transformées (Bernards et al., 1983 ; Schrier et al., 1983).

Hearing et Shenk (1985) en utilisant des virus (Ad5) possédant une ou deux délétions dans les séquences "enhancers" (Hearing and Shenk, 1983a ; Hen et al., 1983) de la région E1A, ont démontré que le produit de l'ARNm 13 S était impliqué dans le mécanisme d'auto-régulation positive de E1A, mais cette auto-régulation ne nécessitait aucune des séquences "enhancers" pour le contrôle de la transcription de E1A.

Les mutants ponctuels ou de délétion dans le premier exon commun aux ARNm 12 S et 13 S de l'Ad5 ont permis à Lillie et al. (1987) et à Schneider et al. (1987) de démontrer que la région comprise entre 697 et 790 nt (domaine 1) et celle comprise entre 920 et 967 nt (domaine 2) sont indispensables à la "transrépression". Le domaine 2 joue surtout un rôle de coopération avec le domaine 1 (Schneider et al., 1987).

Figure 23 :

Modèle hypothétique de régulation positive et négative des protéines de la région E1A de l'Ad2 (Smith et al., 1985).



1.3.2.3- les produits des gènes ayant les mêmes fonctions que les produits de E1A

* papovavirus

Les AgT du virus SV40 (protéine précoce de 90 kDa) et du virus du polyome (100 kDa) localisés dans la membrane nucléaire, sont essentiels à la réplication virale et à la transformation cellulaire ; ils interviennent dans l'auto-régulation de la transcription virale précoce et dans la liaison avec l'ADN. Lors de la cotransfection avec des plasmides contenant le gène de l'AgT et le promoteur tardif de SV40, on constate une transactivation de la transcription à partir du promoteur tardif. Une cotransfection de plasmides qui expriment l'AgT avec les plasmides contenant les promoteurs E2A et E3 de l'Adénovirus, entraîne une stimulation de ces derniers. Mais l'activité de l'AgT de SV40 ne peut être semblable à celle des produits de la région E1A de l'Adénovirus, car les adénovirus mutants n'exprimant pas la région E1A ne sont pas complétés par une pré-infection des cellules par le virus SV40 (revue par Butel, 1986).

* virus de l'herpès

Les produits du gène précoce du virus de l'herpès simplex (HSV) peuvent agir comme les produits du gène précoce du virus pseudorabies, c'est-à-dire en stimulant les gènes précoces hétérologues (adénovirus, β -globine). Pendant l'infection par le HSV, ces protéines stimulent la transcription de gènes viraux de classe B. Ce mécanisme semble être plus dépendant de la structure globale du promoteur que des séquences d'un élément régulateur spécifique (revue par Kingston et al., 1985).

* virus humains lymphotropiques T (HTLV) et virus de l'immunodéficience humaine (HIV)

Le gène "x" ou "lor" des HTLV-I, HTLV-II et HIV code pour une protéine qui peut transactiver le LTR ("long terminal repeat") de virus homologues, ainsi que les promoteurs cellulaires. Les études suggèrent, que la protéine responsable de cette activation se lie à l'extrémité 3' des séquences codées par le virus. Des résultats similaires sont observés avec le virus leucémique bovin. La protéine du gène "x" peut stimuler les promoteurs précoces E2A et E3 de l'Ad5, de même que les protéines précoces de la région E1A de l'Ad2 et du virus pseudorabies peuvent activer l'expression du LTR, mais à un niveau plus faible que ne le fait le gène "x" (Chen et al., 1985).

* rétrovirus

La comparaison des séquences entre la région E1A des différents sérotypes d'adénovirus et le gène v-myc révèle une homologie moyenne entre les protéines de myc et celles de E1A ; une homologie faible entre les protéines du gène myb et celles de myc et E1A. Le nombre d'acides aminés identiques entre les gènes myc, myb et E1A varie entre 15 et 21 %, ce sont des résidus hydrophiles. Mais il y a néanmoins des différences entre ces protéines au niveau biologique : la protéine du gène v-myc est capable de transformer des macrophages et fibroblastes aviaires ; la protéine du gène myb peut transformer les macrophages mais non les fibroblastes ; les protéines de E1A peuvent immortaliser les cellules primaires de rongeurs. Même s'il existe des différences importantes entre ces protéines, il est possible que la présence de séquences homologues aux mêmes positions produisent des structures tertiaires semblables (Ralston and Bishop, 1983).

Les protéines des gènes myc, fos et de la région E1A, possèdent plusieurs régions riches en proline, acide glutamique, sérine et thréonine. Ceci leur confère une demi-vie très courte. Les protéines inhibitrices de la phosphatase type 1 et 2 possèdent une composition similaire. Aussi ces protéines agiraient, probablement, comme des inhibiteurs de la phosphatase (Rechsteiner, 1987).

* facteurs "E1A-like" dans les cellules non différenciées type F-9

La séquence "enhancer" du virus SV40 est active dans plusieurs types de cellules. Cependant, celle du virus du polyome (Py) est inactive dans les cellules embryonnaires non différenciées, mais elle est active dans les cellules différenciées. Les produits de la région E1A de l'Ad2 peuvent réguler négativement les séquences "enhancers" du Py, de SV40 (Borrelli et al., 1984 ; Velcich and Ziff, 1985) et cellulaires (Hen et al., 1985). Imperiale et al. (1984a) ont observé que l'expression du mutant H5 dl 312 est beaucoup plus rapide dans les cellules F-9 indifférenciées que, dans les cellules F-9 différenciées par induction à l'AMPc et l'acide rétinoïque. Ce résultat peut être interprété d'une façon simple : l'expression du H5 dl 312 est facilitée dans les cellules en prolifération par rapport aux cellules dont la croissance est stationnaire ou retardée.

Hen et al. (1986) ont construit un mutant dans la séquence "enhancer" du virus du Py et ont observé qu'il n'est plus inhibé par les produits de la région E1A de l'Ad2 ainsi que dans les cellules du type F-9 (indifférenciées). Il en ont

conclu que cette lignée cellulaire exprime une protéine du type E1A.

1.3.3- Les différents domaines des protéines de la région E1A

1.3.3.1- les sites de phosphorylation

Les deux principales protéines de E1A sont phosphorylées. Ceci leur confère des propriétés biologiques et enzymatiques. Les résidus sérine présentent le taux le plus élevé de phosphorylation et, principalement, la sérine en position 219 (Tsukamoto et al., 1986b). Une substitution de cette sérine par une alanine chez l'Ad5 (pm 1330) (Tsukamoto et al., 1986b) ne change pas la capacité de ce mutant à croître dans les cellules HeLa, ni son pouvoir transformant. Cette phosphorylation n'est pas sous le contrôle de la protéine kinase AMP-cyclique dépendante (Lucher et al., 1985 ; Tsukamoto et al., 1986b).

1.3.3.2- définition des immunodomaines à l'aide d'anticorps monoclonaux

Des hybridomes sécrétant des anticorps monoclonaux spécifiques des protéines de la région E1A de l'Ad2 ont été préparés à partir de souris Balb/c. La réponse immunologique est dirigée contre les protéines fusionnées trpE-E1A (Harlow et al., 1985). L'analyse par immunoprécipitation a permis d'identifier approximativement 60 espèces de polypeptides, dont certains furent divisés en sous-classes immunologiques.

- (a) spécifiques aux deux polypeptides majeurs (289 AA, 243 AA) ;
- (b) spécifiques au polypeptide de 289 AA et à celui de 35-40 kDa ;
- (c) spécifiques aux deux polypeptides majeurs et aux polypeptides de 30 kDa et de 35-40 kDa (Harlow et al., 1985).

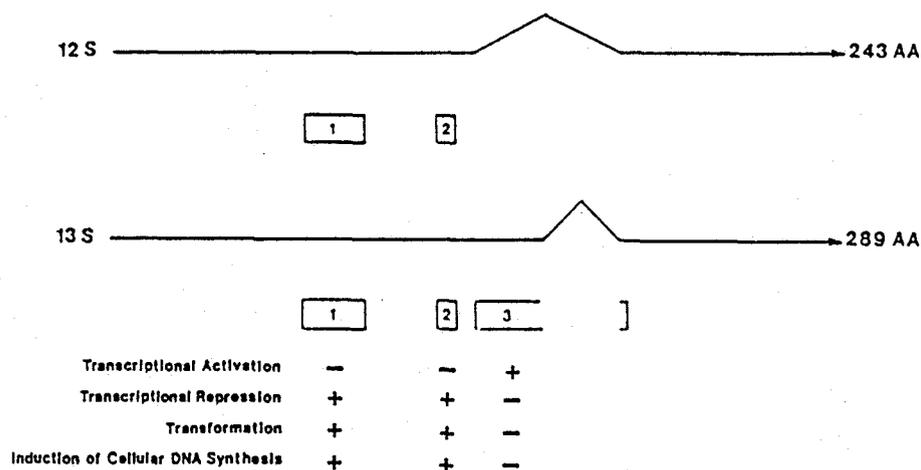
Tsukamoto et al. (1986a) ont obtenu également des anticorps monoclonaux anti-protéines fusionnées trpE-E1A (Harlow et al., 1985) mais chez le rat. Des expériences de fixation compétitive ont mis en évidence un seul site de reconnaissance situé entre les acides aminés 23 et 120, dans le premier exon du gène. Les anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine fusionnée ont permis de reconnaître la même région immunodominante.

1.3.3.3- la localisation des domaines

De nombreuses fonctions sont attribuées aux produits de la région E1A, parmi lesquelles sont retrouvées : l'activation de la transcription des autres gènes précoces, l'immortalisation des cellules primaires de rongeurs, la répression des séquences "enhancers", la différenciation et l'induction de l'ADN cellulaire. Récemment plusieurs groupes ont préparé des virus ou des plasmides contenant des délétions ou des mutations ponctuelles dans les différents exons de la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad5.

Figure 24 :

Les trois domaines conservés des protéines majeures de la région E1A pour les différents sérotypes d'Adénovirus (Kimelman et al., 1985) et les principales fonctions telles qu'elles ont été établies pour l'Ad5 (Lillie et al., 1987).



A l'aide de protéines fusionnées produites chez E. coli et microinjectées dans le noyau de cellules Vero, Krippel et al. (1985) ont déterminé que la partie C-terminale est impliquée dans la localisation intra-nucléaire. Ils ont aussi observé que le premier exon commun aux protéines de 289R et 243R est responsable de la complémentation du mutant H5 dl 312.

Une délétion de 12 % (289R) ou de 14 % (243R) entre les acides aminés 86 et 120 (premier exon) n'entraîne pas de modification du taux de transactivation

des produits de E1A sur cellules HeLa ou HEK-293 (Moran et al., 1986). Par contre une délétion entre les acides aminés 121 et 150 (protéine de 289R) provoque une forte baisse du taux de transactivation et de transformation cellulaire, en coopération avec le gène ras (Moran et al., 1986).

La cotransfection, dans les cellules BRK, du gène Ha-ras et d'un plasmide exprimant la protéine de 289R et possédant les mêmes mutations que les virus hr 3, hr 4 et hr 5 (Tableau 10) induit une immortalisation cellulaire similaire à celle du virus de type sauvage (Moran et al., 1986). Ces résultats confirment que les deux protéines (289R et 243R) sont nécessaires à la transformation cellulaire (Montell et al., 1984). Une mutation ponctuelle au nt 928 (Cys₁₂₄ -->Gly) entraîne une baisse du pouvoir transformant de la région E1A en association avec le gène Ha-ras, sans toutefois altérer le taux de transactivation et de multiplication virale, dans les cellules HeLa (Moran et al., 1986).

Tableau 10 :

Mutants dans la région E1A des adénovirus type 2 ou 5.

Mutant	Localisation	Protéine modifiée
<u>hr1</u>	1 pb délétée au nt 1055	289R : tronquée 243R : native
<u>hr3</u>	Permutation d'une T --> A au nt 1086	289 R : transition d'une Met --> Lys à l'AA 176 243R : native
<u>hr4</u>	Transition d'une C --> T au nt 1076	289R : transition d'une Leu --> Phe à l'AA 173 243R : native
<u>hr5</u>	Transition d'une G --> A au nt 1229	289R : transition d'une Ser --> Asn à l'AA 185 Gly --> Asn à l'AA 243 243R : native
<u>pEK975</u>	Permutation d'une G --> T au nt 975	289R : native 243R : non synthétisée
<u>d11500</u>	délétion entre 1110 et 1119 pb	289R : non synthétisée 243R : native
<u>d1312</u>	délétion entre 448 et 1349 pb	289R : non synthétisée 243R : non synthétisée

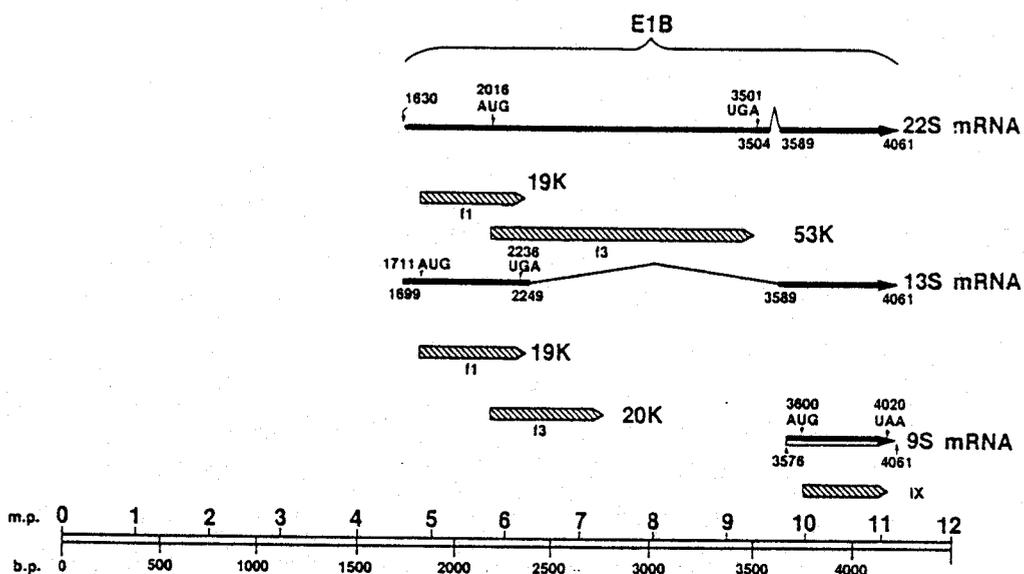
Lillie et al. (1987) ont construit des mutants ponctuels dans les domaines 1, 2 et 3 de la région E1A de l'Ad5 et des peptides correspondant à chacun de ces domaines. Ces outils ont permis de montrer que les trois domaines peuvent agir séparément (Fig.24). Ces résultats ont été confirmés, en partie, par Schneider et al. (1987). En construisant des plasmides et des virus ayant des mutations ou des délétions dans les mêmes domaines et ces auteurs ont établi que : (a) les domaines 1 et 2 sont importants pour la "transrépression", la transformation et l'induction de la synthèse de l'ADN cellulaire ; (b) le domaine 3 et les trois résidus du deuxième exon sont importants pour la transactivation.

2- La région E1B

Localisée entre 4,8 et 11,2 UG, la région E1B code pour trois ARNm : 22 S, 13 S et 9 S. Les deux premiers sont transcrits à partir du même promoteur précédé d'un motif "TATAA". Les pré-ARNm possèdent les mêmes extrémités 5' et 3' et se différencient par un mécanisme d'épissage. Le troisième ARNm (9 S) est transcrit à partir d'un promoteur indépendant et code pour une protéine structurale, le polypeptide IX (Alestrom et al., 1980 ; Baker and Ziff, 1980 ; Perricaudet et al., 1980).

Figure 25 :

Réprésentation graphique des ARNm et des protéines codées par la région E1B de l'Ad2 (Pettersson et al., 1983).



Les ARNm sont représentés par les flèches noires.

Les protéines par les flèches hachurées.

Les traits fins représentent les introns.

L'ARNm 22 S est traduit selon deux cadres de lecture différents, il utilise un des deux sites d'initiation (AUG). Ceci lui confère un caractère polycistronique et lui permet de coder deux protéines : la 55 kDa et la 19 kDa.

Pendant la phase précoce du cycle viral, l'ARNm 22 S est transcrit principalement mais, pendant la phase tardive, le taux de 13 S est 20 fois plus important que celui du 22 S (Wilson and Darnell, 1981). Le changement quantitatif des ARNm de la région E1B peut, en partie, être expliqué par une augmentation de la stabilité de l'ARNm 13 S par rapport à celle du 22 S. Durant la phase précoce, les deux ARNm possèdent une demi-vie de 15 à 20 min, mais la demi-vie de l'ARNm 13 S augmente de 5 à 10 fois lors de la phase tardive (Wilson and Darnell, 1981). Ce changement est dépendant de la synthèse des protéines tardives de l'adénovirus (Babich and Nevins, 1981).

La protéine de 55 kDa (496R) de la région E1B est une phosphoprotéine. Elle est impliquée dans des mécanismes importants, tels que : la maturation des ARNm tardifs ; la baisse de la synthèse protéique de la cellule hôte et la réplication efficace de l'ADN (Babiss and Ginsberg, 1984). Il existe des interactions au cours du processus de la transformation cellulaire entre cette protéine et l'antigène moyen T du virus du polyome, ainsi que la protéine pp⁶⁰ du gène sarc (Malette et al., 1983). La protéine de 55 kDa est associée à une protéine cellulaire de 53 kDa - p53 - présente dans les cellules transformées, ainsi qu'à une protéine de 25 kDa de la région E4, au cours du cycle lytique (Sarnow et al., 1982). Sa localisation est nucléaire et cytoplasmique (Rowe et al., 1983b).

La protéine de 19 kDa (175R) de la région E1B est essentielle au cycle lytique car elle maintient l'intégrité de l'ADN viral et cellulaire. Elle est aussi indispensable à la transformation cellulaire. Cette protéine est localisée au niveau des membranes nucléaire et cytoplasmique (revue par Stillman, 1986).

3- La transformation cellulaire par la région E1

Les adénovirus du sous-groupe A (Ad12, Ad18, Ad31) sont capables d'induire des tumeurs chez le hamster nouveau-né, mais non ceux du sous-groupe C (Ad2, Ad5). Ces deux sous-groupes transforment les cellules primaires de rein de rongeurs (Freeman et al., 1967). Ceci démontre que la

transformation et l'oncogénicité sont des processus distincts chez les adénovirus et ne sont pas nécessairement associées.

La région E1 possède toutes les informations requises pour la transformation oncogénique. La région E1A est suffisante à l'immortalisation des cellules primaires de rongeurs : notamment la partie N-terminale des produits des ARNm 13 S (289R) et 12 S (243R). La région E1B, seule, ne possède pas d'activité transformante, même sous l'influence d'un promoteur hétérologue, mais elle est nécessaire à la tumorigénicité des cellules immortalisées (van den Elsen et al., 1983a). La région E1A en coopération avec un autre oncogène (Ha-ras) peut transformer les cellules primaires (Branton et al., 1985a).

Dans les cellules transformées, les deux protéines majeures de la région E1A (289R, 243R) et celle de 176R de la région E1B sont exprimées, tandis que la protéine de 496R de E1B ne l'est pas. Ces études ont été réalisées à l'aide du fragment HindIII G où seulement la moitié de l'extrémité 5' de la région E1B est présente. Ce qui signifie que la protéine de 176R est présente intégralement, tandis que, seule, la partie N-terminale de la 496R est traduite (Rowe et al., 1984). Le rôle de la 496R-E1B dans la transformation est encore inconnu. Le mutant H5 hr 6 (496R défectif) est incapable de transformer les cellules embryonnaires de rat et les cellules BRK. La protéine 55 kDa serait donc nécessaire pour l'initiation de la transformation par le virion, probablement au niveau de l'intégration de l'ADN (Rowe and Graham, 1983a).

Le rôle principal de la région E1B dans la transformation cellulaire serait d'augmenter le taux d'expression de E1A qui stimulerait E1B. Les effets de E1B sur l'expression de E1A sont en relation avec l'augmentation de la transformation (van den Elsen et al., 1983b ; Senear and Lewis, 1986). La région E1B peut augmenter l'expression de E1A grâce à un élément régulateur situé en "cis" dans E1B, ou par des interactions du type "trans" entre les produits de E1B et les éléments régulateurs de E1A (Senear and Lewis, 1986). A l'aide de plasmides exprimant soit la protéine de 175R, soit celle de 495R de E1B, Senear et Lewis (1986) ont observé que les deux protéines sont nécessaires à la complémentation de E1A dans la transformation cellulaire.

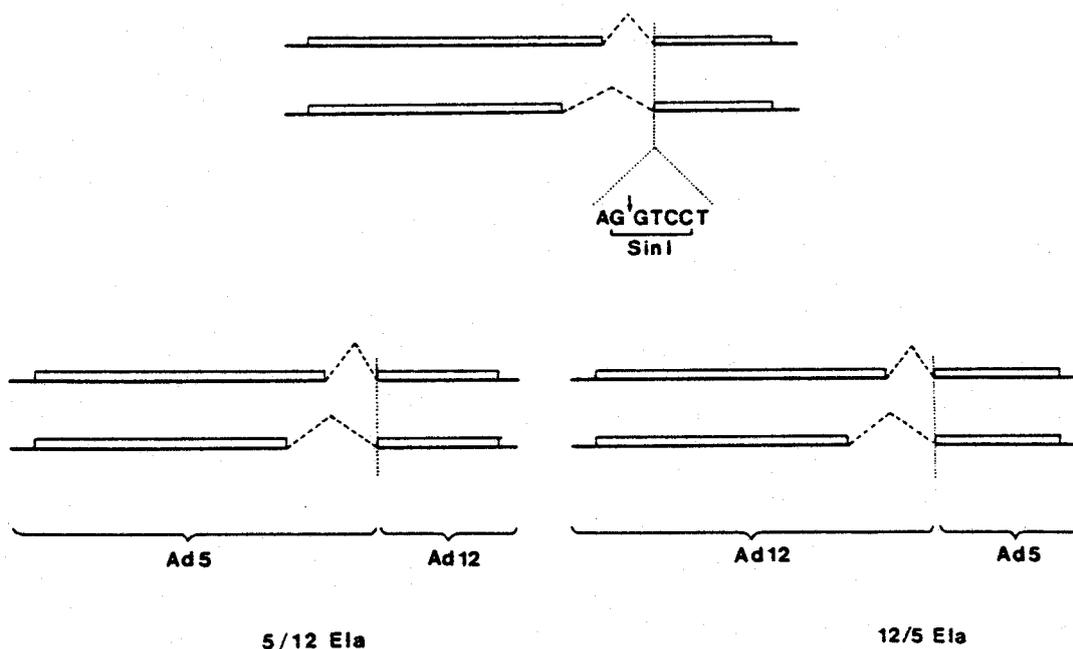
Barker et Berk (1987) ont construit des mutants d'Ad5 dans la région E1B. Le mutant H5 pm 1722 n'exprime que la protéine de 175R, et le H5 dl 1520 que la protéine de 495R ; tandis que le H5 pm 2022 possède un codon "stop"

après le deuxième codon de la protéine de 495R. A l'aide de ces outils, ils ont observé que les deux protéines sont nécessaires à la transformation des cellules de rongeurs. De plus, ils ont constaté qu'une faible expression de la protéine de 495R (H5 pm 2022) est suffisante pour une bonne production virale d'une part, et une transformation cellulaire efficace d'autre part.

Les régions E1 des Ad5 et Ad12 diffèrent par leur capacité à transformer les cellules BRK, ainsi que par la modulation de l'expression des antigènes majeurs d'histocompatibilité de classe I (MHC I). Pour étudier le rôle de la région E1A, Jochemsen et al. (1984) ont construit des plasmides hybrides entre les régions E1A de l'Ad5 et de l'Ad12 (Fig. 26), et les ont cotransfectés avec la région E1B de l'Ad12 dans des cellules BRK. Le premier exon est supposé être impliqué dans la fréquence de transformation cellulaire et dans la modulation de l'expression des Ag MHC I. Ce premier exon de la région E1A de l'Ad5 possède donc un effet dominant sur celui de l'Ad12.

Figure 26 :

Plasmides hybrides dans la région E1A de l'Ad5 et de l'Ad12 (Jochemsen et al., 1984).



Moran et al. (1986) ont démontré que les produits des ARNm 12 S et 13 S de l'Ad5, exprimés individuellement, sont capables de transformer les cellules BRK. Récemment, les domaines 1 et 2 du premier exon commun à ces deux ARNm ont été définis comme essentiels à la transformation cellulaire (Lillie et al., 1987 ; Schneider et al., 1987). Le domaine 2 agirait surtout en coopération avec le domaine 1 (Schneider et al., 1987). Moran et al.(1986), Kuppuswamy et Chinnadurai (1987), Lillie et al. (1987) ont trouvé que les modifications au niveau des résidus 123 à 127 (domaine 2) provoquaient une grande diminution du pouvoir transformant (80%) ; par contre Schneider et al. (1987) ont observé qu'une mutation ponctuelle du résidu 125 (His --> Leu) cause une diminution de seulement 50 %.

TRAVAUX PERSONNELS

I- INTRODUCTION

L'étude des relations existant entre certains adénovirus et les cellules simiennes, ainsi que la caractérisation des interactions entre différents sérotypes d'adénovirus ont permis à Delsert et D'Halluin (1984) de mettre en évidence un phénomène de trans-dominance de l'Ad3 sur l'Ad2. Cette dominance implique l'inhibition stoechiométrique des zones précoces E1A, E1B et E2A de l'Ad2.

Nous avons continué ce travail pour élucider (a) quelle(s) zone(s) précoce(s) du génome de l'Ad3 (E1A, E1B ou E2A) joue(nt) le rôle dominant sur l'Ad2. Puis, nous avons voulu démontrer (b) quel(s) produit(s) de la zone impliquée est(sont) responsable(s) du(des) mécanisme(s). L'évolution des travaux nous a conduit à l'étude de l'organisation des zones précoces des adénovirus de sérotype 2, 3 et 12, notamment celle du gène E1A. L'organisation globale de cette région entre les différents sérotypes est la même, et les études réalisées sur l'Ad2 et l'Ad5 (sous-groupe C) ont été étendues aux autres sérotypes. En réalité, une analyse spécifique de la partie non codante du gène E1A montre une différence assez importante entre les différents composants. Comme cette région semble essentielle dans la régulation du gène E1A, une étude de chaque composant individuel ou de leur ensemble pourrait aider à la compréhension du(des) mécanisme(s) de régulation.

Pendant cette étude, nous nous sommes aperçus qu'une séquence existant dans les plasmides pBR 322 et pKH 47 pourrait jouer un rôle très important au niveau de la régulation des gènes hétérologues. Ceci a motivé nos recherches à démontrer le rôle réel de cette séquence dans la régulation des gènes de la cellule eucaryote.

Les résultats sont présentés sous forme de trois chapitres :

- le premier concerne la stimulation des promoteurs précoces des régions E2A et E3 de l'Ad5,
- le deuxième aborde le phénomène de transdominance intersérotypique,
- le troisième étudie le rôle de la partie non codante de la région E1A des adénovirus type 2, 3 et 12, ainsi que la fonction de la séquence "poison" (inhibitrice de la transcription) qui est présente dans les plasmides pBR 322 et pKH 47.

Pour faciliter la compréhension des résultats les plasmides utilisés sont schématisés à la fin de ce chapitre. Leur construction est détaillée dans les articles présentés sous forme d'annexes à la fin du mémoire.

Ce travail a fait l'objet des communications et publications suivantes :

COMMUNICATIONS

LEITE, J.P.G., DELSERT, C., NIEL, C., COUSIN, C. and D'HALLUIN, J.C. (1985). "Adenovirus type 3 E1A gene products can stimulate or repress Ad2 early promoters". Imperiale Cancer Resarch Fund, Tumour Virus Meeting on SV40, Polyoma & Adenoviruses, 29/07-03/08/85, Cambridge (U.K.).

LEITE, J.P.G., NIEL, C., and D'HALLUIN, J.C. (1986). "The product of 13S mRNA from the E1A region of adenovirus is responsible for the interserotypic transdominance among human adenoviruses". III^{ème} Colloque National de Virologie, 26/11-30/11/1986, Sao Lourenço (Brésil).

LEITE, J.P.G., COUSIN, C., MILLEVILLE, M., and D'HALLUIN, J.C. (1987). "Comparative study among the 5' control regions of E1A genes of Adenovirus serotypes 2, 3 and 12". Workshop Adeno/Papovavirus, 07/04-10/04/87, St Andrews, Ecosse (U.K.).

LEITE, J.P.G., MILLEVILLE, M., COUSIN, C., and D'HALLUIN, J.C. (1987). "Genetic and Biochemical analysis of the E1A promoter region of adenoviruses". 18th FEBS Meeting, 28/06-03/07/87, Ljubljana (Jugoslavie).

LEITE, J.P.G., COLLARD, J.F., MILLEVILLE, M., and D'HALLUIN, J.C. (1987). "E1A region of adenovirus types 2, 3 and 12 : specific activity of promoter and encoding sequences in gene expression". Imperiale Cancer Research Fund, Tumour Virus Meeting onf SV40, Polyoma & Adenoviruses. 27/07-01/08/87, Cambridge (U.K.).

LEITE, J.P.G., COLLARD, J.F., MILLEVILLE, M., and D'HALLUIN, J.C. (1987). "E1A gene control studies about regulation of regions of human adenovirus types 12, 3 and 2". Centenary Symposium Molecular Biology and Infectious Diseases, Institut Pasteur, 05/10-10/10/87, Paris (France).

PUBLICATIONS

LEITE, J.P.G., NIEL, C., and D'HALLUIN, J.C. (1986). "Expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in human cells under the control of early adenovirus subgroup C promoters : effect of E1A gene products from other subgroups on gene expression". Gene, 41 : 207-215, 1986.

LEITE, J.P.G., COLLARD, J.F., and D'HALLUIN, J.C. "The regulation of E1A : the role of the two E1A mRNA products of the subgroup B adenoviruses on the early promoters of the subgroup C adenoviruses". Gene, sous presse.

LEITE, J.P.G., MILLEVILLE, M., and D'HALLUIN, J.C. "The E1A region of adenoviruses : Homologies and difference in its expression and regulation". Virology, soumis à publication.

LEITE, J.P.G., COUSIN, C., HEYSEN, A., and D'HALLUIN, J.C. "Effects of cis-acting silencer sequences of the vector pBR322 on eucaryotic gene expression". Manuscrit en préparation.

AUTRES TRAVAUX

NIEL, C., GOMES, S.A., LEITE, J.P.G., and PEREIRA, H.G. (1986). "Direct detecting and a differentiation of fastidious and non-fastidious adenoviruses in stools using a specific non-radioactive probe". J. Clin. Microbiol., 24 : 785-789.

COUSIN, C., J.P.G. LEITE, and D'HALLUIN, J.C. (1986). "Autoregulation of adenovirus DNA-binding protein preferentially occurs at the E2A early promoter level". Tumor Virus Meeting on SV40, polyoma, and Adenoviruses. 13-17/08/87, New York (USA).

NIEL, C., GOMES, S.A., LEITE, J.P.G., and PEREIRA, H.G. (1986). "Direct detection and a differentiation of fastidious and non fastidious adenoviruses in stools by using a specific non-radioactive probe". III^{ème} Colloque National de Virologie, 26-30/11/86, Sao Lourenço (Brésil).

NIEL, C., GOMES, S.A., LEITE, J.P.G., et PEREIRA, H.G. 1987. "Utilisation de sondes non-radioactives pour le diagnostic des adénovirus à partir d'échantillons de selles". 3^{ème} Colloque d'Animation de la Recherche Génétique Moléculaire et Pathologie, 18-20/09/87, Le Touquet (France).

II- C H A P I T R E I

LA STIMULATION DES PROMOTEURS PRECOCES DES REGIONS E2A ET E3 DE L'AD5

Pour étudier le rôle des produits de la région E1A dans la transactivation des promoteurs précoces, des plasmides contenant le promoteur E2A ou E3 de l'Ad5 ont été construits et deux approches utilisées :

- (1) l'infection des cellules HeLa par les virus suivie d'une transfection (ou vice-versa) ;
- (2) la transfection ou la cotransfection des plasmides exprimant différentes régions du génome viral.

Selon le type d'expérimentation, les cellules sont transfectées ou cotransfectées à raison de 10 à 20 µg d'ADN par boîte de 60 mm de diamètre. Pour atteindre une concentration finale et constante en ADN de l'ordre de 20 µg, le plasmide pKH 47 est ajouté en tant que matériel neutre.

1- Par les virus appartenant aux différents sous-groupes A,B,C,D et E (annexe 1)

Une heure avant la transfection des plasmides (p5 E2Acat, p5 E3cat), des boîtes du type "Falcon" de 60 mm de diamètre contenant 5×10^6 cellules HeLa sont infectées par chaque sérotype à raison de 5 PFU par cellule. Cinq heures après la transfection le milieu de culture (MEM) est changé et les cellules récoltées 40 h post-transfection. Elles sont lysées sous l'action des ultra-sons, puis le dosage de l'activité chloramphénicol acétyl transférase (CAT) est effectué, et quantifié par comptage de la radioactivité des formes mono- et bi-acétylées du (^{14}C)-chloramphenicol. C'est une méthode de dosage indirecte car le promoteur bactérien du gène cat est remplacé par les promoteurs des régions E2A (p5 E2Acat) ou E3 (p5 E3cat) de l'Ad5. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expérimentations minimum.

Au Tableau 11 sont représentées les activités CAT des promoteurs E2A et E3, individuellement ou en présence de virus appartenant à chaque sous-groupe.

Tableau 11 :

Activité CAT de cellules HeLa infectées avec un sérotype représentatif de chaque sous-groupe.

Promoteur	Sans virus	Ad12 (A)	Ad3 (B)	Ad2 (C)	Ad9 (D)	Ad4 (E)
E2A	0,37	4,81	7,20	4,62	1,44	1,04
E3 ^(a)	1,00	14,90	4,30	6,00	6,10	6,40

(a) p5 E3cat : 1,0 correspond à 830 cpm (^{14}C) Ac-Cm/min/ 10^6 cellules à 37° C.

Sans infection virale, l'activité CAT du promoteur E3 est supérieure à celle du promoteur E2A.

Les adénovirus appartenant aux différents sous-groupes sont capables d'activer les promoteurs E2A et E3 de l'Ad5.

Avec le promoteur E2A, l'activité CAT est plus élevée pour les sous-groupes A, B, et C par rapport aux sous-groupes D et E. En ce qui concerne le promoteur E3, cette activité est importante pour le sous-groupe A, moyenne pour les sous-groupes C, D et E, et plus faible pour le sous-groupe B.

Des résultats similaires ont été obtenus si la transfection précède de 5 h l'infection virale.

2- Par la transfection ou la cotransfection de plasmides (annexes 1 et 2)2.1- En présence de la région E1A des Ad2 ou Ad3 (annexe 1)

2.1.1- Stimulation de type "trans"

On appelle stimulation de type "trans", une stimulation faisant intervenir un facteur, normalement de nature protéique, qu'il soit d'origine virale ou cellulaire.

La transactivation des promoteurs précoces par les produits de la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad5 est connue depuis 1979 (Berk et al., 1979; Jones and Shenk, 1979). Par contre la transactivation due aux produits de la région E1A de l'Ad3 n'a pas encore été décrite.

Les plasmides contenant la région E1A de l'Ad2 (pVM 214) ou de l'Ad3 (pVM 312) sont cotransfectés dans des cellules HeLa ou HEK-293, avec les plasmides p5 E2Acat et p5 E3cat. Dans le Tableau 12 sont rapportés les résultats obtenus lors de ces cotransfections.

Tableau 12 :

Activité CAT des cellules transfectées ou cotransfectées avec les plasmides contenant les promoteurs E2A ou E3 de l'Ad5.

Promoteur	pKH 47	Cellules HeLa		Cellules HEK-293	
		pVM 214 (E1A Ad2)	pVM 312 (E1A Ad3)	pKH 47	pVM 312
E2A	0,37	2,90	1,66	4,00	0,92
E3	1,00	6,40	2,10	5,80	5,30

Les deux régions E1A (de l'Ad2 et de l'Ad3) sont capables de stimuler les promoteurs E2A et E3 de l'Ad5 par un mécanisme de type "trans". D'une part les produits de la région E1A de l'Ad2 (cellules HeLa) et de l'Ad5 (cellules HEK-293) stimulent plus fortement que ceux de l'Ad3. D'autre part, les produits E1A de l'Ad3 sont capables d'activer des promoteurs hétérologues (cellules HeLa).

2.1.2- Stimulation de type "cis" et "trans"

Une stimulation de type "cis" fait intervenir une séquence nucléotidique située généralement en amont d'un promoteur.

Les régions E1A de l'Ad2 et de l'Ad3 ont été clonées en amont des promoteurs E2A (p2 E1AE2Acat, p3 E1AE2Acat) et E3 (p2 E1AE3cat, p3 E1AE3cat) de l'Ad5. Après transfection de ces plasmides dans des cellules HeLa et HEK-293, l'activité CAT est mesurée.

Tableau 13 :

Activité CAT des cellules transfectées avec les plasmides contenant la région E1A soit de l'Ad2, soit de l'Ad3 en amont des promoteurs E2A et E3.

E2A	Cellules		E3	Cellules		Rapport
	HeLa	HEK-293		HeLa	HEK-293	
p2 E1AE2Acat	7,14 ^a	ND	p2 E1AE3cat	15,6 ^c	ND	a/b 4,73
p3 E1AE2Acat	1,51 ^b	2,81	p3 E1AE3cat	2,5 ^d	3,5	c/d 6,4

L'analyse de ces résultats permet de démontrer que les deux régions E1A stimulent par un mécanisme de type "cis" les deux promoteurs E2A et E3. L'activité CAT la plus importante est celle obtenue avec la région E1A de l'Ad2.

2.2- Par les produits des ARNm 12 S et 13 S de la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3 (annexe 2)

Les deux produits majeurs codés par la région E1A sont les protéines de 289R et de 243R pour l'Ad2, et de 262R et de 231R pour l'Ad3. Jusqu'à présent leur rôle dans le processus de transactivation est controversé. Pour pouvoir étudier le rôle individuel des produits des ARNm 13 S et 12 S de la région E1A de l'adénovirus type 3, un clone contenant l'ADNc de l'ARNm 13 S (pVM 335) a été sélectionné parmi une banque d'ADNc. Un plasmide n'exprimant que l'ARNm 12 S (pVM 325) de l'Ad3 a été obtenu après modification du site DraI (nt 1178) et la cinétique effectuée avec l'exonucléase Bal31, a permis d'éliminer le site donneur d'épissage de l'ARNm 13 S. Les plasmides exprimant l'ARNm 13 S (pEK 975) ou 12 S (dI 1500) de l'Ad2 (Montell et al., 1982), ont été gracieusement donnés par Dr.A.J.Berk. Pour déterminer lesquels agissaient positivement dans le processus de transactivation, les plasmides pEK 975, dI 1500, pVM 335 et pVM 325 ont été cotransfectés avec les plasmides p5 E2Acat et p5 E3cat dans les cellules HeLa. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14 et Fig. 28.

Tableau 14 :

Activité CAT des cellules HeLa transfectées ou cotransfectées avec les plasmides contenant les promoteurs E2A ou E3 de l'Ad5 en présence de plasmides exprimant un seul produit de la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3.

Promoteurs	pKH 47	Ad2		Ad3	
		<u>pEK 975</u> (13S)	<u>dI 1500</u> (12S)	pVM 335 (13S)	pVM 325 (12S)
p5 E2Acat	0,36	2,77	1,76	0,89	0,76
p5 E3cat	1,00	3,30	1,00	0,44	0,60

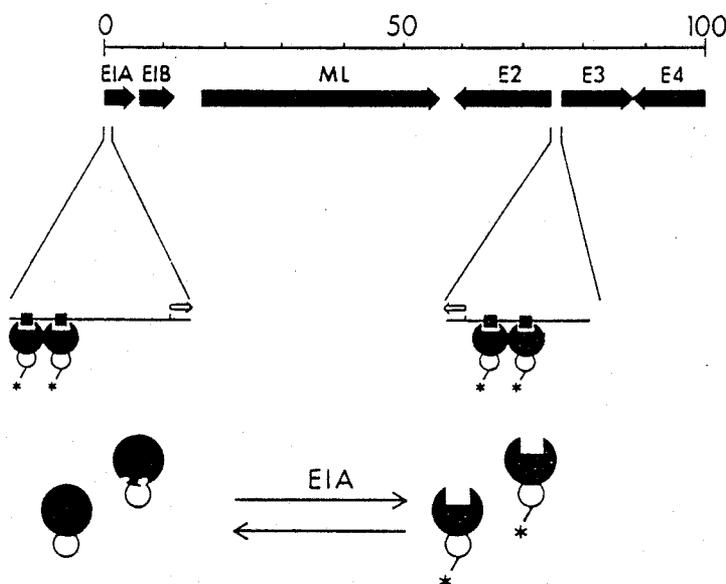
Le produit de l'ARNm 13 S de l'Ad2 (289R) est capable de stimuler les promoteurs E2A et E3. Quant à la protéine 243R (ARNm 12 S) de l'Ad2 elle n'active que le promoteur E2A.

En ce qui concerne l'Ad3, les résultats sont différents. Les produits des ARNm 13 S (262R) et 12 S (231R) sont capables d'activer faiblement le promoteur E2A. Mais les deux produits semblent réguler négativement le promoteur E3 de l'Ad5.

En comparant les Tableaux de ce premier chapitre, il est donc possible d'observer que les produits de la région E1A des adénovirus type 2 et 3 n'agissent pas de la même façon. La protéine de 289R (Ad2), peut stimuler le promoteur E2A au même taux que l'ensemble des produits de la région E1A de l'Ad2 (pVM 214). Par contre, pour le promoteur E3, une coopération entre les deux produits est observée, car les cellules transfectées avec le pVM 214 ont un taux d'activité CAT plus élevé. Quand les protéines de 262R et 231R de l'Ad3 (pVM 312) sont exprimées ensemble, une coopération est observée pour les promoteurs E2A et E3. Mais individuellement ces protéines entraînent une transinhibition du promoteur E3.

Figure 27 :

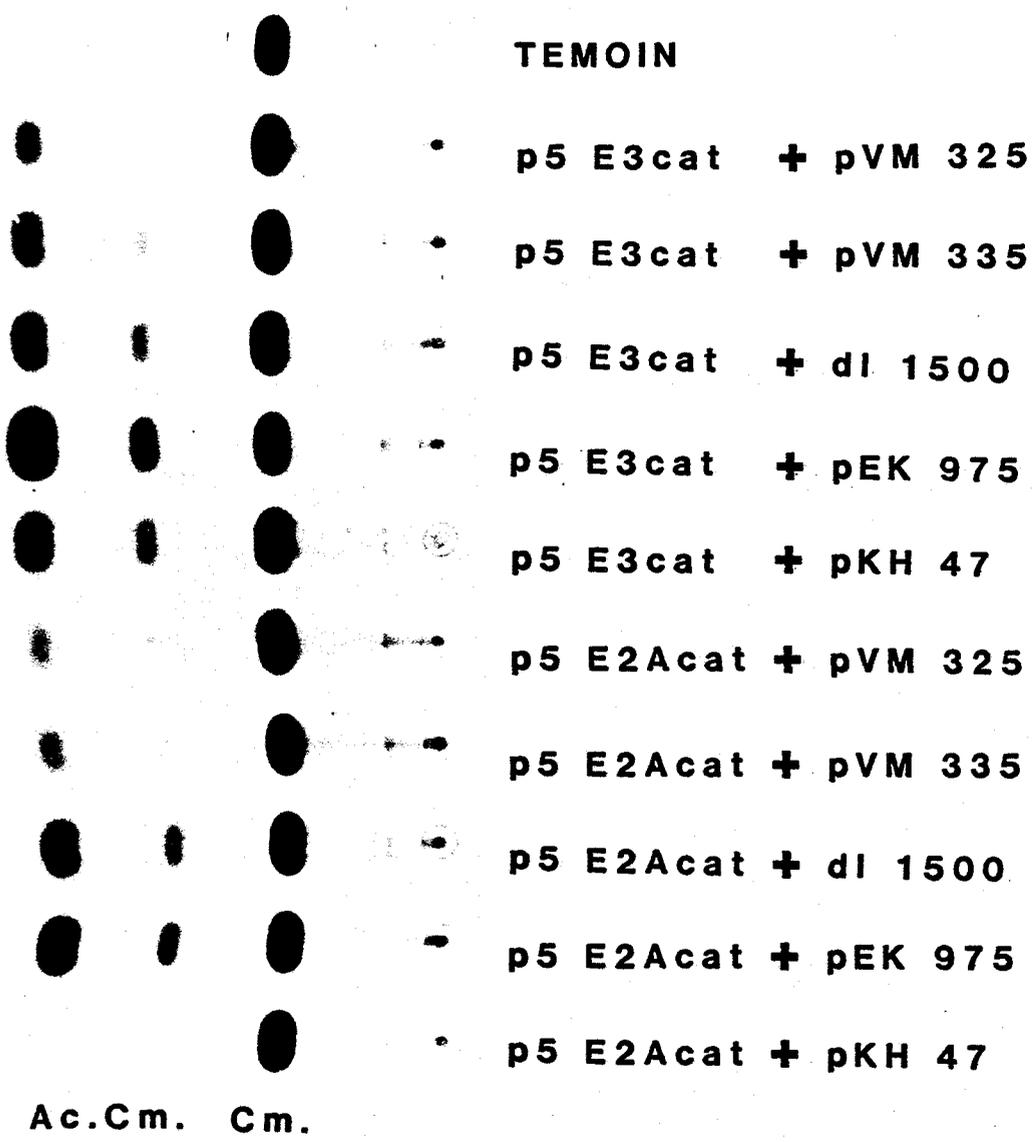
Modèle hypothétique de la transactivation par les produits de la région E1A (Raychaudhuri et al., 1987).



Le facteur E2F reconnaît deux sites présents dans les séquences "enhancers" des gènes E1A et E2A. Le rôle des produits de la région E1A est d'induire des modifications (*) de ce facteur, lui permettant de se lier à l'ADN.

Figure 28 :

Détermination de l'activité CAT dans les cellules HeLa transfectées avec les plasmides contenant le gène cat sous le contrôle du promoteur E2A ou E3 de l'Ad5.



III- C H A P I T R E I I

LA TRANSDOMINANCE INTERSEROTYPIQUE

La majorité des cellules de singe est permissive au virus SV40 mais pas aux adénovirus humains. Les adénovirus oncogènes, sous-groupes A (Ad31) et B (Ad3), ne répliquent pas leur ADN dans les cellules CV-1. Toutefois, la réplication de l'ADN existe pour tous les autres sous-groupes d'adénovirus (C,D et E). En co-infectant les cellules CV-1 avec SV40 ou AD2ND1 et Ad3 (ou Ad31), une inhibition de la synthèse de l'ADN viral et cellulaire est observée. La co-infection de cellules humaines de type HeLa ou KB avec Ad3 (Ad31) et Ad2 a permis la mise en évidence d'un effet inhibiteur de l'Ad3 (ou Ad31) sur l'Ad2 (Delsert and D'Halluin, 1984 ; Delsert, 1985).

Pour déterminer quelle est la région du génome de l'Ad3 impliquée dans ce phénomène, plusieurs plasmides furent construits, exprimant les zones précoces de l'Ad2 ou de l'Ad3 et les promoteurs précoces E2A ou E3 de l'Ad5. En clonant le gène cat en aval de ces promoteurs et en mesurant l'activité CAT, une évaluation du taux de transcription de ces promoteurs est obtenue.

1- Par l'Ad3

Des cellules HeLa sont infectées par les adénovirus type 2 et type 3 à raison de 5 PFU par cellule. Soit l'infection virale est effectuée à différents temps après la transfection des plasmides p2 E1AE2Acat et p2 E1AE3cat, soit les plasmides sont transfectés une heure après l'infection. Les résultats sont représentés dans le Tableau suivant :

Tableau 15 :

Activité CAT des cellules HeLa infectées avec l'Adénovirus type 2 et type 3 à différents temps avant et après transfection.

Plasmides	Virus pKH47	Ad2				Ad3					
		1 h A T	Après transfection				1 h A T	Après transfection			
			1h	2h	3h	4h		1h	2h	3h	4h
p2 E1AE2Acat	7,14	14,9	15,1	15,2	15,2	15,4	3,9	3,8	6,9	7,8	11,4
p2 E1AE3cat	15,6	35,8	35,9	36,0	36,3	36,3	3,3	3,3	9,6	15,2	18,6

A T : avant transfection

L'Ad2 stimule et l'Ad3 inhibe les promoteurs E2A et E3 de l'Ad5 en présence de la région E1A de l'Ad2.

L'inhibition n'est observée que si l'infection est menée une heure avant ou après la transfection. A partir de la deuxième heure post-transfection l'effet s'inverse et une activation est observée.

2- Par la transfection ou cotransfection de plasmides (annexes 1, 2 et 3)

2.1- Le rôle de la région E1A de l'Ad3 dans le phénomène de transdominance (annexes 1 et 2)

Les plasmides contenant la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3 en amont des promoteurs E2A (p2 E1AE2Acat, p3 E1AE2Acat) ou E3 (p2 E1AE3cat, p3 E1AE3cat) de l'Ad5, ont été transfectés dans des cellules HeLa. Des cotransfections ont été effectuées entre ces différents plasmides et celui contenant soit la région E1A de l'Ad2 (pVM 214), soit la région E1A de l'Ad3 (pVM 312). Les résultats sont représentés dans le Tableau suivant :

Tableau 16 :

Activité CAT des cellules HeLa transfectées ou cotransfectées avec les plasmides contenant la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3.

	pKH 47	pVM 214	pVM 312	Rapport
p2 E1AE2Acat	7,14 ^a	13,32	2,14 ^b	a/b 3,3
p2 E1AE3cat	15,60 ^c	18,70	2,65 ^d	c/d 5,9
p3 E1AE2Acat	1,51	2,72	1,66	
p3 E1AE3cat	2,50	3,25	1,25	

Les plasmides possédant la région E1A de l'Ad2 en amont du promoteur E2A (p2 E1AE2Acat) ou E3 (p2 E1AE3cat) montrent une activité CAT plus importante que ceux possédant la région E1A de l'Ad3 (p3 E1AE2Acat, p3 E1AE3cat).

La cotransfection des plasmides p2 E1AE2Acat, p2 E1AE3cat, p3 E1AE2Acat, p3 E1AE3cat avec le plasmide contenant la région E1A de l'Ad2 (pVM 214) entraîne une activité CAT plus importante que celle des plasmides seuls. Par contre, les plasmides p2 E1AE2Acat et p2 E1AE3cat avec le plasmide contenant la région E1A de l'Ad3 (pVM 312) présentent une importante diminution du taux d'activité : pour le p2 E1AE2Acat (rapport 3,3) et surtout pour le p2 E1AE3cat (rapport 5,9). Le phénomène est donc lié à la région E1A de l'Ad2 et de l'Ad3, mais une éventuelle régulation au niveau du promoteur E3 de l'Ad5 ne peut être écartée.

2.2- Le rôle des produits des ARNm 12 S et 13 S de l'Ad2 et de l'Ad3 dans la transdominance (annexe 2)

Les produits de la région E1A de l'Ad2 (pVM 214) stimulent, tandis que ceux de l'Ad3 (pVM 312) inhibent les promoteurs E2A et E3 de l'Ad5, en présence de la région E1A de l'Ad2. Pour déterminer le rôle individuel de chacun des deux produits majeurs de la région E1A de l'Ad3 dans le phénomène de transdominance, les plasmides pVM 335 et pVM 325, lesquels codent respectivement pour la protéine de 262R et de 231R ont été utilisés. Les plasmides pEK 975 et dl 1500 (Montell et al., 1982), exprimant respectivement les protéines de 289R et de 243R de l'Ad2, ont été utilisés comme témoins de régulation positive. Les plasmides sont cotransfectés dans les cellules HeLa avec les plasmides contenant la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3, en amont

des promoteurs E2A ou E3 de l'Ad5. Les résultats sont exprimés dans le Tableau suivant :

Tableau 17 :

Activité CAT des cellules HeLa transfectées ou cotransfectées avec les plasmides contenant la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3 et les plasmides exprimant un seul produit de la région E1A de ces mêmes adénovirus.

	pKH 47	E1A Ad2		E1A Ad3	
		pEK 975 (13S)	d1 1500 (12S)	pVM 335 (13S)	pVM 325 (12S)
p2 E1AE2Acat	7,14	8,60	8,60	2,14	4,20
p2 E1AE3cat	15,60	16,54	16,22	2,65	2,65
p3 E1AE2Acat	1,51	5,10	5,74	1,51	1,81
p3 E1AE3cat	2,50	4,90	2,50	1,25	1,50

Les produits des ARNm 12 S et 13 S de l'Ad2 n'inhibent pas les plasmides contenant soit la région E1A de l'Ad2 soit la région E1A de l'Ad3. Par contre, le produit de l'ARNm 13 S de l'Ad3 inhibe plus fortement le plasmide contenant la région E1A de l'Ad2 et le promoteur E3 de l'Ad5 (p2 E1AE3cat) que celui contenant le promoteur E2A (p2 E1AE2Acat). Le produit de l'ARNm 12 S de l'Ad3 inhibe le promoteur E3 de façon similaire au produit de l'ARNm 13 S et plus faiblement le promoteur E2A.

Ces résultats semblent démontrer que le phénomène de transdominance est dû aux produits des ARNm 12 S et 13 S de la région E1A de l'Ad3 et que la régulation négative a lieu au niveau de la région E1A et du promoteur E3 des adénovirus du sous-groupe C (Fig. 29 et 30).

2.3- Les promoteurs de la région E1A de l'Ad2 et de l'Ad3 (annexes 1, 2 et 3)

Les plasmides p2 E1Acat et p3 E1Acat contiennent le site de coiffe (+ 1) mais non le premier codon d'initiation de la traduction (AUG) pour la région E1A, situé au nt 558 pour l'Ad2 et 576 pour l'Ad3. Ils ont été construits par coupure enzymatique, puis soumis à une cinétique par l'exonucléase Bal31. Une séquence nucléotidique contenant le site de

Figure 29 :

Détermination de l'activité CAT dans les cellules HeLa transfectées avec les plasmides contenant le gène cat sous le contrôle du promoteur E2A ou E3 de l'Ad5, en présence de la région E1A de l'Ad2.

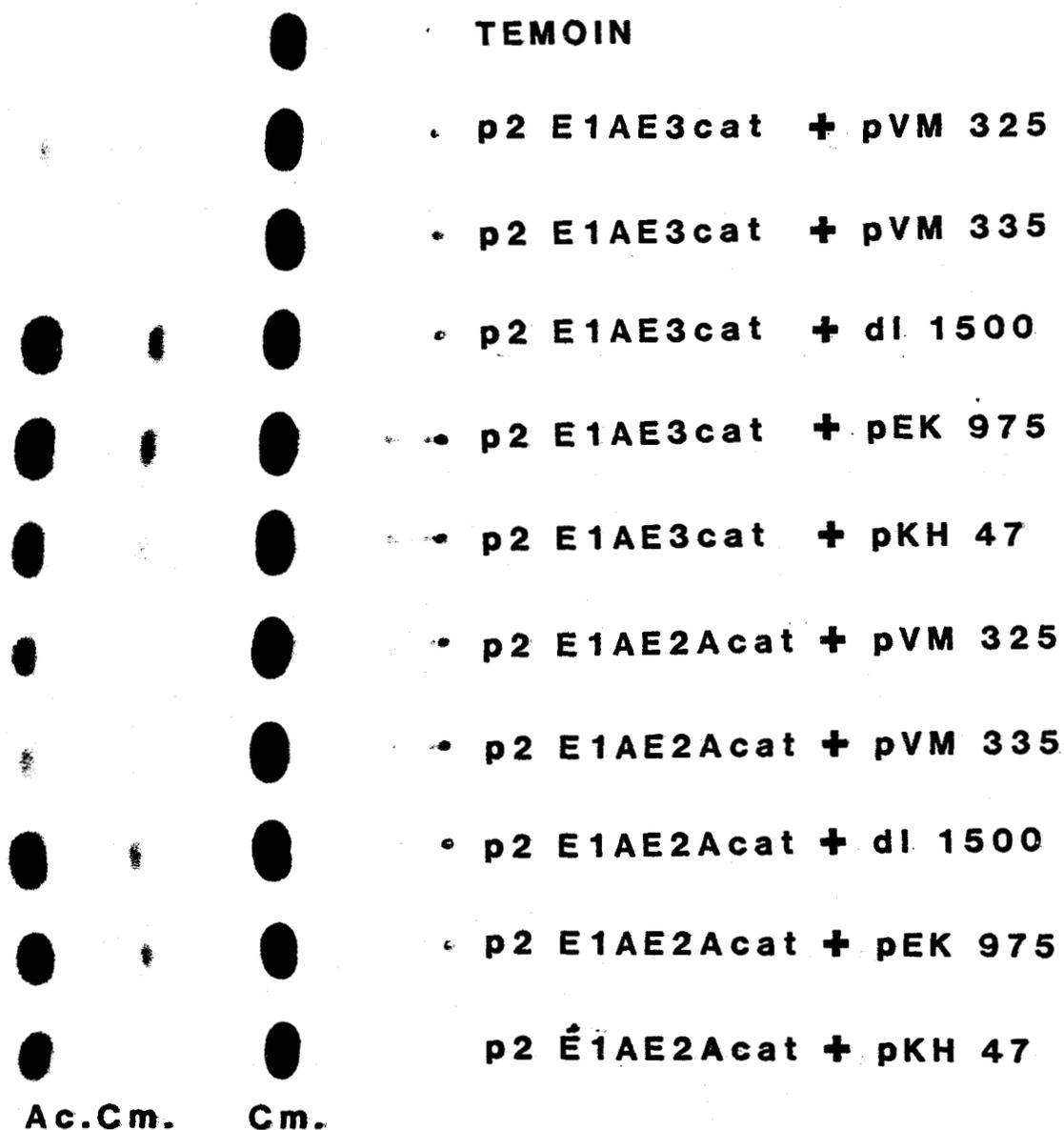
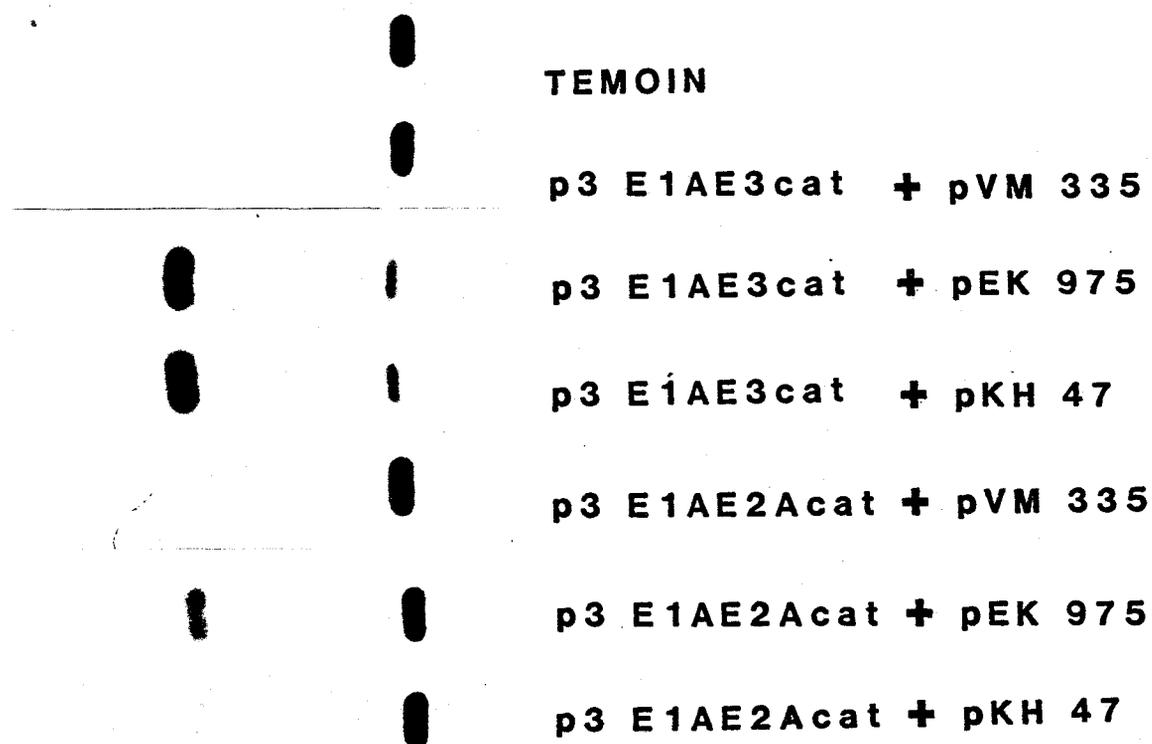


Figure 30 :

Détermination de l'activité CAT dans les cellules HeLa transfectées avec les plasmides contenant le gène cat sous le contrôle du promoteur E2A ou E3 de l'Ad5, en présence de la région E1A de l'Ad3.



l'endonucléase HindIII ("linker" HindIII) est ajoutée avant recircularisation du plasmide par l'ADN ligase du phage T4. La séquence des deux plasmides a été effectuée par la méthode de terminaison des chaînes (Messing et al., 1977 ; Sanger et al., 1977) et déterminée par la localisation du "linker" HindIII au nt 538 pour le p2 E1Acat et au nt 540 pour le p3 E1Acat.

Les résultats des cotransfections de ces plasmides avec les plasmides contenant la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3 sont représentés dans le Tableau suivant :

Tableau 18 :

Activité CAT des cellules HeLa transfectées ou cotransfectées avec les plasmides contenant les promoteurs de la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3.



	pKH 47	E1A Ad2			E1A Ad3		
		pVM 214 (13S et 12S)	pEK 975 (13S)	d1 1500 (12S)	pVM 312 (13S et 12S)	pVM 335 (13S)	pVM 325 (12S)
p2 E1Acat	1,00 ^(a)	2,34	2,44	0,80	0,47	0,40	0,68
p3 E1Acat	0,47	2,20	1,20	0,47	0,70	0,70	0,70

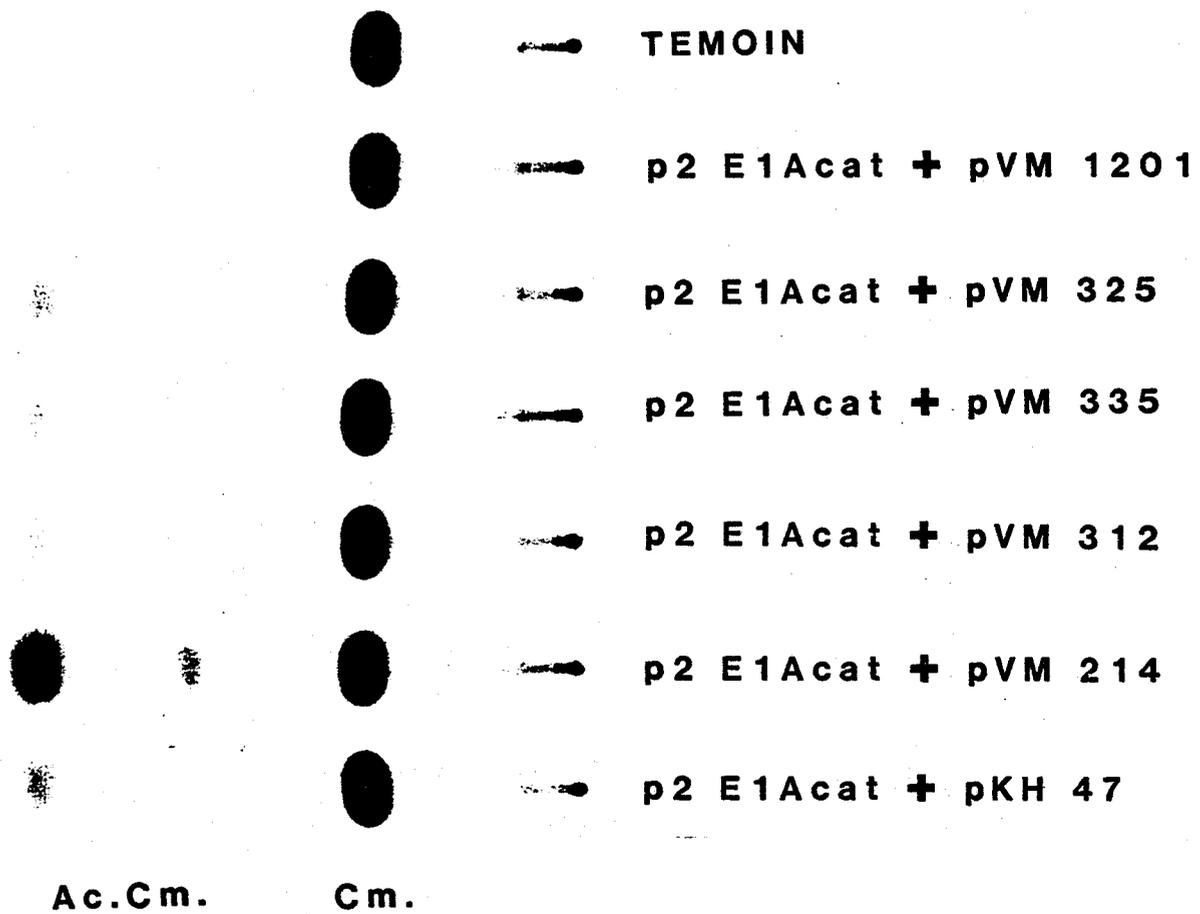
(a) p2 E1Acat : 1,0 correspond à 1700 cpm (¹⁴C) Ac-Cm/min/10⁶ cellules à 37° C.

Le promoteur de la région E1A de l'Ad2 active plus le gène cat que celui de l'Ad3. Le produit de l'ARNm 13 S de la région E1A de l'Ad2 stimule plus efficacement les deux promoteurs de la région E1A. Les produits de la région E1A de l'Ad3 stimulent faiblement leur propre promoteur et inhibent celui de la région E1A de l'Ad2 (Fig. 31).

Le produit de l'ARNm 13 S de l'Ad3 n'agit pas sur son propre promoteur (Tableaux 17 et 18), mais il est capable de réguler négativement le promoteur E3 (Tableau 17).

Figure 31 :

Détermination de l'activité CAT dans les cellules HeLa transfectées avec les plasmides contenant le gène cat sous le contrôle du promoteur E1A de l'Ad2.



IV- CHAPITRE III

COMPARAISON DE LA PARTIE NON-CODANTE DE LA REGION E1A DES ADENOVIRUS TYPE 2, 3 ET 12

L'organisation de la partie non-codante de la région E1A est assez différente pour les Ad2, 3 et 12 (Fig.32). La première différence est observée au niveau de l'ITR : celui de l'Ad12 est constitué de 163 pb, celui de l'Ad3 de 136 pb, et celui de l'Ad5 (Ad2) est réduit à 103 pb. Par contre, la distance entre l'ITR et le site de coiffe chez l'Ad12 est beaucoup plus courte que celle présente chez l'Ad2 ou l'Ad3.

Quant aux différentes séquences "enhancers", leur comparaison indique que la séquence décrite par Hen et al. (1983) est située entre les deux éléments décrits par Hearing et Shenk (1983a) pour l'Ad12, et que la distance entre ces deux éléments est différente pour l'Ad12, l'Ad3 et l'Ad2.

Les deux séquences reconnues par le facteur nucléaire E2F (Kovesdi et al., 1987) sont présentes entre les deux éléments décrits par Hearing et Shenk (1983a) chez l'Ad2, mais seulement l'une des deux est située entre ces éléments chez l'Ad3. Par contre, l'Ad12 ne possède pas de site potentiel de fixation du facteur E2F.

Pour l'Ad2, il est possible d'observer l'existence de cinq séquences "TATA like", mais seulement trois chez l'Ad3 et chez l'Ad12. Les séquences "TATA box" sont différentes entre les trois sérotypes d'adénovirus. La séquence hautement conservée entre ces adénovirus est retrouvée dans cette partie non codante.

Ces observations suggèrent qu'une analyse approfondie de cette région est nécessaire pour pouvoir déterminer et étudier le rôle de l'ensemble du promoteur de la région E1A.

LEGENDE DE LA FIGURE 32

- Séquence "enhancer" décrite par Hen et al., 1983 ("enhancer A")
- == Séquences "enhancers" décrites par Hearing et Shenk, 1983a ("enhancer B")
- ΔΔ Séquence "enhancer" décrite par Imperiale et al., 1983 (-198 nt à -45 nt) ("enhancer C")
- - Séquence ayant une homologie avec la sequence "enhancer B" ;
- .. Séquence ayant une homologie avec la sequence "enhancer A" ;
- ++ Séquences reconnues par le facteur nucléaire E2F (Kovesdi et al., 1987) ;
- TT Séquence reconnue par le facteur nucléaire E4F1 (Lee and Green, 1987) ;
- "" Séquence hautement conservée chez les adénovirus ;
- ** Séquence "TATA box" ;
- oo Séquence "TATA like" ;
- .. Séquence "CAAT box" ;
- ^^ Séquence reconnue par l'endonuclease Pvu II ;
- I Site de coiffe ;
- :: Codon d'initiation de la traduction .

Figure 32A : Séquence nucleotidique d'une partie de la région E1A des adénovirus types 2, 3 et 12 (d'après Tooze, 1980).

A.1) Ad.2

```

5'
CATCATCATA ATATACCTTA TTTTGGATTG AAGCCAATAT GATAATGAGG          50
  ooo  ooooo

GGTGGAGTT TGTGACGTGG CGCGGGGCGT GGAACGGGG CGGGTGACGT          100

AGTAGTGTGG CGGAAGTGTG ATGTTGCAAG TGTGGCGGAA CACATGTAAG          150

CGCCGGATGT GGTAAAAGTG ACGTTTTTGG TGTGCGCCGG TGTATACGGG          200

AAGTGACAAT TTTGCGCGCG TTTTAGGCGG ATGTTGTAGT AAATTTGGGC          250
  ++++++++          o  ooooo  T

GTAACCAAGT AATGTTTGGC CATTTTCGCG GGAAACTGA ATAAGAGGAA          300
TTTTT          ++++++++ +          Δ

GTGAAATCTG AATAATTCTG TGTTACTCAT AGCGCGTAAT ATTTGTCTAG          400
  ooooooo          oooo  oooo

GGCCGCGGGG ACTTTGACCG TTTACGTGGA GACTCGCCCA GGTGTTTTTC          400

TCAGGTGTTT TCCGCGTTCC GGGTCAAAGT TGGCGTTTTA TTATTATAGT          450
          .....          oo  oooooo

CAGCTGACGC GCAGTGTATT TATACCCGGT GAGTTCCTCA AGAGGCCACT          I
  ^          ****  ****          ""  """"""""""
  Δ

CTTGAGTGCC AGCGAGTAGA GTTTTCTCCT CCGAGCCGCT CCGACACCGG          550
"""""""""" """""""""" """""""""" ""

GACTGAAAAT GAGACATATT ATCTGCCACG GAGGTGTTAT TACCGAAGAA          600

ATGGCCGCCA GTCTTTTGGG CCAGCTGATC GAAGAGGTAC TGGCTGATAA          650

TCTTCCACCT CCTAGCCATT TTGAACCACC TACCCTTCAC GAACTGTATG          700
  
```


Figure 32B :
 Comparaison des séquences "enhancers".

B.1) Elément "enhancer A"

B.1.1) Ad2/Ad3

Ad2 AGCGCCGGATGTGGTAAAAGTGACGTTT
 * **** * ** * 9/28 pb
 Ad3 GAGGAGTTATGTTGCAAGTTATTACGGT

B.1.2.) Ad2/Ad12

Ad2 AGCGCCGGATGTGGTAAAAGTGACGTTT
 ***** **** 16/28 pb
 Ad12 CGCGCCGGATGTGACGTTTTAGACGCCA

B.1.3) Ad3/Ad12

Ad3 GAGGAGTTATGTTGCAAGTTATTACGGT
 * **** * ** 9/28 pb
 Ad12 CGCGCCGGATGTGACGTTTTAGACGCCA

B.2) Séquence existante à l'intérieur de la région codante chez l'Ad3 et l'Ad12,
 ayant une homologie avec l'"enhancer A".

B.2.1) Ad2/Ad3

Ad2 AGCGCCGGATGTGGTAAAAGTGACGTTT
 * * * ***** * 13/28 pb
 Ad3 ACTGGAGTTTGTGGTAAATACCCTAATG

B.2.2) Ad2/Ad12

Ad2 AGCGCCGGATGTGGTAAAAGTGACGTTT
 * * ***** * 10/28 pb
 Ad12 TGATCTTGATGTGGAGTCTGCCGGTGAA

B.2.3) Ad3/Ad12

Ad3 ACTGGAGTTTGTGGTAAATACCCTAATG
 ***** * ** 8/28 pb
 Ad12 TGATCTTGATGTGGAGTCTGCCGGTGAA

B.3) Eléments "enhancer B"

B.3.1) Ad2 premier/Ad2 deuxième élément
 premier GGAAGTGACA
 ***** * 9/11 pb
 deuxième AGGAAGTGAAA

B.3.2) Ad3 premier/Ad3 deuxième
 premier CGGAAGTAGAC
 ***** * 7/11 pb
 deuxième AGGAAGTGAAT

B.3.3) Ad12 premier/Ad12 deuxième
 premier AGGAAGTGGGG
 ***** 7/11 pb
 deuxième CGGAAGTGAAA

B.3.4) Ad2/Ad3
 Ad2 premier GGAAGTGACA 6/1 pb deuxième AGGAAGTGAAA
 ***** 10/11 pb
 Ad3 premier CGGAAGTAGAC deuxième AGGAAGTGAAT

B.3.5) Ad2/Ad12
 Ad2 premier GGAAGTGACA 7/11 pb deuxième AGGAAGTGAAA
 ***** 10/11 pb
 Ad12 premier AGGAAGTGGGG deuxième CGGAAGTGAAA

B.3.6) Ad3/Ad12
 Ad3 premier CGGAAGTAGAC 7/11 pb deuxième AGGAAGTGAAT
 ***** * 9/11 pb
 Ad12 premier AGGAAGTGGGG deuxième CGGAAGTGAAA

B.4) Séquence chez l'Ad3 ayant une homologie avec l'"enhancer B"

B.4.1) Séquence (S) : TGCAAGTGAAA

B.4.2) Ad2/(S)
 Ad2 premier GGAAGTGACA 8/11 pb deuxième AGGAAGTGAAA
 * ***** * 9/11 pb
 (S) TGCAAGTGAAA TGCAAGTGAAA

B.4.3) Ad3/(S)
 Ad3 premier CGGAAGTAGAC 6/11 pb deuxième AGGAAGTGAAT
 * ***** * 8/11 pb
 (S) TGCAAGTGAAA TGCAAGTGAAA

B.4.4) Ad12/(S)
 Ad12 premier AGGAAGTGGGG 6/11 pb deuxième CGGAAGTGAAA
 * ***** * 9/11 pb
 (S) TGCAAGTGAAA TGCAAGTGAAA

1- Les plasmides hybrides Ad2/Ad3 et Ad2/Ad12 (annexe 3)

Dans le but d'étudier le rôle des différentes séquences situées en amont du promoteur de la région E1A des adénovirus type 2, 3 et 12, des plasmides hybrides de ces sérotypes ont été construits. Pour cela, le site de l'endonucléase PvuII situé à 13 nt en amont de la séquence "TATA box", site conservé entre tous les sérotypes d'adénovirus humains, à l'exception des fastidieux, a été utilisé.

En ce qui concerne les séquences "enhancers", l'étude est particulièrement intéressante car les homologies ne sont pas toutes "conservées" (Figure 32B). Leur localisation est à peu près connue mais leur type spécifique n'est pas encore étudié chez les adénovirus. De plus, les résultats publiés par les différents auteurs sont contradictoires. Jusqu'à présent aucune explication n'a été fournie sur le rôle des séquences "enhancers" dans le processus de transformation cellulaire. En utilisant les plasmides hybrides Ad2/Ad12, nous avons étudié le rôle des différents domaines dans ce processus.

En remplaçant le gène cat par le gène néo, l'activité du promoteur de la région E1A, intégré au génome cellulaire, a pu être évaluée. Ainsi, les deux types d'activité, CAT et "NEO", fournissent une évaluation du niveau transcriptionnel.

1.1- Les plasmides hybrides Ad2/Ad3

1.1.1- L'activité CAT

Les plasmides p2 E1Acat (Ad2), pVM 261 (Ad2/Ad3), p3 E1Acat (Ad3) et pVM 315 (Ad3/Ad2) ont été cotransfectés dans les cellules HeLa avec les plasmides contenant la région E1A de l'Ad2 (pVM 214), de l'Ad3 (pVM 312) ou avec un plasmide n'exprimant qu'un seul des produits majeurs de cette région (pEK 975, dl 1500, pVM 335, pVM 325).

Les résultats de l'activité CAT des extraits cellulaires obtenus 40 h après cotransfection sont représentés dans le Tableau suivant :

Tableau 19 :

Activité CAT des extraits de cellules HeLa transfectées.

	pKH 47	E1A Ad2			E1A Ad3		
		pVM 214 (13S et 12S)	pEK 975 (13S)	d1 1500 (12S)	pVM 312 (13S et 12S)	pVM 335 (13S)	pVM 325 (12S)
p2 E1Acat	1,00	2,34	2,44	0,80	0,47	0,40	0,68
pVM 261	0,44	2,20	1,06	0,44	0,44	0,54	0,66
p3 E1Acat	0,47	2,20	1,20	0,47	0,70	0,70	0,70
pVM 315	0,98	2,45	1,35	0,69	0,49	0,51	0,53

Les activités CAT dues aux plasmides p2 E1Acat et pVM 315 sont plus élevées que celles produites par les plasmides p3 E1Acat et pVM 261. Les produits de la région E1A de l'Ad2 stimulent les promoteurs E1A de l'Ad2 et de l'Ad3, et l'activité globale est la même pour les quatre plasmides. L'apport du plasmide pEK 975 entraîne, d'une manière générale, les mêmes effets. Cependant, avec le plasmide d1 1500 une légère inhibition du promoteur E1A de l'Ad2 est observée (p2 E1Acat, pVM 315).

Les produits de la région E1A de l'Ad3 stimulent faiblement leur propre promoteur (p3 E1Acat, pVM 261) ; par contre, ils sont capables d'inhiber le promoteur E1A de l'Ad2 (p2 E1Acat, pVM 315). Les mêmes résultats sont observés avec les plasmides exprimant un seul des produits majeurs de la région E1A de l'Ad3 ; mais en présence du produit de l'ARNm 13 S (pVM 335), l'inhibition est plus forte que celle observée avec le produit de l'ARNm 12 S (pVM 325) (Fig. 33).

Ces résultats semblent démontrer que :

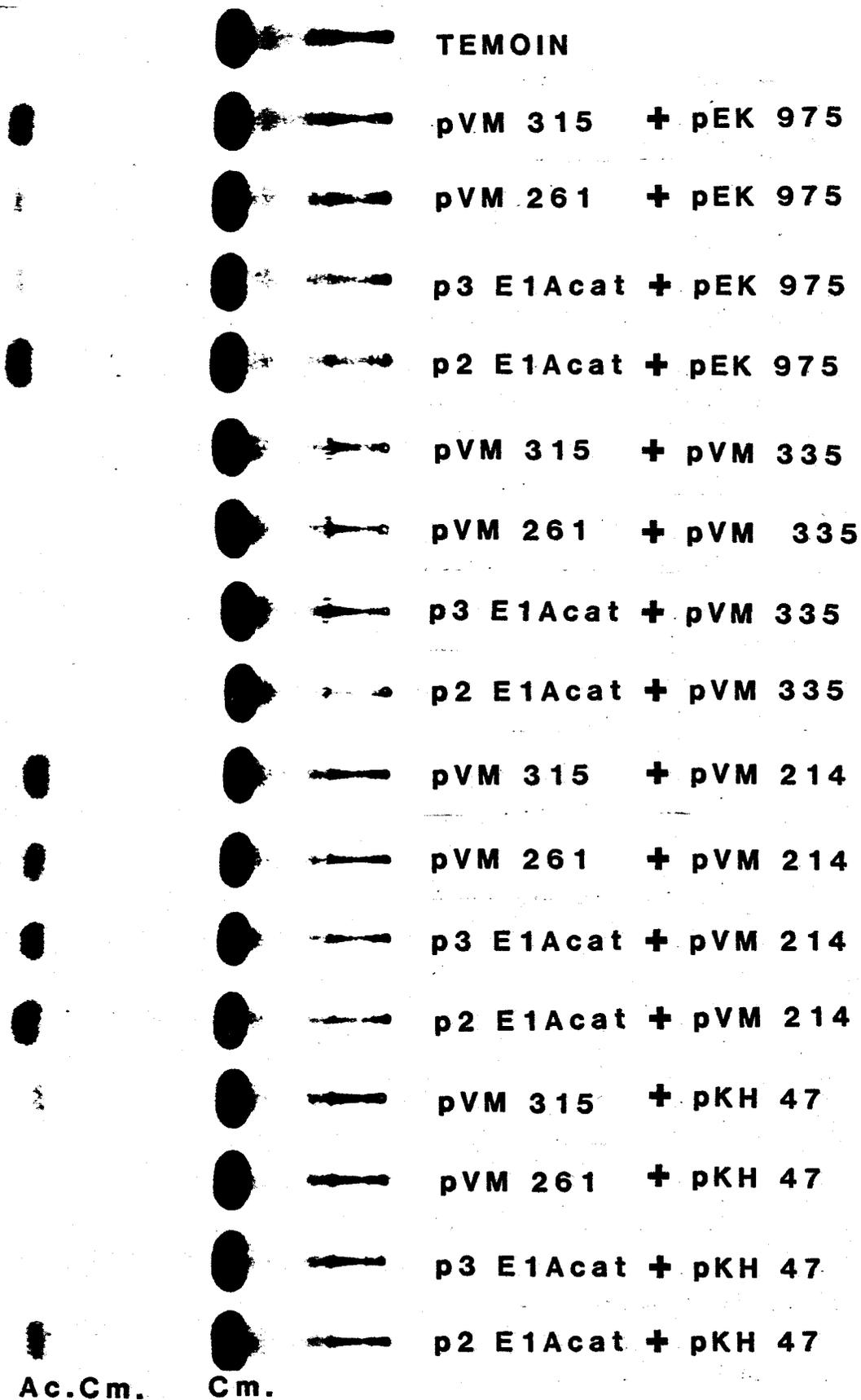
- les produits de la région E1A de l'Ad2 agissent positivement de façon directe ou indirecte sur la région située entre les sites PvuII et HindIII ;
- les produits de la région E1A de l'Ad3 agissent négativement, de façon directe ou indirecte, sur cette même région.

Dans la région comprise entre les sites PvuII et HindIII sont situés :

- le site PvuII, lui-même conservé entre les différents sérotypes d'Adénovirus,
- le motif "TATAA" spécifique à chacun des sérotypes,
- le site de coiffe,
- la séquence hautement conservée entre les différents sérotypes.

Figure 33 :

Détermination de l'activité CAT dans les cellules HeLa transfectées avec les plasmides contenant le gène cat sous le contrôle du promoteur E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3.



1.1.2- L'activité "NEO"

Le gène cat est remplacé par le gène néo du plasmide pSV2néo, après coupure des plasmides pSV2néo, p2 E1Acat et p3 E1Acat par les endonucléases de restriction HindIII et BamHI. Les nouveaux plasmides, dénommés p2 E1Anéo et p3 E1Anéo, ainsi que le pSV2néo, sont transfectés dans les cellules : HeLa, KB₈, KB₁₆ et KB₁₈. Vingt-quatre heures après la transfection les cellules sont divisées (1:2), et au milieu de culture, sont alors ajoutés 0,40 mg/ml de généticine (G418). Le milieu des boîtes de cellules étant changé régulièrement les premiers clones de cellules résistantes apparaissent au bout de trois semaines. Les résultats sont représentés dans le Tableau 20.

Tableau 20 :

Cellules résistantes à la généticine après transfection des plasmides contenant le gène néo sous le contrôle du promoteur de la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad12.

Plasmides	Nombre de foyers par boîte de cellules ^(a)			
	Cellules HeLa	KB ₈	KB ₁₆	KB ₁₈
pSV2néo	192	250	180	250
p2 E1Anéo	2	140	4	2
p3 E1Anéo	1	91	2	1
p12 E1Anéo	2	ND	ND	ND

(a) Boîte de 10 cm Ø. Les résultats expriment une moyenne de 3 boîtes et de 3 expérimentations différentes

ND : non déterminé

L'expression du promoteur E1A, en l'absence des produits de la région E1A de l'Ad2 est pratiquement la même dans les plasmides p2 E1Anéo et p3 E1Anéo. Leur expression est beaucoup plus faible que celle du SV40 (pSV2néo).

En présence des produits de la région E1A de l'Ad5 (cellules KB₈), le nombre de foyers augmente considérablement. Ces résultats sont en accord avec les précédents (activité CAT) ; autrement dit, une régulation positive des produits de la région E1A sur son propre promoteur est mise en évidence. Par contre, pour les cellules exprimant constitutivement la région E1B de l'Ad5 (KB₁₆ et KB₁₈), une régulation négative sur le promoteur E1A est observée.

Le promoteur précoce de SV40 n'est pas régulé négativement par les produits des régions E1A et E1B de l'Ad5.

1.2- Les plasmides hybrides Ad2/Ad12

1.2.1- L'activité CAT

Le plasmide p12 E1Acat est construit à partir du plasmide p12E1A gracieusement fourni par le Dr. Pérricaudet. Comme précédemment, le site PvuII, situé à 13 nt du motif "TATAA" est utilisé pour la construction des plasmides hybrides.

Les plasmides p2 E1Acat (Ad2), pVM 291cat (Ad2/Ad12), p12 E1Acat (Ad12) et pVM 1210cat (Ad12/Ad2), sont cotransfectés dans les cellules HeLa avec les plasmides contenant la région E1A de l'Ad2 (pVM 214) ou de l'Ad12 (pVM 1201). Des extraits cellulaires sont obtenus 40 h après cotransfection et l'activité CAT est mesurée. Les résultats sont représentés dans le Tableau suivant :

Tableau 21 :

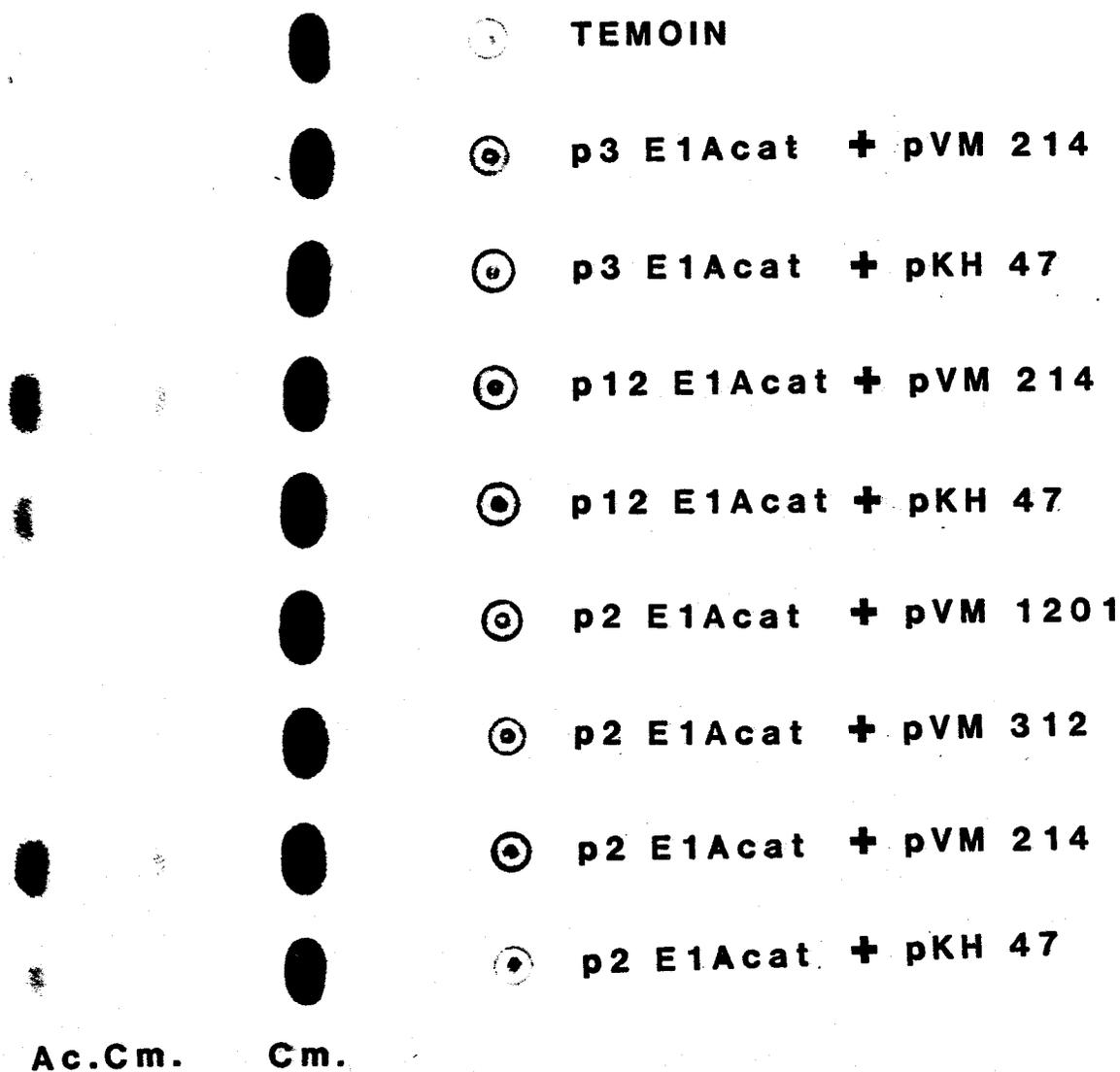
Activité CAT des cellules HeLa transfectées par les plasmides contenant le promoteur de la région E1A des adénovirus type 2 et type 12.

	pKH 47	pVM 214	pVM 1201
p2 E1Acat	1,00	2,26	0,43
pVM 291cat	0,95	2,10	1,60
p12 E1Acat	0,84	2,00	1,29
pVM 1210cat	0,82	1,39	0,42

Les activités CAT de base des plasmides sont semblables. Par ailleurs, les produits de la région E1A de l'Ad2 stimulent les promoteurs E1A de l'Ad2 et de l'Ad12. Par contre, les produits de la région E1A de l'Ad12 inhibent le promoteur E1A de l'Ad2 (p2 E1Acat, pVM 1210cat) et stimulent faiblement leur propre promoteur (p12 E1Acat, pVM 291cat) (Fig. 34).

Figure 34 :

Détermination de l'activité CAT dans les cellules HeLa transfectées avec les plasmides contenant le gène cat sous le contrôle du promoteur E1A de l'Ad2, 3 ou 12.



Comme pour l'Ad3, les produits de la région E1A de l'Ad12 régulent négativement le promoteur E1A de l'Ad2. Cette régulation négative semble influencer sur une séquence comprise entre les sites PvuII et HindIII du promoteur E1A de l'Ad2.

1.2.2- L'activité "NEO"

Le gène cat du plasmide p12 E1Acat est remplacé par le gène néo du plasmide pSV2néo et les foyers résistants à la généticine sont sélectionnés.

Les résultats représentés dans le Tableau 20 confirment que l'activité du promoteur E1A de l'Ad12 est similaire à celle du promoteur E1A de l'Ad2.

2- La transformation des cellules BRK (annexe 3)

Les adénovirus appartenant au sous-groupe C transforment plus efficacement les cellules BRK que ceux appartenant au sous-groupe A. Par contre, leur pouvoir oncogène chez le hamster nouveau-né est différent : les adénovirus du sous-groupe A sont fortement oncogènes, ceux du sous-groupe C ne le sont pas (Tableau 2).

Jusqu'à présent, cette différence a été attribuée au premier exon commun aux ARNm 12 S et 13 S de la région E1A (Jochemsen et al., 1984). Pour étudier le rôle des séquences "enhancers" dans le processus de transformation cellulaire, des plasmides hybrides entre l'Ad5 et l'Ad12 ont été construits. Pour cela le site de l'endonucléase PvuII, situé à 13 nt du motif "TATAA" a été utilisé. L'hybride pVM 1205 (Ad12/Ad5) code pour les produits de la région E1A de l'Ad5 et l'hybride pVM 1212 (Ad5/Ad12) code pour les produits de la région E1A de l'Ad12. La totalité (pVM 701) ou une partie de la région E1B (pVM 592), ainsi que le gène Ha-ras, ont été utilisés pour permettre une transformation cellulaire totale.

Les cellules BRK sont mises en culture après traitement à la trypsine de reins de rat âgés de 4 jours. Dès que le tapis cellulaire est à 80 % de confluence, les cellules sont cotransfectées avec les plasmides : pVM 214, pVM 217, pVM 1201, pVM 1205 ou pVM 1212, avec pVM 592, pVM 701 ou gène Ha-ras.

Au bout d'une quinzaine de jours, le milieu de culture MEM, changé deux fois par semaine, est remplacé par un milieu dépourvu d'ions Ca^{++} . Les premiers foyers de cellules transformées apparaissent environ un mois après la transfection. Les résultats de la transformation cellulaire figurent dans le Tableau 22.

Tableau 22 :

Transformation de cellules BRK par la région E1A de l'Ad5 ou de l'Ad12 en présence de la région E1B de l'Ad2 ou du gène Ha-ras.

Plasmides	pKH 47	gène Ha- <u>ras</u>	pVM 592	pVM 701
pKH	ND	2 ^(a)	3	1
pVM 214	50	90	29	39
pVM 217	60	ND	ND	ND
pVM 1201	0	4	5	5
pVM 1205	ND	2	9	2
pVM 1212	0	75	27	36

(a) : nombre de foyers. Ils représentent la moyenne de deux transformations (sur 20×10^6 cellules) lors de deux expérimentations différentes.

ND : non déterminé

Les plasmides contenant seulement la région E1A (pVM 1201, pVM 1212) ne sont pas capables de transformer les cellules BRK ; par contre, celui contenant les régions E1A + E1B (pVM 217) a cette capacité. Les plasmides pVM 1201 (E1A de l'Ad12) et pVM 1212 (hybride Ad5/Ad12) soit en présence du gène Ha-ras, soit en présence de la région E1B de l'Ad2, produisent à peu près le même nombre de foyers. Le plasmide pVM 1205 (hybride Ad12/Ad5) produit une quantité de foyers beaucoup plus importante, aussi bien avec le gène Ha-ras qu'avec la région E1B de l'Ad2. Ces résultats indiquent que la région

située en amont du site PvuII du promoteur E1A ne possède pas de différence fonctionnelle dans le processus de transformation cellulaire. Sont responsables pour l'activité transformante plus forte de l'Ad5 par rapport à l'Ad2 :

- a) soit la région à partir du site PvuII ;
- b) soit les produits de la région E1A de l'Ad5 ;
- c) soit l'ensemble des deux.

3- Le rôle des différentes séquences "enhancers" (annexe 3)

Les résultats publiés sur les éléments "enhancers" de la région E1A des adénovirus type 2 et 5 (Hearing and Shenk, 1983a, Hen et al., 1983 ; Imperiale et al., 1983), sont contradictoires. Comme nous l'avons précisé précédemment, l'organisation de la zone non codante de la région E1A est très différente entre les adénovirus de sérotype 2, 3 et 12. Cependant, les résultats obtenus jusqu'à maintenant (cf. II et III), lorsque cette "zone" est échangée d'un sérotype à l'autre, semblent démontrer que même avec une telle différence, elle ne joue pas un rôle très important pour l'activité du promoteur E1A.

Pour étudier le rôle de certaines séquences existant dans la "zone" non codante de la région E1A, celle-ci a été modifiée et clonée en amont du gène cat ou du gène néo.

3.1- L'activité CAT

Les plasmides pVM 268 et pVM 293 sont dérivés du p2 E1Acat. Le pVM 268 ne possède ni l'ITR, ni l'élément "enhancer A" ; le pVM 293 est délété de la première séquence de l'élément "enhancer B". Le pVM 334 est un hybride Ad2/Ad3 auquel l'ITR et l'élément "enhancer A" du p2 E1Acat sont placés en amont de son homologue du p3 E1Acat. Le pVM 341 contient une séquence de 70 pb en amont de l'élément "enhancer A" du p3 E1Acat. Cette séquence est située à l'intérieur de la partie codante de la région E1A de l'Ad3 et possède une homologie avec l'élément "enhancer A" (Fig. 32B). Les résultats de l'activité CAT sont décrits dans le Tableau 23.

Tableau 23 :

Activité CAT des cellules HeLa cotransfectées : le rôle des différents éléments enhancers.

	pKH 47	pVM 214	<u>pEK</u> 975	pVM 312	pVM 335	pVM 1201
p2 E1Acat	1,00	2,34	2,44	0,47	0,40	0,40
pVM 268	0,47	1,03	0,99	0,24	0,23	0,21
pVM 293	0,64	1,92	ND	0,32	ND	0,32
p3 E1Acat	0,47	2,20	1,20	0,70	0,70	0,98
pVM 334	0,47	2,12	0,94	0,37	0,33	ND
pVM 341	0,23	0,69	0,32	0,37	0,26	ND

ND : non déterminée

L'activité CAT des plasmides pVM 268 et pVM 293 est plus faible que celle du p2 E1Acat. Ces deux séquences délétées semblent donc être importantes pour l'activité du promoteur E1A de l'Ad2. L'élément "enhancer A" placé en amont du promoteur E1A de l'Ad3 (pVM 334) n'augmente pas l'activité CAT par rapport au p3 E1Acat. La séquence issue de la partie codante de la région E1A de l'Ad3, également placée en amont de ce promoteur, réduit l'activité CAT de moitié (Fig. 35 et 36).

Les produits de la région E1A de l'Ad2 (pVM 214) stimulent les promoteurs E1A de l'Ad2 et de l'Ad3. Le produit de l'ARNm 13S de l'Ad2 (pEK 975) stimule ces mêmes promoteurs à un taux identique. Par contre, les produits de la région E1A de l'Ad3 (pVM 312) ou le seul produit de l'ARNm 13 S (pVM 335) inhibe(nt) le promoteur E1A de l'Ad2 et stimule(nt) faiblement leur propre promoteur.

La cotransfection du plasmide pVM 334 avec ceux exprimant les produits de la région E1A de l'Ad3 (pVM 312, pVM 335) donne une activité CAT plus faible. D'autre part, les produits de la région E1A de l'Ad12 (pVM 1201) stimulent le promoteur E1A natif de l'Ad3 (p3 E1Acat) mais inhibent le promoteur E1A de l'Ad2 (p2 E1Acat, pVM 268, pVM 293).

Les résultats obtenus semblent montrer qu'un ou plusieurs mécanismes de régulation complexe(s) ont lieu également en dehors des séquences "enhancers".

Figure 35 :

Détermination de l'activité CAT dans les cellules HeLa transfectées avec les plasmides contenant le gène cat sous le contrôle du promoteur modifié de la région E1A de l'Ad2.

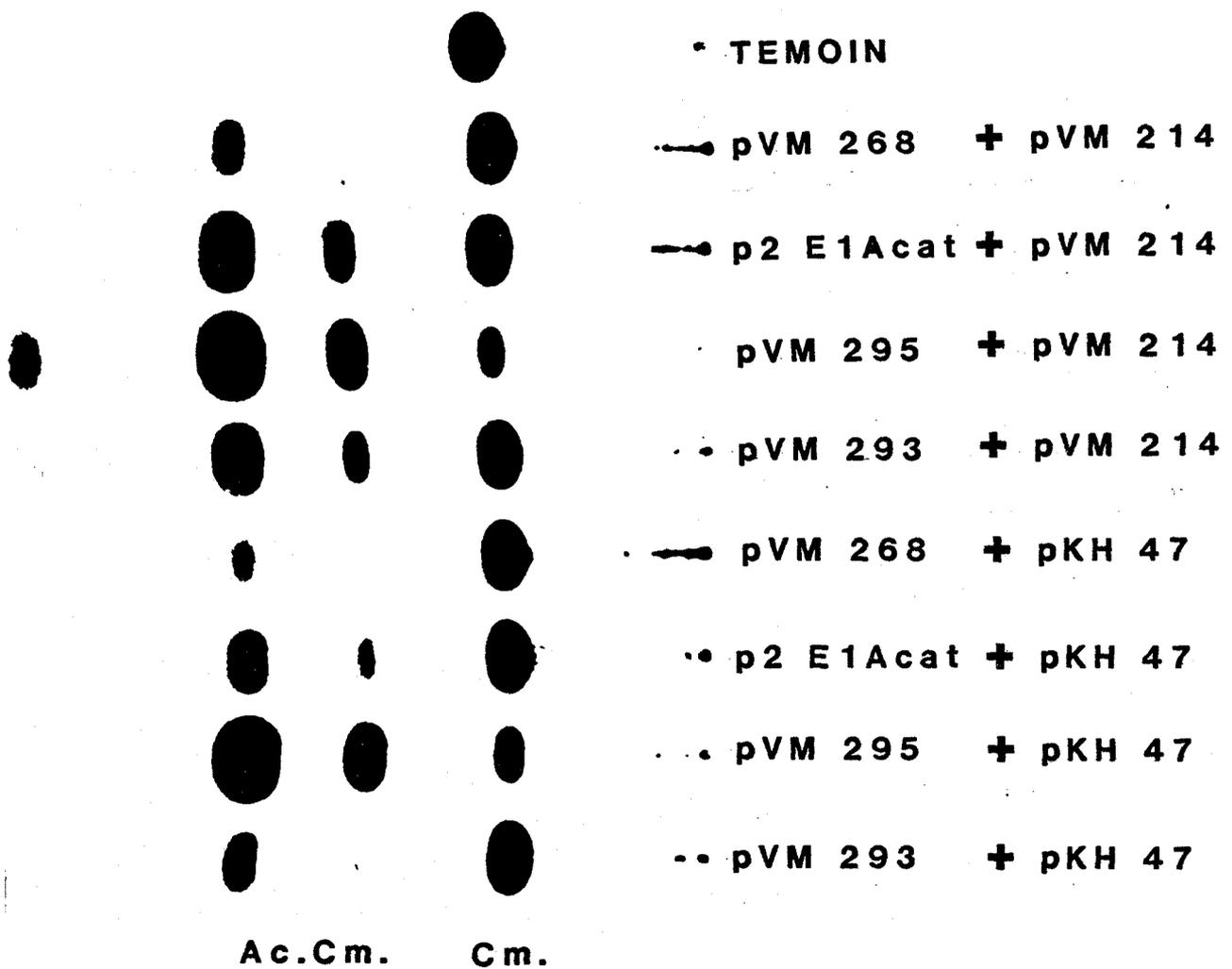
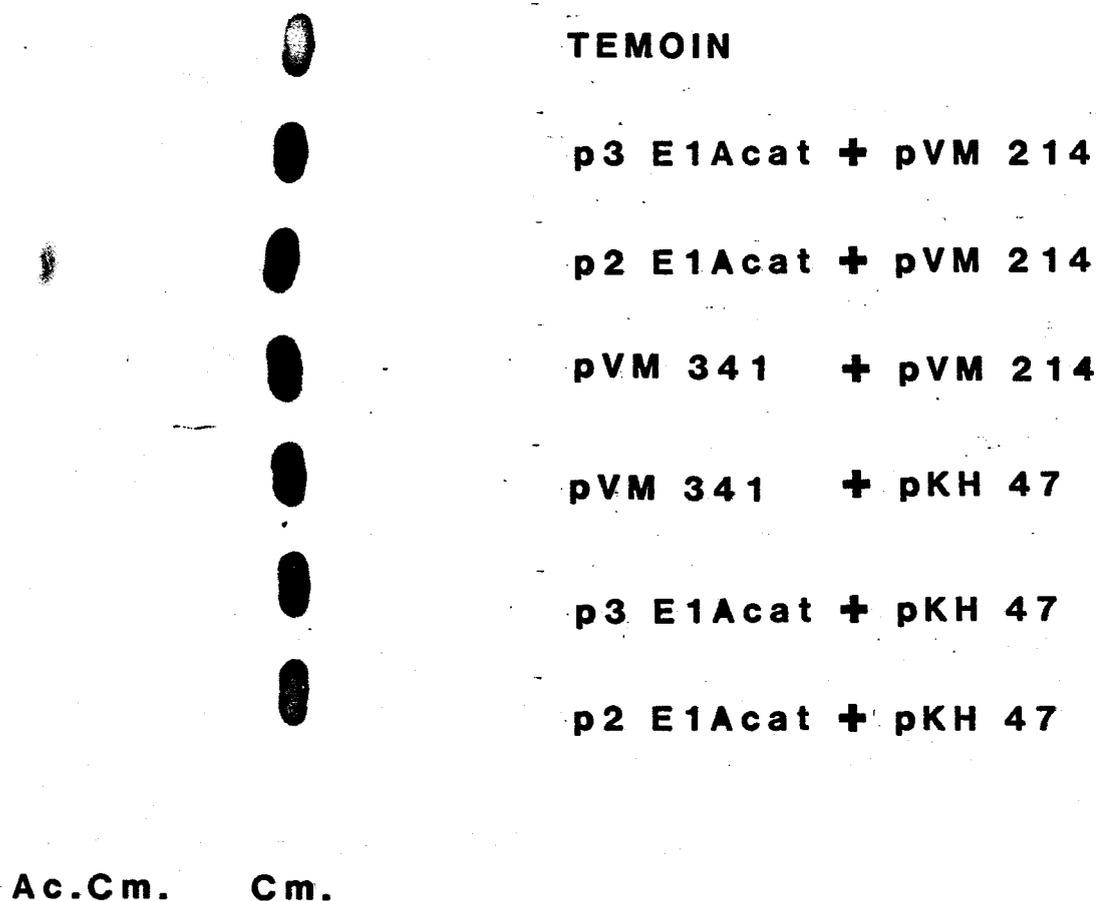


Figure 36 :

Détermination de l'activité CAT dans les cellules HeLa transfectées avec les plasmides contenant le gène cat sous le contrôle du promoteur E1A de l'Ad2 ou sous celui du promoteur modifié de la région E1A de l'Ad3.



3.2- L'activité "NEO"

Pour déterminer le rôle du promoteur natif ou délété E1A de l'Ad2 quand il est intégré dans le génome cellulaire, le gène cat est remplacé par le gène néo. Les nouveaux plasmides (pVM 268néo, pVM 293néo) sont transfectés dans les cellules HeLa. Le Tableau 24 présente les résultats de ces transfections.

Tableau 24 :

Cellules résistantes à la généticine après transfection des plasmides contenant le gène néo sous le contrôle des promoteurs de la région E1A de l'Ad2.

Plasmides	Cellules	Nombre de foyers par boîte de cellules HeLa ^(a)
pSV2néo		192
p2 E1Anéo		2
pVM 268néo		29
PVM 293néo		24

(a) : nombre de foyers. Représentant la moyenne de deux transfections (sur 20×10^6 cellules) lors de deux expérimentations différentes.

Les plasmides possédant des délétions, soit de l'élément "enhancer A" (pVM 268néo), soit de la première séquence de l'élément "enhancer B" (pVM 293néo), produisent plus de foyers que le plasmide non modifié (p2 E1Anéo). Ceci peut signifier que ces deux séquences, lorsqu'elles sont intégrées au génome cellulaire, induisent une régulation négative.

4- La distance entre les deux séquences de l'élément "enhancer B" (annexe 3)

La distance entre les deux séquences de l'élément "enhancer B" est différente selon le sérotype d'adénovirus (Ad2, Ad3, Ad12) (Tableau 25, Fig. 32).

Tableau 25 :

Distance entre les séquences de l'élément "enhancer B".

Séquences	Première séquence		Deuxième séquence		Distance	
	Dernière base	Localisation (a)	Première base	Localisation	Entre les éléments	Par rapport à la "TATA box" (b)
Ad2	A	-291	A	-203	88 pb	162 pb
Ad3	C	-292	A	-195	97 pb	163 pb
Ad12	G	-316	C	-197	119 pb	156 pb

(a) par rapport aux sites de coiffe (+1) :

Ad2 = nt 498

Ad3 = nt 510

Ad12 = nt 445

(b) dernière base de la deuxième séquence.

Bien qu'ayant des distances différentes, ces deux séquences n'interfèrent pas avec l'activité du promoteur E1A des différents sérotypes. Ceci a été démontré avec les plasmides hybrides Ad2/Ad3 et Ad2/Ad12. Pour vérifier l'importance de la distance entre ces séquences pour le promoteur E1A de l'Ad2, celle-ci est modifiée dans une série de plasmides. La comparaison des activités CAT n'a pu être réalisée qu'après délétion d'une séquence inhibitrice de la transcription ("poison") présente dans les plasmides pKH 47 et pBR 322. Les résultats sont décrits dans le Tableau 26.

Tableau 26 :

Rôle de la distance entre les deux séquences de l'élément "enhancer B".

	pKH 47	pVM 214	Rapport
p2 E1Acat	1,00	4,30	4,30
pVM 295	23,30	46,50	2,00
pVM 296	6,30	12,10	1,92
pVM 297	3,50	9,10	2,60
pVM 298	1,20	4,24	3,53

Les plasmides qui ne possèdent pas la séquence "poison" (pVM 295, pVM 296 et pVM 297) ont un taux d'activité nettement plus élevé que le p2 E1Acat et le pVM 298. Toutefois, les produits de la région E1A de l'Ad2 (pVM 214) stimulent plus le p2 E1Acat (rapport 4,30) et le pVM 298 (rapport 3,53) que ceux ayant une modification de la distance entre les deux séquences (pVM 296, rapport 1,92 et pVM 297, rapport 2,60). Pour ceux-ci, une relation inverse entre distance et taux d'activité est observée (Fig. 37).

Ces résultats semblent démontrer que la distance entre les deux séquences de l'élément "enhancer B" joue un rôle important dans l'activité du promoteur de la région E1A de l'Ad2.

5- La séquence "poison"

Le site de l'endonucléase BalI du pKH 47 (pBR 322) a été éliminé après une délétion SalI - NdeI. Ceci a permis de produire des modifications à l'intérieur du site BalI du gène E1A. Dans la séquence délétée du pKH 47, une séquence "poison" est présente (Lusky and Botchan, 1981 ; Peterson et al., 1987). L'activité du plasmide sans celle-ci (pVM 295) est 23 fois plus forte que celle du p2 E1Acat (Tableau 26). Le site "nick" a été éliminé suite à une délétion Tth1111-NdeI du pKH 47 (pVM 298). L'activité de ce plasmide est légèrement plus élevée que celle du p2 E1Acat (Tableau 26). Il est fort probable que la séquence "poison" soit située entre le site PvuII (2066 pb) et le site Tth1111 (2219 pb) (Fig. 38, 39 et 40).

Figure 37 :

Détermination de l'activité CAT dans les cellules HeLa transfectées avec les plasmides délétés de la séquence "poison", contenant le gène cat sous le contrôle du promoteur E1A de l'Ad2.

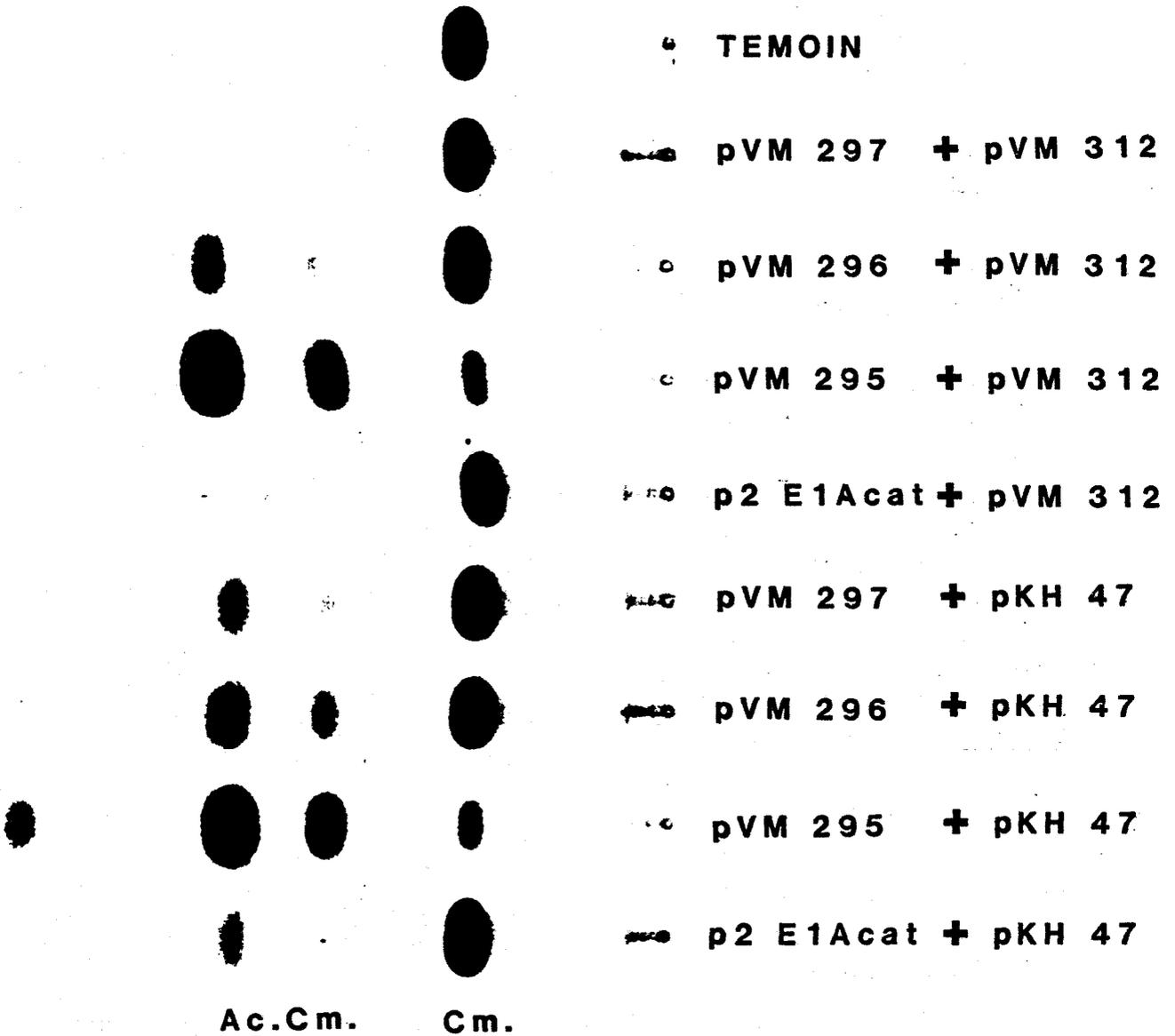


Figure 38 :

Partie de la séquence du plasmide pBR 322 contenant la séquence "poison" (d'après Balbas et al., 1986).

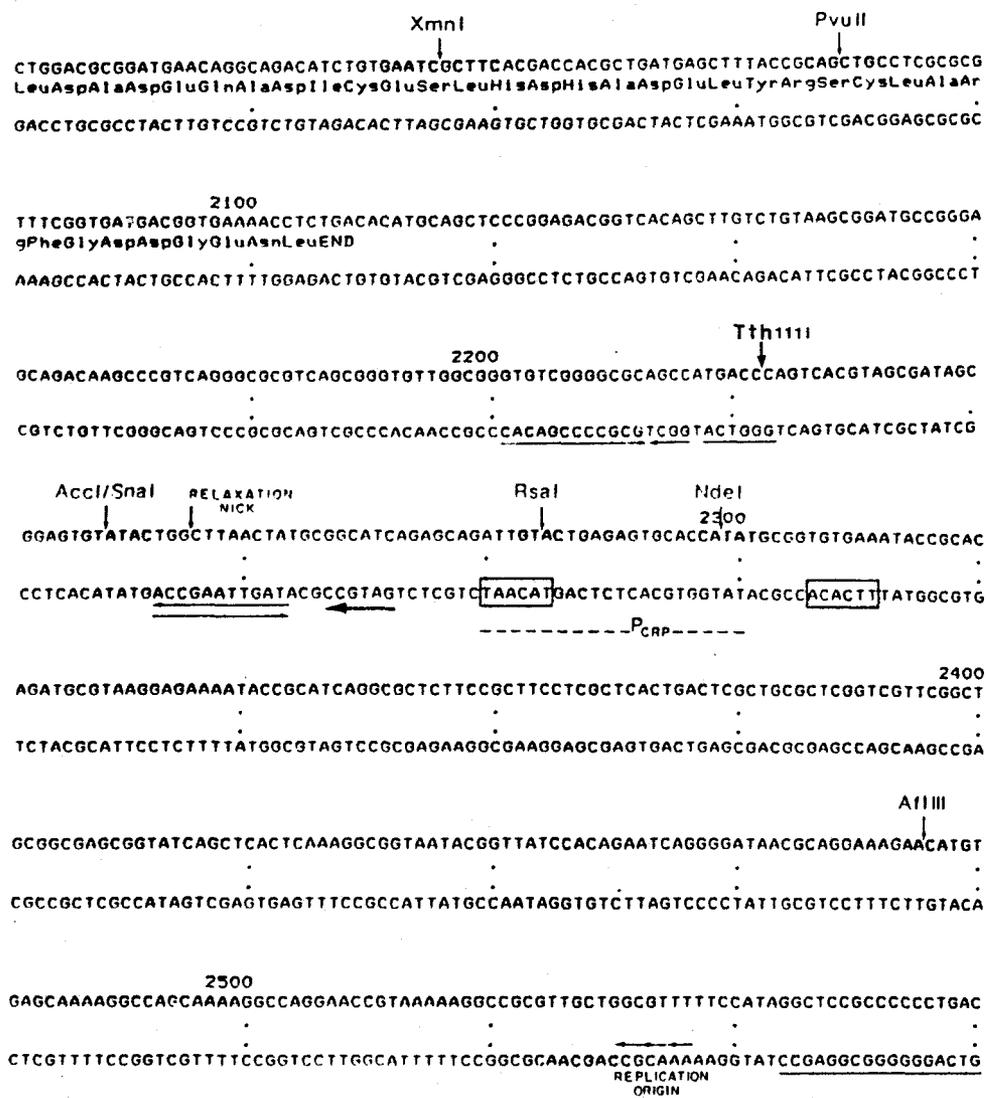


Figure 39 :

Séquence présente entre le site des endonucléases de restriction Tth111I et PvuII du pBR 322 et ayant une structure cruciforme potentielle.

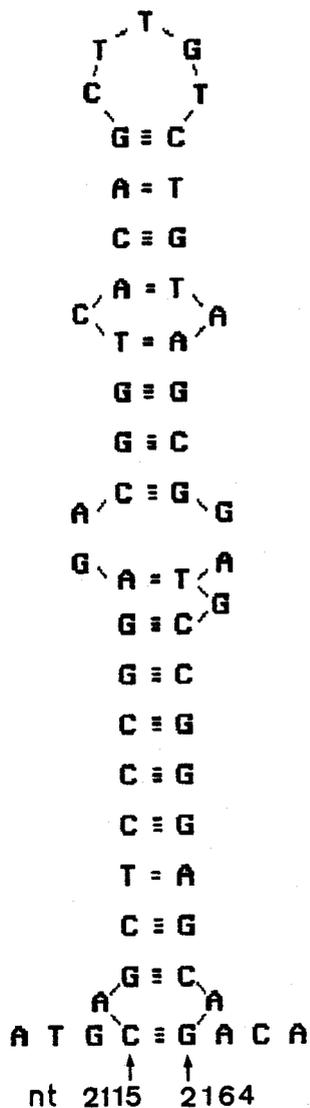


Figure 40 :

Carte de restriction du plasmide pBR 322 (d'après Balbas et al., 1986).

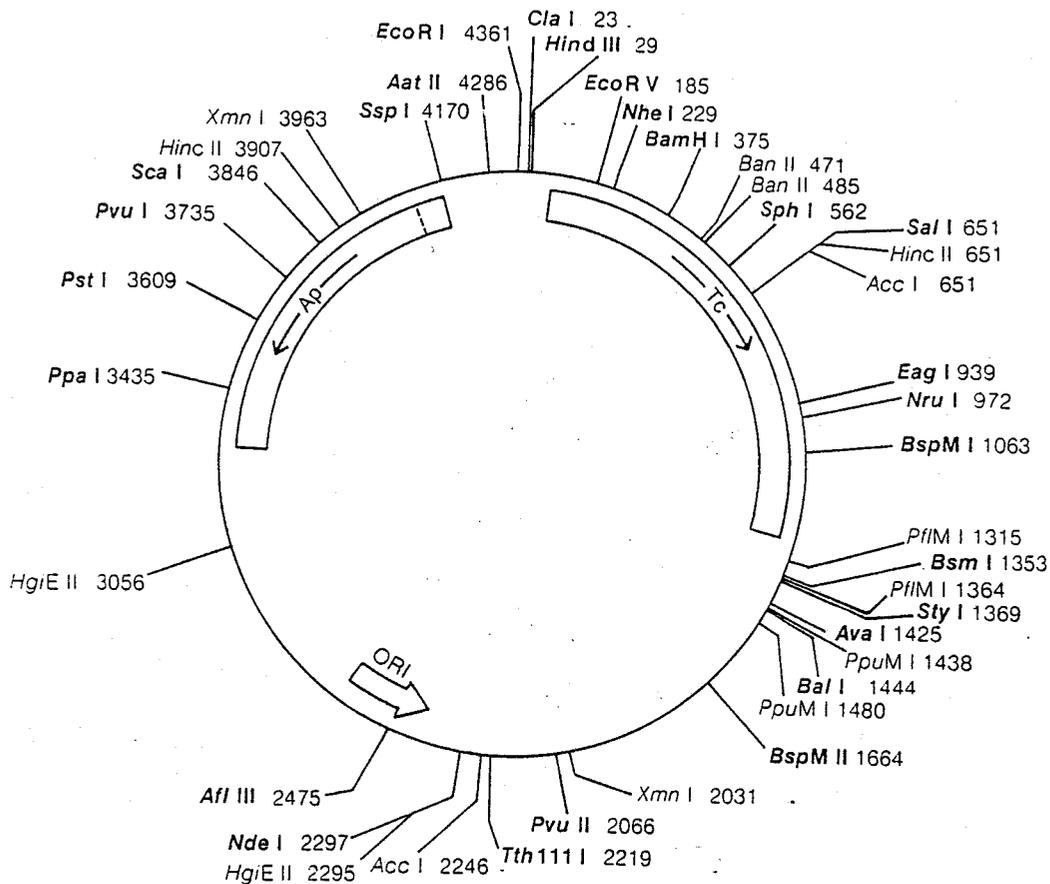


Figure 41 :

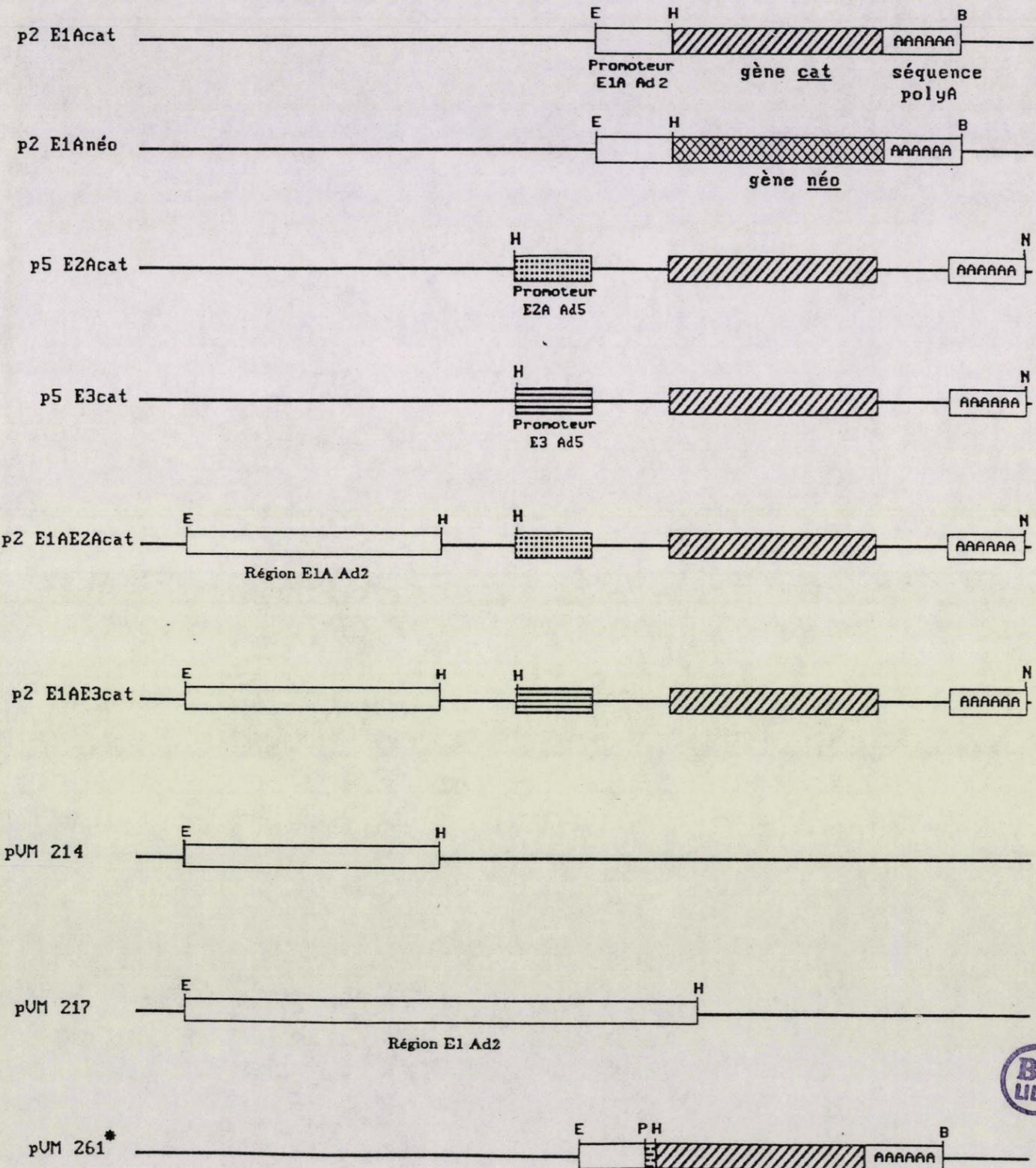
Plasmides construits et utilisés dans notre laboratoire.

A- Contenant des régions du génome de l'Ad2 et/ou de l'Ad5.

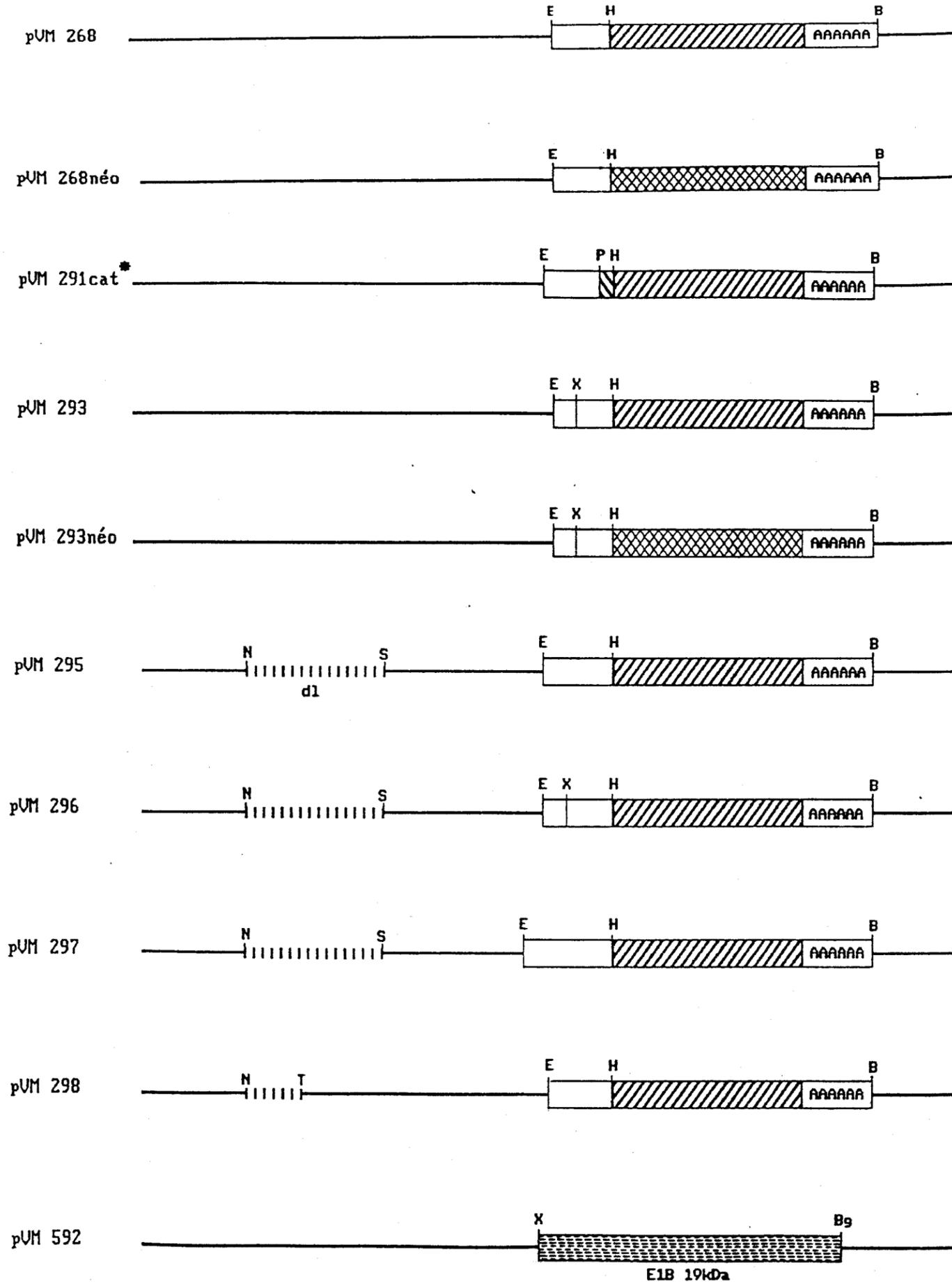
LEGENDE DE LA FIGURE 41

- B : BamHI
- Bg : BglII
- E : EcoRI
- H : HindIII
- P : PvuII
- M : MboI
- N : NdeI
- S : Sall
- Sp : SphI
- T : Tth111I
- X : XbaI

- dl : délétion
- * : plasmides hybrides



BU LILLE



LEGENDE DE LA FIGURE 41

B : BamHI

Bg : BglII

E : EcoRI

H : HindIII

P : PvuII

M : MboI

N : NdeI

S : Sall

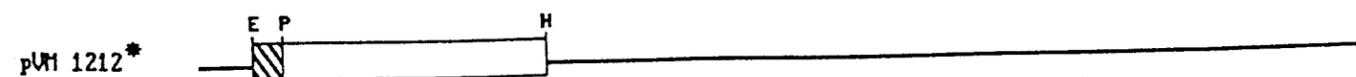
Sp : SphI

T : Tth111I

X : XbaI

dl : délétion

* : plasmides hybrides



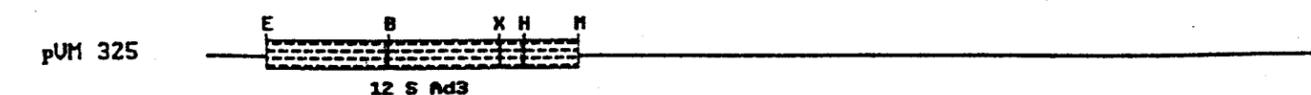
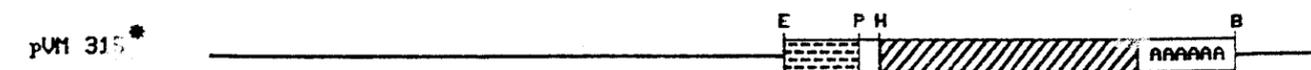
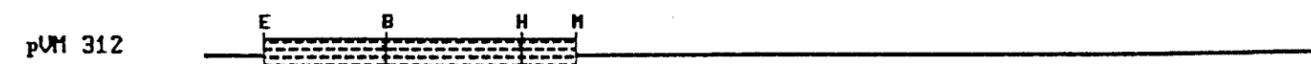
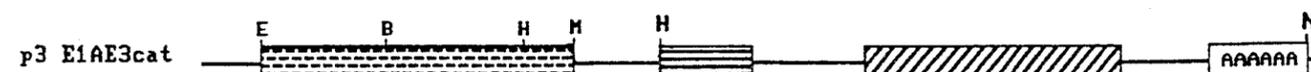
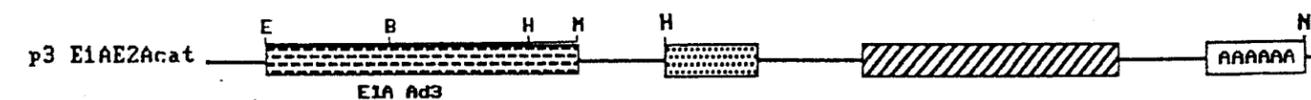
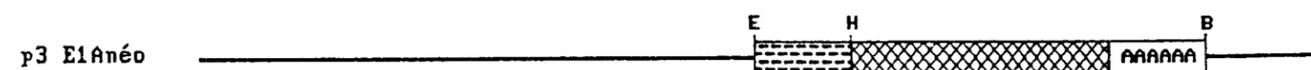
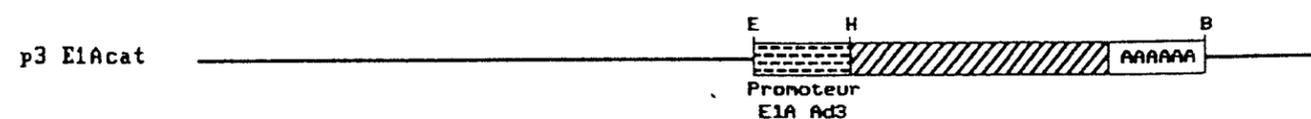
LEGENDE DE LA FIGURE 41

- B : BamHI
- Bg : BglII
- E : EcoRI
- H : HindIII
- P : PvuII
- M : MboI
- N : NdeI
- S : SalI
- Sp : SphI
- T : Tth1111
- X : XbaI

dl : délétion

* : plasmides hybrides

B- Contenant la région E1A de l'Ad3.



LEGENDE DE LA FIGURE 41

B : BamHI

Bg : BglII

E : EcoRI

H : HindIII

P : PvuII

M : MboI

N : NdeI

S : SalI

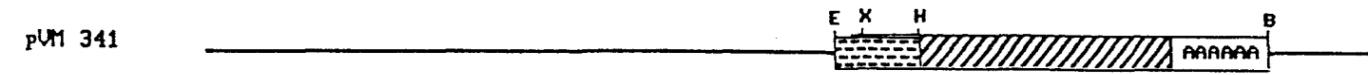
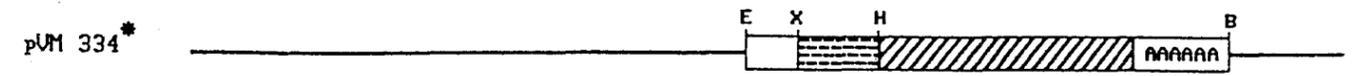
Sp : SphI

T : Tth1111

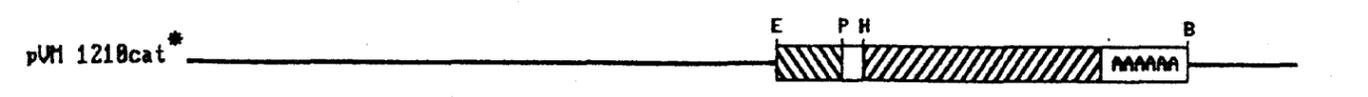
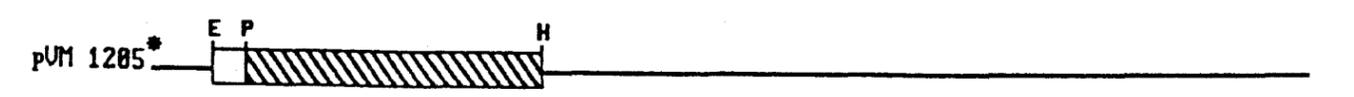
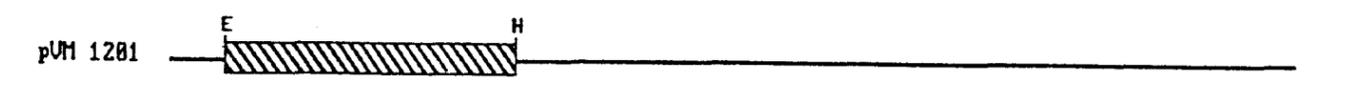
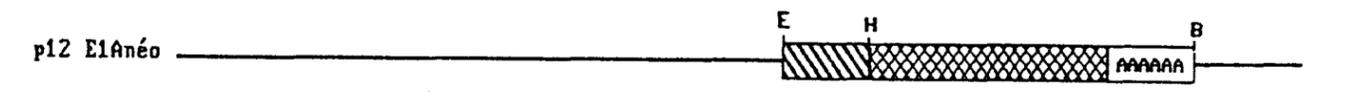
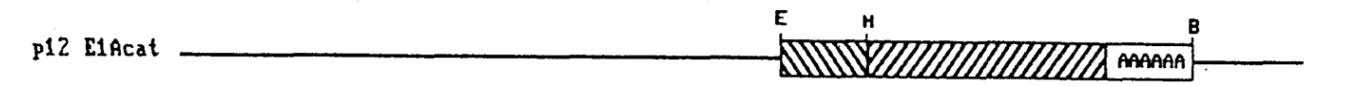
X : XbaI

dl : délétion

* : plasmides hybrides



C- Contenant la région E1A de l'Ad12.



D I S C U S S I O N

I- LA STIMULATION DES PROMOTEURS PRECOCES DES REGIONS E2A et E3 DE L'AD5

Les produits de la région E1A sont d'un grand intérêt non seulement comme modèle d'étude de régulation de la transcription, mais aussi parce qu'ils participent aux processus de transformation oncogénique par les adénovirus. La délétion de la région E1A de l'adénovirus (Ex. H5 dl 312) n'empêche pas la transcription des autres gènes précoces, mais celle-ci est très retardée. Ce retard peut être diminué par une augmentation de la quantité de particules infectieuses. La transcription du virus H5 dl 312 est plus rapide en cellules HeLa qu'en cellules 143-B ou WI-38. Les facteurs cellulaires doivent donc jouer un rôle dans l'expression des produits de la région E1A (revue par Berk, 1986a,b ; Flint, 1986 ; Nevins, 1987).

Aucune autre protéine virale n'est nécessaire à la transactivation des promoteurs précoces. Ces observations ont été faites grâce à l'utilisation de plasmides contenant les différentes parties du génome de l'adénovirus. Ceci a permis de démontrer que la région E1A était capable de stimuler non seulement les promoteurs précoces des adénovirus mais aussi des promoteurs hétérologues (cellulaires et viraux). La diversité des séquences présentes en amont de ces promoteurs indique que le mécanisme de transactivation est probablement indirect ; autrement dit, c'est un(des) facteur(s) cellulaire(s) stimulé(s) ou inhibé(s) par les produits de la région E1A qui vien(nen)t agir en se fixant sur des séquences spécifiques. Ferguson et al. (1985) ont démontré que les protéines de la région E1A de l'Ad2 n'avaient pas d'affinité pour l'ADN, cependant cette hypothèse est en désaccord avec les travaux récents de Ko et al. (1986), Chatterjee et al. (1988).

Le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les produits de la région E1A peu(ven)t transactiver les autres promoteurs est(sont) jusqu'à présent inconnu(s).

Nevins (1981) a utilisé les mutants H5 dl 312 et H5 hr 1 pour démontrer que les produits du gène E1A sont nécessaires à la transcription des autres régions précoces. L'absence des protéines (ou de leurs fonctions) de la région

E1A peut être complétée par l'infection de cellules (HeLa), avec ces mutants, en présence d'anisomycine, antibiotique qui bloque la synthèse protéique. Le rôle des produits de E1A est, par conséquent, l'inhibition de(s) facteur(s) cellulaire(s) de "régulation négative". Les produits de E1A pourraient agir directement en inhibant ce(s) facteur(s) cellulaire(s), ou indirectement sur le(s) gène(s) codant pour ce(s) facteur(s). Le traitement des cellules par l'anisomycine avant l'infection par ces mutants peut réduire la concentration de ce(s) facteur(s). Ainsi, même en l'absence d'une région E1A fonctionnelle, la transcription des autres gènes précoces peut se faire. En conclusion, Nevins propose que la cible d'action de ce(s) facteur(s) soit des éléments "enhancers" ou la "TATA box".

Kovesdi et al. (1986) ont proposé des mécanismes pour la transactivation : les produits de la région E1A vont agir pour modifier ou augmenter les facteurs cellulaires pré-existants, lesquels vont aller se fixer sur des séquences spécifiques (probablement les "enhancers").

L'étude du rôle des différents produits de la région E1A dans la transactivation des promoteurs précoces E2A et E3 est possible, soit par la transfection (ou cotransfection) de plasmides contenant la région E1A des Ad2 et Ad3, soit par l'infection de cellules par les différents sérotypes d'adénovirus appartenant à chaque sous-groupe.

Dans le Tableau 11 sont représentées les activités CAT sous le contrôle des promoteurs E2A et E3 de l'Ad5 en présence des différents sérotypes d'adénovirus. L'activité du promoteur E3 est supérieure à celle du promoteur E2A. Il est possible que le motif "TATAA" présent en amont du promoteur E3 et absent en amont du promoteur E2A soit responsable de cette différence.

Tous les sérotypes d'adénovirus sont capables de stimuler les promoteurs E2A et E3 de l'Ad5, mais le taux d'activation dépend de chaque sous-groupe (sérotipe). Le promoteur E2A est le plus stimulé par l'Ad3; par contre, ce même virus stimule plus faiblement le promoteur E3 que les autres sérotypes. Les mêmes résultats sont obtenus en faisant l'infection virale soit une heure avant la transfection soit cinq heures après.

La complémentation des fonctions de la région E1A entre les différents sous-groupes d'adénovirus a été décrite pour certaines combinaisons de sérotypes. Les mutants d'Ad2 ayant une délétion de la région E1 peuvent être complétés par l'Ad7 ou l'Ad12 dans les cellules KB et HEK-293 (Brusca and Chinnadurai, 1981). Certains mutants hr des régions E1A et E1B de l'Ad5 peuvent être complétés par l'Ad12 dans les cellules HeLa, mais non dans les cellules BHK-21 (Rowe and Graham, 1981). Williams et al. (1975) ont observé qu'un groupe de huit mutants ts de l'Ad5 est complété par co-infection avec l'Ad12 ; par contre, sept autres mutants ts ne le sont pas. Les mutants d'Ad3 (hr) dans la région E1A peuvent être complétés par l'Ad5 en cellules HeLa (Mc Dougall and Mautner, 1987).

La complémentation d'un virus déficient dans la région E1A par un autre non-déficient a comme conséquence une répllication de ce premier, ce qui démontre que la région E1A n'est pas indispensable mais suffisante à la transactivation des autres promoteurs précoces. De même, la région E1A d'un sérotype d'adénovirus peut compléter et activer un des autres promoteurs précoces d'un autre sérotype.

Les transfections des plasmides contenant la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3 dans les cellules HeLa ou HEK-293 (Tableau 12), montrent bien que cette région stimule les promoteurs précoces E2A et E3 de l'Ad5. Les produits de la région E1A de l'Ad2 stimulent plus fortement les promoteurs E2A et E3 que les produits de la région E1A de l'Ad3 (cellules HeLa). Ceci peut être dû à : (i) une coopération plus efficace entre les produits de la région E1A de l'Ad2 ; (ii) la différence de taille des protéines de E1A - 289 AA et 243 AA pour l'Ad2, 262 AA et 231 AA pour l'Ad3 ; (iii) la stimulation d'un promoteur homologue (même sous-groupe).

Ces résultats, comparés aux précédents, sont différents (Tableau 11). Dans le dernier cas, ce sont les produits de la région E1A de l'Ad2 qui stimulent plus que ceux de l'Ad3. Cependant, la stimulation du promoteur E3 par le pVM 312 (E1A de l'Ad3) est toujours la plus faible (cellule HeLa). Ceci peut être expliqué par : (i) une coopération possible des autres zones précoces du virus qui peuvent être plus actives pour l'Ad3 que pour l'Ad2 ; (ii) une

régulation négative entre les différentes régions du génome viral.

Dans le cas d'une répllication de l'ADN viral, Sarnow et al. (1984) ont observé une grande coopération entre les protéines de : 55 kDa (E1B) et 25 kDa (E4) pendant la transition de la phase précoce à la phase tardive du cycle viral. Ils ont également observé que les produits de la région E4 étaient nécessaires aux virus associés aux adénovirus pour leur répllication en cellules HeLa. Une coopération entre E4 et E1B pourra activer E1A (E1B --> E1A) et entraîner en conséquence une plus forte activation des autres régions précoces (Fig. 4). Pour une régulation négative, Blanton et Carter (1979), Nevins et Wrinkler (1980), ont mis en évidence que la 72 kDa (E2A) régulait négativement la transcription de la région E4.

La stimulation des promoteurs E2A et E3 par les régions E1A de l'Ad2 et de l'Ad3 placés en "cis" (p2/p3 E1AE2A/E3cat) est beaucoup plus importante avec l'Ad2 qu'avec l'Ad3 (cellules HeLa, Tableau 13, Fig. 29 et 30). Ceci peut être expliqué par : (i) la présence des éléments "enhancers" situés en amont du promoteur (Hearing and Shenk, 1983a ; Hen et al., 1983), il est possible que ces éléments soient plus efficaces chez l'Ad2 que chez l'Ad3 ; (ii) le taux de transcription des produits de la région E1A de l'Ad2 beaucoup plus important que ceux de l'Ad3 (résultats personnels non publiés) ; (iii) une régulation négative de la région E1B (Ex. 19 kDa) sur la région E1A moins importante chez l'Ad2 que chez l'Ad3 (D'Halluin et al., 1985 ; White et al., 1986).

On met donc en évidence deux types d'actions : en "cis" par les éléments "enhancers" et en "trans" par les produits du gène. Comme il est indiqué précédemment, les produits de la région E1A de l'Ad2 sont plus grands que ceux de l'Ad3. Un effet synergique des deux facteurs peut rendre cette activité plus efficace. Les activités CAT obtenues sont plus importantes pour les plasmides p2 E1AE2A/E3cat que celles obtenues par infection avec l'Ad2 (Tableau 11). Dans le cas de la transfection des plasmides contenant la région E1A de l'Ad3 et le promoteur E3 de l'Ad5 nous constatons une forte baisse de la

stimulation (cellules HeLa - Tableau 13). Le même résultat est observé avec l'infection virale (Tableau 11).

En comparant les Tableaux 12 et 13, les taux d'activation des promoteurs E2A et E3, par la région E1A de l'Ad3, sont similaires (activité en "trans" identique à celle "trans + cis" en cellules HeLa). Pour les cellules HEK-293, les taux d'activité CAT sont plus importants que ceux des cellules HeLa. Ceci confirme une transactivation plus importante par les produits de la région E1A de l'Ad5 (Ad2) par rapport à ceux de l'Ad3. Ces résultats sont plus évidents pour le promoteur E2A.

Pour vérifier et comparer le rôle individuel des produits de la région E1A de l'Ad2 et de l'Ad3, des plasmides contenant la partie codante pour chaque protéine ont été cotransfectés dans des cellules HeLa (Tableau 14). La protéine codée par l'ARNm 13 S de l'Ad2 (289R) stimule efficacement les promoteurs E2A et E3 de l'Ad5. Par contre la protéine codée par l'ARNm 12 S (243R) stimule seulement le promoteur E2A (Fig. 28). Pour le promoteur E3 le taux d'activité des produits, individuellement, est beaucoup plus faible que celui obtenu avec le plasmide codant pour les deux produits (pVM 214, Tableau 12). Un mécanisme de coopération entre ces deux produits semble donc exister pour la transactivation, sauf dans le cas du produit de l'ARNm 13 S de l'Ad2 sur le promoteur E2A.

Le mécanisme de coopération observé entre les deux produits majeurs de la région E1A de l'Ad2 pour la transactivation du promoteur E3 de l'Ad5 semble particulier. Le produit de l'ARNm 12 S ne stimule pas le promoteur E3 précédé d'un motif "TATAA"; par contre, le promoteur E2A ne le possède pas. Il est possible que la protéine de 243R n'agisse pas dès qu'un motif "TATAA" est présent.

Carlock et Jones (1981), Leff et al. (1984), Winberg et Shenk (1984), Ferguson et al. (1985) montrent que les deux produits majeurs de la région E1A de l'Ad2 (Ad5) sont capables de stimuler les promoteurs E2A et E3. Par contre,

Ricciardi et al. (1981), Bos et ten Wolde-Kraamwinkel (1983), Montell et al. (1984), Svensson et Akusjarvi (1984), ont trouvé que seul le produit de l'ARNm 13 S était capable de stimuler ces mêmes promoteurs.

Récemment, Schneider et al. (1987) ont démontré que les protéines de 289R et 243R de la région E1A de l'Ad5 pouvait transactiver le promoteur E2A. C'est le domaine 3 du premier exon, spécifique de l'ARNm 13 S, qui joue un rôle prépondérant dans ce phénomène. D'autre part, ils ont révélé l'importance des trois résidus du deuxième exon, communs aux ARNm 13 S et 12 S, dans la transactivation. Lillie et al. (1987) ont aussi prouvé le rôle fondamental du domaine 3 dans ce processus. Pour cela, ils ont synthétisé des polypeptides spécifiques aux domaines 1, 2 et 3 (les trois résidus du deuxième exon compris), puis les ont transfectés dans les cellules HeLa infectées par H5 dl 312. Seul le polypeptide spécifique du domaine 3 est capable de transactiver le virus délété. Ils ont conclu enfin que la protéine de 289R était la principale responsable de la transactivation mais celle de 243R peut l'être également par un mécanisme différent. En effet, le plasmide 150-1 construit par Kuppuswamy et Chinnadurai (1987) ayant une mutation dans le domaine 3 (Pro, Gly, His --> Pro, Glu, Phe, Arg) a été capable de transactiver le promoteur E2A au même taux que le plasmide du type sauvage.

Dans le domaine 3 existent des séquences homologues au motif de fixation de l'ADN, les "doigts de zinc", initialement identifiés comme étant le transactivateur TFIIIA. Le composant central des "doigts de zinc" est un site de fixation du métal, présent dans plusieurs métallo-enzymes, qui n'interagit pas avec l'ADN (Lillie et al., 1987).

Pour les produits des ARNm 13 S et 12 S de l'Ad3, nous observons une faible stimulation du promoteur E2A par les deux produits (Tableau 14). Cette stimulation est moins importante que celle produite par le plasmide pVM 312 (Tableau 12). L'existence d'un mécanisme de coopération positif (synergique) entre ces deux produits est donc possible. Par contre, pour le promoteur E3, il y a une inhibition. Elle est plus forte pour le produit de l'ARNm 13 S (262 AA) que pour celui du 12 S (231 AA).

Ces résultats sont apparemment contradictoires avec les précédents mais si nous analysons les Tableaux 12 et 13 nous observons que pour le promoteur E3 la présence des deux produits majeurs de la région E1A de l'Ad3 donnent une faible stimulation ainsi que l'infection avec le virus (Tableau 11). De plus, au Tableau 13 on observe que l'activité CAT du plasmide p3 E1AE3cat en cellules HEK-293 est plus importante que celle en cellules HeLa. Il est donc possible que ces deux produits agissent ensemble sur des facteurs cellulaires de régulation "négative" et "positive" et que la "résultante" soit une faible stimulation. Quand les produits de la région E1A de l'Ad5 (cellules HEK-293) sont présents, l'activité est augmentée. Cependant, quand ces produits agissent séparément, les facteurs cellulaires de régulation "négative" sont les plus stimulés (ou moins inhibés) et la "résultante" est négative. Il est possible que le motif "TATAA" soit la cible de ce(s) facteur(s).

Green et al. (1983) ont démontré que la transactivation du gène de la β -globine humaine par les produits de la région E1A de l'Ad5 nécessitait une séquence de 36 pb située en amont du site de coiffe dans laquelle le motif "TATAA" était présent. Ils ont aussi décelé que le promoteur de SV40 et du gène de la β -globine, dépourvus de leurs séquences "enhancers" mais ayant leur motif "TATAA", sont transactivés dans les cellules HEK-293.

Hearing et Shenk (1985) ont utilisé des adénovirus type 5 possédant des mutations dans la partie non codante de la région E1A. Ils observent que la "TATA box" est la seule séquence importante dans la transactivation de E1A. Wu et al. (1987) ont démontré que non seulement la "TATA box", mais aussi le site de fixation du facteur de transcription Sp1, étaient indispensables à la transactivation de la région E1B de l'Ad5.

II- LA TRANSDOMINANCE INTERSEROTYPIQUE

La majorité des cellules de singe ne sont pas permissives aux adénovirus humains. Ces cellules le deviennent quand elles sont co-infectées ou transformées par le SV40. Les cellules d'origine humaine, d'une manière générale, sont permissives aux adénovirus humains mais ne le sont pas aux adénovirus simiens. Les cellules HEK-293 sont permissives à tous les adénovirus humains, Ad40 et Ad41 inclus. Il est donc possible d'observer que les produits des régions précoces, E1A et E1B de l'Ad5, n'empêchent pas la réplication des autres sous-groupes. Par contre, la co-infection de deux adénovirus en cellules permissives peut produire l'inhibition de la réplication d'un des sérotypes. Sur ce point, les opinions divergent.

Des auteurs observent une interférence négative d'un sérotype sur l'autre; tandis que d'autres, dans certaines conditions expérimentales, ne constatent pas le même type d'interférence. Mak (1969) a observé que l'Ad12 inhibait la réplication de l'Ad2 en cellules KB ainsi que Rowe et Graham (1981) avec l'Ad5 en cellules HeLa. Brusca et Chinnadurai (1981) ont observé que l'Ad2 et l'Ad12 pouvaient se répliquer normalement en cellules HeLa et KB, co-infectées par les deux sérotypes. En analysant les résultats nous pouvons voir un taux plus faible d'ADN de l'Ad2. Certains mutants ts de l'Ad12 co-infectés avec l'Ad7 en cellules HEK ou infectant les cellules de singe transformées par un hybride Ad7-SV40, peuvent être complémentés; cependant, ils ne le sont pas par le SV40 (Shiroki et al., 1976).

Delsert et D'Halluin (1984) ont analysé la réplication dans les cellules humaines (HeLa, KB, HEK-293) et simiennes (Vero, CV-1, LLC-MK2) des virus suivants : (a) des adénovirus humains appartenant à chaque sous-groupe ; (b) du SV40 ; (c) du virus AD2ND1. Ils ont observé que les Ad3 et Ad31 ne répliquaient pas leur ADN en cellules CV-1 ; les Ad2, Ad9 et Ad4, quant à eux, peuvent le répliquer. Les Ad3 et Ad31 inhibent la réplication des virus SV40 et Ad2ND1 en cellules de singe, ainsi que l'Ad2 en cellules HeLa et KB.

Delsert (1985) a observé que, dans le cas de la co-infection Ad2-Ad3, le taux de transcription des ARNm des régions E1A et E2A était très faible. En présence de cycloheximide (25 µg/ml), l'inhibition des régions E1A et E2A est nettement réduite. En infectant les cellules HEK-293 par l'Ad2, suivie d'une infection par l'Ad3, il a pu observer la synthèse de la base du penton et de la fibre de l'Ad2. Il en a conclu que le phénomène de transdominance était associé aux protéines de la phase précoce du cycle viral.

Tibbetts et al. (1986), ont observé une inhibition de la réplication de l'Ad2 par l'Ad3 dans les cellules A-549, ainsi qu'un retard de l'expression des ARNm précoces de l'adénovirus en cellules HEK-293. Delsert (1985) a aussi observé qu'en infectant les cellules HeLa par l'Ad2 et 24 h après par l'Ad3, celui-ci ne pouvait plus se répliquer. Récemment, Mc Dougall et Mautner (1987) ont isolé un variant spontané de l'Ad3 (Ad3 var 100); celui-ci possède des délétions dans la région E1A et E3, et ne se réplique que dans les cellules transformées par l'adénovirus (HEK-293, KB₈, KB₁₆). En co-infectant les cellules HeLa et HEK-293 avec l'Ad3 var 100 et l'Ad5, ils ont observé que le premier répliquait normalement son ADN mais que le taux de synthèse de celui de l'Ad5 était fortement diminué. En co-infectant les mêmes cellules soit avec l'Ad3 var 100 et l'Ad5, soit avec l'Ad3 et l'Ad5, ils ont observé que l'Ad3 ne pouvait pas compléter l'Ad3 var 100 en cellules HeLa et HEK-293. L'Ad3 inhibe la réplication du variant ; par contre, il n'inhibe pas la réplication de l'Ad5 en cellules HeLa ou HEK-293.

Les produits de la région E1A sont présents au cours du processus de transactivation et de "transrépression". Sont-ils impliqués dans le phénomène de transdominance ? Si oui, où agissent-ils ?

Les cellules HeLa sont infectées par l'Ad2 ou l'Ad3, puis transfectées avec les plasmides p2 E1AE2Acat ou p2 E1AE3cat (ou vice-versa). Le Tableau 15 montre une nette inhibition de l'activité CAT des deux plasmides en présence de l'Ad3, soit une heure avant, soit une heure après la transfection. Par contre, une stimulation est observée avec l'Ad2. La cinétique démontre bien que la transdominance est un phénomène lié au stade précoce viral et peut être dû à un mécanisme de compétition entre les produits de la région E1A des deux

sérotypes. Avec le plasmide p2 E1AE3cat l'inhibition est plus accentuée qu'avec le p2 E1AE2Acat, et l'activation (infection par l'Ad3 2 h --> 5 h après la transfection) est plus retardée. Des résultats similaires sont observés quand le plasmide contenant uniquement la région E1A de l'Ad2 (pVM 214) ou de l'Ad3 (pVM 312) est utilisé (Tableau 16).

Ces résultats semblent mettre en évidence des mécanismes d'action différents pour les produits de la région E1A des deux sérotypes : (i) les produits précoces de la région E1A de l'Ad3 (plasmides ou virus) sont capables de stimuler les promoteurs précoces E2A et E3 de l'Ad5 quand ils sont ensemble mais inhibent le promoteur E3 quand ils sont exprimés séparément ; (ii) les produits de la région E1A de l'Ad2 stimulent plus fortement les promoteurs E2A et E3 de l'Ad5 quand ils sont ensemble et surtout la protéine de 289R (ARNm 13 S) quand ils sont exprimés séparément (Tableaux 16 et 17).

Le(s) mécanisme(s) de ce phénomène n'est(ne sont) pas connu(s). Il est possible que les produits de la région E1A de l'Ad3 entrent en compétition avec les produits de transcription de l'Ad2 pour les facteurs cellulaires de régulation "négative" et "positive" et, par conséquent, empêchent une régulation "positive" de la transcription.

Les rôles individuels des produits de la région E1A de l'Ad2 (Ad5) sont controversés; ceux de l'Ad3 ne sont pas encore connus. Il semble que l'organisation de la région E1A entre les différents sérotypes d'adénovirus pourrait être identique mais la taille des protéines majeures de cette région n'est pas la même. Entre les différents sérotypes d'adénovirus certains domaines sont hautement conservés (Kimelman et al., 1985). Plusieurs fonctions leur sont attribuées : (a) activation de la transcription ; (b) répression de la transcription ; (c) transformation cellulaire ; (d) induction de la synthèse de d'ADN (Lillie et al., 1987 ; Schneider et al., 1987) (Fig. 24).

Pour déterminer le rôle des produits individuels de la région E1A de l'Ad2 et de l'Ad3 dans le phénomène de transdominance, les plasmides pEK 975, dl 1500, pVM 335 et pVM 325 ont été cotransfectés avec les plasmides p2/p3 E1AE2A/E3cat dans des cellules HeLa (Tableau 17). Comme précédemment, la protéine de 289R (ARNm 13 S Ad2) active les promoteurs E2A et E3 de l'Ad5 en présence de la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3. Par contre, la protéine de

243R (ARNm 12 S Ad2) ne stimule que faiblement le promoteur E2A. Cependant le produit de l'ARNm 13 S de l'Ad3 (262R) inhibe la transcription des plasmides contenant la région E1A de l'Ad2 (p2 E1Acat, p2 E1AE2Acat) et encore plus fortement celle du plasmide contenant en plus le promoteur E3 (p2 E1AE3cat). La protéine de 262R n'agit pas négativement sur son propre promoteur E1A (p3 E1AE2Acat), mais elle inhibe le p3 E1AE3cat ; il existe donc une régulation négative sur le promoteur E3. Des résultats similaires sont obtenus avec le produit de l'ARNm 12 S (231R) mais l'inhibition est plus faible que celle de la protéine de 262R (Fig. 28, 29 et 30).

Le rôle des promoteurs de la région E1A de l'Ad2 et de l'Ad3 a été déterminé à l'aide des plasmides p2 E1Acat et p3 E1Acat. L'activité du promoteur E1A de l'Ad2 est plus forte que celle du promoteur E1A de l'Ad3 (Tableau 18, Fig. 33 et 34). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette activité : (i) la séquence "enhancer B" possède une homologie plus importante chez l'Ad2 que chez l'Ad3 ; (ii) chez l'Ad3 il existe une troisième séquence située entre les deux éléments de l'"enhancer B" et possédant une grande homologie avec eux (Fig. 32B). Elle pourrait intervenir négativement pour la fixation de(s) facteur(s) cellulaire(s) de régulation "positive" et il en résulterait une plus faible activité ; (iii) l'élément "enhancer A" a une faible homologie entre l'Ad2 et l'Ad3 ; (iv) les deux sites de reconnaissance du facteur nucléaire E2F (Kovesdi *et al.*, 1987) sont situés entre les deux éléments de l'"enhancer B" chez l'Ad2 mais un seulement est situé entre ces deux éléments chez l'Ad3 ; (v) la "TATA box" elle même peut jouer un rôle dans le mécanisme de fixation du complexe d'initiation de la transcription ; (vi) la séquence hautement conservée présente entre les différents sérotypes d'adénovirus (Fig. 14).

Tibbets *et al.* (1986) ont construit un plasmide contenant le promoteur E1A de l'Ad3, le premier triplet codant (jusqu'au nt 645) et le gène cat. En cotransfectant en cellules HeLa ce plasmide avec d'autres contenant la région E1A de l'Ad3 ou de l'Ad5, ils ont aussi observé une régulation positive, sur leur propre promoteur, plus importante par les produits de la région E1A de l'Ad5 par rapport à l'Ad3.

Larsen *et al.* (1986) ont isolé un variant de l'Ad3 déficient dans la région E1A (Ad3 hr 15). Il ne se multiplie pas dans les cellules A-549 et avec

beaucoup de difficulté en cellules HEK-293. En analysant la région E1A de ce variant, ils se sont aperçus qu'il possède en plus, au début du gène, le premier élément de l'"enhancer B". Ils ont conclu que cet élément "mal placé" était responsable du phénotype hr de ce variant ainsi que du faible taux de transcription des ARNm de la région E1A.

Pour déterminer le rôle individuel des produits de E1A de l'Ad3 par rapport à ceux de l'Ad2, dans le phénomène de transdominance sur le promoteur de la région E1A, les plasmides : pEK 975 (289R Ad2), dl 1500 (243R Ad2), pVM 335 (262R Ad3) et pVM 325 (231R Ad3) ont été cotransfectés dans des cellules HeLa avec les plasmides p2 E1Acat et p3 E1Acat (Tableau 18). Les deux produits de la région E1A de l'Ad3 régulent négativement le promoteur E1A de l'Ad2. Par contre, le produit de l'ARNm 13 S de l'Ad2 régule positivement le promoteur E1A de l'Ad2 et de l'Ad3 (Fig. 33).

Borrelli et al. (1984), Velcich et Ziff (1985) ont décrit une autorégulation pour les produits de la région E1A de l'Ad2 (Ad5) et ont associé ce mécanisme aux produits des ARNm 12 S et 13 S. Berk et al. (1979), Nevins (1981) ont démontré une régulation positive seulement pour les produits de la région E1A de l'Ad5 (Ad2). Hearing et Shenk (1985) ont décrit que la régulation de la région E1A de l'Ad5 était positive et que cette régulation était due au produit de l'ARNm 13 S. Nous avons observé une faible régulation négative due au produit de l'ARNm 12 S, contrairement à une régulation positive due au produit de l'ARNm 13 S de l'Ad2, sur son propre promoteur.

Les résultats obtenus démontrent que le phénomène de transdominance est associé aux promoteurs précoces E1A et E3. Le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les produits de la région E1A de l'Ad3 inhibe(nt) les promoteurs E1A et E3 des adénovirus du sous-groupe C n'est (ne sont) pas connu(s).

Borrelli et al. (1984) ont proposé que l'autorégulation de la région E1A se passe au niveau des séquences "enhancers" (principalement sur l'"enhancer A"). Soit les produits de la région E1A eux mêmes, soit des facteurs cellulaires de régulation négative viennent se fixer sur ces éléments. Hearing et Shenk

(1985) en utilisant des Ad5 ayant des mutations dans la région E1A ont observé que l'auto-régulation de la région E1A n'exigeait aucune séquence spécifique et ont conclu que seul le motif "TATAA" était indispensable à la transactivation. Nevins (1981) a proposé que le rôle des produits de la région E1A était de se complexer avec les facteurs cellulaires de régulation négative et que ceux-ci pouvaient agir sur des séquences cibles : "enhancers" ou "TATA box".

Il est possible que les produits de la région E1A de l'Ad3 en compétition avec ceux de l'Ad2, empêchent d'une certaine manière, la formation de ce complexe et, en conséquence, la fixation des facteurs de régulation négative sur une séquence spécifique, probablement le motif "TATAA" ou les "enhancers".

Pour déterminer la région du génome de l'Ad2 impliquée dans le phénomène de transdominance des plasmides hybrides Ad2/Ad3 ont été construits. Le plasmide hybride pVM 315 (Ad3/Ad2) possède un taux d'activité CAT similaire à celui du plasmide p2 E1Acat, lequel est plus élevé que celui des plasmides pVM 261 (Ad2/Ad3) et p3 E1Acat (Tableau 19, Fig. 33). Les produits de la région E1A de l'Ad2 stimulent tous les promoteurs, cependant les produits de la région E1A de l'Ad3 inhibent le p2 E1Acat et le pVM 315.

Deux délétions sont effectuées dans le p2 E1Acat : (a) la première de l'élément "enhancer A" (pVM 268); (b) la deuxième de la première séquence de l'"enhancer B" (pVM 293). Nous nous sommes aperçus que les produits de la région E1A de l'Ad3 inhibaient la transcription du promoteur E1A de l'Ad2. Par contre, les produits de la région E1A de l'Ad2 stimulent normalement leur propre promoteur (Tableau 23, Fig. 35). Ceci viendrait donc confirmer deux hypothèses : (a) les produits de la région E1A de l'Ad3 doivent jouer leur rôle entre le site PvuII et le "linker" HindIII (nt 538) de la région E1A de l'Ad2; (b) les produits de la région E1A de l'Ad3 n'agissent ni sur l'"enhancer A" ni sur la première séquence de l'"enhancer B".

Quatre éléments principaux sont situés entre les sites PvuII et HindIII :

- a) le site de l'endonucléase PvuII;
- b) le motif "TATAA";
- c) le site de coiffe;
- d) une séquence hautement conservée chez les adénovirus (Fig. 14).

Le site de coiffe est situé dans la séquence hautement conservée, il est identique entre les différents sérotypes. La séquence hautement conservée est composée de 52 nt et deux bases sont différentes entre l'Ad2 et l'Ad3. Le site PvuII a été modifié par l'insertion d'un "linker" XbaI. Le taux d'activité du nouveau plasmide baisse de 20 % par rapport au p2 E1Acat (résultats non montrés). Il est possible que le motif "TATAA" soit la cible d'action des facteurs de régulation "positive" et "négative". Les motifs "TATAA" de l'Ad2 - TATTTATA - et de l'Ad3 - TATTTAAA possèdent une différence (T <--> A); cette modification est-elle suffisante pour permettre la formation d'un complexe d'initiation (ARN-polymérase + motif "TATAA" + facteur nucléaire Sp1) plus stable ?

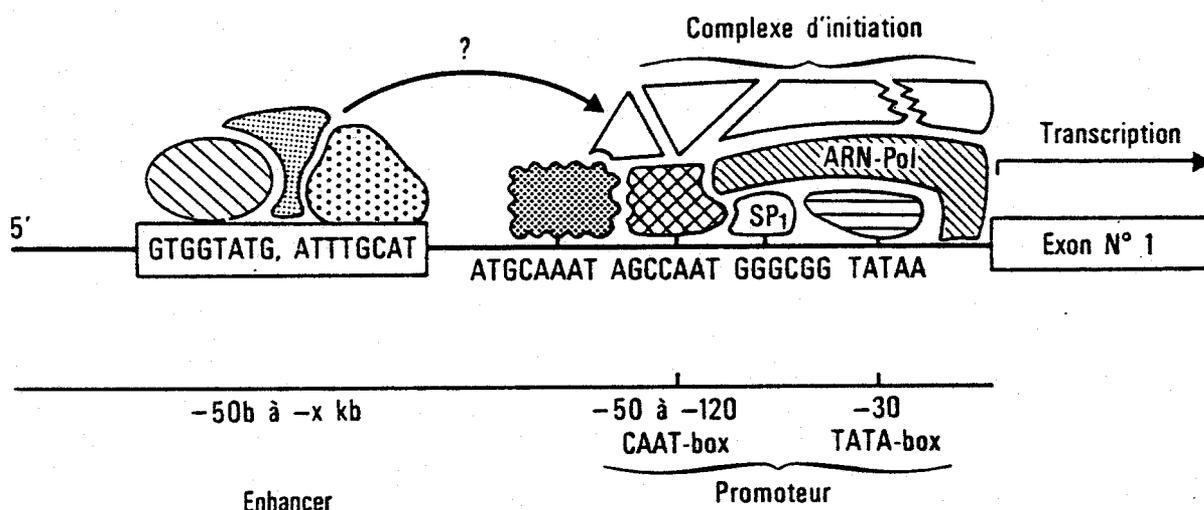
Des mutations ponctuelles dans la "TATA box" pourront aider à répondre à cette question.

Green et al. (1983) ont décelé que seulement les 36 pb, "TATA box" incluse, situées en amont du promoteur du gène de la β -globine humaine, étaient indispensables à sa transactivation en cellules HEK-293 ou en cellules cotransfectées avec des plasmides contenant le gène E1A de l'Ad5, la protéine précoce EIP4 du virus de l'herpès ou la protéine précoce du virus pseudorabis. Ils ont conclu que la "TATA box" était la seule séquence responsable de la transactivation. Hearing et Shenk (1985) ont démontré que la "TATA box" était le seul élément nécessaire à la transactivation du promoteur E1A de l'Ad5. Wu et al. (1987) ont prouvé que seuls la "TATA box" et le site de fixation du facteur nucléaire Sp1 étaient indispensables à la transactivation de la région E1B, par les produits de la région E1A.

En comparant la séquence hautement conservée présente chez les adénovirus et la séquence du promoteur du gène de la β -globine humaine, il n'existe pas d'homologie entre elles. A part la séquence TATA, la "TATA box" est variable entre les différents promoteurs cellulaires et viraux. Il est donc possible que ce soit vraiment la "TATA box" la séquence impliquée dans ces phénomènes.

Figure 42 :

Modèle hypothétique du démarrage de la transcription (d'après Kahn, 1987).



L'"enhancer" est situé à une distance très variable du site d'initiation, de quelques bases à plusieurs kilobases. Outre la "TATA box" (TATAA), la "CAAT box" (AGCCAAT), d'autres éléments fixant des facteurs transcriptionnels sont représentés : le facteur Sp1 se fixe sur une "GC box" (GGGCGG); le facteur NF-A reconnaît la séquence ATGCAAAT du promoteur et son inverse ATTTGCAT localisé au niveau de l'"enhancer". La séquence GTGGTATG de l'"enhancer" est un motif très fréquemment trouvé au niveau de ce type d'élément.

Imperiale et al. (1983) ont décrit l'existence d'un élément "enhancer" situé entre -188 nt et -45 nt chez l'Ad2. Ils ont observé que cette séquence était capable de stimuler le promoteur E2A de l'Ad5 (Ad2) dans les sens 3' --> 5' ou 5' --> 3'. En analysant cette séquence nous nous sommes aperçus de l'existence d'une séquence "TATA like" à chaque extrémité :

-188 ATAATT ----- TATTATTATA -50 (Fig. 32A).

Les deux séquences "TATA like" sont-elles responsables de cette activité "enhancer" ?

Osborne et al. (1982), Hen et al. (1983), Osborne et Berk (1983) ont démontré le démarrage de la transcription du promoteur de la région E1A de l'Ad2 (Ad5) en dehors du site principal de coiffe (transcrits mineurs). Une séquence "TATA-like" est toujours présente en amont de ces "nouveaux" sites de coiffe. La délétion de la "TATA box" diminue jusqu'à 10 fois la transcription des ARNm de la région E1A (Osborne et al., 1982).

Récemment, Nevins et collaborateurs (Nevins, 1987 ; Reichel et al., 1988) ont observé que la stimulation du facteur nucléaire E2F était due au produit de l'ARNm 13 S ; mais comme ce facteur interagit seulement avec le promoteur E2A ils proposent que la "TATA box" soit la cible principale dans le processus de transactivation des autres promoteurs précoces ainsi que celui de la hsp-70 kDa. Le promoteur E4 nécessitant une séquence en amont de la "TATA box", serait une exception (Gilardi and Pérricaudet, 1984).

Guarente (1988) propose la "TATA box" comme élément essentiel dans le processus de transactivation des gènes eucaryotes et de levure.

III- COMPARAISON DE LA PARTIE NON-CODANTE DE LA REGION E1A DES ADENOVIRUS TYPE 2, 3 ET 12

1- Le rôle des éléments "enhancers"

1.1- Dans la transactivation et la "transrépression"

Le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les protéines de la région E1A stimulent la transcription est(sont) d'un grand intérêt pour la compréhension générale du contrôle transcriptionnel de la cellule eucaryote. Si, de plus, des facteurs transcriptionnels cellulaires participent à cette induction, l'ensemble pourrait aider à élucider le(s) mécanisme(s) de régulation des gènes. Les produits de la région E1A participent au processus de transformation et peuvent ne pas stimuler certains gènes cellulaires endogènes (Kao and Nevins, 1983 ; Stein and Ziff, 1984). Ceci augmente l'intérêt d'étudier leurs fonctions. Enfin, les études démontrent la présence d'activité "E1A-like" dans certaines lignées cellulaires et, en particulier, celles originaires de tumeurs (Imperiale et al., 1984a ; Hen et al., 1985).

Des questions importantes se posent pour le contrôle de la transcription par les protéines de la région E1A. Si le(s) facteur(s) cellulaire(s) est(sont) préexistant(s), comment est(sont)-il(s) activé(s) ? Y-a-t-il simplement une augmentation de leur taux ou une modification conformationnelle, à l'origine de l'activation de la transcription ? Quel est le rôle des séquences "enhancers" dans la transactivation" ? Sont-elles les cibles de la "transrépression" dans le processus de transformation cellulaire ?

Dans le but de contribuer à trouver les réponses à ces questions, nous avons étudié le rôle de plusieurs éléments présents dans les parties codantes et non codantes du gène E1A de l'adénovirus.

Les trois séquences "enhancers" décrites par Hearing et Shenk (1983a) Hen et al. (1983) et Imperiale et al. (1983) sont motifs à contradictions entre

ces différents groupes. Hearing et Shenk (1983a,b) ont construit plusieurs mutants de l'Ad5, parmi ceux-ci l'un possède une délétion de l'élément "enhancer A" (Hen et al., 1983) et l'autre de l'élément "enhancer C" (Impériale et al., 1983). Le taux de transcription des ARNm de la région E1A des deux mutants est le même que celui du virus de type sauvage. Par contre, pour le mutant possédant une délétion entre -307 nt et -190 nt ("enhancer B") le taux de transcription baisse de 20 fois (Hearing and Shenk, 1983a). La délétion de séquences en amont de la "TATA box", n'affecte ni le taux de transcription ni la séquence des ARNm de la région E1A (Osborne et al., 1982). Une délétion entre le site Ball (-233 nt) et SacII (-147 nt), dans la région E1A, baisse le taux de transcription du MLP de seulement trois fois, tandis qu'une délétion entre -343 nt et - 320 nt diminue le taux de 60 fois (Hen et al., 1983).

Ces résultats discordants peuvent être dus à la différence de méthodologie utilisée. Hearing et Shenk (1983a,b), Osborne et al. (1982) ont utilisé du virus et Hen et al. (1983), Imperiale et al. (1983) des plasmides.

Des plasmides hybrides entre l'Ad2/Ad3 et l'Ad2/Ad12, ainsi que d'autres ayant des délétions ou des insertions de séquences "enhancers", ont été construits pour étudier le rôle de ces différentes séquences entre les divers sérotypes d'adénovirus.

L'activité du promoteur E1A de l'Ad2 est similaire à celle de l'Ad12 (Fig. 34). Par contre, elle est plus importante que l'activité de l'Ad3 (Tableaux 19 et 21). Ceci pourrait être dû à une organisation différente de leur promoteur E1A : (a) il existe une séquence similaire à l'élément "enhancer B" chez l'Ad3 ; (b) l'élément "enhancer A" est situé entre les deux séquences de l'élément "enhancer B" chez l'Ad12 ; (c) l'homologie de séquences pour les éléments "enhancer A et B" est plus importante entre l'Ad2 et l'Ad12 (Fig. 32).

Les plasmides hybrides pVM 261 et pVM 315 possèdent respectivement, les séquences en amont du site de l'endonucléase PvuII de l'Ad2 et de l'Ad3 ; et les séquences situées entre PvuII et HindIII de l'Ad3 et de l'Ad2. Les hybrides pVM 291cat et pVM 1210cat ont été construits de la même façon mais

à partir des Ad2 et Ad12. L'activité CAT des plasmides pVM 315, pVM 291cat et pVM 1210cat est la même que celle des p2 E1Acat et p12 E1Acat. Par contre, elle est plus élevée que celle des plasmides p3 E1Acat et pVM 261 (Tableaux 19 et 21).

Il semble que les positions des séquences, les unes par rapport aux autres, situées en amont du site PvuII ne soient pas importantes pour l'activité du promoteur E1A, mais il faut qu'elles soient présentes. Par exemple, l'activité des plasmides pVM 268cat et pVM 293cat est plus faible que celle du p2 E1Acat (Tableau 23). Il n'y a pas non plus de spécificité de type pour ces séquences, par rapport aux différents sérotypes d'adénovirus.

Hearing et Shenk (1986) ont décrit deux domaines principaux dans l'élément "enhancer B" (Fig. 18). Le domaine I est responsable de l'activité du promoteur E1A et le domaine II de celle des autres promoteurs précoces (E1B, E2A, E3 et E4). Kovesdi et al. (1987) ont trouvé deux séquences de reconnaissance pour le facteur nucléaire E2F. Elles sont situées dans le domaine II de la région E1A de l'Ad2 et sont présentes seulement en amont des promoteurs E1A et E2A (Kovesdi et al., 1987). Elles sont absentes dans la région E1A de l'Ad12 et disposées de façon différente pour l'Ad3, par rapport à l'Ad2 (Fig. 32). Il y a donc discordance entre le rôle attribué au domaine II de l'élément "enhancer B" et la transactivation due au facteur E2F. Le facteur nucléaire E4F1 (Lee and Green, 1987) reconnaît une séquence dans le domaine II de la région E1A. Cette séquence est aussi présente en amont des promoteurs E2A, E3 et E4 de l'Ad5 (Ad2) (Lee and Green, 1987). Par contre, elle est absente de la région E1A de l'Ad3 et de l'Ad12 (Fig. 32).

Gilardi et Perricaudet (1986) ont observé la présence d'une séquence en amont du promoteur de la région E4 de l'Ad2, laquelle a été aussi localisée en amont des promoteurs E1A et E3. Elle est située dans l'élément "enhancer A" de l'Ad2 et de l'Ad12, mais en dehors de celui-ci pour l'Ad3 (Fig. 32). Barrett et al. (1987) ont décrit un facteur nucléaire qui reconnaît le "core" de l'élément "enhancer A" présent chez l'Ad2, l'Ad3 et l'Ad12.

La distance entre les deux séquences de l'élément "enhancer B" est la même entre l'Ad2 et l'Ad3, mais différente pour l'Ad12 (Tableau 25).

Il est extrêmement difficile d'expliquer pourquoi de telles différences ne produisent aucune modification du taux d'expression du promoteur de la région E1A, alors que ces éléments sont interchangeés. Comme le taux d'activité CAT des plasmides pVM 268 (délétion de l'"enhancer A") et pVM 293 (délétion partielle de l'"enhancer B") est plus faible que le taux du p2 E1Acat (Tableau 23), ceci démontre bien que ces deux éléments sont importants pour l'activité du promoteur de la région E1A de l'Ad2.

L'Ad3 (sous-groupe B) et l'Ad12 (sous-groupe A) inhibent l'Ad2 dans les cellules HeLa et KB₃ (Delsert and D'Halluin, 1984). Ces résultats sont confirmés quand on regarde le taux d'activité des plasmides p2 E1Acat, p3 E1Acat et p12 E1Acat en présence des produits de la région E1A de l'Ad3 (pVM 312) et de l'Ad12 (pVM 1201) (Tableaux 19 et 21). Les plasmides hybrides pVM 315 et pVM 291cat sont activés par les produits de la région E1A de l'Ad2 et "réprimés" pour ceux de l'Ad3 et de l'Ad12 (Tableaux 19 et 21). Des résultats similaires sont obtenus avec les plasmides pVM 268 et pVM 293 (Tableau 23). Ces résultats suggèrent que : les mécanismes de transactivation et de "transrépression" se passent en dehors des éléments "enhancers A" et de la partie déléetée de l'élément "enhancer B".

Le plasmide pVM 334 possède en amont de son promoteur l'élément "enhancer A" de l'Ad2. Une séquence ayant une homologie avec l'"enhancer A" est présente à l'intérieur de la partie codante de la région E1A de l'Ad3 et de l'Ad12, elle a été clonée en amont de cet "enhancer" (pVM 341). Ces séquences ne leur confèrent pas une augmentation du taux de transcription et pour le pVM 341 le taux est égal à la moitié de celui du p3 E1Acat (Tableau 23, Fig. 36). Les produits de la région E1A de l'Ad2 stimulent le pVM 334, tandis que ceux de l'Ad3 l'inhibent légèrement (Tableau 23). Cependant, les plasmides pVM 261, pVM 291cat et pVM 341 ne sont pas inhibés (Tableaux 19, 21 et 23).

La différence fondamentale entre les plasmides pVM 334 et pVM 341 est que le premier possède deux éléments "enhancer A" : celui de l'Ad2 et celui de l'Ad3 ; le deuxième possède un élément "enhancer potentiel" homologue à l'élément "enhancer A". Ceci peut signifier que : l'activité n'est pas une

fonction directe du taux d'homologie entre les différentes séquences. Hen et al. (1983) en décrivant cet élément ont observé une particularité : une action unidirectionnelle (5' --> 3'). Normalement, les séquences "enhancers" agissent de façon bidirectionnelle (Moreau et al., 1981 ; Fromm and Berg, 1983).

L'ensemble des résultats montrent que les séquences "enhancers" ne semblent pas être des cibles pour les facteurs de régulation négative. La transactivation et la "transrépression" agissent sur la séquence entre le site de l'endonucléase PvuII et le premier codon d'initiation de la traduction, de la région E1A. Il est possible que cette cible soit la séquence "TATA box".

L'organisation du promoteur E1A des adénovirus sérotypes 2, 3 et 12 est assez complexe et différente, mais cette différence ne semble pas jouer un rôle fondamental pour l'activité du promoteur.

Une organisation correcte, le nombre et la distance entre les sites de liaison pour le(s) facteur(s) de transcription doivent être nécessaires pour une activité "maximale" des promoteurs. Pour tester cette hypothèse, la distance entre les deux séquences de l'élément "enhancer B" de l'Ad2 a été modifiée (pVM 295, pVM 296 et pVM 297).

Les résultats montrent qu'au fur et à mesure que la distance augmente entre ces deux séquences, le taux d'activité du promoteur ainsi que le taux de transactivation, par les produits de la région E1A de l'Ad2 sur celui-ci, baissent (Tableau 26). La distance entre ces séquences est donc très importante pour l'activité du promoteur E1A.

Comment expliquer que la distance entre ces deux séquences, identique chez l'Ad2 et l'Ad3, est beaucoup plus grande chez l'Ad12, et que par contre, l'activité des plasmides p2 E1Acat et p12 E1Acat est la même et plus élevée que celle du p3 E1Acat ?

Il est possible que cette organisation particulière à chaque sérotype ne soit pas importante pour l'activité du promoteur (plasmides hybrides pVM 261, pVM 291cat, pVM 315 et pVM 1210cat). Par contre, pour un même sérotype, si elle est modifiée, l'activité du promoteur l'est également (pVM 295, pVM 296 et pVM 297) (Fig. 37).

Une hypothèse permet d'expliquer l'ensemble de ces résultats : différents facteurs nucléaires reconnaissent une organisation particulière à chaque promoteur E1A.

De récents travaux effectués par d'autres groupes viennent soutenir cette proposition :

(a) la séquence reconnue par le facteur E2F (Kovesdi et al., 1987) a une localisation différente pour l'Ad2 et l'Ad3; elle est absente pour l'Ad12 (Fig. 32); (b) la séquence reconnue par le facteur E4F1 (Lee and Green, 1987) est présente chez l'Ad2 mais absente chez l'Ad3 et l'Ad12 (Fig. 32); (c) Reichel et al. (1988) ont établi que l'activation par les produits de la région E1A du facteur E2F, présent en faible quantité dans les cellules HeLa non infectées par l'adénovirus, avait pour effet une augmentation du taux de ce facteur qui vient reconnaître exclusivement la séquence en amont des promoteurs E1A et E2A.

Pour comparer la transcription du promoteur E1A des adénovirus des sous-groupes A, B, et C, intégré au génome cellulaire, le gène néo a été substitué au gène cat. L'activité des promoteurs E1A des trois sérotypes (p2 E1Anéo, p3 E1Anéo et p12 E1Anéo) dans les cellules HeLa est identique. Par contre, celle du promoteur du SV40 (pSV2néo) est beaucoup plus importante (Tableau 20). L'activité des promoteurs E1A de l'Ad2 et de l'Ad3 est fortement augmentée dans les cellules KB₈. Ces cellules expriment constitutivement les produits de la région E1A de l'Ad5 (Babiss et al., 1983). Ceci démontre bien une régulation positive par les produits de la région E1A de l'Ad5 (Ad2) sur leur propre promoteur ainsi que sur celui de l'Ad3. De plus, aucune régulation négative n'est observée, ni pour le promoteur de SV40, ni pour celui de E1A de l'Ad2, comme l'ont décrit Borrelli et al. (1984), Velcich et Ziff (1985). Cette différence peut être due à : (i) la structure du promoteur de SV40, intégré au génome cellulaire, (ii) la compétition entre de(s) facteur(s) cellulaire(s) pour les deux promoteurs, (iii) le changement de régulation transcriptionnelle des cellules KB transformées, par rapport aux cellules HeLa.

Treisman et al. (1983) ont démontré que la séquence "enhancer" du SV40 n'était pas inhibée dans les cellules HEK-293 et que cette séquence était même indispensable pour l'activation du gène de la β -globine de lapin dans ces cellules, mais non dans les cellules HeLa. Par contre, le gène de l' α -globine n'a pas besoin de cette séquence pour être activé dans les deux types de cellules.

En présence des produits de la région E1B (KB₁₆ et KB₁₈), le nombre de foyers est réduit au même niveau que celui des cellules HeLa pour les promoteurs des adénovirus mais non pour celui de SV40 (Tableau 20). Ceci suggère une régulation négative des produits de la région E1B sur le promoteur E1A. White et al. (1986) ont décrit que la protéine de 19 kDa (E1B) agissait comme un transinhibiteur du promoteur E1A, dans les cellules HeLa et WI-38.

Herrmann et al. (1987) en utilisant l'expression transitoire (gène cat) ont décelé que la protéine de 19 kDa (E1B) est capable de stimuler les promoteurs E1A, E1B, E3 et E4, ainsi que le promoteur de la protéine hsp-70 kDa.

Le nombre de foyers obtenu pour les plasmides pVM 268néo et pVM 293néo est plus important que pour le p2 E1Anéo (Tableau 24). Ceci peut être dû à : (i) la méthylation de l'ADN viral quand celui-ci est incorporé au génome cellulaire ; (ii) les éléments "enhancers A" et au moins une partie de l'"enhancer B" sont les cibles des facteurs de régulation négative, quand ils sont intégrés au génome cellulaire ; (iii) en l'absence de ces séquences, l'ADN viral pourrait s'intégrer dans une région du génome cellulaire ayant des séquences "enhancers" plus fortes.

Hen et al. (1983) ont établi l'existence d'une homologie de séquence importante entre le "core" de l'"enhancer A" et celui de SV40 (Tableau 9) ; et Hearing et Shenk (1983a) entre le core de l'"enhancer B" et celui du virus du polyome (Tableau 8). Sont-ils des cibles pour les facteurs de régulation négative ?

Des délétions dans les éléments "enhancers" de SV40 et du virus du polyome permettraient d'élucider cette question.

1.2- Dans le processus de transformation cellulaire

Seuls les adénovirus appartenant aux sous-groupes A et B sont capables de produire des tumeurs chez le hamster nouveau-né. Par contre, tous les adénovirus (sous-groupes A à F) sont potentiellement capables de

transformer les cellules primaires de mammifères. Les cellules transformées peuvent fréquemment produire des tumeurs chez les rongeurs, en particulier, s'ils sont immunodéprimés.

Il est convenu, pour la plupart des recherches sur la transformation que ce processus ressemble, du moins aux stades initiaux, à l'induction tumorale chez les animaux. Une observation vient appuyer cette hypothèse : les cellules prélevées des tumeurs viro-induites et établies en culture sont identiques aux cellules transformées en culture. Chez les adénovirus, le but principal de ces études est d'identifier les produits des gènes impliqués et de caractériser leurs fonctions biologiques et biochimiques (Branton et al., 1985a).

Les adénovirus sont largement répandus chez les humains et sont responsables de plusieurs maladies, parmi lesquelles : gastroentérites, infection des tractus respiratoires supérieur et inférieur, kératoconjunctivites (Tableau 3). Par contre, jusqu'à présent, les adénovirus n'ont pas été incriminés dans l'apparition de cancers humains. Bien que les adénovirus puissent transformer les cellules de rongeurs, la transformation oncogénique des cellules humaines en culture n'a jamais été obtenue avec ces virus, mais seulement avec des fragments, non infectieux, de l'ADN viral.

Les régions E1A et E1B sont impliquées dans le processus de transformation cellulaire. Quatre produits majeurs de ces régions : 289R et 243R pour E1A, 496R et 175R pour E1B, sont responsables de ce phénomène (Branton et al., 1985a ; Baker and Berk, 1987).

Lorsque la région E1A est seule, elle peut immortaliser des cellules et les transformer à l'aide d'un gène hétérologue (Ex. Ha-ras). Il est possible qu'elle soit le principal agent impliqué dans ce processus. L'Ad5 (Ad2) transforme plus efficacement les cellules BRK que l'Ad12. Les produits majeurs de la région E1A de chaque sérotype seraient responsables de cette différence. Ces protéines possèdent deux exons et, en construisant des plasmides hybrides entre l'Ad5 et l'Ad12 (Fig. 26), Jochemsen et al. (1984) ont déterminé que le premier exon de l'Ad5 était responsable de l'efficacité de la transformation.

Pour déterminer le rôle des séquences situées en amont du promoteur E1A des Ad5 et Ad12, dans le processus de transformation, des plasmides hybrides ont été construits en utilisant le site de l'endonucléase PvuII, situé en amont du

motif "TATAA". Le plasmide pVM 1212 code pour les produits de la région E1A de l'Ad12 et le pVM 1205 pour ceux de l'Ad5.

Le nombre de foyers obtenu avec le pVM 1205 et le pVM 214 (E1A de l'Ad2) est plus important que celui obtenu avec les plasmides pVM 1212 et pVM 1201 (E1A de l'Ad12) (Tableau 22). Ces résultats confirment ceux obtenus par Jochemsen et al. (1984) et montrent que les séquences situées en amont du promoteur des deux sérotypes, ne jouent pas un rôle fondamental pour la transformation cellulaire.

Les domaines 1 et 2 du premier exon (Fig. 24) ont été définis comme essentiels dans le processus de transformation cellulaire, malgré quelques résultats discordants quant au rôle de chaque domaine (Kuppuswamy and Chinnadurai, 1987 ; Lillie et al., 1987 ; Schneider et al., 1987). Le rôle des séquences situées entre le site PvuII (-13 nt de la "TATA box") et le site accepteur d'épissage n'est pas encore bien défini. Il est encore plus complexe d'expliquer le(s) mécanisme(s) utilisé(s) par les produits de la région E1A pour assurer leurs fonctions.

Subramanian et al. (1988) ont construit des mutants dans la partie N-terminale du premier exon de la région E1A de l'Ad5. Ils ont observé une forte baisse du pouvoir transformant et de l'induction de la synthèse de l'ADN cellulaire par ces mutants, par rapport au virus de type sauvage. Il est donc fort probable que non seulement les domaines 1, 2 et 3 (hautement conservés) mais aussi l'extrémité N-terminale (non conservée) soient importants dans ce processus.

Le produit de l'ARNm 13 S a, respectivement, 289R pour l'Ad2 (Ad5), 262R pour l'Ad3 et 266R pour l'Ad12. De même, le produit de l'ARNm 12 S possède 243R pour l'Ad2 (Ad5), 231R pour l'Ad3 et 235R pour l'Ad12. Il est possible que la différence de taille de ces deux protéines puisse être impliquée dans ce processus. Alors, comment agissent-ils ?

Le taux de transcription de l'ARNm 13 S est plus important que celui du 12 S. Les domaines 1 et 2 du premier exon sont associés plus directement à la transformation cellulaire, la "transrépression" et l'induction de la synthèse de l'ADN cellulaire. Le domaine 3 ainsi que les trois résidus du deuxième exon sont associés à la transactivation. Il est possible que : (i) la protéine de 289R

viennent activer les gènes responsables pour la transcription - facteurs de régulation positive ; (ii) la protéine de 243R vient réprimer les gènes d'auto-régulation de la cellule, et par conséquent, modifier la "machinerie cellulaire" - induction de la synthèse de l'ADN cellulaire.

Hen et al. (1985) et Lillie et al. (1986) ont proposé que les séquences "enhancers" pourraient être des cibles pour les facteurs cellulaires dans le processus de transformation. Cette proposition a été contestée par Schneider et al. (1987).

Les séquences "enhancers" ou la "TATA box" pourraient agir comme cibles pour les facteurs de régulation positive et négative.

2- La séquence "poison"

La séquence située entre le site de l'endonucléase PvuII (position 2066 pb) et l'origine de réplication (position 2536 pb) (Fig. 38 et 40) des plasmides pBR 322 et pKH 47 a été impliquée comme agent de régulation "négative" ("poison") de la transcription et de la réplication de l'ADN (Lusky and Botchan, 1981 ; Peterson et al., 1987). En déléant cette séquence du plasmide p2 E1Acat, le taux d'activité CAT du nouveau plasmide obtenu (pVM 295) augmente de 23 fois (Tableau 26, Fig. 37).

A l'intérieur de cette séquence sont situés : (a) le site "bom" ("basis of mobilization") ; (b) le site "nick" ; (c) une structure cruciforme potentielle (Fig. 38 et 39).

Pour déterminer le rôle de cette séquence dans le système E1A de l'adénovirus, des études au niveau transcriptionnel (gènes cat et néo) et de la transformation cellulaire sont effectuées.

Une délétion entre les sites Tth111I (2219 pb) et NdeI (2297 pb) (pVM 298) élimine le site "nick" mais non le site "bom", ni la structure cruciforme (Fig. 38). L'activité CAT de ce plasmide est légèrement plus élevée que celle du p2 E1Acat (Tableau 26). Ceci démontre que la séquence "poison" est située entre le site Tth111I (2219 pb) et le site PvuII (2066 pb) (Fig. 38 et 40).

Actuellement des plasmides sont en cours de construction de façon à éliminer soit le site "bom", soit la structure cruciforme pour déterminer si l'une ou l'autre de ces séquences (peut être les deux) sont responsables de la régulation.

L'élimination de la séquence "poison", soit au niveau de l'activité "NEO", soit lors de la transformation cellulaire, fait augmenter le nombre de foyers, par rapport aux plasmides d'origine (Leite, J.P.G., Cousin, C., Heysen, A., and D'Halluin, J.C., manuscrit en préparation).

La séquence "poison" n'intervient pas dans le phénomène de "transdominance" car le plasmide p2 E1Acat (avec séquence "poison") et les plasmides pVM 295, pVM 296 et pVM 297 (sans séquence "poison"), sont inhibés par les produits de la région E1A de l'Ad3 (pVM 312) (Fig. 37).

CONCLUSION GENERALE

*

PERSPECTIVES

Nos études ont mis en évidence que chaque sérotype d'adénovirus (Ad2, Ad3 et Ad12) avait une organisation particulière quant aux trois promoteurs de la région E1A. Cette organisation confère une activité propre à chaque promoteur et ne doit en aucun cas être modifiée.

Les deux séquences "enhancers A et B" sont importantes pour l'activité du promoteur E1A de l'Ad2. Ces séquences, présentes chez l'Ad3 et l'Ad12, mais ayant une disposition différente, doivent jouer le même rôle. Pour le démontrer, des modifications dans leur structure pourront être effectuées, et celles-ci permettront de définir leurs fonctions. Cette étude sera plus avantageuse si elle est accompagnée d'une analyse supplémentaire des facteurs cellulaires. Certains facteurs cellulaires reconnaissent des sites présents en amont du promoteur E1A de l'Ad2 et, éventuellement celui de l'Ad3 et de l'Ad12. La comparaison des séquences reconnues permettra peut être de confirmer notre hypothèse initiale : différents facteurs cellulaires reconnaissent l'organisation différente de chaque promoteur E1A (Ad2, Ad3 et Ad12).

Les motifs "TATAA" sont différents pour les trois sérotypes d'adénovirus. Comme la transactivation est un processus indirect et qu'une des séquences "consensus" présente en amont d'une majorité de promoteurs est la "TATA box", il est possible qu'elle soit la cible des facteurs de régulation positive et négative. Nos résultats, ainsi que ceux d'autres groupes, sont en accord avec cette proposition. Des mutations ponctuelles dans la "TATA box" permettront une analyse plus fine et une confirmation probable de cette hypothèse.

Le rôle des produits des ARNm 12 S et 13 S est encore assez controversé. Récemment, plusieurs groupes ont défini le rôle des domaines 1 et 2 du premier exon, communs aux deux ARNm, ainsi que du domaine 3 qui est spécifique à l'ARNm 13 S, à l'exception des trois résidus du deuxième exon communs aux deux ARNm. Nos résultats montrent une régulation différente pour les produits des ARNm 12 S et 13 S de l'Ad3 et de l'Ad12, par rapport à ceux de l'Ad2. Une transdominance par les deux adénovirus oncogènes est assurée sur celui non oncogène. Les produits des ARNm 12 S et 13 S de l'Ad3, exprimés séparément ou ensemble, inhibent les promoteurs E1A et E3 de l'Ad2. Dans ce

même cadre, il serait souhaitable de définir le rôle des produits de la région E1A de l'Ad12 exprimés individuellement.

Il est cependant difficile de comprendre pourquoi les protéines de la région E1A de l'Ad3 et de l'Ad12 stimule leur propre promoteur et inhibent celui de l'Ad2.

Les produits de la région E1A de l'Ad2 stimulent les promoteurs E1A, E2A et E3 des Ad2, Ad3 et Ad12. Nous avons observé une faible régulation négative due au produit de l'ARNm 12 S de l'Ad5 sur le promoteur E1A de l'Ad2. Ce même produit stimule le promoteur E2A mais non le promoteur E3 de l'Ad5. En amont des promoteurs E1A et E3 il existe une séquence "TATA box", qui est absente pour le promoteur E2A. Cette séquence est probablement la cible de régulation négative directe ou indirecte de ce produit. Par contre, le produit de l'ARNm 13 S de l'Ad5 stimule à un taux élevé ces mêmes promoteurs.

La taille des protéines de la région E1A de l'Ad2 est plus grande que celle de l'Ad3 et de l'Ad12. Il est possible que cette différence soit importante au niveau des processus de transactivation, "transrépression" et transformation cellulaire. Des virus ou plasmides hybrides entre ces différents produits (Ex. 289R Ad2 et 235R Ad12 ou 243R Ad2 et 266R Ad12), pourront servir à définir leur rôle. Quant à la fonction des produits des ARNm 11 S, 10 S et 9 S, elle est toujours inconnue.

Pour approfondir l'étude de la transdominance deux approches sont envisagées : a) l'obtention de lignées cellulaires de singe et de hamster transformées par l'Ad3 afin d'étudier le comportement de l'Ad2 dans ces cellules ; b) l'étude des facteurs cellulaires qui participent à ce processus.

Ces études, bien que préliminaires, donnent une modeste idée de la complexité des promoteurs viraux alors que leur structure est simple comparée à celle de la "machinerie" cellulaire. Le promoteur E1A qui contrôle l'expression de cinq produits majeurs, permet quand même un "début" de compréhension de l'organisation de systèmes plus complexes. Le binôme cellule-virus pourra, dans un délai assez bref, fournir des réponses aux problèmes de l'expression et de la régulation des gènes de la cellule eucaryote.

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

I- CULTURE CELLULAIRE

1- Cellules en culture monocouche (Culture stationnaire)

1.1- Lignées continues

Les cellules HeLa , KB_8 , KB_{16} , KB_{18} et HEK-293, sont cultivées dans des flacons (FALCON de 175 cm^2), à une température de 37°C , en milieu DULBECCO (Flow) contenant 5 % de sérum de veau foetal et 5 % de sérum de veau nouveau-né, γ -irradié.

Les cellules décollées au versène-trypsine (EDTA 3 mM, NaCl 137 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 16 mM, KCl 2,7 mM- trypsine 1mg/ml) sont réparties dans des boîtes de Pétri (FALCON de 60 mm de \emptyset) à raison de 5×10^6 cellules par boîte, dans un volume de 5,0 ml du milieu initial.

1.2- Cultures primaires

Les cellules BRK sont mises en culture après traitement à la trypsine-PSA (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - KCl 5,4 mM, NaCl 137 mM, NaHCO_3 4,2 mM, glucose 5,5 mM, rouge de phénol 5 mg/l, pH 7,5 ; pénicilline 75.000 u/ml, streptomycine 50 mg/ml, fongizone 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Les cellules, centrifugées à 20°C , 5 min à 1.000 g, sont reprises dans 20 ml de milieu MEM (Milieu Minimum Essentiel) contenant 20 % de sérum de cheval, puis mises en culture dans des flacons (Falcon de 75 cm^2) et incubées à 37°C .

2- Cellules en suspension

Les cellules KB_3 sont maintenues en suspension à 37°C dans des "spinners", avec du milieu MEM modifié par JOKLIK (F13 - Flow) et contenant 5 % de sérum de cheval décomplémenté.

II- OBTENTION DES PARTICULES VIRALES ET TITRAGE PAR NOMBRE DE FOYERS FLUORESCENTS

Les adénovirus de sérotype 12, 3, 2, 9 et 4 appartenant respectivement aux sous-groupes A, B, C, D et E sont obtenus après multiplication dans des cellules KB₃ en suspension. Les cellules, à la concentration de $4,5 \times 10^5$ cellules/ml, sont centrifugées à 2.000 g, 10 min, à 30° C. Le culot cellulaire est repris dans du milieu F13, sans sérum (1/20 du volume initial). Les cellules sont infectées à raison de 20 particules virales par cellule. Après 1 h d'adsorption virale à 37° C, sous agitation, la suspension cellulaire est diluée 20 fois dans du milieu F13 contenant 2 % de sérum de veau.

Le cycle viral se déroule pendant 40 h à 37° C. Les cellules infectées sont alors centrifugées à 2.000 g 10 min, à 4° C. Le culot cellulaire est repris dans une solution de Tris hypotonique (Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,1). Après trois cycles de congélation(-70° C)-décongélation(37° C) et addition d'un volume égal de fréon 113, la suspension est homogénéisée trois minutes à l'ultra-Turrax. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 6.500 g 20 min, à 4° C. La phase aqueuse est reprise, déposée sur un coussin de CsCl de densité (d) 1,43 et centrifugée 1 h à 110.000 g, à 4° C. Les particules virales, concentrées en une bande opalescente, sont récupérées à l'aide d'une seringue et repurifiées sur gradient isopycnique de CsCl (d = 1,34) par centrifugation à 70.000 g 16 h, à 4° C. Les particules sont récoltées, diluées dans du glycérol (v:v) et titrées avec un immunsérum anti-adénovirus selon la technique du nombre de foyers fluorescents (Thiel and Smith, 1967).

III- ENZYMES UTILISES

L'acétyl coenzyme A, les endonucléases de restriction, l'ADN ligase du phage T4, l'ADN polymérase de Klenow, la désoxyribonucléase libre d'activité ribonucléasique, l'exonucléase Bal31, la nucléase S1, la protéinase K, la ribonucléase T1, la ribonucléase A, le lysozyme et les oligonucleotides-liens ("linkers"), proviennent de chez Amersham, Appligene, Biolabs, Boehringer ou BRL et sont utilisés selon les recommandations prescrites par le fabricant.

IV- TRANSFORMATION BACTERIENNE

1- Transformation sur HB101

La souche bactérienne HB101 est un hybride E. coli K-12 - E. coli B. Son génotype est : Pro, Leu, Thi, Lacy, hsd20, endA, recA, rpsL20, ara-14, galK2, xyl-5, mtl-1, supE44. Elle est employée pour l'obtention et l'amplification de plasmides en vue de leur purification.

Les bactéries sont cultivées, sous agitation à 37° C, dans 30 ml de milieu LB (extrait de levure 5 g/l, peptone 10 g/l - DIFCO, NaCl 5 g/l). Quand la culture atteint une DO₅₈₀ de 0,6, elle est centrifugée à 6.000 g 10 min, à 4° C. Les bactéries sont lavées deux fois dans 20 ml de CaCl₂ 0,1 M. Le culot bactérien, repris dans 20 ml de CaCl₂ 0,1 M est laissé 20 min à 4° C, puis centrifugé une dernière fois.

Les bactéries sont resuspendues dans 0,5 ml de CaCl₂ 0,1 M et réparties en aliquotes de 0,1 ml. Chaque aliquote est mise en contact avec 25 µl d'une solution d'ADN transformant. Après 20 min dans la glace, cinq chocs thermiques (37° C - 4° C) sont effectués; la suspension est conservée 15 min à 4° C. 1,5 ml de milieu 2XTY (extrait de levure 10 g/l, tryptone 16 g/l - DIFCO, NaCl 5 g/l) sont ajoutés, la suspension est mise en agitation 45 min à 37° C; 0,2 ml ou 0,8 ml sont étalés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB gélosé (15 g/l - DIFCO) et l'antibiotique servant de marqueur de résistance. Les boîtes sont incubées 18 h à 37° C et les clones résistants sont isolés.

2- Infection sur JM107

La souche bactérienne JM107 est un hybride E. coli K-12 - E. coli B, son génotype est : endA1, gyrA96, Thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ (lac-proAB), F', [traD36, pro A⁺, pro B⁺, lacI^q, lacZ ΔM15].

Le protocole est identique à celui décrit pour la transformation sur HB101 jusqu'à l'étape des chocs thermiques. 40 µl d'une solution de bluogal à 20 mg/ml (BRL) et 24 µl d'IPTG à 24 mg/ml (BRL) sont ajoutés à chacun des deux tubes contenant 3,5 ml de gélose LB (7 g/l) à 56° C. 10 µl de bactéries compétentes sont alors ajoutés dans un tube et 110 µl dans l'autre tube. A chaque tube sont additionnés 200 µl de milieu LB contenant la JM 107 (DO₅₈₀ 0,3). Le contenu des tubes est mélangé et coulé uniformément sur une boîte de

Pétri contenant du milieu LB gélosé. Après solidification du milieu, les boîtes sont conservées 18 h à 37° C.

3- Sélection de clones

3.1- Méthode des "tailles"

Les bactéries sont mises en suspension dans 500 µl de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) et centrifugées 10 min à 5.000 g, à 4° C. Le culot est resuspendu dans 60 µl d'une solution TBE-25 % saccharose (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM, H₃BO₃, 89 mM, pH 8,3) contenant du lysozyme à raison de 10 mg/ml et de la ribonucléase A à 50 µg/ml. Les bactéries sont ensuite déposées sur gel d'agarose à 0,8 % contenant 8 ng/ml de BrEt. A chaque échantillon sont additionnés 20 µl d'une solution de SDS 1 %, BBØ 0,005 %, saccharose 50 %, puis l'électrophorèse est effectuée à 90 V pendant 4 h (Echardt, 1979).

3.2- Méthode de dénaturation par la chaleur

Le culot de bactéries est resuspendu dans 1,0 ml de la solution suivante: sucrose 8 %, triton X100 0,5 %, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, additionnée de 35 µl de lysozyme à 10 mg/ml, puis les échantillons sont mis à ébullition pendant 60 sec. Après une centrifugation de 10 min à 12.000 g le surnageant est précipité à l'isopropanol, centrifugé 20 min à 12.000 g et séché. Après dissolution, l'ADN est dialysé et analysé à l'aide d'endonucléases de restriction (Holmes and Quigley, 1981).

3.3- Isolement et sélection des phages

Les plages de lyse sont prélevées et mises en suspension dans 1,0 ml de tampon SM (NaCl 10 mM, MgSO₄ 8 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,0, gélatine 0,1 g/l). Deux millilitres de milieu LB contenant les bactéries JM 107 (DO₅₈₀ 0,3) sont ajoutés, et la suspension est mise en agitation à 37° C, 4 h. Cette suspension est ensuite centrifugée 10 min à 8.000 g, à 4° C et le surnageant est récupéré et conservé à 4° C. 200 µl du surnageant sont mélangés à 30 µl d'une solution : SDS 2 %, EDTA 0,2 M, BBØ 0,2 % , glycérol 50 %. Après agitation et incubation à 65° C pendant 10 min, le lysat est déposé sur gel d'agarose à 0,6 % et l'électrophorèse conduite à 30 V pendant 18 h.

V- PURIFICATION DES PLASMIDES

Les clones sélectionnés sont mis en suspension dans 30 ml de milieu LB contenant un antibiotique (ampicilline 50 µg/ml) pendant 3 h à 37° C, sous agitation. Dix millilitres de suspension sont ajoutés à 200 ml de milieu LB et incubés à 37° C, sous agitation, jusqu'à obtention d'une DO_{580} de 1,0; 1,0 ml de chloramphénicol à 34 mg/ml est additionné et la culture laissée 18 h sous agitation. La suspension est centrifugée 10 min à 6.000 g, à 4° C et le culot resuspendu dans 3,0 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, saccharose 25 %. Les bactéries sont conservées à 4° C et 1,0 ml d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml est ajoutée. Après 5 min, 1,0 ml d'EDTA 0,2 M est additionné et les bactéries sont alors conservées pendant une période égale dans la glace. Cinq ml d'une solution Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, Triton 0,01 % sont ajoutés et les débris cellulaires sont sédimentés par centrifugation à 150.000 g 45 min, à 4° C. 8,6 ml de surnageant sont ajoutés à 8,6 g de CsCl et 86 µl d'une solution à 5 mg/ml de BrEt. Après une centrifugation de 300.000 g 20 h, à 16° C la bande d'ADN plasmidique est récupérée, le BrEt éliminé par extraction à l'isopropanol et les plasmides dialysés contre du tampon TE (Sinsheiner, 1977).

VI- HYBRIDATION

1- Obtention de l'ARNm 13 S de l'adénovirus type 3

L'infection des cellules KB₃ par l'Ad3 est effectuée selon la technique précédemment décrite (cf. II).

Les ARNm sont marqués par la (³H)-5,6-uridine (56 Ci/mMole - CEA) en présence de cycloheximide (25 µg/ml). Six heures p.i. les cellules sont centrifugées 10 min à 2.000 g, à 4° C, lavées deux fois dans du sérum physiologique et reprises dans 40 ml d'une solution contenant : Tris-HCl 100 mM pH 7,0, MgCl₂ 2 mM et NP40 0,02 %. Après 10 min dans la glace, les cellules sont rompues à l'aide d'un homogénéiseur de type "Dounce" et un volume de NaCl est additionné pour atteindre une concentration finale de 0,15 M, puis l'on centrifuge 10 min à 2.000 g, à 4° C.

Le surnageant est mélangé v/v à du TSE (Tris-HCl 10 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, SDS 1%). Après homogénéisation, trois extractions v/v de phénol-chloroforme-TSE suivies de trois extractions v/v par l'éther éthylique sont effectuées.

La phase aqueuse est récupérée et après addition d'acétate de sodium (300 mM final), deux cycles de précipitation à l'éthanol sont effectués.

2- Préparation, obtention et purification de l'ADN simple brin à partir du phage M13

Dix µg de plasmide pVM 313 (Leite et al., 1986) sont coupés par BamHI et HindIII. Après électrophorèse sur gel d'agarose 0,6 % un fragment d'ADN (bande B) est récupéré par découpage de l'agarose et trois cycles de congélation (-70° C) - décongélation (37° C) sont effectués. L'agarose est filtré sur filtre "millex" (20 µm) et minicolonne "elutip" (Schleicher et Schuell), cette dernière ayant été préalablement équilibrée à l'aide de tampons : haute force ionique (NaCl 1 M, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) et basse force ionique (NaCl 200 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). L'ADN élué dans le tampon à haute force ionique est précipité à l'éthanol.

La forme répliquative de l'ADN du bactériophage M13 mp19, coupée par les mêmes enzymes, est précipitée à l'éthanol avec le fragment B précédemment obtenu. L'ADN est centrifugé 30 min à 12.000 g, à 4° C, séché et resuspendu dans 40 µl d'eau. Une dialyse de 20 min est effectuée sur membrane millipore (20 µm) ; ensuite sont ajoutés 4 µl de tampon ligase X10 (Tris-HCl 0,5 M pH 7,4, MgCl₂ 0,1 M, dithiothreitol 0,1 M, spermidine 10 mM, ATP 10 mM, BSA 1 mg/ml) et une unité d'ADN Ligase du bactériophage T4. L'ADN est conservé à 16° C pendant 18 h et servira par la suite à la transfection de la souche bactérienne JM107 (cf. IV-2).

L'amplification des phages (cf. IV-3.3) est obtenue par infection de la souche JM107 (DO₅₈₀ 0,1) dans 200 ml de milieu LB et la culture est laissée 18 h à 37° C sous agitation. Les bactéries sont centrifugées à 6.000 g 10 min, à 4° C et l'ADN contenu dans le surnageant est précipité par du polyéthylèneglycol 6000 à 60 % et NaCl 14,6 % final. Après 1 h à 4° C, la solution est centrifugée 30 min à 12.000 g, à 4° C. Le culot est resuspendu dans 100 µl de tampon TE, deux cycles d'extraction au phénol-chloroforme-TSE puis éther sont effectués, suivis d'une précipitation à l'éthanol (Eggerding and Pierce, 1983).

3- Hybridation ADN - ARN et ARN - ARN

Un milligramme d'ARN et 100 µg d'ADN simple brin sont resuspendus dans 1,0 ml de tampon d'hybridation (formamide 80 %, PIPES 40 mM pH 6,4, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM). Après 10 min à 85° C, le mélange est incubé 15 h

à 45° C, puis précipité à l'éthanol et resuspendu dans 1,5 ml de tampon TE. La solution contenant des hybrides ADN-ARN est ajustée à une densité moyenne de 1,53 en Cs_2SO_4 , et centrifugée 40 h à 60.000 g, à 20° C.

Le gradient est récolté par fraction de 0,3 ml et un comptage radioactif est effectué pour déterminer la localisation de l'hybride ADN-ARN. Les fractions sélectionnées sont mélangées et dialysées contre du tampon TE pendant 4 h à 4° C.

Après précipitation à l'éthanol et incubation 10 min à 85° C, les hybrides sont traités à la désoxyribonucléase (1U/ μl) à 37° C en présence de RNasine (inhibiteur de ribonucléase) (1U/ μg). Deux cycles d'extraction au phénol/chloroforme et éther sont effectués, les ARNm sont précipités à l'éthanol en présence d'acétate d'ammonium (300 mM final), puis centrifugés 30 min à 12.000 g à 4° C et resuspendus dans 40 μl d'eau contenant 250U de RNasine.

Une banque d'ADN complémentaires est obtenue selon le protocole d'Amersham (cDNA Synthesis System RPN 1256). Ceux-ci sont coupés par BamHI et HindIII puis clonés dans le plasmide pKH 47 (BRL) coupé par les mêmes enzymes. Après transformation de la souche HB 101, les colonies sont sélectionnées en fonction de leur taille, puis amplifiées et les plasmides sont purifiés.

Leur analyse en gel de polyacrylamide (3,5 à 8 %), après coupure par des enzymes de restriction, a permis de sélectionner les clones désirés. Afin de confirmer la nature de l'insert, les plasmides sont digérés, soumis à une électrophorèse en gel d'agarose, transférés sur membrane Biodine A (Pall) et hybridés avec une sonde spécifique de l'Ad3 (Southern blotting).

4- Méthode de transfert d'ARN (Northern), d'ADN (Southern) et d'hybridation sur membrane

L'ADN ou l'ARN sont transférés du gel d'agarose sur une membrane Biodine A (Pall) par la méthode de Thomas (1980). La membrane est ensuite soumise à une température de 80° C, 2 h afin d'y fixer, par covalence, l'acide nucléique transféré.

La membrane subit une préhybridation de 4 h à 50° C dans la solution : 5 X SSPE (1), 5 X Denhart's (2), SDS 0,3 %, ADN non homologue dénaturé thermiquement 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, formamide 50 %.

(1) SSPE X 20 =

NaCl	3,6 M	
Phosphate Na/Na ₂	0,2 M	pH 8,3
EDTA	0,02 M	pH 8,0

(2) Denhardt's X 100 =

Ficoll	2 %
Polyvinylpyrrolidone	2 %
Sérumalbumine bovine	2 %

L'hybridation se fait dans la même solution à laquelle est ajoutée une sonde préalablement dénaturée thermiquement et marquée à l'alpha (³²P)-dCTP ("nick translation").

Après 18 h, la membrane est lavée trois fois, 30 min, dans la solution : phosphate Na/Na₂ 5 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, SDS 0,2 % .

5- Préparation de sonde par "nick translation"

Le plasmide pVM 312, coupé par BamHI, est marqué à l'alpha (³²P)-dCTP à l'aide de l'ADN polymérase I et d'un ensemble de réactifs ("kit") selon les recommandations faites par le fabricant (Boehringer-976 776).

VII- CONSTRUCTION DU PLASMIDE N'EXPRIMANT QUE L'ARNm 12 S DE LA REGION E1A DE L'ADENOVIRUS TYPE 3

Le plasmide pKH 47 est coupé par DraI. Au moment de la ligature avec l'ADN ligase du bactériophage T4, le "linker" SaII est additionné. Les clones tc^R sont sélectionnés et le plasmide amplifié et purifié (pKH 47Dra⁻). Après coupure par EcoRI et digestion partielle SaII, la bande B est récupérée.

Le plus grand fragment du plasmide pSP 64 (Boehringer) coupé par SaII et BamHI est cloné avec la bande B du plasmide pVM 312 coupé par les mêmes enzymes. De ce clonage résulte le plasmide pVM 431. La bande B de ce plasmide coupé par EcoRI et SaII est clonée avec la bande B du plasmide pKH 47Dra⁻ coupé de façon similaire. Ces deux bandes sont à l'origine du plasmide pVM 329. Ce dernier est digéré par l'endonucléase DraI et un "linker" XbaI est ajouté (pVM 312Xba). Après coupure par XbaI, une digestion en cinétique

par Bal31 est effectuée ainsi que l'addition d'un "linker" XbaI. Les clones sont sélectionnés, les plasmides amplifiés et purifiés. Après analyse un clone est choisi exprimant l'ARNm 12 S de la région E1A (pVM 325).

VIII-TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES

1- Electrophorèse en gel d'agarose

La concentration du gel d'agarose varie de 0,6 à 2 %, selon la taille du fragment d'ADN à isoler. L'ADN est mélangé v/v avec BBØ, déposé sur le gel contenant du BrET et l'électrophorèse est effectuée dans du tampon TBE à 90 V pendant 3 h.

2- Electrophorèse en gel de polyacrylamide non dénaturant

2.1- Pour l'analyse de l'ADN

La concentration du gel varie de 3,5 à 8,0 % (rapport acrylamide / bis-acrylamide 29/1). L'électrophorèse dans du tampon TBE dure 16 h, à un voltage constant de 30 V. Un mélange de bleu de bromophénoï 0,05 % et de xylène cyanol 0,05 % (BBØX) est utilisé comme témoin de migration.

2.2- Pour la séparation des brins d'ADN

L'ADN est marqué en 3' à l'alpha (^{32}P)-dCTP par l'action de l'ADN polymérase de Klenow, dénaturé 10 min à 100° C, puis déposé sur gel d'acrylamide 5 % (rapport acrylamide / bis-acrylamide 5/0,1). Après 16 h d'électrophorèse à 200 V, le gel est mis en autoradiographie pendant 30 min. L'ADN simple brin est récupéré et électro-élué.

3- Gel de polyacrylamide dénaturant pour le séquençage, la cartographie S1 et l'ARN protection

L'électrophorèse se poursuit en gel d'acrylamide 5 à 8 % (rapport acrylamide / bis-acrylamide 38/2), contenant de l'urée (42 %). Après une migration de 16 h à 200 V, le gel est placé 30 min dans une solution d'acide acétique 10 %, rincé à l'eau, puis séché et mis en autoradiographie.

4- Electro-élution de l'ADN

La bande d'acrylamide contenant l'ADN est déposée à la cathode d'une cuve contenant du tampon TBE 0,1 %, SDS 0,005 % et baignant dans du tampon TBE X2. Après 90 min à 200 V la polarité est inversée 30 sec et l'ADN récupéré sous un volume minimal de tampon. Après deux extractions au phénol - chloroforme-TSE et une extraction à l'éther, l'ADN est précipité à l'éthanol.

IX- SEQUENCAGE DE L'ADN

Les plasmides p2 E1Acat et p3 E1Acat sont séquencés par la méthode de terminaison des chaînes de Messing et al. (1977) ; Sanger et al. (1977).

Les petits fragments EcoRI - HindIII de ces deux plasmides sont clonés dans l'ADN du phage M13 mp18 coupé par les mêmes enzymes. Après sélection, amplification et purification des phages, l'ADN simple brin est obtenu.

L'ADN est mélangé avec la solution d'hybridation (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 ; MgCl₂ 5 mM) et une amorce ("primer"). Le mélange est placé 2 h à 65° C, puis transféré dans un tube contenant une aliquote de 5 µl d'alpha (³²P)-dCTP (20 µCi). La réaction est faite à la température ambiante en présence d'un mélange de désoxynucléotides - didésoxy-nucléotides (BRL) et l'ADN polymérase de Klenow. A la fin de la réaction, l'ADN est dénaturé 2 min à 100° C et l'électrophorèse effectuée 16 h à 220 V.

X- CARTOGRAPHIE A LA NUCLEASE S1

L'analyse à la nucléase S1 se fait selon la méthode décrite par Berk et Sharp (1978). Le plasmide pVM 312Xba, coupé par BamHI, est marqué à l'alpha (³²P)-dCTP sur l'extrémité 3' à l'aide de l'ADN polymérase de Klenow. Après coupure par XbaI, les deux brins du petit fragment sont séparés et le brin A mis à hybrider avec les ARNm de cellules préalablement transfectées par les plasmides pVM 312, pVM 325 et pVM 335. Après digestion par la nucléase S1 (800 U, 30 min, à 37° C), les hybrides sont analysés sur gel de polyacrylamide dénaturant à 5 % d'acrylamide.

XI- ARN PROTECTION

Le plasmide pVM 431 subit une délétion HindIII (pVM 431dIHind); à partir du plasmide linéarisé par l'endonuclease HindIII, l'enzyme ARN polymérase en utilisant le promoteur du phage SP6, synthétise des ARNm complémentaires (^{*}ARNm) aux produits de la région E1A de l'Ad3, marqués à l'aide de l'alpha (³²P)-dUTP ("Kit SP6 System"-Amersham-RPN 1506).

Les plasmides pVM 312, pVM 325 et pVM 335 sont transfectés dans les cellules HeLa et les ARNm extraits 40 h après la transfection. Les ARNm sont hybridés avec l'^{*}ARNm synthétisé, selon la technique décrite antérieurement (cf.VI-3). Les hybrides ^{*}ARNm-ARNm sont dilués (10 fois) dans le tampon suivant : Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 5 mM, NaCl 500 mM, contenant 40 µg/ml de ribonucléase A et 2 µg/ml de ribonucléase T1. Après 1 h d'incubation à 30° C, sont ajoutés 20 µl de SDS 10 %, 50 µg de protéinase K et le mélange est incubé 1 h à 30° C. Ensuite, une extraction est effectuée au phénol-chloroforme-TSE, suivie d'une précipitation à l'éthanol en présence d'acétate d'ammonium 300 mM final et de glycogène (5µg) (Boehringer). Après centrifugation à 12.000 g 20 min, à 4° C, le culot est repris dans 20 µl d'eau et 20 µl de BBØX, et les échantillons analysés sur gel dénaturant à 5 % d'acrylamide.

XII- TRANSFECTION DES PLASMIDES DANS LES CELLULES HeLa, KB8, KB16, KB18 ET HEK-293

La transfection a lieu dans des cellules à 70 % de confluence. La méthode a été décrite par Graham et van der Eb (1973) et consiste en une précipitation de l'ADN avec du phosphate de calcium. Environ 10 à 20 µg d'ADN sont mis dans du tampon HBS (NaCl 136 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0,7 mM, dextrose 5,5 mM, HEPES 20 mM, pH 7,05) et du CaCl₂ 125 mM final est ajouté. Après 20 min à la température ambiante, les précipités sont mis 30 min en contact avec les cellules préalablement lavées avec du tampon HBS. Le milieu est alors ajouté et les cultures cellulaires incubées 40 h à 37° C, avec changement du milieu après 16 h.

XIII- DOSAGE DE L'ACTIVITE CHLORAMPHENICOL ACETYL TRANSFERASE

Quarante heures après transfection, les cellules sont décollées au versène, lavées dans du sérum physiologique et centrifugées 10 min à 2.000 g. Le culot est resuspendu dans 100 µl de Tris-HCl 0,25 M pH 7,8 et les cellules sont lysées par traitement aux ultrasons. Les débris cellulaires sont sédimentés par centrifugation de 5 min à 12.000 g.

Vingt µl de surnageant sont alors incubés une heure à 37° C avec 70 µl de Tris-HCl 0,25 M pH 7,8, 35 µl H₂O, 20 µl d'acétyl coenzyme A 4 mM et 1,0 µl de (¹⁴C)- dichloroacétyl 1,2 - chloramphénicol à 0,05 mCi/0,5 ml (NEN). La réaction est arrêtée par l'addition de 0,9 ml d'acétate d'éthyle, le mélange homogénéisé et centrifugé 5 min à 12.000 g. La phase organique est prélevée et séchée sous vide.

Le culot est resuspendu dans 15 µl d'acétate d'éthyle et chromatographié sur couche mince de gel de silice (20 X 20 cm - POLYGRAM). Une prémigration (3 min) dans l'acétone permet de concentrer les dépôts, puis une migration de 40 min dans un système de solvant chloroforme/méthanol (95/5) permet de séparer les formes acétylées du substrat initial.

Les couches minces sont alors mises en autoradiographie à -70° C et le film est révélé après 72 h. La radioactivité est estimée par le comptage en scintillation liquide des tâches de chloramphénicol acétylé (Gorman et al., 1982).

XIV- SELECTION DES CLONES RESISTANTS A LA GENETICINE

Les plasmides contenant le gène néo sont transfectés dans des cellules HeLa, KB₈, KB₁₆ et KB₁₈. Vingt quatre heures après la transfection, les cellules sont divisées (1:2) et mises en flacons (Falcon de 250 ml). Au milieu sont ajoutés 0,4 mg/ml de G418 (GIBCO). Le milieu est renouvelé deux fois par semaine et au bout de 3 semaines les clones résistants commencent à faire leur apparition. Ceux-ci sont comptés, isolés et amplifiés (Southern and Berg, 1982).

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

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

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

J. Virol., 38 : 469-482.

AKUSJARVI, G., PETTERSSON, U., and ROBERTS, R.J. (1986).

Structure and function of the adenovirus-2 genome. Adenovirus DNA. The Viral Genome and Its Expression, pp 53-97, ed. par W. Doerfler, Martinus Hijhall publishing.

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

A protein kinase associated with adenovirus type 2.

Virology, 87 : 276-286.

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 : 671-681.

ALLAN, M., ZHU, J., MONTAGUE, P., and PAUL, J. (1984).

Differential response of multiple ϵ -globin cap sites to cis- and trans- acting controls.

Cell, 38 : 399-407.

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

Processing of adenovirus 2 induced proteins.

J. Virol., 12 : 241-252.

ARBER, W., and DUSSOIX, D. (1962).

Host specificity of DNA produced by Escherichia coli I - Host controlled modification of bacteriophage λ .

J. Mol. Biol., 5 : 18-36.

BABICH, A., FELDMAN, L.T., NEVINS, J.R., DARNELL, J.E., and WEINBERGER, C. (1983).

Effect of adenovirus on metabolism of specific host mRNAs : transport and specific translational discrimination.

Mol. Cell. Biol., 3 : 1212-1221.

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 : 371-379.

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

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

J. Virol., 50 : 202-212.

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 Escherichia coli XGPRT gene in KB cells.

J. Virol., 46 : 454-465.

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 : 415-428.

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 : 189-221.

BALBAS, P., SOBERON, X., MERINO, E., ZURITA, M., LOMELI, H., VALLE, F., FLORES, N., and BOLIVAR, F. (1986).

Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives - a review.

Gene, 50 : 3-40.

BANERJI, J., RUSCONI, S., and SCHAFFNER, W. (1981).

Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences.

Cell, 27 : 299-308.

BARKER, D.D., and BERK, A.J. (1987).

Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection.

Virology, 156 : 107-121.

BARRETT, P., CLARK, L., and HAY, R.T. (1987).

A cellular protein binds to a conserved sequence in the adenovirus type 2 enhancer.

Nucl. Acids Res., 15 : 2719-2735.

BENOIST, C., and CHAMBON, P. (1981).

In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region.

Nature, 290 : 304-310.

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

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

Biochem. Biophys. Acta, 535 : 233-240.

BERGER, S.L., and FOLK, W.R. (1985).

Differential activation of RNA polymerase III-transcribed genes by the polyomavirus enhancer and the adenovirus E1A gene products.

Nucl. Acids Res., 13 : 1413-1428.

BERGET, S.M., MOORE, C., and SHARP, P.A. (1977).

Spliced segments of the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 : 3171-3175.

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. Natl. Acad. Sci. USA, 79 : 381-385.

BERK, A.J. (1986a).

Adenovirus promoters and E1A transactivation.

Ann. Rev. Genet., 20 : 45-79.

BERK, A.J. (1986b).

Functions of adenovirus E1A.

Cancer Surveys, 5 : 367-387.

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

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

Cell, 17 : 935-944.

BERK, A.J., and SHARP, P.A. (1978).

Structure of adenovirus 2 early mRNAs

Cell, 14 : 695-711.

BERKNER, K.L., and SHARP, P.A. (1983).

Generation of adenovirus by transfection of plasmids.

Nucl. Acids Res., 11 : 6003-6020.

BERNARDS, R., SCHRIER, P.I., HOUWELING, A., BOS, J.L., VAN DER EB, A.J., ZULSTRA, M., and MELIEF, C.M.J. (1983).

Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity.

Nature, 305 : 776-779.

BERNARDS, R. and VAN DER EB, A.J. (1984).

Adenovirus : transformation and oncogenicity.

Biochem. Biophys. Acta, 783 : 187-204.

BLACK, B.C., and CENTER, M.S. (1979).

DNA-binding properties of the major core protein of adenovirus 2.

Nucl. Acids Res., 6 : 2339-2353.

BLACK, D.L., CHABOT, B., and STEITZ, J.A. (1985).

U2 as well as U1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in premessenger RNA splicing.

Cell, 42 : 737-750.

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 : 458-465.

BORRELLI, E., HEN, R., and CHAMBON, P. (1984).

Adenovirus 2 E1A products repress enhancer-induced stimulation of transcription.

Nature, 312 : 608-612.

BORRELLI, E., HEN, R., WASYLYK, C., and CHAMBON, P. (1986).

The immunoglobulin heavy chain enhancer is stimulated by the adenovirus type 2 E1A products in mouse fibroblasts.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 : 2846-2849.

BOS, J.L., and TEN WOLDE-KRAAMWINKEL, H.C. (1983).

The E1B promoter of Ad12 in mouse L-cells is activated by adenovirus region E1A.

EMBO J., 2 : 73-76.

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 : 144-156.

BOUDIN, M.L., MONCANY, M., D'HALLUIN, J.C., and BOULANGER, P.A. (1979).

Isolation and characterization of adenovirus type 2 vertex capsomer (penton base).

Virology, 92 : 125-138.

BOULANGER, P.A., LEMAY, P., BLAIR, G.E., and RUSSELL, W.C. (1979).

Characterization of adenovirus protein IX.

J. Gen. Virol., 44 : 783-800.

BOULANGER, P.A., and PUVION, F. (1973).

Large scale preparation of soluble adenovirus hexon, penton and fiber antigens in highly purified form.

Eur. J. Biochem., 39 : 37-42.

BRANTON, P.E., BAYLEY, S.T., and GRAHAM, F.L. (1985a).

Transformation by human adenovirus.

Bioch. Biophys. Acta, 780 : 67-94.

BRANTON, P.E., and ROWE, D.T. (1985b).

Stabilities and interrelations of multiple species of human adenovirus type 5 early region 1 proteins in infected and transformed cells.

J. Virol., 56 : 633-638.

BROKER, T.R., KELLER, C., and ROBERTS, R.J. (1984).

Human adenovirus serotypes 2, 4, 8, 40 and 41 and adenovirus-simian virus 40 hybrids. Genetics Maps, p 99, ed. par S.J. O'BRIEN, Cold Spring Harbor Laboratory.

BROWN, D.T., WESTPHAL, M., BURLINGHAM, B.T., WINTERHOFF, U., and DOERFLER, W. (1975).

Structure and composition of the adenovirus type 2 core

J. Virol., 16 : 366-387.

BRUSCA, J.S., and CHINNADURAI, G. (1981).

Transforming genes among three different oncogenic subgroups of human adenoviruses have similar replicative functions.

J. Virol., 39 : 300-305.

BUTEL, J.S. (1986).

SV40 large T-antigen : dual oncogene.

Cancer Surveys, 5 : 343-365.

CAILLET-BOUDIN, M.L. (1987).

Etude structurale et Biochimique de la fibre de l'adénovirus de type 2.

Thèse de Doctorat, Université de Lille I.

CARLOCK, L.R., and JONES, N.C. (1981).

Transformation-defective mutant of adenovirus type 5 containing a single altered E1A mRNA species.

J. Virol., 40 : 657-664.

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.

CHARDONNET, Y., and DALES, S. (1970).

Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome.

Virology, 40 : 462-477.

CHATTERJEE, P.K., VAYDA, M.E., and FLINT, S.J. (1986).

Identification of proteins and protein domains that contact DNA within adenovirus nucleoprotein cores by ultra-violet light cross-linking of oligonucleotides ³²P-labelled in vivo.

J. Mol. Biol., 188 : 23-37.

CHATTERJEE, P.K., BRUNER, M., FLINT, S.J., and HARTEK, M.L. (1988).

DNA-binding properties of an adenovirus 289R E1A protein.

EMBO J., 7 : 835-841.

CHEN, I.S.Y., CANN, A.J., SHAH, N.P., and GAYNOR, R.B. (1985).

Functional relation between HTLV-II "x" and adenovirus E1A proteins in transcriptional activation.

Science, 230 : 570-573.

CHOW, L.T., and BROKER, T.R. (1978).

The spliced structures of adenovirus 2 fiber message and the other late mRNAs.

Cell, 15 : 497-510.

CHOW, L.T., BROKER, T.R. and LEWIS, J.B. (1979).

Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus 2.

J. Mol. Biol., 134 : 265-303.

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 : 1-8.

COLBY, W.W., and SHENK, T. (1981).

Adenovirus type 5 virions can be assembled in vivo in the absence of detectable polypeptide IX.

J. Virol., 39 : 977-980.

CORDEN, J., ENGELKING, H.M., and PEARSON, G.D. (1976).
Chromatin like organization of the adenovirus chromosome.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73 : 401-404.

CROSSLAND, L.D., and RASKAS, H.J. (1983).
Identification of adenovirus genes that require template replication for
expression.
J. Virol., 46 : 737-748.

DE COMBRUGGHE, B., BUSBY, S., and BUC, H. (1984).
Cyclic AMP receptor protein : role in transcription activation.
Science, 224 : 831-838.

DEKKER, M.M., KONINGS, D.A.M., DENISOVA, T.S., GIBADULIN, R.A., and
VAN ORMONDT, H. (1984).
The nucleotide sequence of the leftmost XhoI fragment (6%) of simian adenovirus
SA7P.
J.Gen.Virol., 65 : 1699-1708.

DELSERT, C. (1985).
Permissivité et hiérarchie de transdominance intersérotypique dans le système
adénovirus humain - cellules simiennes.
Thèse de 3ème cycle, Université de Lille I.

DELSERT, C., and D'HALLUIN, J.C. (1984).
Genetic expression of human adenoviruses in simian cells : evidence for
interserotypic inhibition of viral DNA synthesis.
Virus Res., 1 : 365-380.

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 : 319-337.

DEVAUX, C., CAILLET-BOUDIN, M.L., JACROT, B. and BOULANGER, P.
(1987).
Crystallization, enzymatic cleavage, and the polarity of the adenovirus type 2
fiber.
Virology, 161 : 121-128.

DEVAUX, C., ZULAUF, M., BOULANGER, P., and JACROT, B. (1982).
Molecular weight of adenovirus serotype 2 capsomers : a new characterization.
J. Mol. Biol., 156 : 927-939.

DE VILLIERS, J., OLSON, L., TYNDALL, C., and SCHAFFNER, W. (1982).
Transcriptional enhancers from SV40 and polyoma virus show a cell type preference.
Nucl. Acids Res., 10 : 7965-7976.

D'HALLUIN, J.C. (1980).
Génétique de l'adénovirus.
Bull. Inst. Pasteur, 78 : 347-405.

D'HALLUIN, J.C., DELSERT, C., MILLEVILLE, M., and BOULANGER, P. (1985).
An adenovirus cytotoxic function related to the control of a cellular pH 4 endonuclease activity.
J. Gen. Virol., 66 : 1873-1887.

D'HALLUIN, J.C., MARTIN, G.R., TORPIER, G., and BOULANGER, P.A. (1978a)
Adenovirus type 2 assembly analysed by reversible cross-linking of labile intermediates.
J. Virol., 26 : 357-363.

D'HALLUIN, J.C., MILLEVILLE, M., BOULANGER, P., and MARTIN, G.R. (1978b).
Temperature sensitive mutant of adenovirus type 2 blocked in virion assembly : accumulation of light intermediate particles.
J. Virol., 26 : 344-357.

ECHARDT, T. (1979).
A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria.
Plasmid, 1 : 584-588.

EGGERDING, F.A., and PIERCE, W.C. (1983).

Construction of a cloned library of adenovirus DNA fragments in bacteriophage M13.

J. Biol. Chem., 258 : 10090-10097.

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 : 7105-7117.

ENDERS, J.F., BELL, J.A., DINGLE, J.H., FRANCIS, T., HILLEMANN, M.R., HUEBNER, R.J., and PAYNE, A.M.M. (1956).

Adenoviruses : group name proposed for new respiratory tract-viruses.

Science, 124 : 1197.

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 : 399-417.

EVERETT, R.D., and DUNLOP, M. (1984).

Transactivation of plasmid-borne promoters by adenovirus and several herpes group viruses.

Nucl. Acids Res., 12 : 5969-5978.

EVERITT, E., LUTTER, L., and PHILIPSON, L. (1975).

Structural proteins of adenovirus. XII. Location and neighbour relationship among proteins of adenovirion type 2 as revealed by enzymatic iodination, immunoprecipitation and chemical cross-linking.

Virology, 67 : 197-208.

EVERITT, E., and PHILIPSON, L. (1974).

Structural proteins of adenovirus. XI. Purification of three low molecular weight virion proteins of adenovirus type 2 and their synthesis during productive infection.

Virology, 62 : 253-269.

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 : 130-147.

FELDMAN, L.T., IMPERIALE, M.F., and NEVINS, J.R. (1982).

Activation of early adenovirus transcription by the herpes virus immediate early
gene : evidence for a common cellular control factor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 : 4952-4956.

FELDMAN, L.T., and NEVINS, J.R. (1983).

Localization of the adenovirus E1A protein, a positive acting transcriptional
factor in infected cells.

Mol. Cell. Biol., 3 : 829-838.

FERGUSON, B., JONES, C., RICHTER, J., and ROSENBERG, M. (1984).

Adenovirus E1A gene product expressed at high levels in Escherichia coli is
functional.

Science, 224 : 1343-1346.

FERGUSON, B., KRIPPL, B., ANDRISANI, O., JONES, N., WESTPHAL, H.,
and ROSENBERG, M. (1985).

E1A 13S and 12S mRNA products made in Escherichia coli. Both function as
nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA.

Mol. Cell. Biol., 5 : 2653-2661.

FISCH, T.M., PRYWES, R., and ROEDER, R.G. (1987).

c-fos sequences necessary for basal expression and induction by epidermal
growth factor, 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, and the calcium
ionophore.

Mol. Cell. Biol., 7 : 3490-3502.

FLEWETT, T.H., BRYDEN, A.S., DAVIES, H., and MORRIS, C.A. (1975).

Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward.

Lancet, 1 : 4-5.

FLINT, S.J. (1986).

Regulation of adenovirus mRNA formation.

Adv. Virus Res., 31 : 169-228.

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 : 749-771.

FREEMAN, A.E., BLACK, P.H., VANDER POOL, 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 : 1205-1212.

FRIEDFELD, B.R., KREVOLIN, M.D., and HORWITZ, M.S. (1983).

Effects of the adenovirus H5 ts 125 and H5 ts 107 DNA binding proteins on DNA replication in vitro.

Virology, 124 : 380-389.

FROMM, M., and BERG, P. (1983).

Simian virus 40 early and late region promoter functions are enhanced by the 72-base pair repeat inserted at distant locations and inverted orientations.

Mol. Cell. Biol., 3 : 991-999.

GAYNOR, R.B., and BERK, A.J. (1983).

Cis-acting induction of adenovirus transcription.

Cell, 33 : 689-693.

GAYNOR, R.B., FELDMAN, L.T., and BERK, A.J. (1985).

Viral immediate early proteins activate transcription of class III genes.

Science, 230 : 447-450.

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 : 1193-1197.

GELDERBLOM, H., and MAICHLE-LAUPPE, I. (1982).

The fiber of fowl adenoviruses.

Arch. Virol., 72 : 289-298.

GILARDI, P., and PERRICAUDET, M. (1984).

The E4 transcriptional unit of Ad2 : far upstream sequences are required for its transactivation by E1A.

Nucl. Acids Res., 12 : 7877-7888.

GILARDI, P., and PERRICAUDET, M. (1986).

The E4 promoter of adenovirus type 2 contains an E1A dependant cis-acting element.

Nucl. Acids Res., 14 : 9035-9049.

GINSBERG, H.S., PEREIRA, H.G., VALENTINE, R.C., and WILCOX, W.C. (1966).

A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits.

Virology, 28 : 782-783.

GLENN, G.M., and RICCIARDI, R.P. (1988).

Detailed kinetics of adenovirus type-5 steady-state transcripts during early infection.

Virus Res., 9 : 73-91.

GLUZMAN, Y. (1983).

Maps comparing positions of enhancers and regulatory regions in various genomes. Current Communications in Molecular Biology. Enhancers and Eukaryotic Gene Expression, pp 215-218, ed. par Y. Gluzman and T. Shenk, Cold Spring Harbor Laboratory.

GORMAN, C.M., MOFFART, L.F. and HOWARD, B.H. (1982).

Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl-transferase in mammalian cells.

Mol. Cell. Biol., 2 : 1044-1051.

GRABOWSKI, P.J., SEILER, S.R., and SHARP, P.A. (1985).

A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors.

Cell, 42 : 345-353.

GRAHAM, F.L., SMILEY, J., RUSSELL, W.C., and NAIRN, R. (1977).
Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus
type 5.

J. Gen. Virol., 36 : 59-72.

GRAHAM, F.L., and VAN DER EB, A.J. (1973).

A new technique for the assay infectivity of human adenovirus 5 DNA.

Virology, 52 : 456-467.

GRAND, R.J.A. (1987a).

The structure and functions of the adenovirus early region 1 proteins.

Biochem. J., 241 : 25-38.

GRAND, R.J.A., and GALLIMORE, P.H. (1986).

Modulation of the level of expression of cellular genes in adenovirus 12-infected
and transformed human cells.

EMBO J., 5 : 1253-1260.

GRAND, R.J.A., SMITH, K.J., and GALLIMORE, P.H. (1987b).

Evidence for the expression of protein IX in some rat cells transformed with
adenovirus type 12 early region 1 DNA.

J. Gen. Virol., 68 : 2471-2476.

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.

Curr. Top. Microbiol. Immunol., 109 : 167-192.

GREEN, M., PINA, M., KIMES, R.C., WENSINK, P.C., MACHATTIE, L.A.,
and THOMAS, C.A., Jr. (1967).

Adenovirus DNA. I. Molecular weight and conformation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 57 : 1302-1309.

GREEN, M., MACKAY, J.K., WOL, W., and RIDGEN, P. (1979).

Thirty-one human adenovirus serotypes (Ad1-Ad31) form five groups (A-E)
based on upon DNA genome homologies.

Virology, 93 : 481-492.

GREEN, M., and PINA, A. (1963).

Similarity of DNAs isolated from tumor-inducing viruses of human and animal origin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 50 : 44-46.

GREEN, M.R., TREISMAN, R., and MANIATIS, T. (1983).

Transcriptional activation of cloned human β -globin genes by viral immediate-early gene products.

Cell, 35 : 137-145.

GROSSCHEDL, R., and BIRNSTIEL, M.L. (1980).

Identification of regulatory sequences in the prelude sequences of H2A histone gene by the study of specific deletion mutants in vivo.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 1432-1436.

GRUSS, P., DHAR, R., and KHOURY, G. (1981).

Simian virus 40 tandem repeated sequences as an element of the early promoter.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 : 943-947.

GUARENTE, L. (1988).

UASs and enhancers : common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals.

Cell, 52 : 303-305.

GUGGENHEIMER, R.A., STILLMAN, B.W., NAGATA, K., TAMANOI, F., and HURTWITZ, J. (1984).

DNA sequences required for the in vitro replication of adenovirus DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 : 3069-3073.

HALBERT, D.N., CUTT, J.R., and SHENK, T. (1985).

Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff.

J. Virol., 56 : 250-257.

HANDA, H., KINGSTON, R.E., and SHARP, P.A. (1983).

Inhibition of adenovirus early region 4 transcription in vitro by a purified viral DNA binding protein.

Nature, 302 : 545-547.

HARLOW, E., FRANZA, B.R., and SCHLEY, C. (1985).

Monoclonal antibodies specific for adenovirus early region 1A proteins : extensive heterogeneity in early region 1A products.

J. Virol., 55 : 533-546.

HARPST, J.A., ENNEVER, J.F., and RUSSELL, W.C. (1977).

Physical properties of nucleoprotein cores from adenovirus type 5.

Nucl. Acids Res., 4 : 477-490.

HARTER, M., and LEWIS, J.B. (1978).

Adenovirus type 2 early proteins synthesized in vitro and in vivo : identification in infected cells of the 38,000 to 50,000 molecular weight protein encoded by the left end of the adenovirus type 2 genome.

J. Virol., 26 : 736 -749.

HASHIMOTO, S., PURSLEY, M.H., and GREEN, M. (1981).

Nucleotide sequences and mapping of novel heterogenous 5'-termini of adenovirus 2 early region 4 mRNA.

Nucl. Acids Res., 9 : 1675-1689.

HEARING, P., and SHENK, T. (1983a).

The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element.

Cell, 33 : 695-703.

HEARING, P., and SHENK, T. (1983b).

Functional analysis of the nucleotide sequence surrounding the cap site for adenovirus type 5 region E1A messenger.

J. Mol. Biol., 167 : 809-822.

HEARING, P., and SHENK, T. (1985).

Sequence-independent autoregulation of the adenovirus type 5 E1A transcription unit.

Mol. Cell. Biol., 5 : 3214-3221.

HEARING, P., and SHENK, T. (1986).

The adenovirus type 5 enhancer contains two functionally distinct domains : one is specific for E1A and the other modulates transcription of all early units in cis.

Cell, 45 : 229-236.

HEN, R., BORRELLI, E., and CHAMBON, P. (1985).

Repression of the immunoglobulin heavy chain enhancer by the adenovirus-2 E1A products.

Science, 230 : 1391-1394.

HEN, R., BORRELLI, E., FROMENTAL, C., SASSONE-CORSI, P., and CHAMBON, P. (1986).

A mutated polyoma virus enhancer which is active in undifferentiated embryonal carcinoma cells is not repressed by adenovirus-2 E1A products.

Nature, 321 : 249-251.

HEN, R., BORRELLI, E., 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 : 8747-8761.

HEN, R., SASSONE-CORSI, P., CORDEN, J., GAUB, M.P., and CHAMBON, P. (1982).

Sequences upstream from the TATA box are required in vivo and in vitro for efficient transcription from the adenovirus serotype 2 major late promoter.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 : 7132-7136.

HERISSE, J., COURTOIS, G., and GALIBERT, F. (1980).

Nucleotide sequence of the EcoRI D fragment of adenovirus 2 genome.

Nucl. Acids Res., 8 : 2173-2191.

HERRMANN, C.H., DERY, C.V., and MATHEWS, M.B. (1987).

Transactivation of host and viral genes by the adenovirus E1B 19K tumor antigen.

Oncogene, 2 : 25-35.

HILLEMANN, M.R., and WERNER, J.H. (1954).

Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 85 : 183-188.

HOLMES, D.S., and QUIGLEY, M. (1981).

A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.

Anal. Biochem., 114 : 193.

HORNE, R.W., BRENNER, S., WATERSON, A.P., and WILBY, P. (1959).
The icosahedral form of an adenovirus.

J. Mol. Biol., 1 : 84-86.

HORWITZ, M.S. (1978).

Temperature-sensitive replication of H5 ts 125 adenovirus DNA in vitro.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 : 4291-4295.

HORWITZ, M.S., SCHARFF, 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 : 682-694.

HOSAKAWA, K., and SUNG, M.T. (1976).

Isolation and characterization of an extremely basic protein from adenovirus type 5.

J. Virol., 17 : 924-934.

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 : 537-550.

HUEBNER, R.J. (1967).

Adenovirus-directed tumor and T antigens.

Pollard M. (Ed.) Perspectives in Virology, 5 : 147-166.

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 : 2051-2058.

HUEBNER, R.J., ROWE, W.P., WARD, T.G., PARROTT, R.H., and BELL, J.A. (1954).

Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents. A newly recognized group of common viruses of the respiratory system.

New Engl. J. Med., 251 : 1077-1086.

IHARA, S., FELDMAN, L., WATANABE, S., and BEN-PORAT, T. (1983).
Characterization of the immediate-early functions of pseudorabies virus.
Virology, 131 : 437-454.

IMPERIALE, M.J., FELDMAN, L.T., and NEVINS, J.R. (1983).
Activation of gene expression by adenovirus and herpes virus regulatory genes
acting in trans and by a cis-acting adenovirus enhancer element.
Cell, 35 : 127-136.

IMPERIALE, M.J., KAO, H.T., FELDMAN, L.T., NEVINS, J.R. and
STRICKLAND, S. (1984a).
Common control of the heat shock gene and early adenovirus genes : evidence
for a cellular E1A-like activity.
Mol. Cell. Biol., 4 : 867-874.

IMPERIALE, M.J., and NEVINS, J.R. (1984b).
Adenovirus 5 E2 transcription unit : an E1A-inducible promoter with an
essential element that functions independently of position or orientation.
Mol. Cell. Biol., 4 : 875-882.

JOICHEMSEN, A.G., BOS, J.L., and VAN DER EB, A.J. (1984).
The first exon of region E1A genes of adenovirus 5 and 12 encodes a separate
functional protein domain.
EMBO J., 3 : 2923-2927.

JONES, N., and SHENK, T. (1979).
An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early
viral genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 : 3665-3669.

JORNVALL, H., AKUSJARVI, G., ALESTROM, P., VAN BAHR-LINDSTROM,
H., PETTERSSON, U., APELLA, E., FOWLER, A.V., and PHILIPSON, L.
(1981).
The adenovirus hexon protein : the primary structure of the polypeptide and
its correlation with the hexon gene.
J. Biol. Chem., 256 : 6181-6186.

KACZMAREK, L., FERGUSON, B., ROSENBERG, M., and BASERGA, R. (1986).
Induction of cellular DNA synthesis by purified adenovirus E1A proteins.
Virology, 152 : 1-10.

KAHN, A. (1987).
ADN, protéines et transcription.
Médecine/Sciences, 3 : 487-489.

KÄMPE, O., BELLGRAM, D., HAMMERLING, U., LIND, P., PÅABO, S.,
SEVERINSSON, L., and PETERSON, P.A. (1983).
Complex formation of class I transplantation antigens and a viral glycoprotein.
J. Biol. Chem., 258, 10594-10598.

KAO, H.T., and NEVINS, J.R. (1983).
Transcriptional activation and subsequent control of the human heat shock gene
during adenovirus infection.
Mol. Cell. Biol., 3 : 2058-2065.

KIMELMAN, D., LUCHER, L.A., BRACKMANN, K.H., SYMINGTON, J.S.,
PTASHNE, M., and GREEN, M. (1984).
Synthesis in Escherichia coli of human adenoviruses type 12 transforming
proteins encoded by early region 1A 13S mRNA and 12S mRNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 : 6300-6304.

KIMELMAN, D., MILLER, J.S., PORTER, D., and ROBERTS, B.E. (1985).
E1A regions of the human adenovirus and of the highly oncogenic simian
adenovirus 7 are closely related.
J. Virol., 53 : 399-409.

KINGSTON, R.E., BALDWIN, A.S., and SHARP, P.A. (1985).
Transcription control by oncogenes.
Cell, 41 : 3-5.

KLESSIG, D.F., RICE, S.A., CLEGHON, V., BROUGH, D.E., WILLIAMS, J.F.,
and VOELKERDING, C. (1986).
Studies on the adenovirus DNA-binding protein. Cancer Cells. DNA Tumor
Viruses, Control of Genes Expression and Replication, pp 485-496, ed. par M.
Botchan, T. Grodzicker and P.A. Sharp, Cold Spring Harbor Laboratory.

KO, J.L., and HARTER, M.L. (1984).

Plasmid-directed synthesis of genuine adenovirus 2 early-region 1A and 1B protein in Escherichia coli.

Mol. Cell. Biol., 4 : 1427-1439.

KO, J.L., DALIE, B.L., GOLDMAN, E., and HARTER, M.L. (1986).

Adenovirus-2 early region 1A protein synthesized in Escherichia coli extracts indirectly associates with DNA.

EMBO J., 5 : 1645-1651.

KOVESDI, I., REICHEL, R., and NEVINS, J.R. (1986).

E1A transcription induction : enhanced binding of a factor to upstream promoter sequences.

Science, 231 : 719-722.

KOVESDI, I., REICHEL, R., and NEVINS, J.R. (1987).

Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 2180-2184.

KRAINER, A.R., and MANIATIS, B. (1985).

Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA spliced in vitro.

Cell, 42 : 725-736.

KRIPPL, B., FERGUSON, B., JONES, N., ROSENBERG, M., and WESTPHAL, H. (1985).

Mapping of functional domains in adenovirus E1A proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 7480-7484.

KRIPPL, B., FERGUSON, B., ROSENBERG, M., and WESTPHAL, H. (1984).

Functions of purified E1A proteins microinjected into mammalian cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 : 6988-6992.

KRUIJER, W., NICOLAS, J.C., VAN SCHAİK, F.M.A., and SUSSENBACH, J.S. (1983).

Structure and function of DNA binding proteins from revertants of adenovirus type 5 mutants with a temperature sensitive DNA replication.

Virology, 124 : 425-433.

KRUIJER, W., VAN SCHAIK, F.M.A., and SUSSENBACH, J.S. (1981).
Structure and organization of the gene coding for the DNA binding protein of
adenovirus type 5.

Nucl. Acids Res., 9 : 4439-4457.

KRUIJER, W., VAN SCHAIK, F.M.A., and SUSSENBACH, J.S. (1982).
Nucleotide sequence of the gene encoding adenovirus type 2 DNA-binding
protein.

Nucl. Acids Res., 10 : 4493-4500.

KUPPUSWAMY, M.N., and CHINNADURAI, G. (1987).
Relationship between the transforming and transcriptional regulatory functions
of adenovirus 2 E1A oncogene.

Virology, 159 : 31-38.

LAIMINS, L.A., KESSEL, M., ROSENTHAL, N., and KHOMY, G. (1983).
Viral and cellular enhancer elements. Current Communications in Molecular
Biology. Enhancers and Eukaryotic Gene Expression, pp 28-37, ed. par Y.
Gluzman and T. Shenk, Cold Spring Harbor Laboratory.

LAIMINS, L.A., KHOURY, G., GORMAN, C., HOWARD, B, and GRUSS, P.
(1982).

Host-specific activation of transcription by tandem repeats from simian virus 40
and moloney murine sarcoma virus.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 : 6453-6457.

LARSEN, P.L., MC GRANE, M.M., ROBINSON, C.C., and TIBBETTS, C.
(1986).

An E1A mutant of adenovirus type 3 : Ad3 hr 15 has reiterated DNA sequences
5' to its E1A gene.

Virology, 155 : 148-159.

LAVER, W.G., PEREIRA, H.G., RUSSELL, W.C. and VALENTINE, R.C. (1968).
Isolation of an internal component of adenovirus type 5.

J. Mol. Biol., 37 : 379-386.

LECHNER, R.L., and KELLY, T.J. (1977).

The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules.

Cell, 12 : 1007-1020.

LEE, K.A.W., and GREEN, M.R. (1987).

A cellular transcription factor E4F1 interacts with an E1A-inducible enhancer and mediates constitutive enhancer function in vitro.

EMBO J., 6 : 1345-1353.

LEFF, T., ELKAIM, R., GODING, C.R., JALINOT, P., SASSONE-CORSI, P., PERRICAUDET, M., KEDINGER, C., and CHAMBON, P. (1984).

Individual products of the adenovirus 12S and 13S E1A mRNAs stimulate viral E1a and E1b expression at the transcriptional level.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 : 4381-4385.

LEITE, J.P.G., NIEL, C., and D'HALLUIN, J.C. (1986).

Expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in human cells under the control of early adenovirus subgroup C promoters : effect of E1A gene products from other subgroups on gene expression.

Gene, 41 : 207-215.

LEMAY, P., and BOULANGER, P. (1980).

Physicochemical characteristics of structural and non structural proteins of human adenovirus 2.

Ann. Virol., 131 : 259-275.



LEWIS, J.B., and MATHEWS, M.B. (1981).

Viral messenger RNAs in six lines of adenovirus-transformed cells.

Virology, 115 : 345-360.

LEWIS, A.M., RABSON, A.S., and LEVINE, A.S. (1974).

Studies of non defective adenovirus 2-simian virus 40 hybrid viruses-transformation of hamster kidney cells by adenovirus 2 and the nondefective hybrid viruses.

J. Virol., 13 : 1291-1301.

LILLIE, J.W., GREEN, M., and GREEN, M.R. (1986).

An adenovirus E1A protein region required for transformation and transcriptional repression.

Cell, 46 : 1043-1051.

LILLIE, J.W., LOEWENSTEIN, P.M., GREEN, M.R., and GREEN, M. (1987).
Functional domains of adenovirus type 5 E1A proteins.
Cell, 50 : 1091-1100.

LONBERG-HOLM, K., and PHILIPSON, L. (1969).
Early events of virus-cell interactions in an adenovirus system.
J. Virol., 4 : 323-338.

LOSICK, R., and PERO, J. (1981).
Cascades of sigma factors.
Cell, 25 : 582-584.

LUCAS, J.J., and GINSBERG, H.S. (1971).
Synthesis of virus specific RNA in KB cells infected with Ad2.
J. Virol., 8 : 203-213.

LUCHER, L.A., LOEWENSTEIN, P.M., and GREEN, M. (1985).
Phosphorylation in vitro of Escherichia coli produced 235R and 266R tumor
antigens encoded by human adenovirus type 12 early transformation region 1A.
J. Virol., 56 : 183-193.

LUPKER, J.H., DAVIS, A., JOCHEMSEN, H., and VAN DER EB, A.J. (1981).
In vitro synthesis of adenovirus type 5 antigens. 1. Translation of early region
1 specific RNA from lytically infected cells.
Virology, 37 : 524-529.

LUSKY, M., and BOTCHAN, M. (1981).
Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences.
Nature, 293 : 79-81.

MAIZEL, J.V., Jr., WHITE, D.O., and SHARFF, M.D. (1968).
The polypeptides of adenoviruses. 1. Evidence for multiple protein components
of the virion and a comparison of adenovirus types 2, 7 and 12.
Virology, 36 : 115-125.

MAK, S. (1969).
Transcription and replication of viral deoxyribonucleic acid in cells co-infected
with adenovirus types 2 and 12.
J. Virol., 4 : 651-656.

MALETTE, P., YEE, S.P., and BRANTON, P.E. (1983).

Studies on the phosphorylation of the 58,000 dalton early region E1B protein of human adenovirus type 5.

J. Gen. Virol., 64 : 1069-1078.

MANIATIS, T., GOODBOURN, S., and FISCHER, J.A. (1987).

Regulation of inducible and tissue-specific gene expression.

Science, 236 : 1237-1244.

MATHEWS, M.B. (1975).

Genes for VA-RNA in adenovirus 2.

Cell, 6 : 223-229.

MC DOUGALL, I., and MAUTNER, V. (1987).

An adenovirus type 3 host range variant with mutations in the E1A and E3 early gene regions.

J. Gen. Virol., 68 : 1361-1371.

MCLACHLAN, A.D., and BOSWELL, D.R. (1985).

Confidence limits for homology in protein or gene sequences. The c-myc oncogene and adenovirus E1A protein.

J. Mol. Biol., 185 : 39-49.

MESSING, J., CRONENBORN, B., MÜLLER-HILL, B., and HOFSCHEIDER, P.H. (1977).

Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle : insertion of a HindII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 : 3642-3646.

MONCANY, M.L.J., REVET, B., and GIRARD, M. (1980).

Characterization of a new adenovirus type 5 assembly intermediate.

J. Gen. Virol., 50 : 33-47.

MONTELL, C., COURTOIS, G., ENG, C., and BERK, A. J. (1984).

Complete transformation by adenovirus 2 requires both E1A proteins.

Cell, 36 : 951-961.

MONTELL, C., FISHER, E., CARUTHERS, M., and BERK, A.J. (1982).
Resolving the functions of overlapping viral genes by site-specific mutagenesis
at a mRNA splice site.

Nature, 295 : 380-384.

MORAN, E., ZERLER, B., HARRISON, T.M., and MATHEWS, M.B. (1986).
Identification of separate domains in the adenovirus E1A gene for
immortalization activity and the activation of virus early genes.

Mol. Cell. Biol., 6 : 3470-3480.

MOREAU, P., HEN, R., WASYLYK, B., EVERRETT, R., GAUB, M.P., and
CHAMBON, P. (1981).

The SV40 72 bp repeat has a striking effect on gene expression both in SV40
and other chimeric recombinants.

Nucl. Acids Res., 9 : 6047-6067.

MORGAN, C., ROSENKRANS, 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 : 777-796.

NAGATA, K., GUGGENHEIMER, R.A., ENOMOTO, T., LICHY, J.M., 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 : 6438-6442.

NAGATA, K., GUGGENHEIMER, R.A., and HURWITZ, J. (1983).

Adenovirus DNA replication in vitro : synthesis of full length DNA with
purified proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 : 4266-4270.

NATARAJAN, V., MADDEN, M.J., and SALZMAN, N.P. (1984).

Proximal and distal domains that control in vitro transcription of the adenovirus
IVa2 gene.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 : 6290-6294.

NEVINS, J.R. (1981).

Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product.

Cell, 26 : 213-220.

NEVINS, J.R. (1987).

Regulation of early adenovirus gene expression.

Microb. Reviews, 51 : 419-430.

NEVINS, J.R., GINSBERG, H.S., BLANCHARD, J.M., WILSON, M.C., and DARNELL, J.E. (1979).

Regulation of the primary expression of the early adenovirus transcription units.

J. Virol., 32 : 727-733.

NEVINS, J.R., and WRINKLER, J.J. (1980).

Regulation of early adenovirus transcription : a protein product of early region 2 specifically repress region 4 transcription.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 1893-1897.

NEURATH, A.R., RUBIN, B.A., and STASNY, J.T. (1968).

Cleavage by formamide of intercapsomer bonds in adenovirus type 4 and 7 virions and hemagglutinins.

J. Virol., 2 : 1086-1095.

NICOLAS, J.C., SARNOW, P., GIRARD, M., and LEVINE, A.J. (1983).

Host-range temperature-conditional mutants in the adenovirus DNA binding protein are defective in the assembly of infectious virus.

Virology, 126 : 228-239.

NORRBY, E., MARUSYK, H.L., and HAMMARSKJOLD, M.L. (1969).

The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. V. Identification of antigen specificities available at the surface of virions.

Virology, 38 : 477-482.

NORRBY, E., and SKAARET, P. (1967).

The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. III. Immunological identification of fiber antigen and isolated vertex capsomer antigen.

Virology, 32 : 489-502.

O'MALLEY, R.P., MARIANO, T.M., SIEKIERKA, J., and MATHEWS, M.B. (1986).

A mechanism for the control of protein synthesis by adenovirus VA-RNA I.
Cell, 44 : 391-400.

OSBORNE, T.F., ARVIDSON, D.N., TYAN, 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 : 1293-1305.

OSBORNE, T.F., and BERK, A.J. (1983).

Far upstream initiation sites for adenovirus early region 1A transcription are utilized after the onset of viral DNA replication.

J. Virol., 45 : 594-599.

OSBORNE, T.F., GAYNOR, R.B., and BERK, A.J. (1982).

The TATA homology and the mRNA 5' untranslated sequence are not required for expression of essential adenovirus E1A functions.

Cell, 29 : 139-148.

PADGETT, R.A., GRABOWSKI, P.J., KOWARSKA, M.M., and SHARP, P.A. (1985).

Splicing messenger RNA precursors : branch sites and lariat RNAs.

TIBS, 10 : 154-157.

PARKER, C.S., and TOPOL, J. (1984).

A drosophila RNA polymerase II transcription factor contains a promoter-region-specific DNA-binding activity.

Cell, 36 : 357-369.

PEREIRA, H.G. (1958).

A protein factor responsible for the early cytopathic effect of adenoviruses.

Virology, 6 : 601-611.

PEREIRA, H.G., HUEBNER, R.J., GINSBERG, H.S., and VAN DER VEEN, J. (1963).

A short description of the adenovirus group.

Virology, 20 : 613-620.

PERRICAUDET, M., AKUSJARVI, G., VIRTANEN, A., and PETERSSON, U. (1979).

Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses.

Nature, 281 : 694-696.

PERRICAUDET, M., LE MOULLEC, J.M., and PETERSSON, U. (1980).

The predicted structure of two adenovirus T-antigens.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 3778-3782.

PERSSON, H., JANSSON, M., and PHILIPSON, L. (1980).

Synthesis and genomic site for an adenovirus type 2 early glycoprotein.

J. Mol. Biol., 136 : 375-394.

PETERSON, D.O., BEIFUSS, K.K., and MORLEY, K.L. (1987).

Context-dependent gene expression : cis-acting negative effects of specific prokaryotic plasmid sequences on eukaryotic genes.

Mol. Cell. Biol., 7 : 1563-1567.

PETERSSON, U., and HOGLUND, S. (1969).

Structural protein of adenoviruses. III. Purification and characterization of the adenovirus type 2 penton antigen.

Virology, 39 : 90-106.

PETERSSON, U., VIRTANEN, A., PERRICAUDET, M., and AKUSJARVI, G. (1983).

The messenger RNAs from the transforming region of human adenoviruses.

Curr. Top. Microbiol. Immunol., 109 : 107-123.

PETERSSON, U., and WADELL, G. (1985).

Antigenic structure of the adenoviruses. *Immunochemistry of Viruses. The Basis for Serodiagnosis and Vaccines*, pp 295-319, ed. par M.H.V. van Reggenmortel and A.R. Neurath, Elsevier Sciences Publishers B.V.

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 : 447-451.

QUINLAN, M.P., and GRODZICKER, T. (1987a).

Adenovirus E1A 12S protein induces DNA synthesis and proliferation in primary epithelial cells in both the presence and absence of serum.

J. Virol., 61 : 673-682.

QUINLAN, M.P., SULLIVAN, N., and GRODZICKER, T. (1987b).

Growth factor(s) produced during infection with an adenovirus variant stimulates proliferation of non established epithelial cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 3283-3287.

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 : 5003-5009.

RALSTON, R., and BISHOP, J.M. (1983).

The protein products of the myc and myb oncogenes and adenovirus E1A are structurally related.

Nature, 306 : 803-806.

RAYCHAUDHURI, P., ROONEY, R., and NEVINS, J.R. (1987).

Identification of an E1A-inducible cellular factor that interacts with regulatory sequences within the adenovirus E4 promoter.

EMBO J., 6 : 4073-4081.

RECHSTEINER, M. (1987).

Do myc, fos and E1A function as protein phosphatase inhibitors ?

Bioch. Biophys. Res. Commun., 143 : 194-198.

REICHEL, R., KOVESDI, I., and NEVINS, J.R. (1988).

Activation of a preexisting cellular factor as a basis for adenovirus E1A-mediated transcription control.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 : 387-390.

REICHEL, P.A., MERRICK, W.C., SIEKIERKA, J., and MATHEWS, M.B. (1985).

Regulation of a protein synthesis initiation factor by adenovirus-virus associated RNA I.

Nature, 313 : 196-200.

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 : 283-295.

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. Acad. Sci. USA, 78 : 6121-6125.

RICHTER, J.D., YOUNG, P., JONES, N.C., KRIPPL, B., ROSENBERG, M., and FERGUSON, B. (1985).

A first exon-encoded domain of E1A sufficient for post-translational modification, nuclear-localization, and induction of Adenovirus E3 promoter expression in Xenopus oocytes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 8434-8438.

RIJNDERS, A.W.M., VAN BERGEN, B.G.M., VAN DER VLIET, P.C., and SUSSENBACH, J.S. (1983).

Specific binding of the adenovirus terminal protein precursor. DNA polymerase complex to the origin of DNA replication.

Nucl. Acids Res., 11 : 8777-8789.

ROSEN, L. (1960).

A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses.

Am. J. Hyg., 71 : 120-128.

ROWE, D.T., BRANTON, P.E., YEE, S.P., BACCHETTI, S., and GRAHAM, F.L. (1984).

Establishment and characterization of hamster cell lines transformed by restriction endonuclease fragments of adenovirus 5.

J. Virol., 49 : 162-170.

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.

ROWE, D.T., and GRAHAM, F.L. (1983a).

Transformation of rodent cells by DNA extracted from transformation-defective adenovirus mutants.

J. Virol., 46 : 1039-1044.

ROWE, D.T., GRAHAM, F.L., and BRANTON, P.E. (1983b).

Intracellular localization of adenovirus type 5 tumor antigens in productively infected cells.

Virology, 129 : 456-468.

ROWE, W.P., HUEBNER, R.J., GILMORE, L.K., PARROTT, R.H., and WARD, T.G. (1953).

Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 84 : 570-573.

RUSSELL, W.C., MC INTOSH, K., and SKEHEL, J.J. (1971).

The preparation and properties of adenovirus cores.

J. Gen. Virol., 11 : 35-45.

RUSSELL, W.C., and PRECIOUS, B. (1982).

Nucleic acid binding properties of adenovirus structural polypeptides.

J. Gen. Virol., 63 : 69-79.

SANGER, D., NICKLEN, S., and COULSON, A.R. (1977).

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74 : 5463-5467.

SARNOW, P., HEARING, P., ANDERSON, C.W., REICH, N., and LEVINE, A.J. (1982).

Identification and characterization of an immunologically conserved adenovirus early region 11,000 MW protein and its association with the nuclear matrix.

J. Mol. Biol., 102 : 565-583.

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-dalton protein in productively infected cells.

J. Virol., 49 : 692-700.

SASSONE-CORSI, P., and BORRELLI, E. (1987).

Promoter trans-activation of protooncogenes c-fos and c-myc, but not c-Ha-ras, by products of adenovirus early region 1A.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 6430-6433.

SASSONE-CORSI, P., HEN, R., BORRELLI, E., LEFF, T., and CHAMBON, P. (1983).

Far upstream sequences are required for efficient transcription from the adenovirus-2 E1A transcription unit.

Nucl. Acids Res., 11 : 8735-8745.

SCHNEIDER, J.F., FISHER, F., GODING, C.R., and JONES, N.C. (1987).

Mutational analysis of the adenovirus E1A gene : the role of transcriptional regulation in transformation.

EMBO J., 6 : 2053-2060.

SCHNEIDER, R.J., WEINBERGER, C., and SHENK, T. (1984).

Adenovirus VAI-RNA facilitates the initiation of translation in virus infected cells.

Cell, 37 : 291-298.

SCHRIER, P.I., BERNARDS, R., VAESSEN, R.T.M.J., HOUWELING, A., and VAN DER EB, A.J. (1983).

Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells.

Nature, 305 : 771-775.

SENEAR, A.W., and LEWIS, J.B. (1986).

Morphological transformation of established rodent cell lines by high-level expression of the adenovirus type 2 E1A gene.

Mol. Cell. Biol., 6 : 1253-1260.

SETH, P., FITZGERALD, D., WILLIANGHAM, M., and PASTAN, I. (1986).

Pathway of adenovirus entry into cells. *Virus Attachment and Entry Into Cells*, pp 191-195, ed. par R.L. Crowell and R. Lonberg-Holm, American Society for Microbiology.

SEVERINSSON, L., and PETERSON, P. (1985).

Abrogation of cell surface expression of human class I transplantation antigens by an adenovirus protein in Xenopus laevis oocytes.

J. Cell. Biol., 101 : 540-547.

SHARP, P.A. (1981).

Speculation on RNA splicing.

Cell, 23 : 643-646.

SHARP, P.A. (1984).

Adenovirus transcription. The Adenoviruses, pp 173-204, ed. par H.S. Ginsberg, Plenum press, New York.

SHARP, P.A. (1986).

Analysis of splicing of mRNA precursors in vitro. Cancer Cells. DNA Tumor Viruses. Control on Gene Expression and Replication, pp 245-249, ed. par M. Botchan, T. Grodziecker and P.A. Sharp, Cold Spring Harbor Laboratory.

SHINAGAWA, M., LIDA, Y., MATSUDA, A., TSUKIYAMA, T., and SATO, G. (1987).

Phylogenetic relationships between adenoviruses as inferred from nucleotide sequences of inverted terminal repeats.

Gene, 55 : 85-93.

SHIROKI, K., SEGAWA, K., and SHIMOJO, H. (1980).

Two tumor antigens and their polypeptides in adenovirus type 12-infected and transformed cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 2274-2278.

SHIROKI, K., SHIMOJO, H., SEKIKAWA, K., FUJINAGA, K., RABEK, J., and LEVINE, A.J. (1976).

Suppression of the temperature-sensitive character of adenovirus 12 early mutants in monkey cells transformed by an adenovirus 7 - simian virus 40 hybrid.

Virology, 69 : 431-437.

SINSHEINER, R.L. (1977).

Recombinant DNA.

Ann. Rev. Biochem., 46 : 415-438.

SMART, J.E., LEWIS, J.B., MATHEWS, M.B., HARTER, M.L., and ANDERSON, C.W. (1981).

Adenovirus type 2 early proteins: assignment of the early region 1A proteins synthesized in vivo and in vitro to specific mRNAs.

Virology, 112 : 703-713.

SMART, J.E., and STILLMAN, B.W. (1982).

Adenovirus terminal protein precursor : partial amino acid sequence and the site of covalent linkage to virus DNA.

J. Biol. Chem., 257 : 13499-13505.

SMITH, D.H., KEGLER, D.M., and ZIFF, E.B. (1985).

Vector expression of adenovirus type 5 E1A proteins : evidence for E1A autoregulation.

Mol. Cell. Biol., 5 : 2684-2696.

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 : 585-593.

SOUTHERN, P.J., and BERG, P. (1982).

Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV-40 early promoter.

J. Mol. Appl. Genet., 1 : 327-341.

SPECTOR, D.J., CROSSLAND, L.D., HALBERT, D.N., and RASKAS, H.J. (1980).

A 28 K polypeptide is the translation product of 9S RNA encoded by region 1A of adenovirus 2.

Virology, 102 : 218-221.

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 : 395-414.

SPINDLER, K.R., and BERK, A.J. (1984).

Rapid intracellular turnover of adenovirus 5 early region 1A proteins.

J. Virol., 52 : 706-710.

SPINDLER, K.R., ENG, C.Y., and BERK, A.J. (1985).

An adenovirus early region 1A protein is required for maximal viral DNA replication in growth arrested human cells.

J. Virol., 53 : 742-740.

STABEL, S., ARGOS, P., and PHILIPSON, C. (1985).

The release of growth arrest by microinjection of adenovirus E1A DNA.

EMBO J., 4 : 2329-2336.

STALHANDSKE, P., PERSSON, H., PERRICAUDET, M., PHILIPSON, L., and PETTERSSON, U. (1983).

Structure of three spliced mRNAs from region E3 of adenovirus type 2.

Gene, 22 : 157-165.

STEIN, R., and ZIFF, E.B. (1984).

HeLa cell β -tubulin gene transcription is stimulated by adenovirus 5 in parallel with viral early genes by an E1A-dependant mechanism.

Mol. Cell. Biol., 4 : 2792-2801.

STEPHENS, C., and HARLOW, E. (1987).

Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNAs that encode 30 Kd and 35 Kd proteins.

EMBO J., 6 : 2027-2035.

STILLMAN, B. (1986).

Functions of the adenovirus E1B tumour antigens.

Cancer Surveys, 5 : 389-404.

STILLMAN, B.W., TOP, W.C., and ENGLER, J.A. (1982).

Conserved sequences at the origin of adenovirus DNA replication.

J. Virol., 44 : 530-537.

STRAUSS, 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 : 828-832.

SUBRAMANIAN, S., KUPPUSWAMY, M., NASR, R.J., and CHINNADURAI, G. (1988).

An N-terminal region of adenovirus E1A essential for cell transformation and induction of an epithelial cell growth factor.

Oncogene, 2 : 105-112.

SUNDQUIST, B., EVERITT, E., PHILIPSON, L., and HOGLUND, S. (1973).

Assembly of adenoviruses.

J. Virol., 11 : 449-459.

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 : 47-49.

SVENSSON, C., and AKUSJARVI, G. (1984).

Adenovirus 2 early region 1A stimulates expression of both viral and cellular genes.

EMBO J., 3 : 789-794.

SVENSSON, C., PETTERSSON, U., and AKUSJARVI, G. (1983).

Splicing of adenovirus 2 early region 1A mRNAs is non-sequential.

J. Mol. Biol., 165 : 475-479.

TAKIFF, H.E., STRAUS, S.E., and GARON, C.F. (1981).

Propagation an in vitro studies of previously non-cultivable enteral adenoviruses in 293 cells.

Lancet, 2 : 832-834.

TATE, V.E., and PHILIPSON, L. (1979).

Parental adenovirus DNA accumulates in nucleosome-like structures in infected cells.

Nucl. Acids Res., 6 : 2769-2785.

THIEL, J.F., and SMITH, K.O. (1967).

Fluorescent focus assay of viruses on monolayers in plastic petri dishes.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 125 : 892-895.

THIMMAPAYA, B., WEINBERGER, C., SCHNEIDER, R.J., and SHENK, T. (1982).

Adenovirus VA I RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection.

Cell, 31 : 543-551.

THOMAS, P.S. (1980).

Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 5201-5205.

TIBBETTS, C., LARSEN, P.L., and JONES, S.N. (1986).

Autoregulation of adenovirus E1A gene expression.

J. Virol., 57 : 1055-1064.

TIGGES, M.A., and RASKAS, H.J. (1982).

Expression of adenovirus 2 early region E4 : assignment of the early region 4 polypeptides to their respective mRNAs, using in vitro translation.

J. Virol., 44 : 907-921.

TOOZE, J. (1980).

Nucleotide sequence and analysis of groups A, B and C adenoviruses. DNA Tumor Viruses, pp 923-949, ed. par J. Tooze, Cold Spring Harbor Laboratory.

TREISMAN, R., GREEN, M.R., and MANIATIS, T. (1983).

Cis and trans activation of globin gene transcription in transient assays.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 : 7428-7432.

TRENTIN, J.J., YOSHIRO, Y., and GRANT, T. (1962).

The quest for human cancer viruses.

Science, 137 : 835-841.

TSUKAMOTO, A.S., FERGUSON, B., ROSENBERG, M., WEISSMAN, I.L., and BERK, A.J. (1986a).

An immunodominant domain in adenovirus type 2 early region 1A proteins.

J. Virol., 60 : 312-316.

TSUKAMOTO, A.S., PONTICELLI, A., BERK, A.J. and GAYNOR, R.B. (1986b).

Genetic mapping of a major site of phosphorylation in adenovirus type 2 E1A proteins.

J. Virol., 59 : 14-22.

UHLEN, M., SVENSSON, M., JOSEPHSON, S., ALESTROM, P., CHATTOPA-DHYAYA, J.B., PETTERSSON, U., and PHILIPSON, L. (1982).

Leader arrangement in the adenovirus fiber mRNA.

EMBO J., 1 : 249-254.

ULFENDAHL, P.J., LINDER, S., KREIVI, J.P., NORDQUIST, K., SEVENSSON, C., HULTBERG, H. and AKUSJÄRVI, G. (1987).

A novel adenovirus-2 E1A mRNA encoding a protein with transcription activation properties.

EMBO J., 6 : 2037-2044.

VALENTINE, R.C., and PEREIRA, H.G. (1965).

Antigens and structure of the adenovirus.

J. Mol. Biol., 13 : 13-20.

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 : 377-390.

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 : 242-246.

VAN DER EB, A.J., VAN KESTEREN, L.W., and VAN BRUGGEN, E.F.J. (1969).

Structural properties of adenovirus DNAs.

Biochem. Biophys. Acta, 182 : 530-541.

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 : 415-426.

- 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 : 98-110.
- VAN OOSTRUM, J. and BURNETT, R.M. (1985).
Molecular composition of the adenovirus type 2 virion.
J. Virol., 56 : 439-448.
- 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 : 299-309.
- VAYDA, M.E., LEONE, K., and FLINT, S.J. (1983).
The structure of nucleoprotein cores released from Ad2.
Nucl. Acids Res., 11 : 441-460.
- VELCICH, A., and ZIFF, E. (1985).
Adenovirus E1A proteins repress transcription from the SV40 early promoter.
Cell, 40 : 705-716.
- VIRTANEN, A., and PETTERSSON, U. (1983).
The molecular structure of the 9S mRNA from early region 1A of adenovirus serotype 2.
J. Mol. Biol., 165 : 496-499.
- WADELL, G. (1978).
Classification of human adenoviruses by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of structural polypeptides.
Intervirology, 11 : 47-57.
- WADELL, G. (1984).
Molecular epidemiology of human adenovirus.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 110 : 191-220.
- WADELL, G., HAMMARSKJOLD, M.L., WINBERG, G., VERSANYL, T.M., and SUNDELL, G. (1980).
Genetic variability of adenoviruses.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 354 : 16-42.

WEEKS, D.L., and JONES, N.C. (1983).

E1A control of gene expression is mediated by sequences 5' to the transcriptional starts of the early viral genes.

Mol. Cell. Biol., 7 : 1222-1234.

WEINBERG, D.H., and KETNER, G. (1986).

Adenoviral early region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression.

J. Virol., 57 : 833-838.

WEINMAN, 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 : 3426-3430.

WEITHER, H., KONIG, M., and GRUSS, P. (1983).

Multiple point mutations affecting the simian virus 40 enhancer.

Science, 219 : 626-631.

WHITE, E., FAHA, B., and STILLMAN, B. (1986).

Regulation of adenovirus gene expression in human WI38 cells by an E1B-encoded tumor antigen.

Mol. Cell. Biol., 6 : 3763-3773.

WIGAND, R., ADRIAN, T., and BRICOUT, F. (1987).

A new human adenovirus of subgenus D : candidate adenovirus type 42.

Arch. Virol., 94 : 283-286.

WIGAND, A., BARTHA, A., DREIZIN, R.S., ESCHE, H., GINSBERG, H.S., GREEN, M., HIERHOLZER, J.C., KALTER, S.S., MC FERRAN, J.B., PETTERSSON, U., RUSSEL, W.C., and WADELL, G. (1982).

Adenoviridae, second report.

Intervirology, 18 : 169-177.

WILLCOX, N., and MAUTNER, V. (1976).

Antigenic determinants of adenovirus capsids. I. Measurement of antibody cross-reactivity.

J. Immunol., 116 : 25-29.

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.

WILSON, M.C., and DARNELL, J.E., Jr. (1981).

Control of mRNA concentration by differential cytoplasmic half-life : adenovirus mRNAs from transcription units 1A and 1B.

J. Mol. Biol., 148 : 231-251.

WINBERG, C., and SHENK, T. (1984).

Dissection of overlapping functions within the adenovirus type 5 E1A gene.

EMBO J., 3 : 1907-1912.

WOLFSON, J., and DRESSLER, D. (1972).

Adenovirus DNA contains an inverted terminal redundancy.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64 : 3054-3057.

WU, L., ROSSER, D.S.E., SCHMIDT, M.C. and BERK, A.J. (1987).

A TATA box implicated in E1A transcriptional activation of a simple adenovirus 2 promoter.

Nature, 326 : 512-515.

YOUNGHUSBAND, H.B., and MAUNDRELL, K. (1982).

Adenovirus DNA is associated with the nuclear matrix of infected cells.

J. Virol., 43 : 705-713.

ZAJCHOWSKI, D.A., BOEUF, H., and KEDINGER, C. (1987).

E1A inducibility of the adenoviral early E2A promoter is determined by specific combinations of sequence elements.

Gene, 58 : 243-256.

ZERLER, B., ROBERTS, R.J., MATHEWS, M.B., and MORAN, E. (1987).

Different functional domains of the adenovirus E1A gene are involved in regulation of host cell cycle products.

Mol. Cell. Biol., 7 : 821-829.

ANNEXE 1

Gene. 41 (1986) 207-215
Elsevier

GENE 1515

Expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in human cells under the control of early adenovirus subgroup C promoters: effect of E1A gene products from other subgroups on gene expression

(Recombinant DNA; enhancers; interserotypic transdominance; plasmid vectors)

J.P.G. Leite*, C. Niel and J.C. D'Halluin**

Laboratoire de Virologie Moléculaire de l'INSERM, U. 233, Place de Verdun, F-59045 Lille (France) Tel. 20-53-41-23

(Received July 28th, 1985)

(Accepted November 5th, 1985)

SUMMARY

A hierarchy of dominance has been observed in HeLa cells co-infected with two serotypes of adenovirus belonging to different subgroups. DNA replication and late protein synthesis of one serotype are inhibited by those of the other. The degree of inhibitory effect has the following decreasing order: adenovirus type 3 (Ad3) and Ad7 (subgroup B), Ad9 (D), Ad4 (E), Ad12 (A), Ad2 and Ad5 (C) [Delsert and D'Halluin, *Virus Res.* 1 (1984) 365-380].

HeLa cells were first transfected with recombinant plasmids carrying Ad5 E2A or E3 promoters fused to the chloramphenicol acetyl transferase gene (*cat*), and then infected with human Ad belonging to different subgroups. All the serotypes tested were found to be able to stimulate both E2A and E3 promoters. When HeLa cells were co-transfected with either of the previous plasmids, plus a second plasmid carrying the Ad3 E1A region, the same stimulatory effect was observed. However, an inhibitory effect on Ad5 E2A and E3 promoters seemed to occur when both Ad2 E1A (subgroup C) and Ad3 E1A (subgroup B) genes were present together.

To determine which one of the early products was responsible for the observed repression effect, and to assign the target on the genome of subgroup C Ad, a plasmid was constructed in which the sequences at the 5' end of the Ad2 E1A region were fused to the structural sequences of the *cat* gene. In HeLa cells transfected with this plasmid, CAT activity was significantly increased after co-transfection with a plasmid carrying the Ad2 E1A region, but decreased with a plasmid carrying the Ad3 E1A region.

This suggests that some product of the Ad3 E1A genes represses the Ad2 E1A promoter region, but is capable of stimulating the Ad5 E2A and E3 promoters in the absence of Ad2 E1A gene products.

* Permanent address: Department of Virology, Instituto Oswaldo Cruz, Caixa Postal 926, Av. Brasil 4365, 21040 - Manguinhos, Rio de Janeiro (Brazil) Tel. (021) 270 63 97.

** To whom correspondence and reprint requests should be addressed.

Abbreviations: aa, amino acid(s); Ac-CoA, acetyl coenzyme A; Ac-Cm, acetyl chloramphenicol; Ad, adenovirus; CAT, Cm acetyl transferase; Cm, chloramphenicol; E1, E2, E3, early mRNAs of Ad; EtdBr, ethidium bromide; m.u., map units; nt, nucleotide(s); pfu, plaque-forming unit(s); VA, viral associated.

INTRODUCTION

At early times during productive infection with Ad2, before the onset of viral DNA replication, five separate regions of the viral genome are transcribed. E1A is the first region to be expressed, followed by E1B, E3, E2A and E4 (Nevins et al., 1979). Positive and negative regulations between the early regions of

Ad have been described (for reviews, see Sharp, 1984; Kingston et al., 1985). Early region 1A encodes multifunctional products. Two mRNAs (12S and 13S), resulting from differential splicing during RNA processing, are produced by early region 1A early during infection (Berk and Sharp, 1978; Chow et al., 1979; Kitchingman and Westphal, 1980). They code for two proteins of 243 and 289 aa, respectively (Perricaudet et al., 1979) which have their N- and C-terminal portions in common. A functional role has been assigned to the product encoded by the 13S E1A mRNA in the activation of transcription of other early regions (Berk et al., 1979; Carlock and Jones, 1981; Ricciardi et al., 1981; Montell et al., 1982; Leff et al., 1984; Ferguson et al., 1984; Rossini, 1983) and in the activation of transcription of some cellular genes (Nevins, 1982; Kao and Nevins, 1983; Curtois and Berk, 1984).

The mechanism by which transcription of the early regions is activated is poorly understood. The E1A products might catalyse the assembly of stable transcriptional complexes (Gaynor and Berk, 1983). This activation requires specific nucleotide sequences upstream from the TATA box of E2A (Imperiale and Nevins, 1984; Weeks and Jones, 1983; Kingston et al., 1984), E3 (Elkaim et al., 1983; Leff et al., 1985) and E4 (Gilardi and Perricaudet, 1984). Recently, the repression by E1A gene products of enhancer-induced stimulation of transcription has been reported (Borrelli et al., 1984). This repression probably involves an interaction between the enhancer elements and (a) *trans*-acting factor(s), possibly the E1A products themselves. E1A products also repress the activity of the SV40 and polyoma enhancers (Borrelli et al., 1984; Velcich and Ziff, 1985). The E1A 12S mRNA product represses the late promoter region of the DNA-binding protein (Guilfoyle et al., 1985) encoded by the early region E2A and required for DNA replication (Van der Vliet et al., 1975).

At early times after infection, the predominant promoter for the E2A gene lies at 75 m.u. (Berk and Sharp, 1977; Kitchingman et al., 1977; Evans et al., 1977; Chow et al., 1979), and at intermediate and late times, the majority of cap sites map at 72 m.u. Two other mRNAs (E2B) coding for the DNA polymerase and the terminal protein precursor are initiated at this later promoter (Chow et al., 1979).

Adenoviruses belonging to oncogenic subgroups A and B fail to replicate their DNA in simian CV1 cells, whereas DNA replication occurs for all the other subgroups (Delsert and D'Halluin, 1984). Coinfection of CV1 cells with Ad2ND1 and Ad3 (or Ad31) results in the inhibition of any viral DNA synthesis. In human cell lines co-infected with Ad2 and Ad3, a dominant, inhibitory effect of Ad3 over Ad2 is observed, no Ad2 DNA is replicated and no Ad2 particles are assembled. This effect requires viral early functions (Delsert and D'Halluin, 1984).

As a tool to dissect Ad3 functions responsible for this inhibitory effect and to assign the targets on the Ad2 genome, we have fused Ad2 (or Ad5) early control regions to the *cat* gene and studied the CAT activity in transfected HeLa cells in the presence and in the absence of E1A gene products of Ad2 and/or Ad3. The experiments described here indicate that the Ad3 E1A gene products repress the Ad2 E1A promoter region but stimulate E2A and E3 promoters of Ad5 in the absence of Ad2 E1A gene products.

MATERIALS AND METHODS

(a) Human cells and viruses

Monolayers of HeLa, originally obtained from J. Williams (Carnegie Mellon Institute, Pittsburgh), were grown in Dulbecco's medium (Gibco) supplemented with 5% newborn calf serum. Human Ad2 and Ad5 were obtained from J. Williams, types 9 and 12 from J.C. Nicolas (Hôpital Trousseau, Paris), and types 3 and 4 from R. Marusyk (Edmonton, Canada). Stocks of Ad were prepared and titrated as described elsewhere (D'Halluin et al., 1978). Viral DNA was extracted from Ad particles by protease treatment and purified in CsCl gradient (D'Halluin et al., 1978).

(b) Materials

Plasmid pBR325 was supplied by Boehringer, Mannheim. Plasmids pSV2cat (Gorman et al., 1982), HE4 (Stow, 1981) and XD-7 (Pearson, 1983) were kindly provided by Dr. Gorman, Dr. Stow and Dr. Corden, respectively. Restriction endonucleases,

T4 DNA ligase and BAL 31 nuclease were purchased from Boehringer or from Bethesda Research Laboratories. [^{14}C]Cm (40 mCi/mmol) was obtained from New England Nuclear. Chromatography of Ac-Cm was carried out on silica gel sheets (Merck) without fluorescent indicator. The linker, 5'-P-d(CAAGCTTG)-3' was purchased from P.L. Biochemicals, Inc.

All plasmids were amplified in *Escherichia coli* HB101, cells were lysed by the lysozyme-EDTA procedure and plasmids were purified by a CsCl-EtdBr ultracentrifugation (Radloff et al., 1967).

(c) Nucleotide sequencing

The method used was the chain-termination method (Messing et al., 1977; Sanger et al., 1977).

The *Eco*RI-*Hind*III restriction fragment of p2E1Acat was subcloned into phage M13mp18 DNA. The sequence of the first nucleotides following the *Hind*III linker allowed us to determine the length of fragment of Ad2 DNA present in plasmid p2E1Acat.

(d) Human cells transfection

All transfections were carried out by using the calcium phosphate coprecipitation technique (Graham and Van der Eb, 1973). Plasmid DNA (10–20 μg) and KB cell DNA (5–20 μg) were precipitated by 0.12 M CaCl_2 . The precipitate was allowed to form at room temperature for 20 min and was then added directly to each 60-mm plate of cells at 70% confluence. After 30 min of incubation at room temperature, 5 ml of Dulbecco medium supplemented with 5% newborn calf serum was added and incubation was continued for 5 h at 37°C. The medium was replaced with fresh medium and the cells were harvested 40 h after transfection.

RESULTS AND DISCUSSION

(a) Expression of *CAT* gene fused to the E2A and E3 control regions

The ability to construct chimeric genes in which the regulatory region of one gene is fused to the

structural sequences of a second depends on knowing the nucleotide sequence at the 5' end of the gene of interest, especially the transcription initiation site. Consequently, we fused the 5' control regions of the Ad early genes E2A and E3 to the structural sequence encoding the bacterial *CAT* enzyme. The activity of this enzyme can be readily assayed after transient expression of the *cat* plasmids in mammalian cells (Gorman et al., 1982; Weeks and Jones, 1983). The construction of chimeric genes in which expression of the *cat* sequence is controlled by elements at the 5' end of the viral E2A or E3 region is described and shown in Fig. 1.

To determine if the Ad2 E1A gene products can stimulate *in trans* the *cat* gene expression under the E2A or E3 control regions, p5E2Acat and p5E3cat were transfected into HeLa cells in the absence or presence of plasmid HE4 (Stow, 1981) containing the Ad2 E1A region. The expression of the chimeric gene can be readily measured by determining the proportion of Cm converted to the acetylated form. At 40 h after transfection, cell extracts were prepared and assayed for *CAT* activity as described in Table I. HeLa cells transfected with the E2A early promoter-*cat* chimeric plasmid (p5E2Acat) showed a low level of *CAT* activity. This activity was elevated eight-fold in cells co-transfected with plasmid HE4 containing the E1A region. Similar results (six-fold increase) were obtained with p5E3cat and HE4. In this latter case, the *CAT* activity appeared to attain a higher level than with p5E2Acat.

Transfections with plasmids containing the E1A region (p2E1AE2Acat and p2E1AE3cat) resulted in 19-fold and 15-fold stimulations of *CAT* activity for E2A and E3, respectively.

These results suggested that E1A genes and their control region could stimulate E2A and E3 promoters in two different ways, i.e., by a *trans*-acting and *cis*-acting modes.

(b) Stimulation of the expression of the *cat* gene under the control of Ad5 E2A and E3 promoters after infection by adenoviruses belonging to different subgroups

An effect of transdominance has been observed in HeLa cells co-infected with Ad belonging to two different subgroups. This effect provokes a strong inhibition of the Ad DNA replication of one of the

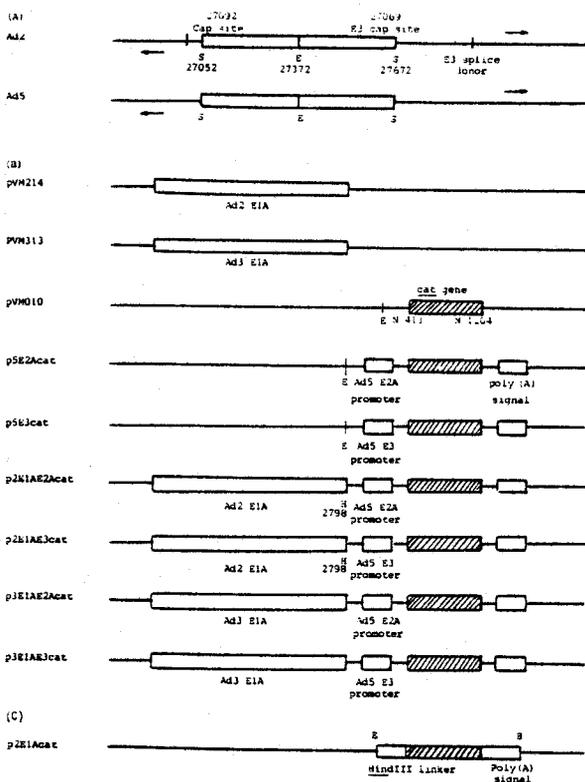


Fig. 1. Structure of the subgroup C Ad E2A and E3 promoters and of the recombinant plasmids. (A) Early region of the Ad5 and the closely related Ad2 genomes. Arrows specify the orientation of the transcription. The numbering of nt is that of Ad2. (B) Recombinant plasmids used in this study. Plasmid pVM214 contains the Ad2 HindIII-G fragment (0–7.8 m.u.) cloned between the EcoRI and HindIII sites of pKH47. The Ad3 E1A

region (0–4.5 m.u.) was cloned in the same vector and named pVM313. The *TaqI*-C fragment of plasmid pBR325 which contains the *cat* gene was inserted between nt 413 and 1204 of pBR322 after complete digestion of this plasmid by *NarI*. The recombinant plasmid was named pVM010. Early E2A and E3 promoters from Ad5 were then placed upstream from the *cat* gene: *EcoRI* site-containing *Sau3A* fragments from pVM504 (E2A) and pVM503 (E3) (D'Halluin et al., 1984) were cloned into the *BamHI* site of pVM010 in the desired orientation. In a second step, a *PvuII* fragment of Ad5 DNA containing the polyadenylation signal of E1B region (nt 3966–4874) was inserted into the *PvuII* site of the previous plasmids at the 3' end of the *cat* gene. The resulting plasmids were named p5E2Acac and p5E3cat. Plasmids p2E1AE2Acac and p2E1AE3cat were constructed by cloning the entire E1A region of Ad2 from pVM214 upstream from the *cat* transcription unit of plasmids p5E2Acac and p5E3cat, respectively. In a similar manner p3E1AE2Acac and p3E1AE3cat were obtained by addition of Ad3E1A region from pVM313. The hatched boxes represent the bacterial *cat* gene, the open boxes represent segments of the adenovirus genome. The lines represent pKH47 sequences. E, *EcoRI*; N, *NarI*; H, *HindIII*; S, *Sau3A*. (C) Plasmid p2E1Acat contains the *cat* gene downstream from the E1A promoter region of Ad2. It was constructed from the pVM 205, a pKH47 derivative containing the Ad2 DNA left-hand end (0–2.6 m.u.). The pVM 205 was cut by *HindIII* + *BamHI* and then digested by nuclease BAL 31. *HindIII* linker was added before recircularization. A plasmid containing the E1A cap site (nt 498) but devoid of the initiation triplet of E1A proteins (nt 559) was selected by the technique of Holmes and Quigley (1981). The *EcoRI*-*HindIII* fragment of this plasmid whose size was 538 nt as determined by nt sequencing, was cloned into pKH47. The fragment *HindIII*-*BamHI* B from pSV2cat containing the *cat* gene and a polyadenylation signal was inserted into the corresponding sites of the resulting plasmid. E, *EcoRI*; B, *BamHI*.

TABLE I

CAT activity in HeLa cells transfected with plasmids containing E2A or E3 Ad promoters

Ad5 promoter E2A controlling <i>cat</i> gene		Ad5 promoter E3 controlling <i>cat</i> gene	
Plasmids transfected	CAT activity ^a	Plasmids transfected	CAT activity ^a
p5E2Acac	1.0	p5E3cat	1.0
p5E2Acac + HE4	7.8	p5E3cat + HE4	6.4
p5E2Acac + pVM313	4.5	p5E3cat + pVM313	2.1
p3E1AE2Acac	4.2	p3E1AE3cat	4.2
p2E1AE2Acac	19.3	p2E1AE3cat	15.6
p2E1AE2Acac + pVM313	7.1	p2E1AE3cat + pVM313	2.5

^a CAT activity was visualized essentially as described by Gorman et al. (1982). The relative CAT activities are expressed in arbitrary units; CAT activity = 1 corresponds to p5E2Acac or p5E3cat transfected into HeLa cells. For p5E2Acac, the reference activity of 1 correspond to 300 cpm [¹⁴C]Ac-Cm/min/10⁶ cells at 37°C. For p5E3cat, the reference activity of 1 was 820 cpm [¹⁴C]Ac-Cm/min/10⁶ cells at 37°C. All values are averages from three separate experiments.

two serotypes, as has been shown for Ad3 (subgroup B) inhibiting Ad2 (subgroup C). This effect also occurs in the absence of viral DNA replication of the transdominant serotype (Delsert and D'Halluin, 1984). To determine whether Ad3, or adenoviruses belonging to other subgroups, such as Ad9, Ad4 and Ad12, could inhibit the expression of the *cat* gene fused to the E2A or E3 control regions of Ad5, infection and transfection experiments were carried out using the previously described plasmids.

HeLa cells were infected with 5 pfu/cell of one serotype (Ad3, Ad9, Ad4, Ad12 or Ad2), or mock-infected, and 1 h after infection, transfected with p5E2Acat or p5E3cat. CAT activity was assayed 40 h after infection. Mock-infected HeLa cells showed a low level of CAT activity (Table II). This activity was stimulated in infected cells and the magnification factor depended on the co-infecting Ad serotype and on the promoter fused to the *cat* gene. It was more elevated with Ad12, Ad3 and Ad2 than with Ad9 and Ad4 for the E2A promoter, and with Ad12 for the E3 promoter. Ad3 increased CAT activity to a much greater extent when the *cat* gene was under the control of the E2A promoter (19.5-fold) than when it was under the E3 promoter (4.3-fold). Similar results were obtained when HeLa cells were infected 1 h or 5 h after transfection (not shown).

(c) Expression of the chimeric *cat* gene in the presence of Ad3 early region 1A

The mechanism of stimulation of CAT activity under the control of E2A and E3 promoters by the

whole Ad genome could be explained in at least two ways: (i) E1A gene products stimulate the other early promoters; (ii) VA-RNAs increase the translation efficiency. The VA-RNAs are two small Ad-encoded RNAs transcribed by RNA polymerase III, which can increase translation efficiency (Svensson and Akusjärvi, 1984; Kaufman, 1985; Thimmappaya et al., 1982; Schneider et al., 1984). These two hypotheses were tested by Ad-substituting adenoviruses by plasmids containing the E1A region.

HeLa cells were transfected with p5E2Acat or p5E3cat in the presence or absence of a plasmid containing Ad3 region E1A (pVM313, Fig. 1). Ad3 was chosen because it has been shown to be the most transdominant serotype (Delsert and D'Halluin, 1984). The CAT activity was assayed 40 h after transfection. The results of these experiments are summarized in Table I. HeLa cells co-transfected with plasmids pVM313 and p5E2Acat showed a 4–5-fold higher level of CAT activity than cells transfected with the second plasmid alone. Similar results were obtained when p5E3cat replaced p5E2Acat (2–4-fold stimulation).

When HeLa cells were transfected with the hybrid plasmid p3E1AE2Acat, the level of CAT activity was similar to that observed in the case of co-transfected cells. Thus, there was no apparent difference between co-transfection with p5E2Acat or p5E3cat plasmid and Ad3 E1A-carrying plasmid (*trans*-acting effect), and single transfection with a hybrid plasmid carrying Ad3 E1A upstream from the chimeric *cat* gene (*cis*-acting effect). It should be noted, however, that transfection by p3E1AE3cat alone gave a CAT activity slightly higher than in the

TABLE II
CAT activity in HeLa cells infected with adenoviruses from each subgroup before transfection

Plasmid transfected	Serotype of infecting virus (subgroup) ^a					
	Mock (control)	Ad12 (A)	Ad3 (B)	Ad2 (C)	Ad9 (D)	Ad4 (E)
	CAT activity ^b					
p5E2Acat	1	13	19.5	12.5	3.8	2.8
p5E3cat	1	14.9	4.3	6	6.1	6.4

^a HeLa cells were infected with 5 pfu/cell and incubated at 37°C. One hour after infection, the cells were transfected with 10 µg of plasmid/60-mm dish.

^b The relative CAT activities are expressed in arbitrary units; see footnote a in Table I for the mock (HeLa) cells, and for CAT assay.

case of cells co-transfected with p5E3cat and pVM313. This weak stimulation of the Ad5 E3 promoter by the Ad3 E1A gene was consistent with the results obtained in combined infection and transfection experiments (Table II). The higher level of CAT activity in cells singly transfected with a plasmid containing the Ad3 E1A region might be due to the *cis*-acting effect of an Ad3 E1A enhancer. This element has been shown to stimulate the transcription at long distance (Imperiale and Nevins, 1984; Weeks and Jones, 1983).

Thus, Ad3 E1A early gene products, from either plasmid or from superinfecting Ad3, appeared to stimulate the E2A and E3 transcription units, although to a lesser extent than did those of Ad2 E1A (Table I). These results were in apparent disagreement with the inhibition effect observed in double infection involving members of subgroups B and C adenoviruses (e.g., Ad3 vs. Ad2; Delsert and D'Halluin, 1984). The apparently conflicting results might be explained in various ways. (i) Ad3 early gene products might directly inhibit other Ad5 early transcription units. (ii) In double infection, group C Ad members (Ad2/Ad5) early gene product(s) might interfere with other Ad early gene product(s). (iii) Ad3 E1A gene products might interact with the Ad2 E1A transcription unit, and secondarily affect the amount of other Ad5 early transcripts. These hypotheses were tested in the following experiments.

(d) Expression of the E2Acat and E3cat fusion gene in the simultaneous presence of both Ad2 and Ad3 early genes

Co-transfections were carried out in HeLa cells using p2E1AE2Acat or p2E1AE3cat in the presence of plasmid pVM313, containing the Ad3 E1A region. The results of these experiments are shown in Table I. A drastic reduction of CAT activity was observed, in particular when the *cat* gene was under the control of the E3 promoter. This result suggested that interactions between E1A gene products belonging to two different subgroups were responsible for the observed reduction of CAT activity.

(e) Expression of *cat* gene fused to the E1A control region in the presence of Ad2 or Ad3 E1A early genes

To determine whether the Ad3 E1A early gene products could inhibit the Ad2 E1A transcription

unit, transfection experiments were carried out using the plasmid p2E1Acat containing the Ad2 E1A control region linked to the *cat* gene.

Plasmid p2E1Acat whose construction is described in Fig. 1 contains the E1A cap site (nt 498) but not the first E1A coding triplet at nt 559. The *cat* gene and a polyadenylation signal from pSV2cat were added downstream from the Ad2 DNA (Fig. 1C). The nt sequence around an *Hind*III linker situated between Ad2 DNA and *cat* gene was determined. Thus, the number of nt originating from Ad2 DNA in p2E1Acat was determined to be 538.

HeLa cells were transfected with plasmid p2E1Acat in the presence or the absence of plasmids carrying the entire Ad2 E1A or Ad3 E1A regions. Cell extracts were processed and assayed for CAT activity 40 h after transfection. The results of these experiments are shown in Table III. HeLa cells transfected with p2E1Acat alone (10 μ g/60 mm petri dish) showed a low level of CAT activity. This activity was 2-fold higher in cells co-transfected with the same plasmid and 10 or 20 μ g of Ad2 E1A region (pVM214). This result confirmed previous reports that E1A gene products stimulated their own transcription unit (Berk et al., 1979; Nevins, 1981). The CAT activity was reduced about 2-fold in cells co-transfected with the p2E1Acat plasmid in the presence of 20 μ g of Ad3 E1A region (pVM313).

These results show that the fusion of the E1A promoter region to the structural sequences of the *cat*

TABLE III

CAT activity in extracts of HeLa cells transfected with p2E1Acat and increasing amounts of pVM214 or pVM313

Amount of pVM plasmid ^a (μ g)	pVM214 (Ad2 E1A)	pVM313 (Ad3 E1A)
	CAT activity ^b	
—	1.0	1.0
5	1.4	1.0
10	1.9	0.8
20	2.1	0.6

^a HeLa cells were transfected with 10 μ g of plasmid p2E1Acat per 60-mm dish and specified amounts of plasmid pVM214 or pVM313.

^b Numbers refer to the relative CAT activities. For p2E1Acat, the reference activity of 1 corresponds to 340 cpm [¹⁴C]Ac-Cm/min/10⁶ cells at 37°C (see also Table I).

gene renders the chimeric gene susceptible to the E1A-mediated regulation. This suggests that the target sequences for the positive control exerted by Ad2 E1A products, or the negative one induced by Ad3 E1A products, are located at the 5' end of the E1A transcription unit. The transdominance of Ad3 over the Ad2 would therefore be the result of a negative control of Ad3 E1A gene products over the Ad2 E1A promoter region.

(f) Conclusions

Activation of Ad early transcription units has been described as being a function of the product encoded by the E1A 13S mRNA (Berk et al., 1979; Carlock and Jones, 1981; Ricciardi et al., 1981; Montell et al., 1982; Leff et al., 1984; Ferguson et al., 1984; Guilfoyle et al., 1985).

In a recent report, it has been shown in our laboratory that Ad3 prevents Ad2 DNA replication in CV1 cells where it normally occurs (Delsert and D'Halluin, 1984). This inhibition has been found to be an early event. In permissive human cell lines co-infected with Ad2 and Ad3, a dominant, inhibitory effect of Ad3 over Ad2 has also been observed (Delsert and D'Halluin, 1984). In an attempt to elucidate the mechanism of this transdominance effect, the present study analysed the interactions of Ad3 E1A and Ad2 E1A gene products with the E2A and E3 control regions of Ad5. The effect of Ad3 E1A gene products on the Ad2 E1A promoter region was also studied.

Infection of HeLa cells by adenoviruses belonging to different subgroups resulted in a stimulation of the E2A and E3 promoters controlling the *cat* gene (Table II). It was further demonstrated that both Ad2 and Ad3 E1A gene products could stimulate the expression of the *cat* gene fused to Ad5 E2A or E3 control regions. Our results showed that the stimulation of transcription mediated by enhancers could be negatively regulated. Indeed, it was possible to inhibit the Ad2 E1A promoter fused to the *cat* gene by co-transfecting it in HeLa cells with a recombinant plasmid carrying the Ad3 E1A region. Other studies have evidenced that E1A products stimulate transcription of the E1A transcription unit early in Ad infection (Berk et al., 1979; Nevins, 1981). Moreover, it has been shown that E1A products could act as negative regulators of their own transcription unit

during lytic infection, and could repress SV40, polyoma and Ad2 E1A enhancers (Borrelli et al., 1984; Velcich and Ziff, 1985). The expression of one defined cellular gene has been clearly shown to be repressed by E1A products. The expression of a class I major histocompatibility complex gene is repressed in rat cells transformed by the E1A transcription unit of the highly oncogenic Ad12, but not by the non-oncogenic Ad5 (Schrier et al., 1983; Jochemsen et al., 1984).

The dual, opposite action of E1A gene products on the E2A or E3 promoters was surprising in the case of human cells being transfected with two early regions 1A belonging to subgroups B and C. This strongly suggested that the transdominance effect of Ad3 over subgroup C adenoviruses resulted from interactions between E1A gene products.

The mechanism by which Ad3 E1A gene products repress Ad5 E2A and E3 promoters in the presence of Ad2 E1A gene products is still unclear. Some hypotheses can be formulated to explain this phenomenon. (i) Ad3 E1A gene products might bind to the Ad2 E1A promoter and conversely. Thus, the exhaustion of free E1A gene products in the cell would prevent the stimulation of other promoters. (ii) E1A gene products might act as multimeric proteins and bind to the specific sequences, and these multimers could be active only as homopolymers, whereas the presence of both Ad2 and Ad3 E1A products in the same cell would lead to the formation of inactive heteropolymers.

Experiments are now in progress to determine whether either hypotheses, or possibly a combination of both hypothesis is correct. The construction Ad3 E1A mutants will be necessary to establish the role of each E1A gene product, encoded by 13S and 12S mRNA.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U. 233), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS UA. 538) and by grants from the Ministère de la Recherche et de la Technologie. We thank Drs. Gorman, Stow and Corden for providing us with the pSV2 *cat*, HE4 and XD-7

plasmids; we are grateful to Pierre Boulanger and Arnold Berk for helpful advice and discussion during the course of this work and to Chantal Cousin for DNA sequencing. We acknowledge the secretarial aid of V. Delecroy. J.P.G. Leite is a recipient of a post-doctoral fellowship from the Ministère des Relations Extérieures and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq).

REFERENCES

- Berk, A.J., Lee, F., Harrison, T., Williams, J. and Sharp, P.A.: Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell* 17 (1979) 935-977.
- Berk, A.J. and Sharp, P.A.: Ultraviolet mapping of the adenovirus 2 early promoters. *Cell* 12 (1977) 45-55.
- Berk, A.J. and Sharp, P.A.: Structure of the adenovirus 2 early RNAs. *Cell* 14 (1978) 695-711.
- Borrelli, E., Hen, R. and Chambon, P.: Adenovirus 2 E1A products repress enhancer-induced stimulation of transcription. *Nature* 312 (1984) 608-612.
- Carlock, L.R. and Jones, N.: Transformation-defective mutant of adenovirus type 5 containing a single altered E1A mRNA species. *J. Virol.* 40 (1981) 657-664.
- Chow, L.T., Broker, T.R. and Lewis, J.B.: Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus 2. *J. Mol. Biol.* 134 (1979) 265-303.
- Curtois, G. and Berk, A.J.: Adenovirus E1A protein activation of an integrated viral gene. *EMBO J.* 3 (1984) 1145-1149.
- D'Halluin, J.C., Cousin, C., Niel, C. and Boulanger, P.: Characterization of an early temperature-sensitive and cytotoxic double mutant of adenovirus type 2. *J. Gen. Virol.* 65 (1984) 1305-1317.
- D'Halluin, J.C., Martin, G.R., Torpier, G. and Boulanger, P.: Adenovirus type 2 assembly analyzed by reversible cross-linking of labile intermediates. *J. Virol.* 26 (1978) 357-363.
- Delsert, C. and D'Halluin, J.C.: Genetic expression of human adenoviruses in simian cells. Evidence for interserotypic inhibition of viral DNA synthesis. *Virus Res.* 1 (1984) 365-380.
- Elkaim, R., Goding, C. and Keding, C.: The adenovirus 2-E1A early gene promoter: sequences required for efficient *in vitro* and *in vivo* transcription. *Nucl. Acids Res.* 11 (1983) 7105-7117.
- Evans, R.M., Fraser, N., Ziff, E., Weber, J., Wilson, M. and Darnell Jr., J.E.: The initiation sites for transcription in Ad2 DNA. *Cell* 12 (1977) 733-740.
- Ferguson, B., Jones, N., Richter, J. and Rosenberg, M.: Adenovirus E1A gene product expressed at high levels in *Escherichia coli* is functional. *Science* 224 (1984) 1343-1346.
- Gaynor, R.B. and Berk, A.J.: *Cis*-acting induction of adenovirus transcription. *Cell* 33 (1983) 683-693.
- Gilardi, P. and Perricaudet, M.: The E4 transcriptional unit of Ad2: far upstream sequences are required for its transactivation by E1A. *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 7877-7888.
- Gorman, C.M., Moffatt, L.F. and Howard, B.H.: Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl-transferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2 (1982) 1044-1051.
- Graham, F. and Van der Eb, A.J.: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52 (1973) 456-457.
- Guilfoyle, R.A., Osheroff, W.P. and Rossini, M.: Two functions encoded by adenovirus early region 1A are responsible for the activation and repression of the DNA binding protein gene. *EMBO J.* 4 (1985) 707-713.
- Holmes, D.S. and Quigley, M.: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114 (1981) 193-197.
- Imperiale, M.J. and Nevins, J.R.: Adenovirus 5 E2 transcription unit: an E1A inducible promoter with an essential element that functions independently of position or orientation. *Mol. Cell. Biol.* 4 (1984) 875-882.
- Jochemsen, A.G., Bos, J.L. and Van der Eb, A.J.: The first exon of region E1A genes of adenoviruses 5 and 12 encodes a separate functional domain. *EMBO J.* 3 (1984) 2923-2927.
- Kao, H.T. and Nevins, J.R.: Transcriptional activation and subsequent control of the human heat shock gene during adenovirus infection. *Mol. Cell. Biol.* 3 (1983) 2058-2065.
- Kaufman, R.J.: Identification of the components necessary for adenovirus translational control and their utilization in cDNA expression vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 689-693.
- Kingston, R.E., Baldwin, A.G. and Sharp, P.A.: Transcription control by oncogenes. *Cell* 41 (1985) 3-5.
- Kingston, R.E., Kaufman, R.J. and Sharp, P.A.: Regulation of transcription of the adenovirus E1A promoter by E1A gene products: absence of sequence specificity. *Mol. Cell. Biol.* 4 (1984) 1970-1977.
- Kitchingman, G.R., Lai, S.P. and Westphal, H.: Loop structures in hybrids of early RNA and the separated strands of adenovirus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 4392-4395.
- Kitchingman, G.R. and Westphal, H.: The structure of Adenovirus 2 early nuclear and cytoplasmic RNAs. *J. Mol. Biol.* 137 (1980) 23-48.
- Leff, T., Elkaim, R., Goding, C.R., Jalinot, P., Sassone-Corsi, P., Perricaudet, M., Keding, C. and Chambon, P.: Individual products of the adenovirus 12S and 13S E1A mRNAs stimulate viral E1A and E1B expression at the transcriptional level. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 4381-4385.
- Leff, T., Corden, J., Elkaim, R. and Sassone-Corsi, P.: Transcriptional analysis of the adenovirus 5 E1A promoter: absence of sequence specificity for stimulation by E1A gene products. *Nucl. Acids Res.* 13 (1985) 1209-1221.
- Messing, J., Gronenborn, B., Müller-Hill, B. and Hofschneider, P.H.: Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a *Hind*III fragment of the *lac* regulatory region in M13 replicative form *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 3642-3646.
- Montell, C., Fisher, E.F., Caruthers, M.H. and Berk, A.J.:

- Resolving the functions of overlapping viral genes by site-specific mutagenesis of a mRNA splice site. *Nature* 295 (1982) 380-384.
- Nevens, J.R.: Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. *Cell* 26 (1981) 213-220.
- Nevens, J.R.: Induction of the synthesis of a 70,000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product. *Cell* 29 (1982) 913-919.
- Nevens, J.R., Ginsberg, H.S., Blanchard, J.M., Wilson, M.C. and Darnell Jr., J.E.: Regulation of the primary expression of the early adenovirus transcription units. *J. Virol.* 32 (1979) 727-733.
- Pearson, G.D., Chow, K.-C., Enns, R.E., Ahern, K.G., Corden, J.L. and Harpst, J.A.: In vitro replication directed by a cloned adenovirus origin. *Gene* 23 (1983) 293-305.
- Perricaudet, M., Akusjärvi, G., Virtanen, A. and Pettersson, U.: Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses. *Nature* 281 (1979) 694-696.
- Radloff, R., Bauer, W. and Vinograd, J.: A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed circular DNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57 (1967) 1514-1521.
- Ricciardi, R.P., Jones, R.L., Cepko, C.L., Sharp, P.A. and Roberts, B.E.: Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 6121-6125.
- Rossini, M.: The role of adenovirus early region 1A on the regulation of early regions 2A and 1B expression. *Virology* 131 (1983) 49-58.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463-5467.
- Schneider, R.J., Weinberger, C. and Shenk, T.: Adenovirus VAI RNA facilitates the initiation of translation in virus infected cells. *Cell* 37 (1984) 291-298.
- Schrier, P.I., Bernards, R., Vaessen, R.T.M.J., Houweling, A. and Van der Eb, A.J.: Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. *Nature* 305 (1983) 771-775.
- Sharp, P.A.: Adenovirus transcription, in Ginsberg, H.S. (Ed.), *The Adenoviruses*, Plenum, New York, 1984, pp. 173-204.
- Stow, N.D.: Cloning of a DNA fragment from the left-hand terminus of the adenovirus type 2 genome and its use in site directed mutagenesis. *J. Virol.* 37 (1981) 171-180.
- Svensson, C. and Akusjärvi, A.G.: Adenovirus VA-RNA₁: a positive regulator of mRNA translation. *Mol. Cell. Biol.* 4 (1984) 736-742.
- Thimmappaya, B., Weinberger, C., Schneider, R.J. and Shenk, T.: Adenovirus VA RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection. *Cell* 31 (1982) 543-551.
- Van der Vliet, P.C., Levine, A.J., Ensinger, M.J. and Ginsberg, H.S.: Thermolabile DNA binding proteins from cells infected with a temperature-sensitive mutant of adenovirus defective in viral DNA-synthesis. *J. Virol.* 15 (1975) 348-354.
- Velcich, A. and Ziff, E.: Adenovirus E1A proteins repress transcription from the SV40 early promoter. *Cell* 40 (1985) 705-716.
- Weeks, D.L. and Jones, N.C.: E1A control of gene expression is mediated by sequences 5' to the transcriptional starts of the early viral genes. *Mol. Cell. Biol.* 3 (1983) 1222-1234.

Communicated by H. van Ormondt.

ANNEXE 2

The regulation of E1A : The role of the two E1A mRNA products of subgroup B adenoviruses on the early promoters of subgroup C adenoviruses

(Recombinant DNA, enhancers, interserotypic, transdominance, plasmid vectors)

J.P.G. Leite^{*}, J.F. Collard⁺, and J.C. D'Halluin^{**}

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

* Permanent adress : Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365 - C.P.926 - 20010 - Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ (BRASIL), Tel : 5521-2706397

+ Present address : Institut du Cancer de Montréal, 1560 est, rue Sherbrooke, Montréal, Québec, H2L 4M1 (CANADA)
Tel : 514-8767078.

** Correspondence to Dr. J.C. D'Halluin, Laboratoire de Virologie Moléculaire, de l'INSERM, U. 233, Place de Verdun, F-59045 Lille (France).
Tel 33-20-53-41-23.

Abbreviations : aa, amino acid(s) ; Ac-CoA, acetyl coenzyme A ; Ac-Cm, acetyl-Cm ; Ad, adenovirus ; CAT, Cm acetyl transferase ; cat, gene coding for CAT ; Cm, chloramphenicol ; Δ , deletion ; EtdBr, ethidium bromide ; hr, host-range ; m.u., map units ; NF, nuclear factor ; nt, nucleotide(s) ; pfu, plaque-forming unit ; pi, post-infection ; var, variant.

SUMMARY

HeLa cells were co-transfected with recombinant plasmids carrying Ad2 or Ad3 E1A promoters fused to the chloramphenicol acetyl transferase gene (cat), and a plasmid encoding the Ad3 E1A gene. Whereas no stimulating effect was observed on the Ad3 E1A promoter, the Ad2 promoter was inhibited.

To determine which of the E1A gene products of Ad3 was responsible for the repressive effect, plasmids were constructed in which only the 13S or 12S mRNA product of Ad3 was expressed. Both the 12S and 13S mRNA products of Ad3 E1A were found to depress the transcription from the Ad2 E1A promoter. Each Ad3 E1A gene product was able to stimulate transcription from the Ad5 E2A early promoter in a manner similar to that of the Ad2 E1A gene products. In the case of the Ad5 E3 promoter, neither of the Ad3 E1A gene products stimulated transcription, but an inhibition was observed.

These results suggest that both mRNA products of the Ad3 E1A region inhibit transcription at the TATA box transcription complex.

INTRODUCTION

During the early period of productive infection with Ad, five separate regions of the viral genome are transcribed. E1A is the first region to be expressed followed by E1B, E3, E2A and E4 (Nevins et al., 1979). Regulatory interactions between these early regions have been described elsewhere (for reviews, see Sharp, 1984 ; Kingston et al., 1985). The E1A region encodes two major mRNAs (12S and 13S) which code for two proteins of 243 and 289 aa, respectively (Perricaudet et al., 1979). These proteins have identical amino and carboxyl termini and differ only by 46 aa unique to the 289 aa protein resulting from differential splicing (Berk and Sharp, 1978 ; Chow et al., 1979 ; Kitchingman and Wesphal, 1980). Recently, two novel Ad2 and Ad5 early region E1A mRNAs, designated 10S and 11S have been characterized (Stephens and Harlow, 1987 ; Ulfendahl et al., 1987).

The proteins encoded by the E1A region are of interest for a number of reasons. The E1A proteins stimulate : (i) transcription of the other early viral transcription units ; (ii) transcription of nonviral genes transiently introduced into cells and of certain endogenous cellular genes ; (iii) transcription by RNA polymerase III. In some instances E1A also appears to repress gene transcription and finally, E1A proteins are required for the oncogenic transformation of rodent cells by adenovirus (for reviews, see Berk, 1986a,b ; Flint, 1986 ; Grand, 1987).

Two general mechanisms by which E1A proteins could stimulate transcription have been proposed : (a) E1A proteins could interact with, or modify transcription factors to increase the frequency of initiation by RNA polymerase II (Kingston et al., 1985) ; alternatively, (b) E1A proteins could increase the number of DNA molecules transcribed by augmenting their assembly into transcription complexes, i.e. complexes of promoter DNA and bound transcription factor(s) (Gaynor and Berk, 1983). Because of the sequence diversity of the different early adenovirus promoters it seems improbable that transactivation by

E1A proteins is mediated by binding of E1A proteins to a specific DNA sequences, although the 13S mRNA product, possess a DNA-binding activity as recently reported (Ko et al., 1986 ; Chatterjee et al., 1988).

In contrast to all other serotypes, the adenoviruses of subgroups A and B fail to replicate their DNA in simian CV1 cells (Delsert and D'Halluin, 1984). Co-infection of CV1 cells with Ad2ND1 and Ad3 (or Ad31) results in the inhibition of any viral DNA synthesis. In human cell lines co-infected with Ad2 and Ad3, a dominant inhibitory effect of Ad3 over Ad2 is observed, no Ad2 DNA is replicated and no Ad2 particles are assembled. This effect requires early viral functions (Delsert and D'Halluin, 1984).

Our laboratory has recently demonstrated that the Ad3 E1A gene products repress the Ad2 E1A promoter but stimulate the E2A and E3 promoters of Ad5 in the absence of Ad2 E1A gene products (Leite et al., 1986). To assign which product of the E1A region is responsible for this function we have constructed plasmids expressing either the 12S or the 13S mRNA of Ad3 E1A region. These plasmids were cotransfected in HeLa cells with plasmids carrying the Ad2 (or Ad5) early control region fused to the cat gene and the CAT activity was determined. The experiments described here indicate that the 12S and 13S mRNA products of the Ad3 E1A region inhibit transcription from the E1A and E3 promoters of subgroup C adenoviruses.

MATERIALS AND METHODS

(a) Human cells

HeLa cells, originally obtained from J. Williams (Carnegie Mellon Institute, Pittsburgh), were grown as monolayers in Dulbecco's medium (GIBCO) containing 5 % newborn calf serum.

(b) Materials

Restriction endonucleases, T4 DNA ligase and Bal31 nuclease were purchased from Appligene, Bethesda Research Laboratories or Boehringer Mannheim. (¹⁴C) Cm (40 mCi/mM) was obtained from New England Nuclear, (³H) 5,6 uridine from CEA, Ac-CoA from Boehringer Mannheim and silica gel sheets from Polygram. The linkers, HindIII 5' P-d(CAAGCTTG)-3' and XbaI 5' P-d(CTCTAGAG)-3', were purchased from Pharmacia. Plasmid pSP64 and the SP6 transcription kit were supplied by Boehringer Mannheim ; pEK975 and dl1500 (Montell et al., 1982) were kindly provided by Dr. A. Berk.

All plasmids were amplified in Escherichia coli HB101 and were extracted from the pelleted bacteria. DNA was purified by CsCl-EtdBr density gradient centrifugation as described elsewhere (Radloff et al., 1967).

(c) Nucleotide sequencing

The EcoRI - HindIII restriction fragment of p3E1Acat was isolated and recloned into M13mp18 replicative form DNA and sequenced by the chain-termination method (Messing et al., 1977 ; Sanger et al., 1977).

(d) Construction of plasmids expressing the 12S and 13S mRNAs of Ad3 E1A region

1 l of KB cells in suspension were infected with Ad3 (5 pfu). After one hour pi 25 µg/ml of cycloheximide and 2 mCi of (³H) 5,6 uridine were added. After 7 h p.i., the RNAs were extracted using the technique described by Berk et

al. (1979). The E1A specific mRNAs were isolated by hybridization (Berk et al., 1979) with single stranded M13mp18 DNA containing the sequences extending from BamHI (nt 747) to HindIII (nt 1347). The single-stranded DNA was prepared according to Eggerding and Pierce (1983). After digestion by RNase-free-DNAse, a cDNA library was constructed with the cDNA synthesis system RPN 1256 of Amersham radiochemical centre. One clone expressing 13S mRNA (pVM335) was selected by Southern blotting with a nick-translated probe. The clone expressing Ad3 12S mRNA was obtained by a partial digestion with DraI of plasmid pVM312 and addition of an XbaI linker at nt 1176 (pVM312Xba). This plasmid was cut by XbaI following limited digestion with Bal31. An XbaI linker was added before recircularization with T4 DNA ligase and the linker position was determined as 1110 nt by sequencing. The BamHI-XbaI fragment of this plasmid was cloned into plasmid pVM312Xba cut by the same enzymes (pVM325).

(e) Preparation and SP6 analysis of mRNAs

Plasmids pVM312 (12S and 13S of Ad3), pVM325 (12S Ad3) and pVM335 (13S Ad3) were transfected into HeLa cells and cytoplasmic RNAs were extracted as described by Berk et al. (1979). The specific 12S and 13S mRNAs were quantitated by hybridization with an RNA probe synthesized by SP6 RNA polymerase from vector pVM431, a pSP64 derivative containing the BamHI - HindIII fragment of the Ad3 E1A region.

(f) DNA transfections

Monolayers of the HeLa cell line were transfected with 10-20 µg DNA by the calcium phosphate precipitation method (Graham and van der Eb, 1973) as used in our laboratory (Leite et al., 1986). For each assay plasmid pKH47 was used to obtain a constant DNA concentration.

(g) Transient-expression assay of chloramphenicol acetyl transferase (CAT) activity

Cells were harvested 40 h after transfection and assayed for CAT activity. Cell lysate (30 μ l) was incubated with 1 μ Ci of (14 C) Cm, 30 μ l of distilled water, 70 μ l of 0,1 M Tris-HCl pH 7,8 and 30 μ l of 4 mM Ac-CoA. After one hour of incubation at 37°C, the organic phase was extracted with ethyl acetate and dried. The pellet was resuspended with 15 μ l of ethyl acetate and subjected to thin layer chromatography initially in acetone (3 min) and then with chloroform-methanol (95/5 v/v) for 40 min. The extent of conversion of Cm to its acetylated form was quantified by liquid scintillation spectroscopy.

RESULTS

(a) Expression of the cat gene under the control of adenovirus type 2 and 3 E1A promoters

To demonstrate the action of Ad2 and Ad3 E1A gene products on the Ad3 E1A promoter we fused the 5' control region of the Ad3 early E1A gene to the structural sequence encoding the bacterial cat gene. A HindIII linker was inserted between the cap site and the initiation triplet of E1A as previously described (Leite et al., 1986). The HindIII linker was localized at nt 540 by sequencing. The cat gene and a polyadenylation signal from pSV2cat were cloned downstream from this linker (Fig. 1).

To distinguish between the actions of the major Ad3 E1A 12S and 13S mRNA products, a cDNA library was constructed. A clone expressing the 13S mRNA was then selected (pVM335). A plasmid encoding only the 12S mRNA was obtained after elimination of the donor splice site for 13S mRNA (pVM325). The mRNAs of HeLa cells transfected with plasmids pVM312, pVM325 or pVM335 were extracted and analysed by RNA protection using an RNA probe synthesized by SP6 RNA polymerase as described in Materials and Methods. These plasmids expressed both 12S and 13S, only 12S or only 13S mRNA, respectively (not shown).

The action of each E1A gene product of Ad3 or Ad2 on their promoters was determined by cotransfection experiments into HeLa cells. After 40 h transfected cells were harvested, cell extracts were prepared and CAT activity measured.

As shown in Table I, the global activity of the Ad2 E1A promoter was stronger than that of the Ad3 E1A promoter. The Ad2 E1A products (pVM214) stimulated both promoters. The Ad3 E1A products were found to activate on their own promoter, but to inhibit the Ad2 E1A promoter.

Using the two products of the Ad2 E1A region separately we could also show that the 13S mRNA (pEK975) was able to stimulate both E1A promoters. On the other hand, the 12S species (dl1500) had no effect (Table I). The Ad2 E1A 13S mRNA

alone stimulated the Ad2 promoter at a similar level, as the two E1A products combined (pVM214).

Separately, each Ad3 E1A gene product weakly activated its own promoter but inhibited the Ad2 E1A promoter (Table I). This inhibition was greater with the 13S (pVM335) than the 12S (pVM325) mRNA product.

(b) Expression of the cat gene under the control of Ad5 E2A or E3 promoters

The construction of chimeric genes in which expression of the cat sequence is controlled by 5' elements of the viral E2A or E3 genes has been described previously (Leite et al., 1986). In cells co-transfected by p5E2Acat or p5E3cat and pVM312, the CAT activity was increased, but that only a weak stimulation was observed for the E3 promoter. The Ad2 E1A products stimulated both promoters in a similar fashion. Identical results were obtained in infected HeLa cells with each serotype (Leite et al., 1986).

To determine the action of each E1A gene product of Ad2 or Ad3 on the transcription from the Ad5 E2A early and E3 promoters, HeLa cells were cotransfected with plasmids expressing the 12S and/or 13S mRNA of Ad2 or Ad3 with p5E2Acat or p5E3cat. The CAT activity was measured from cell extracts 40h post-transfection.

Taken separately, each Ad3 E1A product inhibited the Ad5 E3 promoter. Interestingly, the simultaneous action of the Ad3 E1A gene products (pVM312) resulted in a weak activation (Table II). These products also stimulated the Ad5 E2A early promoter.

The 13S mRNA product of the Ad2 E1A activated the transcription from both Ad5 E2A and E3 promoters. As observed previously with the Ad2 E1A promoter (Table I), the 13S mRNA product stimulated the E2A early promoter in a similar fashion to the combined E1A gene products (pVM214). It is possible that the two E1A gene products of Ad2 cooperate to stimulate the transcription from the E3 promoter. Nevertheless, the 12S mRNA product of the Ad2 E1A had an activating action on the Ad5 E2A early promoter only (Table II).

(c) Expression of the E2A cat and E3 cat fusion gene in the simultaneous presence of both Ad2 and Ad3 early genes.

The presence of the E1A gene products of two serotypes belonging to different subgroups resulted in decreased transcription from the E2A early and E3 promoters (Leite et al., 1986). The action of each E1A gene product of Ad2 or Ad3 was determined by the following co-transfection experiments. Plasmids p2E1AE2Acat, p2E1AE3cat, p3E1AE2Acat and p3E1AE3cat were co-transfected with plasmids expressing the 12S and/or 13S mRNA of either the Ad2 or Ad3 E1A region (Fig. 1). The resulting CAT activity is shown in Fig. 2 and Table III.

The Ad2 E1A 12S and 13S mRNA products were able, together or separately, to activate transcription from the plasmid carrying the Ad2 E1A region and Ad5 E2A or E3 promoter (p2E1AE2Acat and p2E1AE3cat) (Table III). No difference was seen using plasmids encoding either the 12S or 13S mRNA product(s) of Ad2, or both. Cotransfection with p2E1AE2Acat or p2E1AE3cat and plasmids carrying Ad3 E1A instead of Ad2 E1A resulted in a marked inhibition of CAT activity. This inhibition was greater when the Ad2 E3 promoter was present (Fig. 2 and Table III).

The Ad3 E1A 12S and 13S mRNAs were able, together as well as separately, to inhibit transcription from the Ad5 E2A early and E3 promoters in the presence of the Ad2 E1A region (Table III).

As shown earlier (Table I), neither mRNA product of the Ad3 E1A region had any transinhibitor effect on its own promoter. On the other hand, in the presence of the Ad5 E3 promoter (p3E1AE3cat) the Ad3 13S and 12S mRNA products had an inhibitory effect (Fig. 2 and Table III).

DISCUSSION

Activation of Ad early transcription units has been described as being a function of the product encoded by the E1A 13S mRNA (Berk et al., 1979 ; Carlock and Jones, 1981 ; Ricciardi et al., 1981 ; Montell et al., 1982 ; Ferguson et al., 1984 ; Leff et al., 1984 ; Svensson and Akusjärvi, 1984). The repression by E1A gene products of enhancer-induced stimulation of transcription has been so reported (Borrelli et al., 1984 ; Velcich and Ziff, 1985). The 12S mRNA product of the E1A region is associated with inhibition of transcription from the E2A late promoter (Guilfoyle et al., 1985). In a recent report, it has been shown in our laboratory that the Ad3 E1A gene inhibited the transcription from the Ad2 E1A promoter (Leite et al., 1986) and this result explained the transdominance effect of Ad3 over Ad2 in permissive and semi-permissive cells (Delsert and D'Halluin, 1984).

To identify the Ad3 E1A gene product responsible for this effect, plasmids encoding either the 13S or the 12S mRNA were constructed. Both Ad3 E1A gene products were able to inhibit the Ad2 E1A promoter and to activate weakly the Ad3 E1A promoter. The stronger effect was observed with the plasmid encoding the 13S mRNA. In contrast, the Ad2 E1A 12S message had a weak effect on the Ad2 E1A promoter and no effect on the Ad3 E1A promoter. These differences could be explained by the structural differences between the E1A promoter of the two Ad serotypes and/or by some modifications in both E1A gene products.

The Ad3 E1A products (pVM312) stimulated the transcription from the Ad5 E3 promoter whereas each individually product (12S or 13S) inhibited this promoter (Table II). Some hypothesis can be explain these results : i) an additional mRNA species which encode the protein which functions as the primary transcription activator ; ii) two majors E1A products cooperate to obtain a full activity ; iii) each E1A product regulate different cellular factors that cooperate in the transcriptional complex. These possibilities are not mutually exclusive.

In this study, the Ad3 E1A promoter appeared less strong than the Ad2 promoter, but transcription from the Ad3 E1A promoter was stimulated to a greater extent by Ad2 E1A gene products (Table 1). After stimulation by Ad2 E1A gene products (pVM214) CAT activity was similar in HeLa cells transfected with p3E1Acat and p2E1Acat (Table I). These results are in apparent disagreement with the report by Tibbetts and co-workers (1986) in which Ad3 E1A promoter appeared stronger than the Ad2 E1A promoter. This discrepancy might be explained in two ways : i) in the p3E1Acat, the fusion occurred between the E1A cap site and the initiation codon of the cat gene, and the cat gene was deprived of its prokaryotic promoter, ii) in Ad3 E1A gene, an enhancer element could be present in the coding sequence.

Some laboratories study the Ad2/5 E1A promoter, in particular to identify the DNA sequences that are responsible for enhancer activity or that can be activated by E1A gene products. In addition to the CAAT box and Sp1 sites, three different enhancers have been described (Hearing and Shenk, 1983 ; Hen et al., 1983 ; Imperiale et al., 1983). These enhancer elements are partially conserved in the Ad3 sequence upstream of the E1A cap site but their organization is very different, for example the enhancer core described by Hearing and Shenk (1983) is present twice on Ad2, but similar sequences are present three times (-302,-245,-205) on Ad3.

In the mutant Ad3hr15, a partial duplication of the E1A enhancer sequence is accompanied by a decrease in early transcription (Larsen et al., 1986). In the case of this particular mutant, the unique duplication(s) may disrupt the template for transcription complex assembly and render the E1A promoter less functional (Larsen et al., 1986). It is possible that the three core enhancer sequences in the Ad3 E1A promoter are responsible for the weak activity of this promoter. A correct organization, the number and the mutual distances of the transcription factor, binding sites are all necessary for optimum activity of promoters. Furthermore, there are two binding sites for the E2F factor (Kovesdi

et al., 1987) situated between the enhancer elements described by Hearing and Shenk (1983) for the Ad5 genome, but only one of the two is present in the case of Ad3. Experiments are now in progress to determine the enhancer element(s) on the Ad2 E1A promoter responsible for inhibition by Ad3 E1A gene products.

Recently, two domains, present on both E1A gene products responsible for gene repression have been localized (aa 46-77, aa 121-136) (Moran et al., 1986 ; Lillie et al., 1987 ; Schneider et al., 1987). These domains are conserved in serotypes belonging to subgroups A, B and C of Ad. The problem is to explain the greater inhibitory effect of the Ad3 E1A 13S mRNA product on the Ad2 E1A promoter. The major difference between Ad2 and Ad3 E1A 13S mRNA products is the size of the sequence unique for the translation product of the 13S mRNA : 46 aa for Ad2/Ad5 and only 30 aa in the case of Ad3/Ad7 (subgroup B) or Ad12 (subgroup A) (van Ormondt and Galibert, 1984).

The inhibitory effect of the Ad3 E1A 12S and 13S mRNA products is not only exerted on the Ad2 E1A promoter, but equally on that of Ad5 E3. This result explains perhaps the properties of mutant H3var100 isolated by Mc Dougall and Mautner (1987) who attribute an important role to the E3 region in the interactions between Ad5 and Ad3. This effect is not observed on the Ad5 E2A early promoter. The TATA box may be the element that is indispensable to the inhibitory effect of the Ad3 E1A gene product on the early transcription of the other adenoviruses. The TATA box is the only sequence required for transactivation of the transcription of E1A by the Ad5 E1A 13S mRNA product (Hearing and Shenk, 1985) or E1B (Wu et al., 1987).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U. 233), the Université de Lille II and by a grant from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (84 V 0818). We thank Dr. A.J. Berk for providing us with the pEK975 and dl1500 plasmids ; we are grateful to P.C. Leite for DNA sequencing. We acknowledge the secretarial aid of V. Delecroy and technical aid of D. Petite. We also acknowledge the constructive criticism of R. Pierce for his critical reading of the English manuscript. J.P.G. Leite is a recipient of a post-doctoral fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq).

REFERENCES

- Berk, A.J. : Functions of adenovirus E1A. *Cancer Surveys* 5 (1986a) 367-388.
- Berk, A.J. : Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Ann. Rev. Genet.* 20 (1986b) 45-79.
- Berk, A.J., Lee, F., Harrison, T., Williams, J. and Sharp, P.A. : Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell* 17 (1979) 935-944.
- Berk, A.J. and Sharp, P. : Structure of the adenovirus 2 early RNAs. *Cell* 14 (1978) 695-711.
- Borrelli, E., Hen, R. and Chambon, P. : Adenovirus 2 E1A products repress enhancer-induced stimulation of transcription. *Nature* 312 (1984) 608-612.
- Carlock, L.R. and Jones, N. : Transformation-defective mutant of adenovirus type 5 containing a single altered E1A mRNA species. *J. Virol.* 40 (1981) 657-664.
- Chatterjee, P.K., Bruner, M., Flint, S.J. and Harter, M.L. : DNA-binding properties of an adenovirus 289R E1A protein. *Embo J.* 7 (1988) 835-841.
- Chow, L.T., Broker, T.R. and Lewis, J.B. : Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus 2. *J. Mol. Biol.* 134 (1979) 265-303.
- Delsert, C. and D'Halluin, J.C. : Genetic expression of human adenoviruses in simian cells. Evidence for interserotypic inhibition of viral DNA synthesis. *Virus Res.* 1 (1984) 365-380.

Eggerding, F.A. and Pierce, W.C. : Construction of a cloned library of adenovirus DNA fragments in bacteriophage M13. J. Biol. Chem. 258 (1983) 10090-100097.

Ferguson, B., Jones, N., Richter, J. and Rosenberg, H. : Adenovirus E1A gene product expressed at high levels in Escherichia coli is functional. Science 224 (1984) 1343-1346.

Ferguson, B., Krippel, B., Andrisani, O., Jones, N. and Westphal, H. : E1A 13S and 12S mRNA products made in Escherichia coli both function as nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA. Mol. Cell. Biol. 5 (1985) 2653-2661.

Flint, S.J. : Regulation of adenovirus mRNA formation. Advances in Virus Research 31 (1986) 169-228.

Gaynor, R.B. and Berk, A.J. : Cis-acting induction of adenovirus transcription. Cell. 33 (1983) 683-693.

Gorman, C.M., Moffoert, L.F. and Howard, B.H. : Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl-transferase in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 2 (1982) 1044-1051.

Graham, F. and van der Eb, A.J. : A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology 52 (1973) 456-457.

Grand, R.J.A. : The structure and functions of the adenovirus early region 1 proteins. Biochem. J. 241 (1987) 25-38.

Guilfoyle, R.A., Osherooff, W.P., and Rossini, M. : Two functions encoded by adenovirus early region 1A are responsible for activation and repression of the DNA binding protein gene. *EMBO J.* 4 (1985) 707-713.

Hearing, P. and Shenk, T. : The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element. *Cell* 33 (1983) 695-703.

Hearing, P., and Shenk, T. : Sequence-independent autoregulation of the adenovirus type 5 E1A transcription unit. *Mol. Cell. Biol.* 5 (1985) 3214-3221.

Hen, R., Borrelli, E., Sassone-Corsi, P. and Chambon, P. : An enhancer element is located 340 base pairs upstream from the adenovirus 2 E1A cap site. *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 8747-8761.

Holmes, D.S. and Quigley, M. : A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114 (1981) 193-197.

Imperiale, M.J., Feldman, L.T. and Nevins, J.R. : Activation of gene expression by adenovirus and herpes virus regulatory genes acting in trans and by a cis-acting adenovirus enhancer element. *Cell* 35 (1983) 127-136.

Kingston, R.E., Baldwin, A.G. and Sharp, P.A. : Transcription control by oncogenes. *Cell.* 41 (1985) 3-5.

Kitchingman, G.R. and Westphal, H. : The structure of adenovirus 2 early nuclear and cytoplasmic RNAs. *J. Mol. Biol.* 137 (1980) 23-48.

Ko, J.L., Dalie, B.L., Goldman, E. and Harter, M.L. : Adenovirus-2 early region 1A protein synthesized in Escherichia coli extracts indirectly associates with DNA. *Embo J.* 5 (1986) 1645-1651.

Kovesdi, I., Reichel, R. and Nevins, J.R. : Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A mediated coordinate gene control. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 2180-2184.

Larsen, P.L., Mc Grane, M.M., Robinson, C.C. and Tibbetts, C. : An E1A mutant of adenovirus type 3 : Ad3 hr 15 has reiterated DNA sequences 5' to its E1A gene. Virology 155 (1986) 148-159.

Leff, T., Elkain, R., Goding, C.R., Jalinot, P., Sassone-Corsi, P., Perricaudet, M., Kedinger, C. and Chambon, P. : Individual products of the adenovirus 12S and 13S E1A mRNAs stimulate viral EIIA and EIII expression at the transcriptional level. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 4381-4385.

Leite, J.P.G., Niel, C., and D'Halluin, J.C. : Expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in human cells under the control of early adenovirus subgroup C promoters : effect of E1A gene products from other subgroups on gene expression. Gene 41 (1986) 207-215.

Lillie, J.W., Loewenstein, P.M., Green, M.R. and Green, M. : Functional domains of adenovirus type 5 E1A proteins. Cell 50 (1987) 1091-1100.

Mc Dougall, I. and Mautner, V. : An adenovirus type 3 host range variant with mutations in the E1A and E3 early gene regions. J. Gen. Virol. 68 (1987) 1361-1371.

Messing, J., Gronenborn, B., Muller-Hill, B. and Hofschneider, P.H. : Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle : insertion of a HindII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 3642-3646.

Montell, C., Fisher, E., Caruthers, M. and Berk, A.J. : Resolving the functions of overlapping viral genes by site-specific mutagenesis at a mRNA splice site. *Nature* 295 (1982) 380-384.

Moran, E., Zerler, B., Harrison, T.M. and Mathews, M.B. : Identification of separate domains in the adenovirus E1A gene for immortalization. *Mol. Cell. Biol.* 6 (1986) 3470-3480.

Nevins, J.R., Ginsberg, H.S., Blanchard, J.M., Wilson, M.C. and Darnell Jr., J.E. : Regulation of the primary expression of the early adenovirus transcription units. *J. Virol.* 32 (1979) 727-733.

Perricaudet, M., Akusjärvi, G., Virtanen, A. and Pettersson, U. : Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses. *Nature* 281 (1979) 694-696.

Radloff, R., Bauer, W., and Vinograd, J. : A dye-buyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA : the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57 (1967) 1514-1521.

Ricciardi, R.P., Jones, R.L., Cepko, C.L., Sharp, P.A. and Roberts, B.E. : Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 6121-6125.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463-5467.

Schneider, J.F., Fisher, F., Goding, C.R. and Jones, N.C. : Mutational analysis of the adenovirus E1A gene : the role of transcriptional regulation in transformation. *EMBO J.* 6 (1987) 2053-2060.

Sharp, P.A. : Adenovirus transcription, in Ginsberg, H.S. (Ed), The adenoviruses, Plenum, New York (1984) pp173-204.

Stephens, C. and Harlow, E. : Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNAs that encode 30 kD and 35 kD proteins. EMBO J. 6 (1987) 2027-2035.

Svensson, G. and Akusjärvi, G. : Adenovirus 2 early region 1A stimulates expression of both viral and cellular genes. Embo J. 3 (1984) 789-794.

Tibbetts, C., Larsen, P.L., and Jones, S.N. : Autoregulation of adenovirus E1A gene expression. J. Virol. 57 (1986) 1055-1064.

Ulfendahl, P.J., Linder, S., Kreivi, J.P., Nordvist, K., Severson, C., Hultberg, H. and Akusjärvi, G. : A novel adenovirus-2 E1A mRNA encoding a protein with transcription activation properties. EMBO J. 6 (1987) 2037-2044.

van Ormondt, H. and Galibert, F. : Nucleotide sequences of adenovirus DNA in the Molecular Biology of Adenoviruses 2, Ed. by Doerfler, W., pp73-142.

Velcich, A. and Ziff, E. : Adenovirus E1A proteins repress transcription from the SV40 early promoter. Cell 40 (1985) 705-716.

Wu, L., Rosser, D.S.E., Schmidt, M.C. and Berk, A.J. : A TATA box implicated in E1A transcriptional activation of a simple adenovirus 2 promoter. Nature 326 (1987) 512-515.

Table I : CAT activity in HeLa cells transfected with plasmids harboring Ad2 or Ad3 E1A genes

	Ad2 E1A				Ad3 E1A		
	pKH47	pVM214 ^(b) (13S and 12S)	pEK975 (13S)	d11500 (12S)	pVM312 (13S and 12S)	pVM335 (13S)	pVM325 (12S)
p2E1Acat	1.00 ^(a)	2.26	2.44	0.80	0.47	0.40	0.68
p3E1Acat	1.00	4.50	2.46	1.00	1.50	1.50	1.50

(a) CAT activity was visualized essential as described by Gorman *et al.* (1982). The relative CAT activities are expressed in arbitrary units ; CAT activity = 1.00 corresponds to p2E1Acat or p3E1Acat transfected into HeLa cells. For p2E1Acat, the reference activity of 1.00 corresponds to 1700 cpm (¹⁴C) Ac-Cm/min/10⁶ cells at 37° C, and for p3E1Acat, 800 cpm (¹⁴C) Ac-Cm/min/10⁶ cells at 37° C. All values are averages from five separate experiments.

(b) HeLa cells were cotransfected with 10 µg of p2E1Acat or p3E1Acat and 10 µg of pVM214 (Ad2 E1A), pVM312 (Ad3 E1A), pEK975 (Ad2 E1A 13S), d1 1500 (Ad2 E1A 12S), pVM335 (Ad3 E1A 13S), pVM325 (Ad3 E1A 12S) or pKH 47.

Table II : CAT activity in HeLa cells transfected with plasmids containing Ad5 E2A or E3 promoters

	Ad2 E1A		Ad3 E1A				
	pKH47	pVM214 ^(b) (13S and 12S)	pEK975 (13S)	d11500 (12S)	pVM312 (13S and 12S)	pVM335 (13S)	pVM325 (12S)
p5E2Acat ^(a)	1.00 ^(c)	7.80	7.70	4.90	4.50	2.47	2.10
p5E3cat	1.00	6.40	3.30	1.00	2.10	0.44	0.60

(a) cat gene, under the control of Ad5 E2A early promoter (p5E2Acat), and E3 promoter (p5E3cat).

(b) Plasmids cotransfected with the plasmid harboring the cat gene were the same as in Table I footnote (b).

(c) The relative CAT activities are expressed in arbitrary units ; see footnote (a) in Table I ; all values are averages from four separate experiments.

Table III :

CAT activity in HeLa cells transfected with plasmids containing
Ad2 or Ad3 E1A genes upstream from Ad5 E2A or E3 promoters

	Ad2 E1A				Ad3 E1A		
	pKH47	pVM214 ^(b) (13S and 12S)	pEK975 (13S)	d11500 (12S)	pVM312 (13S and 12S)	pVM335 (13S)	pVM325 (12S)
p2E1AE2Acat ^(a)	1.0 ^(c)	1.87	1.20	1.20	0.30	0.30	0.59
p2E1AE3cat	1.0	1.20	1.06	1.04	0.16	0.17	0.17
p3E1AE2Acat	1.0	1.80	3.38	3.80	1.1	1.00	1.2
p3E1AE3cat	1.0	1.30	1.96	1.00	0.50	0.50	0.6

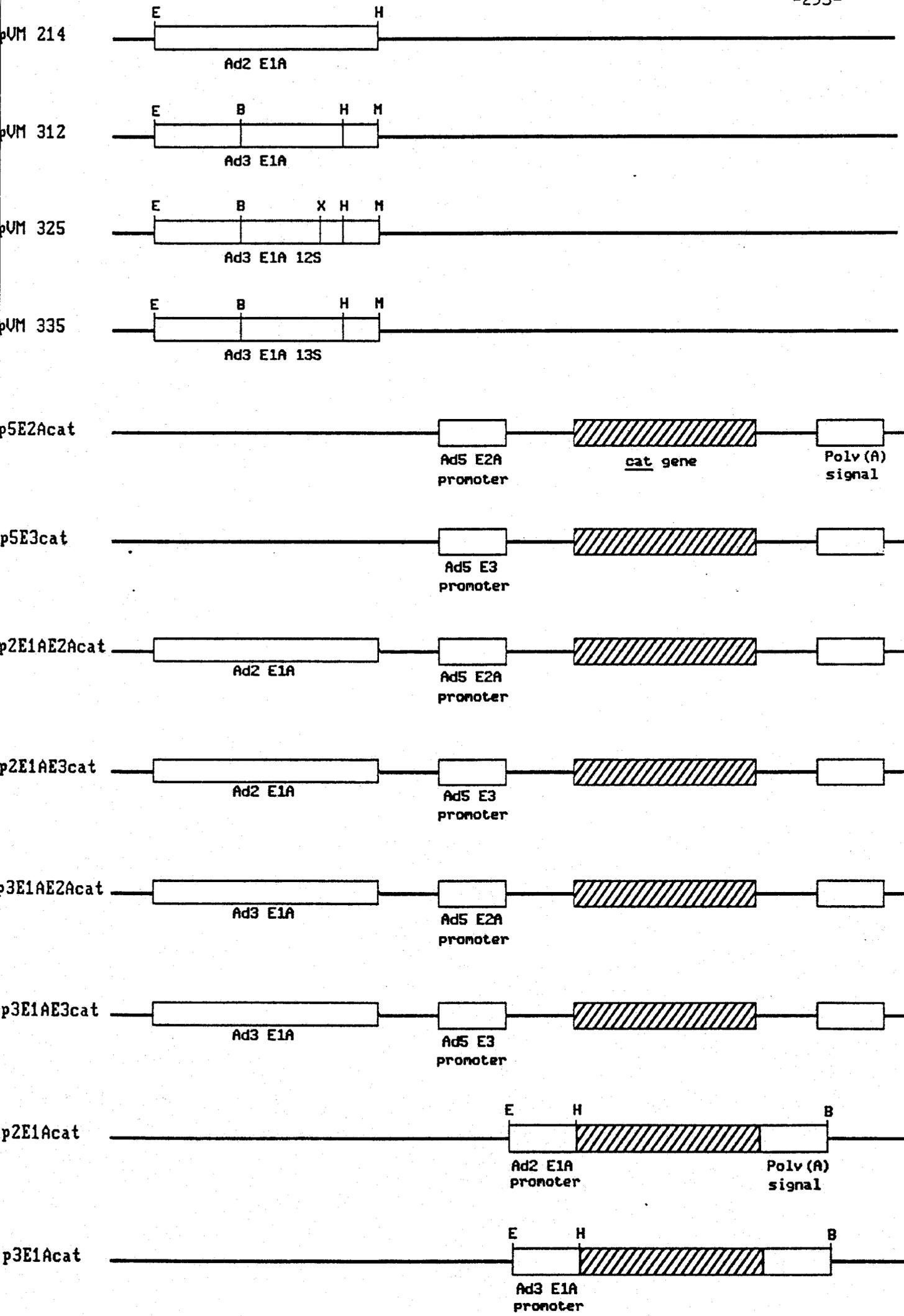
(a) cat gene under the control of the Ad5 E2A early promoter (p2E1AE2Acat, p3E1AE2Acat) and the E3 promoter (p2E1AE3cat, p3E1AE3cat)

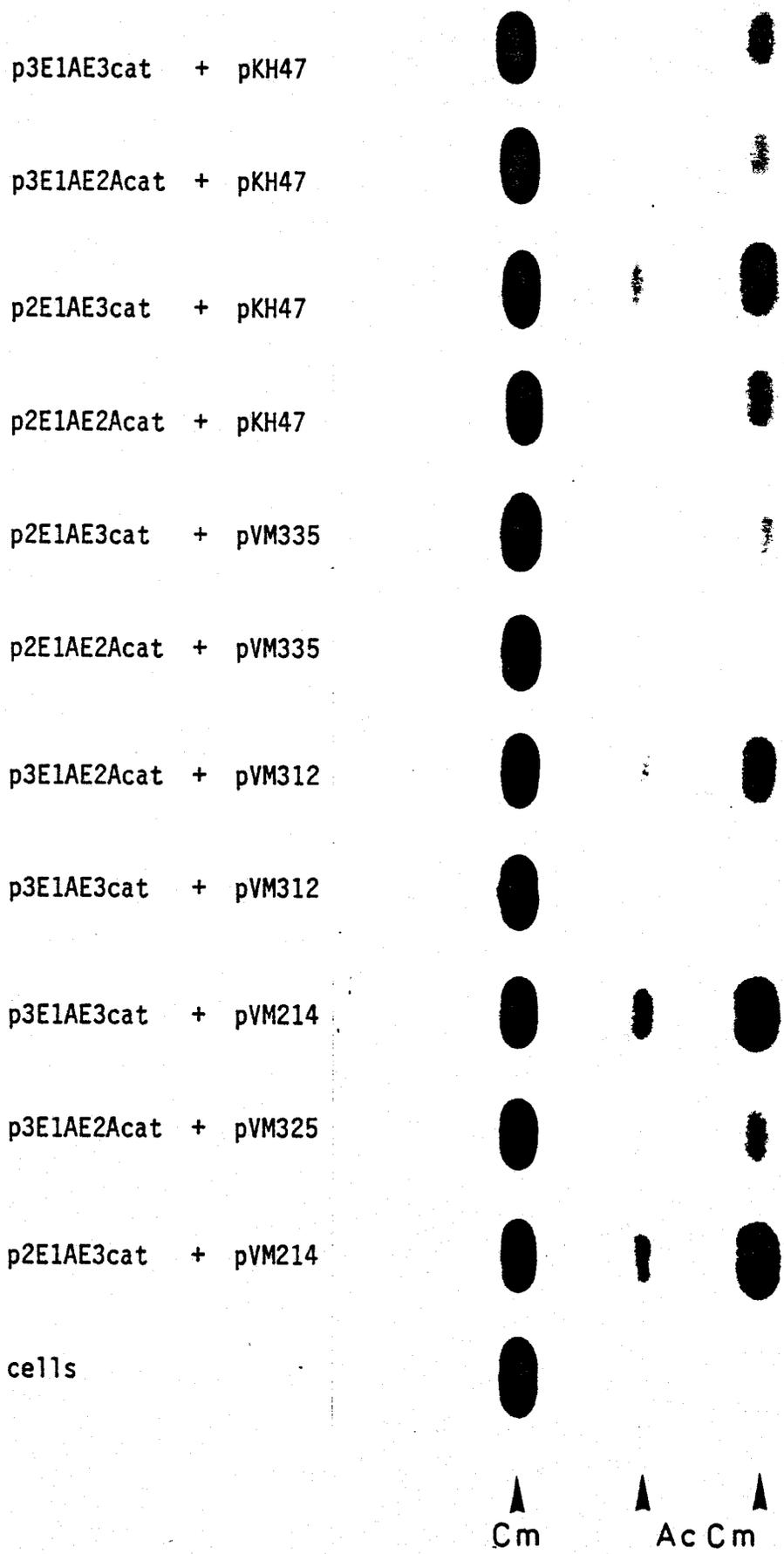
(b) Plasmids cotransfected with the plasmid harboring the cat gene were the same as in Table I footnote (b).

(c) The relative CAT activities are expressed in arbitrary units : CAT activity = 1.00 corresponds to 5,700 , 12,300 , 1,300, and 3,500 CPM (¹⁴C) Ac-Cm/min/10⁶ cells at 37° C for p2E1AE2Acat, p2E1AE3cat, p3E1AE2Acat and p3E1AE3cat respectively. All values are averages from three separate experiments.

Fig. 1 : Structure of recombinant plasmids. Plasmids pVM214, pVM312, p5E2Acat, p5E3cat, p2E1AE2Acat, p2E1AE3cat, p3E1AE2Acat, p31AE3cat and p2E1Acat were previously described (Leite et al., 1986). Plasmids : (a) pVM335 contains cDNA derived from Ad3 E1A 13S mRNA cloned between the BamHI - HindIII sites of pVM312 ; (b) pVM325 contains a Δ between nt 1178 (DraI) - 1110 (XbaI) of pVM312Xba. This plasmid does not contain the donor splice site of 13S mRNA ; (c) p3E1Acat was obtained by the following method : the pVM312 was cut by BamHI and SalI and then digested by nuclease Ba131. A HindIII linker was added before recircularization. A plasmid containing the E1A cap site (nt 510) but devoid of the initiation triplet of E1A proteins (nt 574) was selected by the technique of Holmes and Quigley (1981). The EcoRI - HindIII fragment of this plasmid whose size was 540 nt as determined by nt sequencing, was cloned into pKH47. The fragment HindIII - BamHI from pSV2cat containing the cat gene and a poly-adenylation signal was inserted into the corresponding sites of the resulting plasmid. B, BamHI ; E, EcoRI ; H, HindIII ; M, MboI resulting from the fusion of BamHI and BglII sites ; X, XbaI.

Fig. 2 : Expression of the cat gene under the control of E2A early and E3 promoters of Ad5 in HeLa cells by cotransfection with plasmids expressing Ad3 or Ad2 E1A. HeLa cells were transfected with per plate 10 μ g of p2E1AE2Acat, p2E1AE3cat, p3E1AE2Acat or p3E1AE3cat alone or together with 10 μ g of pVM312 (Ad3 E1A), pVM214 (Ad2 E1A), pVM325 (12S mRNA of Ad3) or pVM335 (13S mRNA of Ad3). 40 h after transfection, cell extracts were prepared and CAT activity determined as described in the Materials and Methods. The 12S and 13S mRNA translation products of Ad3 inhibited the transcription from the E2A early and E3 promoters of Ad5 in the presence of Ad2 E1A early region.





ANNEXE 3

The E1A region of adenoviruses : homologies and differences in its
expression and regulation

J.P.G. Leite^{*}, M. Milleville and J.C. D'Halluin⁺

Laboratoire de Virologie Moléculaire
INSERM U. 233
2, place de Verdun
59045 Lille Cédex (Tel : 33-20534123)
France

Key words : Adenovirus subgroup ; promoters ; enhancers ; neo ; cat ;
transformation.

* Permanent adress : Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Av
Brasil, 4365 - C.P. 926 - 20010 Manguinhos, Rio de Janeiro-
RJ - Brasil (Tel 5521-2706397)

+ corresponding author.

Summary

We examined E1A gene expression for three evolutionarily divergent human adenoviruses, type 2 (subgroup C), type 3 (subgroup B) and type 12 (subgroup A). For this, transient expression assays were developed, DNA sequences of the E1A control region being fused to the sequence encoding the cat gene. Cotransfection of HeLa cells with the Ad2 E1A-expression plasmid increased the expression of the Ad2, Ad3 or Ad12 E1A promoter-driven cat gene. By contrast the Ad3 E1A expression plasmid decreased the expression of the Ad2 E1A promoter driven cat gene. Using hybrid E1A promoters containing elements from Ad2 and Ad12 or Ad2 and Ad3 we showed that the domain responsible for the inhibitory effect extended from the conserved PvuII restriction site (-45 nt) to the end of the conserved sequences (nt +39 for Ad2), and was probably the TATA box. In the case of the Ad2 E1A promoter, the two enhancers A (Hen, Borreli, Sassone-Corsi and Chambon, 1983, *Nucleic Acids Res.* 11, 8747-8761) and B (Hearing and Shenk, 1983, *Cell* 33, 695-703) were required for full transcriptional activity.

In stable integration into cell DNA, the E1A promoter of Adenoviruses 2, 3 and 12 appeared as a very weak promoter compared to the SV40 early promoter with the neo gene as reporter. Even integrated into the cell DNA, the E1A promoters were transactivable by the E1A gene products but the E1B gene products repressed this activation. In KB cell lines expressing the E1A and/or E1B gene products (Babiss, Young, Fisher and Ginsberg, 1983, *J. Virol.* 46, 454-465), the SV40 early promoter appeared not to be inhibited when it was fused to the neo gene and integrated into cellular DNA.

The transforming E1 regions of human adenoviruses Ad2 and Ad12 differ from each other in the frequency by which they can transform BRK cells. We have investigated this property, and it can be assigned to the promoter or the encoding domain of the E1A region. For this purpose, we have constructed chimeric E1A regions, in which the promoter of Ad2 was linked to the encoding region of Ad12, and vice versa. The frequency of transformation appeared to be determined by the encoding sequences.

I- Introduction

The adenoviruses are a family of DNA viruses, that have been isolated from humans and from various animal species. Forty-two human adenovirus serotypes have been divided into six subgroups, initially on the basis of immunological criteria and latterly on the basis of DNA homologies and DNA restriction mapping studies (for a review see, Wadell, 1984). The first adenovirus genes to be transcribed after viral infection and DNA transport into the nucleus have been designated E1. The organisation of this part of the genome is very similar in the serotypes from different subgroups for which nucleotidic sequence data is available (C : 2,5 ; B : 7 ; A : 12 ; E : 4 and F : 40,41) (van Ormondt et al., 1980 ; van Ormondt and Esper, 1983 ; Sugisaki et al., 1980 ; Kimura et al., 1981 ; Bos et al., 1981 ; Tokunaga et al., 1986 ; van Loon et al., 1987). The E1 region between 0 and 11.2 map units has been subdivided into two major transcriptional units, E1A and E1B (Berk and Sharp, 1978 ; Chow et al., 1979 ; Perricaudet et al., 1979 ; Wilson et al., 1979). These two regions (a part of E1B) are able to induce a morphological transformation of cells in culture. Only cells transformed by oncogenic adenoviruses are tumorigenic for animals. This difference results essentially from the expression of the E1A region (Bernards and van der Eb, 1984) and using recombined E1A region between Ad5 and Ad12, van der Eb and his colleagues have demonstrated that the domain extending upstream to the splice site acceptor is the most important domain in the tumorigenicity of Adenovirus from subgroup A (Jochemsen et al., 1984).

The E1A region encodes two major mRNAs (12S and 13S) which code respectively for two proteins of 243 and 289 aa (Perricaudet et al., 1979). These proteins have identical amino and carboxyl termini and differ only by 46 aa unique to the 289 aa protein resulting from differential splicing (Berk and Sharp 1978 ; Chow et al., 1979 ; Kitchingman and Wesphal, 1980). Recently, two novel Ad2 and Ad5 early region E1A mRNAs, designated 10S and 11S have been characterized (Stephens and Harlow, 1987 ; Ulfendahl et al., 1987). The E1A region sequences of adenovirus show three conserved domains : i) between 140-188 aa in the unique 13S mRNA product ; ii) 40-80 aa and iii) 121-140 aa. These domains are associated with transformation of primary cells, repression of enhancer induced stimulation of transcription, transcriptional activation and induction of cellular DNA synthesis (Moran et al., 1986 ; Lillie et al., 1987 ; Schneider et al., 1987). In the promoter region, some enhancer elements have been described but only for the related serotypes 2 and 5 of subgroup C (Hearing and Shenk, 1983 ; Hen et al., 1983 ; Imperiale et al., 1983).

Recently, we have shown that the E1A gene products of adenovirus type 2 and type 3 could regulate their promoters differently (Leite et al., 1986). In the present report, we demonstrate that the E1A gene products of the adenovirus belonging to subgroup C stimulate transcription from different E1A promoters at higher levels than the other adenovirus E1A gene products. The Ad12 E1A gene products do not stimulate their promoter. Furthermore, the sequences previously described as enhancers (Hen et al., 1983 ; Hearing and Shenk, 1983) are each indispensable for transcription expression of the E1A promoter.

II- Materials and Methods

Cells : HeLa, HEK-293, KB₈, KB₁₆, KB₁₈ were maintained as monolayer cultures in Dulbecco modified minimal essential medium supplemented with 10 % foetal calf serum. KB₈, KB₁₆, KB₁₈ are KB cell lines transformed by Adenovirus type 5 E1 region and expressing respectively E1A, E1A + E1B and E1B gene products (Babiss et al., 1983), and were kindly supplied by Dr. Young.

Materials

Restriction endonucleases, T4 DNA ligase were purchased from Boehringer-Mannheim (FGR) or Appligene (Strasbourg, France). Phosphorylated linkers were from Pharmacia (Sweden). (¹⁴C) Cm (40 mCi/mmol) was obtained from New England Nuclear. Chromatography of Ac-Cm was carried out on silica gel sheets (Polygram). The neo gene derived from the plasmid pSV2neo was purchased from Bethesda Research Laboratories, Geneticin (G418) was from Gibco and used at 400 µg/ml.

Plasmids

The plasmids expressing E1A gene products of adenovirus type 2 and 3, and the chloramphenicol acetyl transferase (cat) gene under the control of the Ad2 or Ad3 E1A promoter have been previously described (Leite et al., 1986). The plasmid p12E1A, harboring the adenovirus serotype 12 sequences 0-1545 in the unique HindIII site of the vector pML1 was kindly provided by Dr. Perricaudet. The plasmid p12E1Acat containing the cat gene under the control of the Ad12 E1A promoter (0 - 498 nt) was constructed in the following way : the plasmid p12E1A was linearized at the unique NarI site, the protruding ends blunted with the Klenow fragment of Escherichia coli DNA pol I and deoxynucleotides, ligated in the presence of a HindIII linker and transformed into Escherichia coli HB101. The resulting plasmid was linearized at the EcoRV site (from the pBR322 sequences) and ligated in the presence of an EcoRI linker and transformed into HB101. The B fragment (EcoRI-HindIII) from this plasmid was inserted into the plasmid p2E1Acat restricted with the same enzymes. The resulting plasmid was named p12E1Acat.

Hybrid plasmids containing elements in the promoter region from Ad2 and Ad3 or from Ad2 and 12 were obtained using the conserved PvuII site, located 13 nt upstream to the TATA box, by exchanging the fragment EcoRI-PvuII into the

plasmids p2E1Acat, p3E1Acat and p12E1Acat. The resulting plasmids were named pVM261, pVM315, pVM291 and pVM1210 and are shown in Fig. 1. The hybrid E1A regions were constructed in a similar manner, schematized in Fig. 1 and named p2/12E1A and p12/2E1A.

The Ad2 E1A promoter was deleted for each enhancer element in the following way. For the enhancer A (Hen *et al.*, 1983) (Fig. 1) ; the plasmid p2E1Acat was deleted between EcoRI and AccI restriction site nt 0-193, ligated in the presence of an EcoRI linker and the resulting plasmid named pVM268. In a similar manner the Ad2 E1A promoter was deleted between the AccI and BalI restriction sites (nt 193-270), that removed a large part of the enhancer described by Hearing and Shenk (1983). The resulting plasmid was pVM 293 (Fig. 1).

After modification of the AccI site on the Ad2 E1A promoter to a XbaI site, the fragment EcoRI-XbaI (0-193) was cloned upstream to the Ad3 E1A promoter (p3 E1Acat), and the resulting hybrid plasmid was pVM 334. The fragment Sau3aI (624-684 bp) from the Ad3 E1A region was inserted in the unique BamHI site of vector pSP64. Fragment B (EcoRI-XbaI) of this plasmid was introduced upstream to the Ad3 E1A promoter after modification of the HpaI site to XbaI, and the new plasmid named pVM 341.

The plasmid p2E1Acat was deleted between the SalI and NdeI restriction sites, that remove the BalI site present in the vector sequences. The resulting plasmid (pVM 295) was linearized with BalI, and recircularized by T4 DNA ligase in the presence of a XbaI linker. After transformation of E. coli HB 101, plasmids were tested for the presence of the new restriction site and a clone was chosen and named pVM 296. After linearization of this plasmid by digestion with XbaI a 50 base pair fragment consisting of pBR 322 sequences (nt 1315-1364) was introduced at this site, the new plasmid being pVM 297.

Plasmids encoding the neo gene were obtained by the insertion of the HindIII-BamHI fragment from pSV2neo (Southern and Berg, 1982) in the place of the cat gene and the resulting plasmids were named p2E1Aneo, p12E1Aneo, p3E1Aneo, pVM268neo and pVM293neo (Fig. 1).

DNA transfections

Monolayers of cell lines at 70 % confluence were transfected with 10-20 μ g DNA by the calcium phosphate precipitation method (Graham and van der Eb, 1973).

For CAT activities, cells were harvested 40 h after transfection, cell extracts and assays of CAT activity were performed as previously described (Gorman et al., 1982 ; Leite et al., 1986). For geneticin resistance, cells were divided 16 h after transfection and G418 (400 µg/ml) was added after the third day. The medium was changed twice a week and the number of foci was counted after four weeks.

Transformation experiments

Primary cultures of BRK cells were prepared from kidneys of four-day old Wistar rats. Transformation of these cells with recombinant plasmids was performed as described by Jochemsen et al. (1984). A plasmid encoding the Ha-ras gene was used to obtain full transformation (Reddy et al., 1982).

Results

Expression of the cat gene fused to the E1A promoter of adenovirus serotypes belonging subgroup A, B and C.

To compare the E1A promoters of adenoviruses, we fused the 5' control regions of the E1A early gene of Adenovirus serotypes 2 (subgroup C), 3 (B) and 12 (A) to the structural sequence encoding the bacterial CAT enzyme. The activity of this enzyme can be readily assayed after transient expression of the cat gene in mammalian cells. The cat gene is a real reporter gene for the promoter activity and simple to study. The construction of chimeric genes in which expression of the cat sequence is controlled by elements at the 5' end of the viral E1A regions were previously described for the Ad2 serotype (Leite et al., 1986) or in Materials and Methods (Ad3, Ad12) and shown in Fig. 1. HeLa cells were transfected with the plasmids p2E1Acat, p3E1Acat and p12E1Acat and extracts were prepared 40 h after transfection and assayed for CAT activity as described in Materials and Methods.

The CAT activity appeared at a low-level in HeLa cells transfected with the Ad3 E1A promoter-cat chimeric plasmid (Table 1). The Adenovirus E1A promoter is transactivated by the E1A gene products (Berk, 1986a,b). To determine the transactivation of each E1A promoter by E1A gene products of different adenoviruses, the following cotransfection experiments were performed. The plasmids p2E1Acat, p3E1Acat or p12E1Acat were transfected alone or cotransfected with a plasmid encoding one E1A region of the adenovirus serotypes 2, 3 or 12. The resulting CAT activities are shown in Table 1. Relative CAT activity appeared at the same level in HeLa cells cotransfected with plasmids encoding the Ad2 E1A and each E1A promoter fused to the cat gene. The E1A gene products of the Ad3 and Ad12 did not stimulate these E1A promoters in a similar manner. They stimulated weakly the transcription from their promoters, but in contrast they inhibited the Ad2 E1A promoter, as previously described for the Ad3 E1A gene products (Leite et al., 1986).

Expression of the cat gene under the control of E1A hybrid promoters after cotransfection with E1A genes belonging to different subgroups.

To determine the E1A promoter domain(s) of Ad2, responsible for transinhibition by E1A gene products of Ad3 and Ad12, hybrid promoters were constructed. These were made up of a part of Ad2 and Ad3 or Ad2 and Ad12 E1A

promoters using the conserved PvuII site located 13 nt upstream from the TATA box. The detailed construction is described in Materials and Methods and shown in Fig. 1. The construct with the domain extending from EcoRI to PvuII of Ad2 E1A and the second domain extending from PvuII to HindIII of Ad3 E1A is called pVM261, and the opposite construct pVM315. The constructs with Ad2 and Ad12 E1A promoters are called respectively pVM291 and pVM1210. These four plasmids contained the cat gene downstream from the HindIII linker.

These plasmids were transfected into HeLa cells in the presence of one of the others plasmids encoding the E1A gene of Adenoviruses 2, 3 and 12. CAT activity was measured 40 h after transfection and the results are summarized in Table 2.

The CAT activity appeared at the same level in all transfected HeLa cells with plasmids encoding the cat gene except for p3E1Acat and pVM261. The plasmid pVM261 contained Ad3 sequences between the PvuII and HindIII sites and this domain could be responsible for the weak activity of the hybrid as for the Ad3 E1A promoter. In cotransfection experiments the Ad2 E1A gene products stimulated transcription from all tested promoters ; a weak activation was observed with the plasmid pVM1210. In contrast, using the Ad3 and Ad12 E1A gene in cotransfection, three different types of results were obtained : i) a weak stimulation with Ad3 E1A and Ad12 E1A gene products on their own promoters and on the hybrid promoter 2/12 (pVM291) ; ii) the activity was unchanged with Ad3 E1A gene products on the hybrid promoter 2/3 (pVM261) ; iii) an inhibitory effect appeared whatever the E1A gene products of Ad3 or Ad12 when the cat gene was under the control of the Ad2 promoter or the hybrid promoters 3/2 and 12/2 (pVM315 and pVM1210). The results suggested an important role played by the Ad2 domain extending between the PvuII and HindIII restriction sites ; the TATA box is included in this domain of negative regulation of transcription.

Enhancer elements in the E1A promoter belonging to the serotypes 2, 3 and 12.

The Ad 2/5 E1A promoter has been studied by others, in particular to determine the DNA sequences responsible for enhancer activity and transactivation by E1A gene products. In addition to the CAAT box and Sp1 sites, three different enhancers have been described (Hearing and Shenk, 1983 ; Hen et al., 1983 ; Imperiale et al., 1983). Analysis of DNA sequences revealed that these enhancer elements are particularly conserved in the Ad3 and Ad12 sequences upstream to the E1A cap site but that their organization is different (Fig. 2).

For example, in the case of Ad12, a homologous DNA sequence to the enhancer core described by Hen et al. (1983) is included between the core elements of that described by Hearing and Shenk, 1983. This analysis using a matrice program revealed the presence of homologous DNA sequences to the enhancer described by Hen et al. (1983), in the coding sequence of the Ad3 and Ad12 E1A regions (nt +132, Ad3 ; nt +200, Ad12).

To determine the role of each enhancer element in the promoter activity, the following E1A hybrid or deleted promoters were built, and fused to the cat gene. The Ad2 E1A promoter was deleted in enhancer A sequences and partially deleted for enhancer B sequences ; and the resulting plasmids were respectively named pVM268 and pVM293 (Fig. 1). The enhancer A sequences from the Ad2 E1A promoter were cloned upstream to the Ad3 E1A promoter using an XbaI linker (Fig. 1), the resulting hybrid plasmid was pVM334. The fragment Sau3aI (624-694 bp), from the Ad3 E1A region containing a "potential" enhancer A, was inserted into the unique BamHI site of pSP64. It was then introduced upstream to the Ad3 E1A promoter as described in Materials and Methods and the new plasmid named pVM341 (Fig. 1).

To compare the transcription level from these modified E1A promoters, HeLa cells were transfected with the plasmids p2E1Acat, p3E1Acat, pVM268, pVM293, pVM334 and pVM341 either alone or together with Ad2 or Ad3 E1A expressing plasmids. The CAT activity was determined 40 h after transfection and the results are shown in Table 3. The transcription level was reduced with the two deleted E1A promoters of Ad2 and the most marked effect was observed with the plasmid lacking the enhancer A (pVM268). In cotransfection experiments, with the plasmid expressing the Ad2 E1A gene and pVM293, the CAT activity level was similar to that obtained with the control plasmid (p2E1Acat). The addition of the enhancer A upstream to the E1A promoter of Ad3 had no effect on CAT activity. The homologous DNA sequences to this enhancer A, placed upstream to the E1A promoter (pVM341) reduced the CAT activity two fold (Table 3).

In all cotransfection experiments the CAT activity was increased more with the plasmid expressing the Ad2 E1A gene than in the presence of the Ad3 E1A gene. This agrees with our previous results and furthermore corroborates the fact that the E1A gene products of Ad3 inhibit the Ad2 E1A promoter.

Effect on the transcriptional activity of changing the distance between the enhancer B elements of the E1A promoter.

A correct distance between the binding sites for transcription factors could be necessary for optimum activity of promoters. To test this assumption, the enhancer B sequences were modified as described below. An XbaI linker was inserted into the unique BalI site (nt 270) present in E1A promoter (pVM295) and 50 base pairs were also introduced in the new XbaI site ; these resulting plasmids were named, respectively, pVM296 and pVM297. To facilitate these plasmid constructions, the BalI site present in the pBR322 sequence was removed by deletion of the DNA sequence extending from the SalI to the NdeI restriction sites (Fig. 1).

HeLa cells were transfected with plasmids p2E1Acat, pVM295, pVM296, and pVM297 either alone or together with the Ad2 E1A expressing plasmid (p2E1A). The CAT activity was determined 40 h after transfection and the results summarized in Table 4. The first observation was a high level of CAT activity in cells transfected with the plasmid pVM295 suggesting an inhibitor/silencer domain present in the vector sequences as reported by Peterson et al. (1987).

Addition of an XbaI linker at the BalI restriction site, or insertion of 50 base pairs at this site, reduced the CAT activity level 3.6 and 6.60 fold, respectively. In each cotransfection experiment CAT activity was increased in a similar manner. The results above confirmed the importance of the distance between enhancer elements.

Activity of the E1A promoter sequences integrated into the host cell DNA

To compare the E1A promoter activity of the adenoviruses belonging to the different subgroups, integrated into the cellular DNA, we exchanged the cat gene for the neo gene. The neo gene confers resistance to G418, an analogous of neomycine. The neo gene and a polyadenylation signal from pSV2neo were fused to the E1A promoter sequences. The resulting plasmids were named p2E1Aneo, p3E1Aneo and p12E1Aneo (Fig. 1). HeLa cells were transfected with each of these plasmids and treated as described in Materials and Methods. The number of foci of HeLa cells resistant to G418 was counted four weeks after transfection and the results are shown in Table 5. A small number of cell foci appeared in HeLa cells transfected with plasmids containing the neo gene under the control of the E1A promoter of the adenovirus serotypes 2, 3 and 12. In contrast, a large number of HeLa cell foci were observed with pSV2neo.

The weak activity of the E1A promoter could result from the absence of E1A gene products. To test this hypothesis, similar experiments were performed in KB cells expressing E1A and/or E1B gene products (Babiss *et al.*, 1983). The results are shown in Table 5. In KB₈ cells, expressing E1A gene products of Ad5, the resistance frequency with plasmids encoding the neo gene under the control of Ad2 or Ad3 E1A promoters was increased almost 100 fold. In contrast, the frequency of resistance was similar in KB₁₆, KB₁₈ and HeLa cells, suggesting a transinhibitor effect of the E1B gene products. When integrated into the cell DNA, the E1A promoter was regulated by the E1A gene products as in the viral genome or in transient expression.

The number of foci appeared very similar in all cell lines transfected with pSV2neo implying that the E1A gene products did not inhibit the SV40 early promoter.

Construction of chimeric E1A regions and transformation frequency.

The hybrid E1A regions in which the Ad2 E1A promoter is linked to the encoding sequences of Ad12 E1A and vice-versa, were constructed using the PvuII restriction site, conserved in the E1A region of the two serotypes. The construct with the promoter of Ad2 E1A and the encoding sequences of Ad12 E1A is called p2/12E1A, and the opposite p12/2E1A (Fig. 1).

The plasmids expressing the hybrid E1A regions were cotransfected with the Ad2 E1B region or Ha-ras in primary cultures of BRK cells. Four or six weeks after transfection, when transformed foci were clearly visible, the transformation frequency was determined and is shown in Table 6. With Ha-ras p12/2E1A has a transformation frequency comparable with that of p2E1A, and that of p2/12E1A is comparable with that of p12E1A. Similar results were obtained when the E1B region of Ad2 replaced the Ha-ras gene. This implies that the difference between the frequency of transformation induced in BRK cells by Ad2 and Ad12 is specified by the encoding sequences of the E1A region.

Discussion

Activation of Ad early transcription units has been described as being a function of the product encoded by the E1A 13S mRNA (Berk et al., 1979 ; Carlock and Jones, 1981 ; Ricciardi et al., 1981 ; Montell et al., 1982 ; Ferguson et al., 1984 ; Leff et al., 1984 ; Svensson and Akusjärvi, 1984). Repression by E1A gene products of enhancer-induced stimulation of transcription has also been reported (Borrelli et al., 1984 ; Velcich and Ziff, 1985 ; Dery et al., 1987). Recently, in our laboratory, it has been shown that both products encoded by the E1A region of Ad3 inhibited transcription from the Ad2 E1A promoter (Leite et al., 1986), this result explaining the transdominance effect of Ad3 over Ad2 in permissive and semi-permissive cells (Delsert and D'Halluin, 1984 ; Mc Dougall and Mautner, 1987).

In this study, the E1A promoter of Ad12 and Ad3 appears less strong than the that of Ad2 but the transcription of the Ad3 E1A promoter is more stimulated by Ad2 E1A gene products (Table 1). The E1A gene products of Ad12 and Ad3 inhibited cat gene transcription under the control of Ad2 E1A promoter, confirming our previous results (Leite et al., 1986). To determine the part of the E1A promoter responsible for trans repression activity, hybrid promoters were constructed using the conserved PvuII restriction site. The DNA sequences extending between this restriction site and the end of the conserved region surrounding the cap site, were the target of the inhibitor effect of the E1A gene products of Ad3 or Ad12 on the Ad2 E1A promoter (Table 2) : the TATA box is therefore probably the essential element for this repression.

The TATA box is the only sequence required for transactivation in the HEK-293 cell line of the β -globin gene in the absence of enhancer sequences (Green et al., 1983 ; Treisman et al., 1983). Hearing and Shenk (1985) and Wu et al. (1987) demonstrated that the TATA box is the only sequence required for transactivation by the 13S mRNA product. The TATA element is a target in the hsp70 promoter for E1A regulation (Simon et al., 1988). DNA sequences of the E1A TATA box of the adenovirus type 2, 3 and 12 are different, as shown on Fig. 2. Are these changes sufficient to explain the inhibition of the Ad2 E1A promoter ? Point mutations are required to answer this question.

Both enhancer elements described by Hearing and Shenk (1983) and Hen et al. (1983) were required for full activity of the E1A promoter. These results confirm the recent report of Hermann et al. (1987). The addition of enhancer A upstream to the Ad3 E1A promoter did not stimulate or even inhibit

transcription. A correct organisation, the number and the distance between the binding sites for transcriptional factor(s) are necessary for optimum activity of the promoter (Table 3 and 4). However, these enhancers did not occur in the transinhibition of Ad2 E1A promoters by the E1A gene products of Ad3 and Ad12.

To compare the transcription from the E1A promoter of adenoviruses belonging to different subgroups in transient expression and when integrated into cellular DNA, the neo gene was used as the reporter gene. The three adenovirus E1A promoters used were very weak (compared to the SV40 early promoter) in the absence of the E1A gene products. This activity increases in the KB₈ cell line expressing only the E1A gene products, but the foci number was reduced to the basal level (in HeLa cells) in the presence of the E1B gene products. The E1B-21 kDa protein has been reported as a transinhibitor in WI 38 cells and HeLa cells (White *et al.*, 1986) but also as a transactivator (Hermann *et al.*, 1987). This protein would act as a transinhibitor on the E1A promoter, whether viral DNA or integrated into cellular DNA. In contrast, the E1A gene products did not inhibit the SV40 early promoter in KB cells (Table 5). It has been reported that the E1A gene products inhibit the SV40 early promoter in transient expression (Borrelli *et al.*, 1984 ; Velcich and Ziff, 1985 and our unpublished results). However, in the HEK-293 cell line, Treisman *et al.* (1983), did not observe the negative regulation on the SV40 enhancer when fused to the β -globin gene. Several hypothesis could be proposed to explain previous results : i) the structure of the SV40 promoter integrated into cell DNA, ; ii) the competition between the two viral promoters for cellular binding factor(s) present(s) at a very low concentration ; iii) changes in the transcriptional regulation of the transformed KB cells by Ad5 compared to HeLa cells or the parental KB cell line. These possibilities are not mutually exclusive.

To determine the possible involvement in the degree of oncogenicity of the E1A promoter of adenoviruses belonging different subgroups, we have constructed chimeric E1A regions in which the promoter of the Ad2 E1A region is linked to the encoding sequences of the Ad12 E1A region and vice-versa. The difference between Ad5 and Ad12 is their transformation frequency : Ad5 E1 transforms BRK cells with a higher frequency than does Ad12. Here evidence is presented that this frequency is determined by the encoding sequence (Table 6). Jochemsen *et al.* (1984) have demonstrated that the second exon of the E1A gene is not involved in the transformation frequency and the degree of oncogenicity. We could conclude that only the first exon of the E1A gene determines the transformation frequency and the tumorigenicity of transformed cells. In the

first exon of the E1A region, three domains relatively conserved for the serotypes belonging to subgroups A, B and C have been localized : two domains (46-77 aa ; 121-136 aa) present on both E1A gene products are responsible for gene repression and transformation and the third domain, present only in the 13S mRNA product, is involved in transactivation of gene expression (Moran et al., 1986 ; Lillie et al., 1987 ; Schneider et al., 1987). Experiments are now in progress to determine the E1A domain responsible for the difference in transformation frequency and the degree of oncogenicity of transformed cells.

Acknowledgments

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, U. 233), the Université de Lille II, the Fondation pour la Recherche Médicale, the Fédération Nationale des Groupements des Entreprises Française dans la Lutte contre le Cancer and by a grant from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (84.V.0818). We are grateful to Dr. M. Perricaudet for providing us with the pAd12 E1A plasmid, Dr. J.P. Kerkaert for plasmid encoding Ha-ras and Dr. C.H.S. Young for transformed KB cell lines. We acknowledge the secretarial aid of V. Delecroy, and technical aid of D. Petite and E. Fleurbaix. Special thanks go to Dr. R. Pierce for critical reading of the manuscript. J.P.G. Leite is a recipient of a post-doctoral fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq).

REFERENCES

- 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 Escherichi coli XGPRT gene in KB cells. *J. Virol.* 46, 454-465.
- Berk, A.J. (1986a). Functions of adenovirus E1A. *Cancer Surveys* 5, 367-388.
- Berk, A.J. (1986b). Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Ann. Rev. Genet.* 20, 45-79
- Berk, A.J., Lee, F., Harrisson, T., Williams, J. and Sharp, P.A. (1979). Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell* 17, 935-944.
- Berk, A.J. and Sharp, P.A. (1978). Structure of the adenovirus 2 early mRNAs. *Cell* 14, 695-711.
- Bernards, R. and Van der Eb, A.J. (1984). Adenovirus transformation and oncogenicity. *Biochem. Biophys. Acta* 783, 187-204.
- Borrelli, E., Hen, R. and Chambon, P. (1984). Adenovirus 2 E1A products repress enhancer-induced stimulation of transcription. *Nature* 312, 608-612.
- 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 Ad12 and Ad5 codes for two tumor antigens starting at different AUG triplets. *Cell* 27, 121-131.
- Carlock, L.R. and Jones, N. (1981). Transformation-defective mutant of adenovirus type 5 containing a single altered E1A mRNA species. *J. Virol.* 40, 657-664.
- Chow, L.T., Broker, T.R. and Lewis, J.B. (1979). Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus 2. *J. Mol. Biol.* 134, 265-303.
- Delsert, C. and D'Halluin, J.C. (1984). Genetic expression of human adenoviruses in simian cells. Evidence for interserotypic inhibition of viral DNA synthesis. *Virus Res.* 1, 365-380.

Dery, C.V., Herrmann, C.H. and Mathews, M.B. (1987). Response of individual adenovirus promoters to the products of the E1A gene. *Oncogene* 2, 15-23.

Ferguson, B., Jones, N., Richter, J., and Rosenberg, H. (1984). Adenovirus E1A gene product expressed at high levels in Escherichia coli is functional. *Science* 224, 1343-1346.

Gorman, C.M., Moffoert, L.F. and Howard, B.H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl-transferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044-1051.

Graham, F. and van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-457.

Green, M.R., Treisman, R., and Maniatis, T. (1983). Transcriptional activation of cloned human B-globin genes by viral immediate early gene product. *Cell* 35, 137-148.

Hearing, P. and Shenk, T. (1983). The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element. *Cell* 33, 695-703.

Hearing, P. and Shenk, T. (1985). Sequence-independent autoregulation of the adenovirus type 5 E1A transcription unit. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3214-3221.

Hen, R., Borelli, E., Sassone Corsi, P. and Chambon, P. (1983). An enhancer element is located 340 base pairs upstream from the adenovirus 2 E1A cap site. *Nucleic Acids. Res.* 11, 8747-8761.

Herrmann, C.H., Dery, C.V. and Mathews, M.B. (1987). Transactivation of host and viral genes by the adenovirus E1B 19 K tumor antigen. *Oncogene* 2, 25-35.

Imperiale, M.J., Feldman, L.T. and Nevins, J.R. (1983). Activation of gene expression by adenovirus and herpes virus regularoty genes acting in trans and by a cis-acting adenovirus enhancer element. *Cell* 35, 127-136.

Jochemsen, A.G., Bos, J.L. and Van der Eb, A.J. (1984). The first exon of region E1A genes of adenoviruses 5 and 12 encodes a separate functional protein domain. *EMBO J.* 3, 2923-2927.

Kimura, T., Sawada, Y., Shinawawa, M., Shimizu, Y., Shiroki, K., Shimojo, H., Sugisaki, H., Takanami, M., Vemizu, Y. and Fujinaga, K. (1981). Nucleotide sequence of the transforming region E1B of adenovirus 12 DNA : Structure and gene organization, and comparison with those of adenovirus type 5 DNA. *Nucleic Acids Res.* 9, 6571-6589.

Kitchingman, G.R., and Westphal, H. (1980). The structure of adenovirus 2 early nuclear and cytoplasmic RNAs. *J. Mol. Biol.* 137, 23-48.

Leff, T., Elkain, R., Goding, C.R., Jalinot, P., Sassone-Corsi, P., Perricaudet, M., Kedinger, C. and Chambon, P. (1984). Individual products of the adenovirus 12S and 13S E1A mRNAs stimulate viral E1IA and E1II expression at the transcriptional level. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4381-4385.

Leite, J.P.G., Niel, C., and D'Halluin, J.C. (1986). Expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in human cells under the control of early adenovirus subgroup C promoters : effect of E1A gene products from other subgroups on gene expression. *Gene* 41, 207-215.

Lillie, J.W., Loewenstein, P.M., Green, M.R. and Green, M. (1987). Functional domains of adenovirus type 5 E1A proteins. *Cell* 50, 1091-1100.

Mc Dougall, I. and Mautner, V. (1987). An adenovirus type 3 host range variant with mutations in the E1A and E3 early gene regions. *J. Gen. Virol.* 68, 1361-1371.

Montell, C., Fisher, E., Caruthers, M. and Berk, A.J. (1982). Resolving the functions of overlapping viral gene by site-specific mutagenesis at a mRNA splice site. *Nature* 295, 380-384.

Moran, E., Zerler, B., Harrison, T.M. and Mathews, M.B. (1986). Identification of separate domains in the adenovirus E1A gene for immortalization. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3470-3480.

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, 694-696.

Peterson, D.O., Beifuss, K.K., and Morley, K.L. (1987). Context-independent gene expression : cis-acting negative effects of specific procaryotic plasmid sequences on eucaryotic genes. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1563-1567.

Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E., and Barbacid, M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300, 149-152.

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. Acad. Sci. USA* 78, 6121-6125.

Schneider, J.F., Fisher, F., Goding, C.R. and Jones, N.C. (1987). Mutational analysis of the adenovirus E1A gene : the role of transcriptional regulation in transformation. *EMBO J.* 6, 2053-2060.

Simon, M.C., Fisch, T.M., Benecke, B.J., Nevins, J.R., and Heintz, N. (1988). Definition of multiple functionally distinct TATA elements, one of which is a target in the hsp70 promoter for E1A regulation. *Cell* 52, 723-729.

Southern, P.J. and Berg, P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV₄₀ early promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 327-341.

Stephens, C., and Harlow, E. (1987). Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNAs that encode 30 KD and 35 KD proteins. *EMBO J.* 6, 2027-2035.

Sugisaki, H., Sugimoto, K., Takanami, M., Shiroki, K., Saito, I., Shimogo, H., Sawada, Y., Vermizu, Y., Vesugi, S. and Fujinaga, K. (1980). Structure and gene organization in the transforming HindIII-G fragment of Ad12. *Cell* 20, 777-786.

Svensson, G., and Akusjarvi, G. (1984). Adenovirus 2 early region 1A stimulates expression of both viral and cellular genes. *EMBO J.* 3, 789-794.

Tokunaga, O., Yaegashi, T., Lowe, J., Dobbs, L. and Padmanabhan, R. (1986). Sequence analysis in the E1 region of adenovirus type 4 DNA. *Virology* 155, 418-433.

Treisman, R., Green, M.R. and Maniatis, T. (1983). Cis and trans activation of globin gene transcription in transient assays. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7428-7432.

Ulfendahl, P.S., Linder, S., Kreivi, J.P., Nordvist, K., Severson, C., Hultberg, H., and Akusjarvi, G. (1987). A novel adenovirus-2 E1A mRNA encoding a protein with transcription activation properties. EMBO J. 6, 2037-2044.

Van Loon, A.E., Ligtenberg, M., Reemst, A.M.C.B., Sussenbach, J.S. and Rozyn, T.H. (1987). Structure and organization of the left-terminal DNA regions of fastidious adenovirus types 40 and 41. Gene 58, 109-126.

Van Ormondt, H. and Hesper, B (1983). Comparison of the nucleotide sequences of early region E1B DNA of adenovirus types 12, 7 and 5 (subgroups A, B and C). Gene 21, 217-226.

Van Ormondt, H., Maat, J. and Dijkema, R. (1980). Comparison of nucleotide sequences of the early E1A regions for subgroups A, B and C of human adenoviruses. Gene 12, 63-76.

Velcich, A. and Ziff, E. (1985). Adenovirus E1A proteins repress transcription from the SV40 early promoter. Cell 40, 705-716.

Wadell, G. (1984). Molecular Epidemiology of human adenoviruses. In Current Topics in Microbiology and Immunology vol. 110, 191-220. Ed. Doerfler W., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

White, E., Faha, B., and Stillman, B. (1986). Regulation of adenovirus gene expression in human WI38 cells by an E1B-encoded tumor antigen. Mol. Cell. Biol. 6, 3763-3773.

Wilson, M.C., Fraser, N.W. and Darnell, J.F. Jr. (1979). Mapping of RNA initiation sites by high doses of UV irradiation : evidence for three independent promoters within the left 11 % of the Ad2 genome. Virology 94, 175-184.

Wu, L., Rosser, D.S.E., Schmidt, M.C. and Berk, A.J. (1987). A TATA box implicated in E1A transcriptional activation of a simple adenovirus 2 promoter. Nature 326, 512-515.

Table 1 : CAT activity in HeLa cells transfected with plasmids containing the E1A promoter of adenovirus serotypes 2, 3 and 12

	Ad2 (p2E1Acat)	Ad3 (p3E1Acat)	Ad12 (p12E1Acat)
Alone	1.00 ^a	0.47	0.84
pVM214 (Ad2)	2.26	2.26	2.00
pVM312 (Ad3)	0.47	0.70	N.D.
pVM1201 (Ad12)	0.40	0.98	1.29

a) CAT activity was visualized as described in Materials and Methods. The relative CAT activities are expressed in arbitrary units ; CAT activity = 1 corresponds to p2E1Acat transfected into HeLa cells. The reference activity of 1 correspond to 1,700 cpm (¹⁴C) Ac-Cm/min/10⁶ cells at 37° C. All values are averages from five separate experiments.

ND : Not determined

Table 2 : CAT activity in HeLa cells transfected with plasmids containing E1A hybrid promoters.

A)

	Ad2 p2E1Acat	Ad3 p3E1Acat	2/3 pVM261	3/2 pVM315
alone	1.00 ^a	0.47	0.47	0.94
pVM214	2.26	2.26	2.25	2.35
pVM312	0.47	0.70	0.46	0.47

B)

	Ad2 p2E1Acat	Ad12 p12E1Acat	2/12 pVM291	12/2 pVM1210
alone	1.00 ^a	0.84	0.95	0.82
pVM214	2.26	2.00	2.10	1.39
pVM1201	0.43	1.29	1.60	0.42

a) see footnote Table 1 (a).

Table 3 : CAT activity in HeLa cells transfected with plasmids containing deleted or modified E1A promoters.

	Alone	Ad2 E1A p2 E1A	Ad3 E1A p3 E1A
p2E1Acat	1.00 ^a	2.26	0.47
pVM268	0.44	0.96	0.22
pVM293	0.71	2.13	0.35
p3E1Acat	0.47	2.26	0.70
pVM334	0.47	2.11	0.37
pVM341	0.24	0.72	0.38

a) see footnote Table 1 (a). All values are averages from three separate experiments

Table 4 : Expression of the cat gene in HeLa cells transfected with plasmids containing a modified enhancer B

	alone (a)	p2E1A (b)	b/a
p2E1Acat	1.00 ^c	4.30	4.30
pVM295	23.3	46.5	2.00
pVM296	6.30	12.1	1.90
pVM297	3.50	9.10	2.60

c) see footnote. Table 1(a). All values are averages from four separate experiments.

Table 5 : Frequency of resistant cells containing the neo gene under the control of E1A promoters in the presence of G418

Plasmids	Cell line			
	HeLa	KB ₈	KB ₁₆	KB ₁₈
pSV2neo ^a	192 ^b	250	180	250
p2E1Aneo	2	140	4	2
p3E1Aneo	1	91	2	1
p12E1Aneo	2	ND	ND	ND

- a) 60 mm dishes of HeLa or transformed KB cells lines were transfected with 10 µg of following plasmid encoding the neo gene under the control of SV₄₀ early or E1A promoter from Ad2, Ad3 and Ad12.
- b) The number of foci of resistant cells were counted four weeks after transfection. All values are averages from duplicate plates of three independent experiments.
- ND : not determined

Table 6 : Transformation frequency of BRK cells by hybrid E1A regions in the presence of Ha-ras or the E1b region of Ad2

E1A regions	Ha- <u>ras</u>	E1B
p2E1A ^(a)	90 ^(b)	34
p12E1A	4	5
p12/2E1A	75	32
p2/12E1A	2	5

a) BRK cells on 100 mm plates were transfected with 20 µg of plasmid encoding E1A genes in the presence of Ha-ras or E1B region.

b) The foci numbers of transformed BRK cells were determined four to six weeks after transfection. All values are averages from duplicate plates of four separate experiments.

FIGURES LEGEND

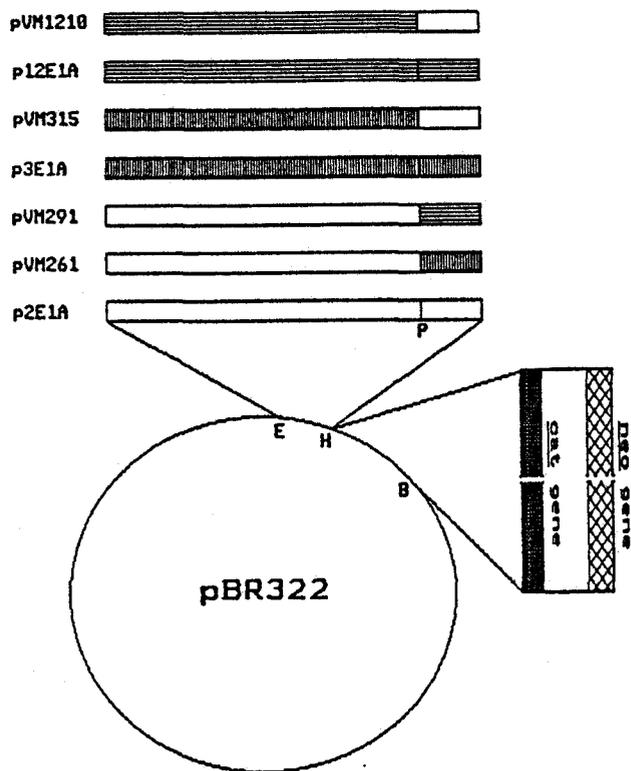
Fig. 1 : Construction of plasmids encoding the cat or neo gene under the control of E1A promoters. The 5' control region of the E1A gene was inserted between EcoRI and HindIII restriction sites of the pBR322. The cat (black boxes) or neo (boxes with lozenges) gene from pSV2cat or pSV2neo, respectively, was inserted downstream the E1A promoter using HindIII and BamHI restriction sites. A) E1A promoters from adenovirus serotypes 2, 3 and 12 are indicated. The hybrid promoters are schematized using the corresponding symbols. B) Modified E1A promoters. The Ad2 E1A promoter deleted between -498 and -345 nt (pVM268) or -345 and -228 nt (pVM293) ; the Ad3 E1A promoter additionned of Ad2 E1A sequences between -498 and -345 nt (pVM334) or Ad3 E1A sequences between +123 and +150 nt (pVM341). C) Modified Ad2 E1A promoter. After deletion of the fragment SalI and NdeI from the p2E1Acat (pVM295), a XbaI linker was introduced at the BalI site (pVM296). A fragment of 50 base pairs from pBR322 was introduced at this XbaI site (pVM297). D) The Ad2, Ad12 and hybrids E1A coding region. E, EcoRI ; B, BamHI ; H, HindIII ; P, PvuII ; S, SalI ; X, XbaI.

Fig. 2 : Comparison of the nt sequences among Ad2, Ad3 and Ad12.

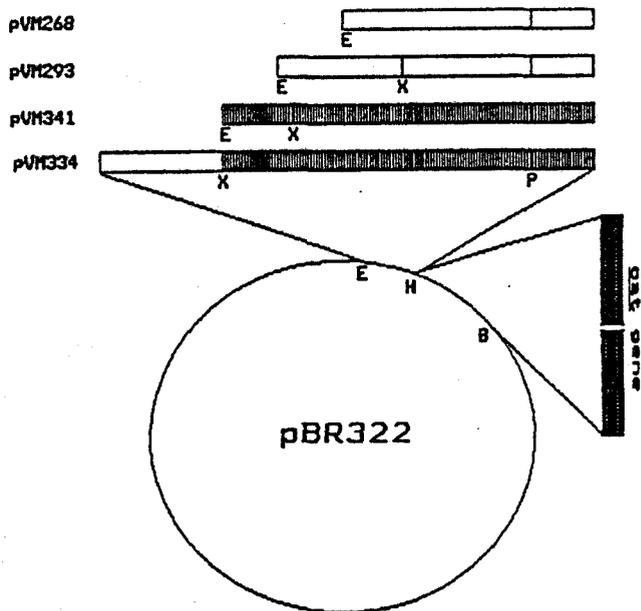
A) The nt sequence of the enhancer "A" (Hen et al., 1983) of Ad2, Ad3 and Ad12 (1) and the sequence from Ad3 and Ad12 (2) present in the coding region of the E1A gene. The vertical lines indicate the identical nt, the asterisks denote the homologous nt between Ad2 and Ad3, and the squares between Ad2 and Ad12.

B) The nt sequence between PvuII restriction site and E1A cap site from Ad2, Ad3 and Ad12 (van Ormondt et al., 1980).

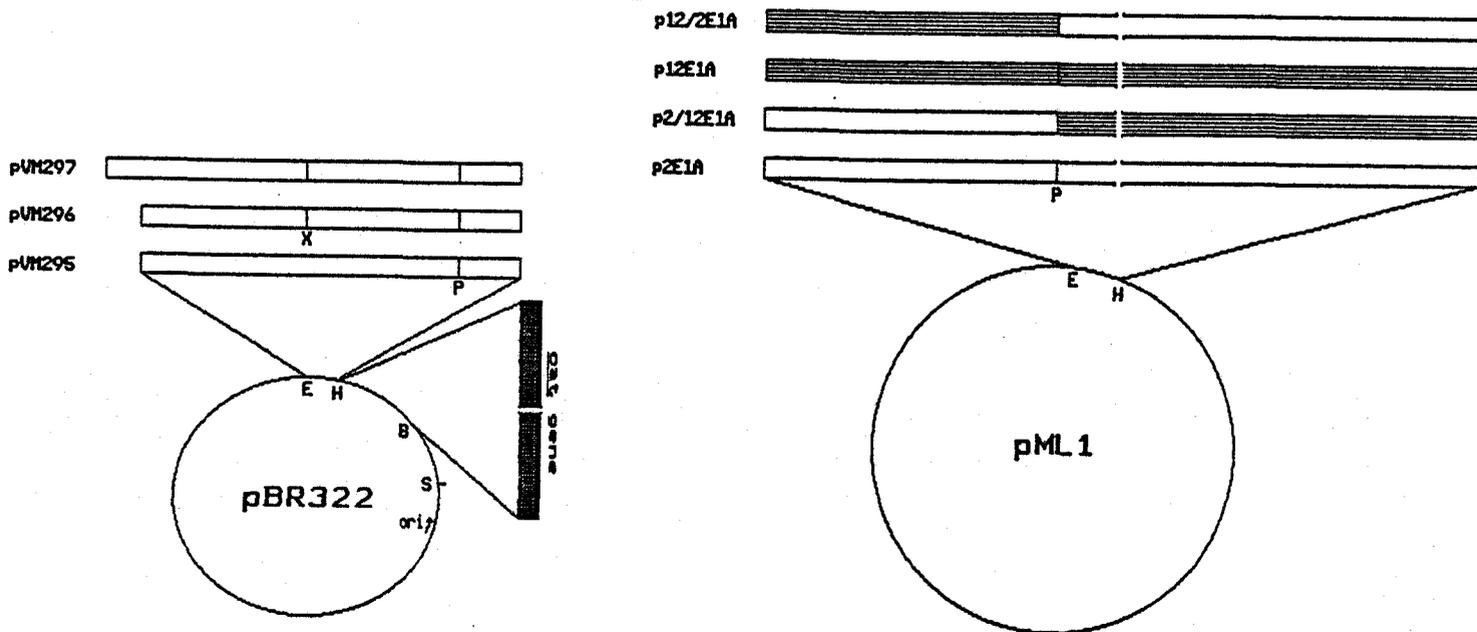
A



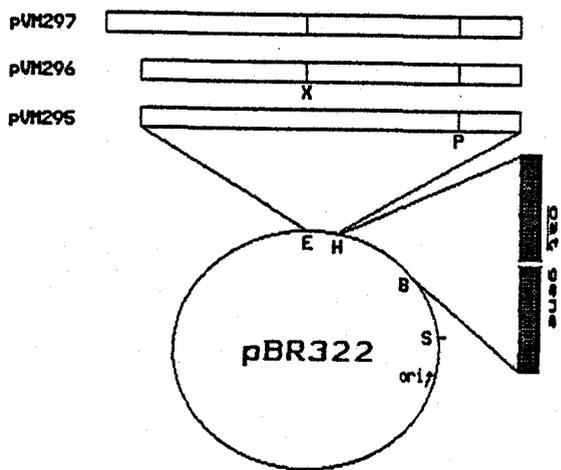
B



D



C



A

```

Ad12(2) +191 TGATCTTGATGTGGAGTCTGCCGGTGAA +218
                | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Ad3(2) +123 ACTGGAGTTTGTGGTAAATACCCTAATG +150
                | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Ad2(1) -349 AGCGCCGGATGTGGTAAAAGTGACGTTT -322
                | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Ad12(1) -297 CGCGCCGGATGTGACGTTTTAGACGCCA -270
                | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Ad3(1) -363 GAGGAGTTATGTTGCAAGTTATTACGGT -336
                * ** *

```

B

Ad2 -48 CAGCTGACGTGTAGTGTATTTATACCCGGTGAGTTCC-TCAAGAGGCCA

Ad3 -48 CAGCTGATCGTCAGGGTATTTAAACCTGACGAGTTCCGTCAAGAGGCCA

Ad12 -48 CAGCTGATCGTTTGGGTATTTAATGCCCGCGTGTTCC-GTCAAGAGGCCA

PvuII

"TATA"



+1

cap site E1A mRNAs

RESUME

L'organisation du gène E1A est similaire pour les adénovirus des sérotypes 2, 3 et 12; mais une analyse plus détaillée révèle des différences au niveau des zones codantes et non codantes. La différence dans la zone non codante ne semble pas être importante pour l'activité du promoteur car les plasmides hybrides entre ces sérotypes conservent le même taux d'expression que les plasmides natifs. Cependant, la séquence "TATA box" jouerait un rôle fondamental dans les processus de transactivation et de "transrépression".

Les produits de la région E1A de l'Ad2 stimulent les promoteurs E1A des Ad2, Ad3 et Ad12. Les produits de la région E1A de l'Ad2 et de l'Ad3 stimulent les promoteurs E2A et E3 de l'Ad5. Par contre, ceux de l'Ad3 et de l'Ad12 inhibent ces mêmes promoteurs dès que la région E1A de l'Ad2 est présente.

Les deux principales séquences "enhancers" décrites sont indispensables à l'activité maximale du promoteur E1A de l'Ad2. Leur organisation doit être conservée car des modifications produites entre ces séquences diminuent le taux d'expression du promoteur.

La transactivation dépend de l'organisation individuelle de chaque promoteur. Ceci suggère l'existence de différents facteurs nucléaires qui reconnaissent une organisation propre à chaque sous-groupe d'adénovirus humain.

MOTS-CLES :

ADENOVIRUS	"TATA box"
"ENHANCERS"	TRANSACTIVATION
REGION E1A	TRANSDOMINANCE
REGULATION	TRANSFORMATION