

50376
1990
160

50376
1990
160

N° D'ORDRE: 591

*UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS*

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

OPTION BIOCHIMIE

PAR



Nathalie WINTER

Régulation de la biosynthèse de la protéine
IVa2 de l'adénovirus de type 5.

Soutenue le 17 Octobre 1990 devant la commission d'examen :

PRESIDENT : Professeur A. VERBERT
RAPORTEURS : Docteur M. KACZOREK
Professeur S. BALL
EXAMINATEURS : Docteur B. GICQUEL
Docteur J.C. D'HALLUIN

A mon grand-père

A mes parents

A André

Avec toute mon affection.

Ce travail est l'un des derniers à avoir été réalisé à l'Unité de Virologie Moléculaire de l'INSERM de Lille, sous la direction du Docteur Jean-Claude D'HALLUIN, directeur intérimaire depuis avril 1986. Je tiens ici à le remercier de m'avoir accueillie et soutenue sans relâche depuis le début de ce travail de recherches.

Mes plus vifs remerciements vont également à mes collègues de labeur et en particulier :

- à Marie-Thérèse BELIN et Marie-Laure CAILLET pour leur grande expérience des "embûches protéiques et immunologiques" et pour la gentillesse avec laquelle elles ont toujours accepté de me remettre sur la voie;

- à Philippe VERWAERDE pour les discussions philosophiques autour d'une bonne bière;

- à Valérie LECLERE pour sa bonne humeur et son véritable esprit d'équipe;

- à Chantal COUSIN pour sa constante présence, sa grande expérience du travail de laboratoire en général et de la virologie en particulier;

- à Christian NIEL pour les enrichissantes discussions;

- aux nombreuses secrétaires qui se sont relayées pour la dactylographie : Fatima HAMMOUCHI, Laurence FOFANA et Virginie DELECROY.

Je remercie également le Dr J.P KERKAERT et C. COCQUERELLE de l'Unité 124 pour leur précieuse aide technique lors des essais de P.C.R.

Merci, enfin, à tous les membres du jury d'avoir bien voulu juger ce travail.

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>	p17
<u>G E N E R A L I T E S</u>	p20
I- Présentation	p20
1- Classification	p20
2- Structure	p20
3- Les différents cycles viraux	p20
II- Le cycle lytique	p23
1- Le déroulement	p23
2- La phase précoce	p23
3- La réplication	p26
4- La phase tardive	p28
5- Les promoteurs régulés par la réplication de l'ADN viral	p28
5-1 Introduction	p28
5-2 Le promoteur majeur tardif	p31
5-3 Le promoteur du polypeptide IX	p32
5-4 Le promoteur du polypeptide IVa2	p33
6- Le gène du polypeptide IVa2	p34
6-1 Description	p34
6-2 Organisation du promoteur	p36
6-3 Régulation de la transcription	p38
6-4 Régulation post-traductionnelle	p41
7- L'assemblage	p41
8- Les protéines mineures de l'adénovirus	p46
8-1 Introduction	p46
8-2 Les protéines de 52 et 55 kDa	p46
8-3 Les différentes protéines de 50 kDa des intermédiaires de maturation	p47
8-3-1 Le mutant H2 <u>ts</u> 112	p47
8-3-2 Les capsides vides de l'adénovirus 2	p47
8-3-3 Le mutant H2 <u>ts</u> 3	p49
8-4 Le polypeptide IVa2	p50
8-5 Les propriétés du polypeptide IVa2	p50

III- La transformation	p52
1- Introduction	p52
2- Les gènes viraux impliqués dans la transformation	p52
3- Intégration de l'ADN viral	p53
4- Structure et fonction des gènes de E1	p53
4-1 Les séquences essentielles à la transformation par l'ADN	p53
4-2 Les ARNm de E1	p55
4-2-1 La région E1A	p55
4-2-2 La région E1B	p55
4-3 Analyse génétique de E1	p55
4-4 Les polypeptides de la région E1	p56
4-5 La localisation intracellulaire des protéines de E1 dans les cellules transformées	p56
4-6 Fonctions biologiques des protéines de E1 dans le cycle lytique et la transformation	p57
4-6-1 Régulation des gènes viraux	p57
4-6-2 Régulation des gènes cellulaires	p58
4-6-3 La transformation	p58
4-7 Association des protéines de E1 avec des protéines cellulaires	p58
4-7-1 E1A et <u>Rb</u>	p58
4-7-2 E1B et p53	p60
4-8 La coopération d'oncogènes	p60
5- Conclusions	p61

T R A V A U X P E R S O N N E L S p63

Introduction	p65
I- Le sérum anti-IVa2	p67
1- Obtention	p67
1-1 Caractérisation des épitopes	p67
1-2 Clonage du pVM809	p67
1-3 Expression et purification de la protéine fusionnée	p70
2- Caractérisation de la protéine IVa2	p72
2-1 Dans différentes particules virales	p72
2-2 Réaction croisée avec l'hexon d'Ad5	p74

2-3 Dans les extraits de cellules infectées	p76
2-3-1 Fractionnement cellulaire	p76
2-3-2 Localisation intracellulaire	p78
2-4 Purification du sérum	p79
2-4-1 Spécificité des deux fractions du sérum	p79
2-4-2 Détection de la protéine IVa2 par immunofluorescence	p81
2-4-3 Localisation de la protéine de 43 kDa	p81
II- Expression du messenger IVa2 lors de l'infection	p84
1- Détection des ARNm IVa2 et E2B des cellules HeLa infectées par l'Ad2	p85
1-1 Structure du gène IVa2	p85
1-2 Analyse des ARNm par la technique de P.C.R.	p85
1-3 Analyse par protection de la digestion aux ribonucléases A et T1	p88
2- Infection par le mutant H5 <u>ts</u> 125	p93
3- Infection des cellules CV1 par l'Ad2 ou l'Ad7 type sauvage	p95
III- Lignées cellulaires contenant le gène IVa2	p99
1- Etablissement des lignées	p100
1-1 Construction des plasmides	p100
1-2 Caractérisation des lignées	p102
1-2-1 Présence du gène IVa2	p102
1-2-2 Recherche de la protéine IVa2	p103
1-2-3 Expression de l'ARNm IVa2	p105
1-2-3-1 Analyse par protection de la digestion aux ribonucléases A et T1	p105
1-2-3-2 Analyse par la technique de P.C.R.	p107
2- Essais d'obtention de virus mutants	p109
2-1 Construction de plasmides	p109
2-2 Transfections	p109
2-3 Conclusions	p112

IV- Rôle du produit du gène IVa2 dans la transformation	p113
1- Essais de transformation de cellules primaires de rein de rat (BRK)	p113
1-1 Régions de génome employées	p113
1-2 Numération des foyers de transformation obtenus	p116
2- Etablissement de foyers de transformation de BRK en lignées continues	p118
2-1 Analyse de leur contenu en ARNm	p118
2-2 Analyse de leur contenu en protéines	p119
2-2-1 Analyse en Western Blot	p119
2-2-2 Localisation de la 43kDa	p122
V- Essais de liaison <u>in vitro</u> à l'(α - ³² P)-GTP	p123
 DISCUSSION	 p126
I - La protéine IVa2 dans les particules virales et les cellules infectées par l'Ad2 de type sauvage.	p126
II - Expression de l'ARNm IVa2 lors de l'infection.	p130
III- Rôle de la réplication sur l'expression du gène IVa2.	p133
IV - Lignées cellulaires contenant le gène IVa2.	p135
V - Site potentiel de liaison aux NTP dans la protéine IVa2 et transformation de cellules primaires BRK.	p138
 CONCLUSION - PERSPECTIVES	 p143
 MATERIELS ET METHODES	 p147
I- Techniques électrophorétiques	p147
1- Electrophorèse en gel d'agarose	p147
2- Electrophorèse en gel de polyacrylamide	p147
2-1 Pour les acides nucléiques	p147
2-2 Pour les protéines	p147
3- Electroélution	p148

II- Transformation bactérienne	p148
1- Vecteurs de clonage	p148
2- Transformation de la souche HB101 d' <u>E.coli</u> .	p151
3- Transformation de la souche N4830 d' <u>E.coli</u> .	p151
4- Sélection des clones	p152
4-1 Méthode des tailles	p152
4-2 Méthode de dénaturation par la chaleur	p152
4-3 Méthode de "mini-préparation"	p152
5- Purification de plasmides	p153
III- Préparation de protéines	p153
1- Purification de protéine fusionnée produite par <u>E.coli</u> N4830	p153
2- Fractionnement de protéines de cellules eucaryotes	p154
IV- Production de séra	p155
1- Le sérum monoclonal anti-V	p155
2- Immunisations	p155
3- Récolte des séra et concentration des IgG	p155
V- Techniques immunologiques	p155
1- Immunotransfert ou Western Blot	p155
2- Purification du sérum sur nitrocellulose	p156
3- Immunofluorescence indirecte	p157
VI- Culture cellulaire	p158
1- Cellules en culture monocouche	p158
1-1 Lignées continues	p158
1-2 Cultures primaires	p158
2- Cellules en suspension	p158
3- Obtention de lignées continues	p158
3-1 Sélection au G418	p158
3-2 Etablissement des lignées	p159

VII- Transfections dans les cellules HeLa et BRK	p159
VIII- Techniques virales	p160
1- Infection	p160
1-1 Cellules HeLa en monocouche	p160
1-2 Cellules KB ₃ en suspension	p160
2- Purification de virus	p160
3- Titrage par le nombre de foyers fluorescents	p161
4- Production de virus par plages de lyse	p161
4-1 Transfections	p161
4-2 Amplification et analyse rapide de l'ADN viral	p162
5- Purification de l'ADN viral	p162
5-1 Complexe ADN- Protéine terminale (PT)	p162
5-2 ADN viral nu	p163
IX- Analyse de l'ADN et des ARN cellulaires et viraux	p163
1- L'ADN	p163
1-1 Purification d'ADN cellulaire	p163
1-2 Transfert et hybridation	p164
1-2-1 Transfert (Southern Blot)	p164
1-2-2 Préparation de la sonde radioactive et hybridation	p164
2- L'ARN	p165
2-1 Purification d'ARN de cellules infectées ou non	p165
2-2 Analyse en protection de la digestion aux ribonucléases A et T1	p165
2-2-1 Obtention des sondes radioactives	p165
2-2-2 Hybridation et digestion aux ribonucléases A et T1	p166
2-3 Analyse en Polymerase Chain Reaction (P.C.R.)	p166
X- Techniques de liaison <u>in vitro</u> à l' [α - ³² P]-GTP	p167

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

p169

INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES

GENERALITES

Tableau	GI	: Classification des adénovirus humains avec leurs principales caractéristiques.	p21
Figure	G1	: Modèle structural et localisation des protéines de l'adénovirus de type 2.	p22
Figure	G2	: Carte du génome de l'adénovirus mettant en évidence les transcrits précoces et intermédiaires.	p25
Figure	G3	: Modèles de la réplication de l'ADN de l'adénovirus de type 2.	p27
Figure	G4	: Représentation des cinq familles de gènes transcrites au stade tardif sous le contrôle de M.L.P.	p29
Tableau	GII	: Les protéines codées par les cinq familles de gènes de MLP.	p30
Figure	G5	: Schématisation des ARNm des régions IVa2 et E2B transcrits sur le brin gauche (g) de l'ADN viral.	p35
Tableau	GIII	: Composition et séquence en acides aminés de la protéine IVa2 d'adénovirus 5.	p37
Figure	G6	: Régulation de la transcription du gène IVa2 : interactions avec le M.L.P.	p39
Figure	G7	: Modèles d'assemblage de l'adénovirus.	p45
Figure	G8	: A - Gel de polyacrylamide-SDS de particules virales d'Ad2 et d'extraits de cellules infectées 20 heures. B - Poids moléculaires et origines des principales protéines observées en gel.	p48
Figure	G9	: Représentation schématique des polypeptides viraux d'après leur migration en gel de polyacrylamide-SDS.	p51
Figure	G10	: Structure des gènes E1A et E1B d'Ad2.	p54
Figure	G11	: Complexes entre les oncogènes des virus tumorigènes à ADN et les anti-oncogènes cellulaires.	p59

TRAVAUX PERSONNELS

Figure	R1	: Caractérisation des épitopes de la protéine IVa2.	p68
Figure	R2	: Clonage du pVM809.	p69
Figure	R3	: Expression et purification de la protéine fusionnée.	p71
Figure	R4	: Caractérisation de la protéine IVa2 dans différentes particules virales.	p73
Figure	R5	: Réaction croisée avec l'hexon d'Ad5.	p75
Figure	R6	: Caractérisation de la protéine IVa2 dans les extraits de cellules infectées en Western Blot.	p77
Figure	R7	: Spécificité des deux fractions du sérum révélée à la ³⁵ S-Met protéine A.	p80
Figure	R8	: Détection de la protéine IVa2 par immunofluorescence.	p82
Figure	R9	: Localisation de la protéine de 43 kDa.	p83
Figure	R10	: Coordonnées du gène IVa2 et schématisation des ARNm IVa2 et E2B.	p86
Figure	R11	: Oligonucléotides O1, O2 et produits d'amplification en P.C.R. des ARNm IVa2 et E2B.	p87
Figure	R12	: Analyse de l'ARNm IVa2 en P.C.R.	p89
Figure	R13	: Plasmides pVM425 et pVM427 pour l'analyse en protection de la digestion aux ribonucléases A et T1.	p90
Figure	R14	: Analyse des ARNm IVa2 et E2B en protection de la digestion aux ribonucléases A et T1.	p92
Figure	R15	: Détection par la technique de P.C.R. de l'ARNm IVa2 de cellules infectées par le H5 <u>ts</u> 125.	p94
Figure	R16	: Détection de la protéine IVa2 dans les cellules infectées par le H5 <u>ts</u> 125.	p96
Figure	R17	: Infection de cellules CV1 par l'Ad2 et l'Ad7 de type sauvage.	p98
Figure	R18	: Construction des pVM520 <u>néo</u> , pVM656 <u>néo</u> et pVM657 <u>néo</u> .	p101
Figure	R19	: Analyse des lignées en Southern Blot.	p104
Figure	R20	: Analyse des ARNm IVa2 dans les lignées par protection de la digestion aux ribonucléases A et T1.	p106
Figure	R20Bis:	Analyse des ARNm IVa2 dans les lignées par la technique de P.C.R.	p108
Figure	R21	: Obtention de virus mutants : les plasmides utilisés.	p110

Figure	R22	: Site potentiel de liaison aux NTP dans la protéine IVa2.	p114
Figure	R23	: Essais de transformation de cellules BRK : les plasmides employés.	p115
Tableau	RI	: Numération des foyers de transformation sur cellules BRK.	p117
Figure	R24	: Expression de l'ARNm IVa2 dans les lignées de BRK établies.	p120
Figure	R25	: Analyse des protéines des lignées de BRK.	p121
Figure	R26	: Résultats de liaison à l'(α - ³² P)-GTP.	p124

MATERIELS ET METHODES

Figure	M1	: Le plasmide pRIT2T (Pharmacia).	p149
Figure	M2	: Les plasmides pSP64 et pSP65 (Amersham).	p150

LEXIQUE

1) Cellules

- BRK : Baby Rat Kidney. Cellules primaires de rein de rat Wistar nouveau-né.
- CV1 : lignée établie de cellules de singe vert africain.
- HEK293 : Human Embryonary Kidney. Cellules transformées par les 11,5% gauches du génome d'Ad5 (nt 270 à 4423).
- HeLa : lignée établie de cellules humaines de carcinome du col utérin.
- KB3 : lignée établie de cellules humaines de carcinome du plancher buccal.

2) Virus et termes viraux

- Ad : Adénovirus.
- cyt : cytocidal.
- DBP : DNA Binding Protein (protéine se liant à l'ADN)
- IM : Intermédiaires de maturation.
- ITR : Inversed Terminal Repeat (répétition terminale inversée)
- LTR : Long Terminal Repeat (répétition terminale longue)
- MLP : Major Late Promoter (promoteur majeur tardif)
- M-MLV : Moloney Mouse Leukemia Virus.
- MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus.
- p : précurseur polypeptidique (ex : pVI = précurseur du polypeptide VI).
- PT : Protéine Terminale.
- SV40 : Simian Virus 40. Papovavirus dont l'hôte naturel est le singe.
- ts : thermosensible.

3) Gènes

- myc : oncogène de la leucémie myélo-monocytaire.
- néo : gène de résistance à la néomycine.
- ras : oncogène du sarcome murin de Harvey.

Rb : gène du rétinoblastome.
tk : gène codant pour la thymidine kinase du virus herpétique.
XGPRT : gène codant pour la xanthine-guanine phosphoryl transférase.

4) Réactifs

BBO : bleu de bromophénol.
BrET : bromure d'éthidium
CsCl : chlorure de césium.
DABCO : 1-4-Diazobicyclo(2,2,2)octane.
DM : dexaméthasone.
FITC : conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine.
G418 : généticine.
Hépès : acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-éthanesulfonique.
HU : hydroxyurée.
LiCl : chlorure de lithium.
MEM : Minimum Eagle Medium.
Pipes : acide pipérazinediéthane-sulfonique-1,4.
PMSF : fluorure de méthyl phényl sulfonyl.
SAB : sérum-albumine bovine.
SDS : dodécyl sulfate de sodium.
TPCK : L-1-chloro-3-tosyl-amido-4-phényl-2-butanone.

5) Unités

d : densité.
h : heure.
kDa : kilodalton.
mn : minute.
nt : nucléotide.
pb : paire de bases.
pfu : plaque forming unit.
rpm : rotation par minute.
S : coefficient de Svedberg.
sec : seconde.
u.g. : unité génome, 1 u.g. = 360 pb.

V : volt.
Vol : volume.

6) Autres termes.

AA : acide aminé.
Cis : mode de régulation de séquence à séquence sur l'ADN.
IgG : Immunoglobuline G.
Mr : masse moléculaire apparente.
NTP : nucléotide tri-phosphate.
P.C.R. : Polymerase Chain Reaction.
Pm : Poids moléculaire
Trans : mode de régulation par l'intermédiaire d'un facteur protéique se fixant sur l'ADN ou sur l'ARN.

INTRODUCTION

De nombreux concepts de la biologie moléculaire ont été établis grâce à la virologie. Les bactériophages, en particulier, ont permis de mettre à jour la structure de l'ADN en 1950, puis ont joué un rôle prépondérant dans le développement d'idées nouvelles telles que l'organisation des gènes, la transcription de l'ADN, la traduction des ARNm ou encore le code génétique.

Les virus animaux ont également permis d'éclaircir de nombreux points.

Parmi eux, les adénovirus découverts en 1953 par ROWE et coll. dans les tissus amygdaliens d'un enfant apparemment en bonne santé, représentent un excellent modèle d'étude de l'expression et de la régulation des gènes eucaryotes. Ils ont par exemple permis la découverte de la coïncidence du site de démarrage de la transcription par l'ARN polymérase II avec l'extrémité 5' des ARNm et le mécanisme d'épissage des ARN précurseurs.

En 1962, il fut démontré que l'adénovirus de type 12 était responsable de l'apparition des tumeurs malignes chez le hamster nouveau-né. C'était la première description d'un agent pathogène humain capable d'induire des tumeurs chez l'animal. Récemment, la découverte de la liaison du produit de 105 kDa du gène Rb avec la protéine de E1A de l'adénovirus de type 2 ont fait naître un nouveau concept de régulation de la transformation par formation de complexes protéiques : les oncogènes et les anti-oncogènes cellulaires.

Outre leur intérêt scientifique, les adénovirus humains (les sérotypes 40 et 41 en particulier) présentent une importance médicale certaine, dans les pays en voie de développement surtout, où, associés à la malnutrition, ils sont responsables d'une grande mortalité infantile : parmi les 20% de gastroentérites virales mortelles chez l'enfant, au Brésil, plus de la moitié est due aux adénovirus.

La régulation de l'expression de la région E1A et l'action de ses différents produits représentent une grande partie des recherches sur l'adénovirus. C'est également un excellent modèle d'étude des interactions protéine-protéine : l'assemblage de la particule virale a fait l'objet de nombreux travaux.

Le rôle de certains gènes et produits de gènes est cependant peu clair.

Les informations sur le gène IVa2, par exemple, sont peu nombreuses. Ce gène est situé sur le brin gauche de l'ADN viral, à proximité de la région E1A. Il a été classé dans la catégorie des gènes intermédiaires car il est actif avant le démarrage de la réplication de l'ADN viral. Son expression augmente fortement ensuite.

Le polypeptide IVa2 est supposé intervenir dans l'assemblage de la particule virale. Cependant, la plupart des protéines de structure sont codées par cinq familles de gènes contrôlées par le promoteur majeur tardif, sur le brin droit de l'ADN.

Bien que peu de travaux sur le gène et la protéine IVa2 aient été publiés, les questions qu'ils soulèvent concernant la régulation de l'expression et la fonction biologique de cette région du génome viral, nous ont paru mériter une étude approfondie.

GENERALITES

I- Présentation

1- Classification (Tableau GI)

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin de capsidie icosaédrique. Ils sont responsables de troubles respiratoires, de kératoconjunctivites et de gastroentérites. Ce sont également de redoutables agents opportunistes pour les malades immuno-déprimés. Les sérotypes humains actuellement identifiés sont répartis en 6 sous-groupes, ceci en fonction de :

- la teneur de leur ADN en bases G + C
- la longueur de leur fibre
- leurs propriétés d'hémagglutination
- le degré d'homologie de leur génome
- leur pouvoir oncogène chez le hamster nouveau-né.

2- Structure (Fig.G1)

La capsidie virale de diamètre 60 à 80 nm est formée de 20 faces identiques. La protéine majeure qui les compose est l'hexon. Les capsomères de chaque sommet sont appelés pentons et sont prolongés d'une projection apicale : la fibre.

L'ADN viral de 36000 paires de bases (pb) est bicaténaire linéaire et est protégé à l'intérieur de la capsidie par des protéines virales basiques : l'ensemble est appelé nucléoïde viral ou "core". A chaque extrémité de l'ADN se trouve liée de façon covalente la protéine terminale de 55 kDa.

3- Les différents cycles viraux

Selon la cellule hôte et le sérotype d'adénovirus, différentes interactions ont lieu. Le virus peut, par exemple, exprimer partiellement son information. C'est le cas des adénovirus humains sur les cellules de singe CV1. Il a en effet été montré que la croissance des adénovirus était réduite de 100 à 1000 fois dans les cellules CV1 par rapport aux cellules humaines HeLa, permissives. Le blocage du développement viral est dû à différents phénomènes suivant le sérotype étudié. Dans le cas de l'adénovirus de type 2 (Ad2) du sous-groupe C,

Sous-groupe	Sérotype	Degré d'homologie du DNA		Teneur en base G/C	Nombre de fragments de restriction obtenus avec <u>SmaI</u>	Masse moléculaire apparente des polypeptides majeurs internes			Longueur de la fibre (en nm)	Oncogénicité chez le hamster nouveau-né	Groupe d'héماغglutination
		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	Forte	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, 43 44, 45, 46, 47	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	65%	15 %	Moyenne : 49 - 52%	9-12	46-43,5 K	25,5 K	17,2-17,7 K	28-33	Aucune	IV

D'après PETERSSON et WADELL (1985), modifié.
K : kDa

TABLEAU GI : CLASSIFICATION DES ADENOVIRUS HUMAINS AVEC LEURS PRINCIPALES CARACTERISTIQUES

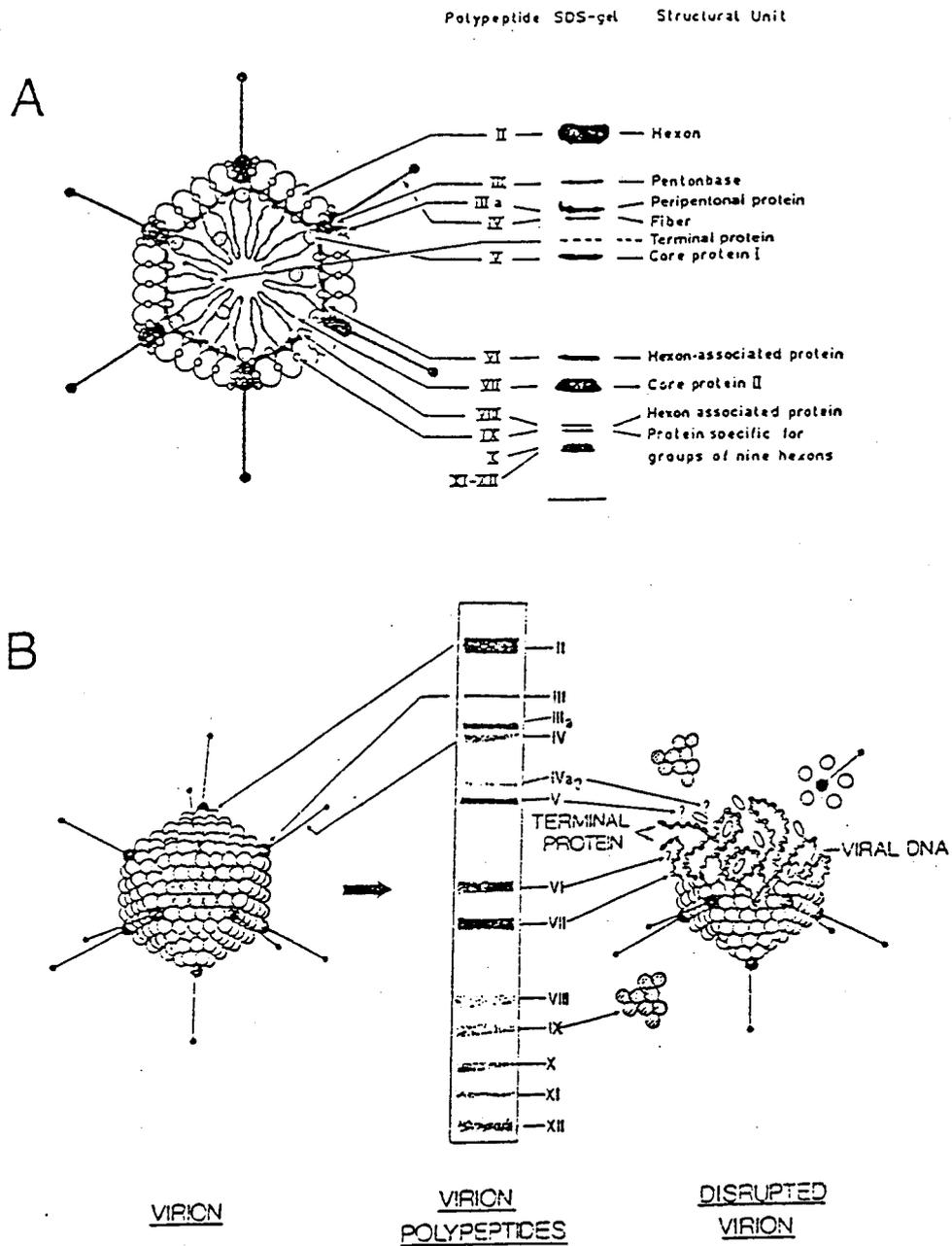


FIGURE G1 : MODELE STRUCTURAL ET LOCALISATION DES PROTEINES DE L'ADENOVIRUS DE TYPE 2.

A : Les protéines du virion et leur localisation (EVERITT et al., 1975)

B : Modèle structural schématique (RUSSELL and PRECIOUS, 1982)

l'épissage de l'ARNm de la fibre (protéine majeure de structure) est déficient dans les CV1 : la protéine n'étant pas synthétisée en quantité suffisante, l'infection virale est bloquée (KLESSIG and CHOW, 1980). Pour l'Ad3 par contre (sous-groupe B) ou l'Ad31 (sous-groupe A), le blocage a lieu au niveau de la réplication de l'ADN viral (DELSERT and D'HALLUIN, 1984). Dans tous les cas, un cycle abortif se déroule avec une production virale quasi-nulle.

Tous les adénovirus sont capables de transformer in vitro des cellules non permissives de rats embryonnaires. Ces cellules acquièrent alors de nouvelles propriétés physiologiques et morphologiques qui ne se maintiennent qu'en présence de la partie gauche (11%) du génome viral intégrée de façon stable dans le génome cellulaire.

Lorsque l'adénovirus, enfin, est en présence de cellules permissives, c'est un cycle lytique qui se déroule, provoquant la lyse de la cellule et la libération de particules virales capables de se propager aux cellules voisines.

II- Le cycle lytique

1- Le déroulement (Revue : HORWITZ, M.S., 1987)

Le cycle lytique de l'adénovirus, débute par une phase d'attachement de la fibre au récepteur de la cellule hôte. Le récepteur est un complexe de trois polypeptides de Mr 78, 42 et 34 kDa (HENNACHE and BOULANGER, 1977). Le virus pénètre ensuite et est décapsidé avant d'injecter son ADN dans le noyau de la cellule.

La transcription des gènes viraux est ensuite divisée en deux phases, précoce et tardive, ponctuées par le démarrage de la réplication de l'ADN viral.

L'infection par l'adénovirus perturbe fortement la cellule : les synthèses de l'ADN, des ARN ribosomiques et des protéines cellulaires sont très réprimées.

2- La phase précoce

Cette phase de l'infection englobe tous les événements précédant la réplication de l'ADN viral et se déroule de 0 à 5-6 heures post-infection.

Les ARNm cytoplasmiques viraux précoces sont complémentaires de sept régions non contigues sur le génome viral transcrites à partir de six promoteurs distincts (Fig. G2).

Les transcrits précoces sont classés chronologiquement en quatre périodes :

- "précoce immédiat" (région E1A)
- "pré-précoce" (région L1)
- "précoce tardif" (E1B, E2, E3, E4)
- "intermédiaire" (IVa2 - IX)

Le brin droit de l'adénovirus dirige la transcription des zones précoces E1 (1,3 à 11,2 unités génome ou u.g.) et E3 (76,6 à 86,2 u.g.), la zone E1 étant elle-même divisée en deux sous-unités E1A (1,3 à 4,5 u.g.) et E1B (4,6 à 11,2 u.g.). Le brin gauche dirige la transcription des régions E4 (96,8 à 91,3 u.g.) E2A (75 à 61,5 u.g.) et E2B (75 à 14,2 u.g.). Le promoteur de E2A change de la phase précoce à la phase tardive de l'infection et les produits de E2A sont synthétisés tout au long du cycle lytique (CHOW et al., 1979).

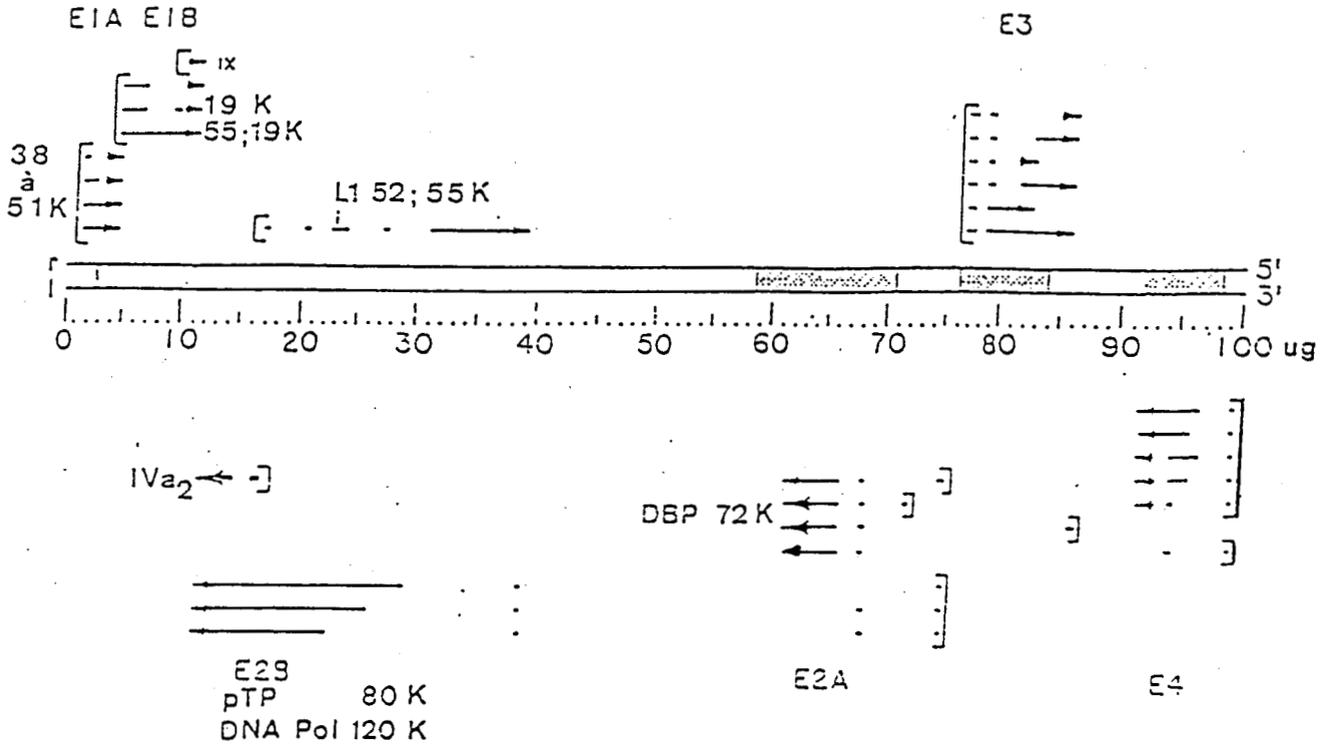
La région E1A localisée de 1,3 à 4,5 u.g. code pour 6 polypeptides de 38 à 51 kDa détectés en gel de polyacrylamide-SDS. Ils sont traduits principalement à partir de deux ARNm de 13S et 12S.

Les produits de l'ARNm 13S sont impliqués dans la régulation de nombreux promoteurs tant viraux que cellulaires.

La région E1B (4,6 à 11,2 u.g.) code pour trois polypeptides dont deux, de Mr 55 et 20 kDa, sont reliés. La protéine de 19 kDa est différente et traduite dans une autre phase de lecture.

Le rôle de la protéine de 55 kDa serait de transporter les ARNm au cytoplasme où ils sont traduits (BABISS et al., 1985). La protéine de 19 kDa serait impliquée dans le maintien de l'intégrité de l'ADN viral (EZOE et al., 1981; WHITE et al., 1984).

La zone E2, divisée en E2A et E2B, dirige la synthèse de protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral : E2A code pour la DNA Binding Protein (DBP) une protéine de 72 kDa ayant une grande affinité pour l'ADN simple brin, E2B code pour le précurseur de la protéine terminale (une protéine de 80 kDa qui sera ensuite clivée en une protéine de 55 kDa) et pour l'ADN polymérase de 120 kDa.



D'après RICHARDSON et WESTPHAL (1981)

FIGURE G2 : CARTE DU GENOME DE L'ADENOVIRUS METTANT EN EVIDENCE LES TRANSCRITS PRECOCES ET INTERMEDIAIRES

- les crochets désignent la localisation des promoteurs,
- les lignes noires représentent les exons des ARNm et les blancs, les introns,
- les flèches montrent le sens de transcription,
- les protéines codées sont également indiquées.

Les régions E3 et E4 codent pour des protéines dont le rôle n'est pas toujours clairement établi. Il semble pourtant que la glycoprotéine 19 kDa de E3 est associée avec les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de la cellule infectée. La protéine de 11 kDa de la région E4 a été retrouvée associée à la matrice nucléaire.

3- La réplication

(Revue: HORWITZ, M.S.; 1987)

Une séquence, d'une centaine de paires de bases, l'ITR (Inversed Terminal Repeat), est retrouvée à chaque extrémité de l'ADN de l'adénovirus. La structure palindromique de l'ITR permet à chaque brin de se replier en structure "manche de poêle". Il contient des éléments de séquence très conservés parmi tous les sérotypes.

Les enzymes impliqués dans la réplication sont au moins cinq dont trois viraux. L'initiation de la réplication (Fig. G3) a lieu de chaque côté de l'ADN grâce à l'amorce - protéine terminale. Un résidu déoxycytidine est lié par son groupement 5' phosphate sur le β hydroxyl d'un résidu sérine de la protéine terminale et sert d'amorce à l'ADN polymérase virale. Le facteur nucléaire NFI est nécessaire à cette étape d'initiation. L'élongation a lieu par le mécanisme de déplacement de brins (Fig. G3). L'ADN polymérase virale et la DBP assurent la synthèse du nouveau brin d'ADN ; cette dernière se lie au brin déplacé et le protège de l'action des endonucléases. Le facteur cellulaire NFII facilite cette étape d'élongation.

Deux types de réplication sont retrouvés : le type I qui a lieu sur les molécules d'ADN double brin parentales, par déplacement et le type II qui a lieu sur les molécules simple brin repliées en structure "manche de poêle" grâce aux ITR.

Dans la particule virale, le précurseur de la protéine terminale (80 kDa) est clivé en protéine de 55 kDa grâce à la protéase virale codée par la région L3 de l'adénovirus.

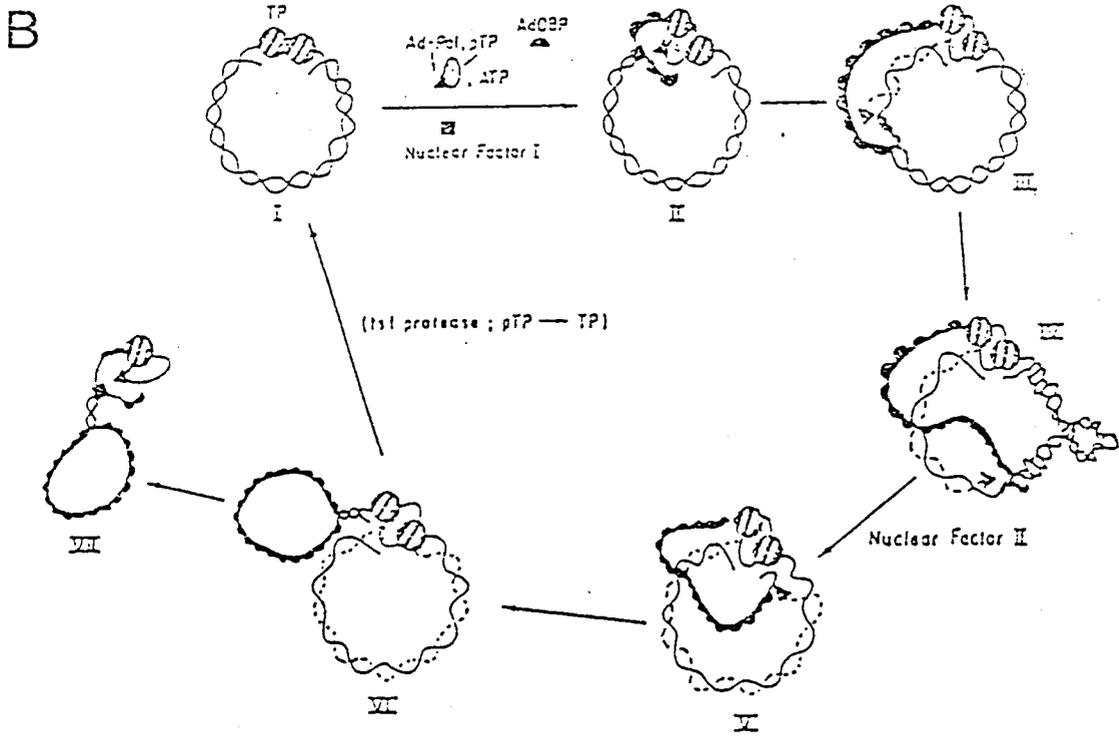
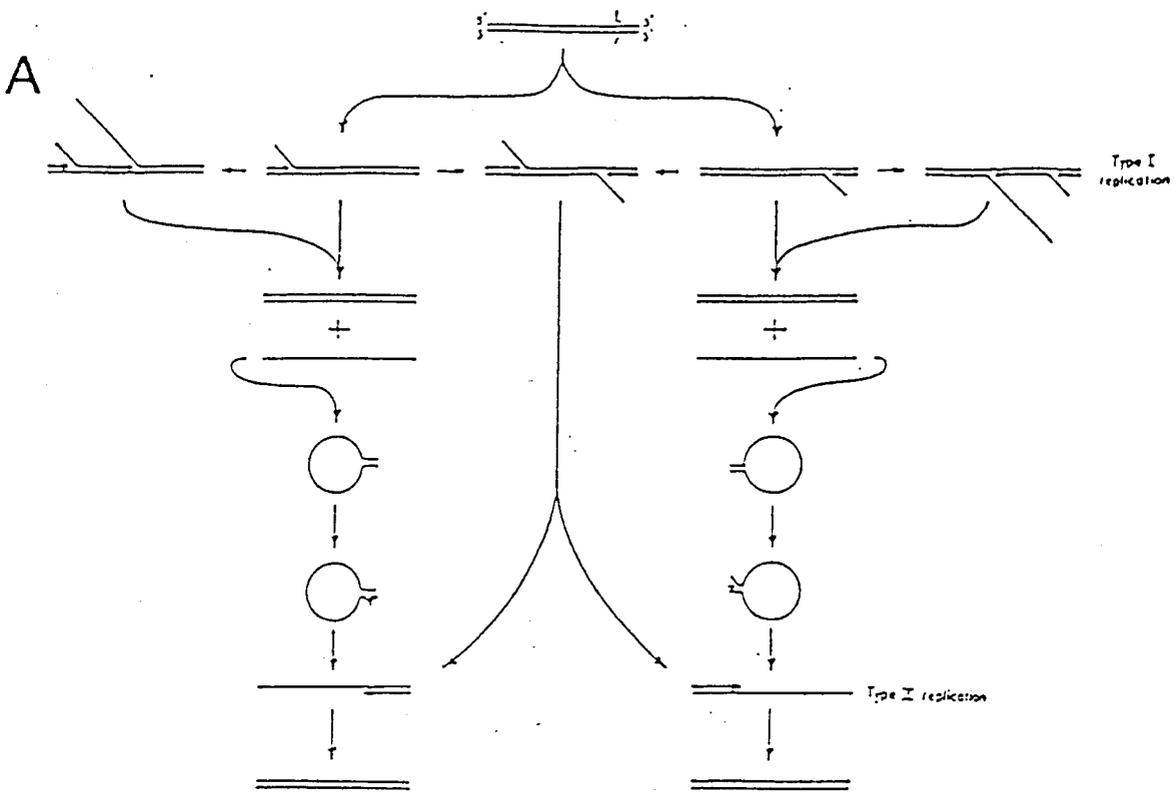


FIGURE G3 : MODELES DE LA REPLICATION DE L'ADN DE L'ADENOVIRUS DE TYPE 2

- A : Modèle de LECHNER et KELLY (1977) expliquant le mécanisme de déplacement du brin non répliqué
- B : Modèle de GUGGENHEIMER et al., (1984) montrant le rôle des protéines cellulaires et virales dans la répliqué.

4- La phase tardive (Fig. G4)

Durant la phase tardive de l'infection le promoteur majeur tardif est très actif. Il dirige la transcription sur le brin droit du génome à partir de 16,6 u.g. (EVANS et al., 1977) d'un ARN nucléaire précurseur de 28 S qui sera ensuite épissé pour donner cinq familles de gènes.

Ces familles possèdent en commun trois séquences en 5', qui, jointes sur l'ARN messenger après épissage, formeront une "séquence de tête" de 200 nucléotides (nt) (BERGET et al., 1977). A l'intérieur de chaque famille, les ARNm de tailles variables ont la même extrémité polyadénylée en 3' (ZIFF and EVANS, 1978). Dix-huit messagers dérivent du précurseur commun. L'abondance relative de chaque ARNm est contrôlée à deux niveaux : le premier est le choix du site de polyadénylation en 3' de chaque famille de gènes, le deuxième est le choix des sites d'épissage à l'intérieur de chacune des cinq familles (Revue : PHILIPSON, 1979).

Les protéines codées par ces cinq familles de gènes (Tableau GII) sont en majorité les protéines structurales du virus ou leurs précurseurs. Cependant, certaines non structurales comme les protéines de 100 kDa ou de 50 kDa (PERSSON et al., 1979) impliquées dans la maturation de la capsid, sont également synthétisées durant cette période.

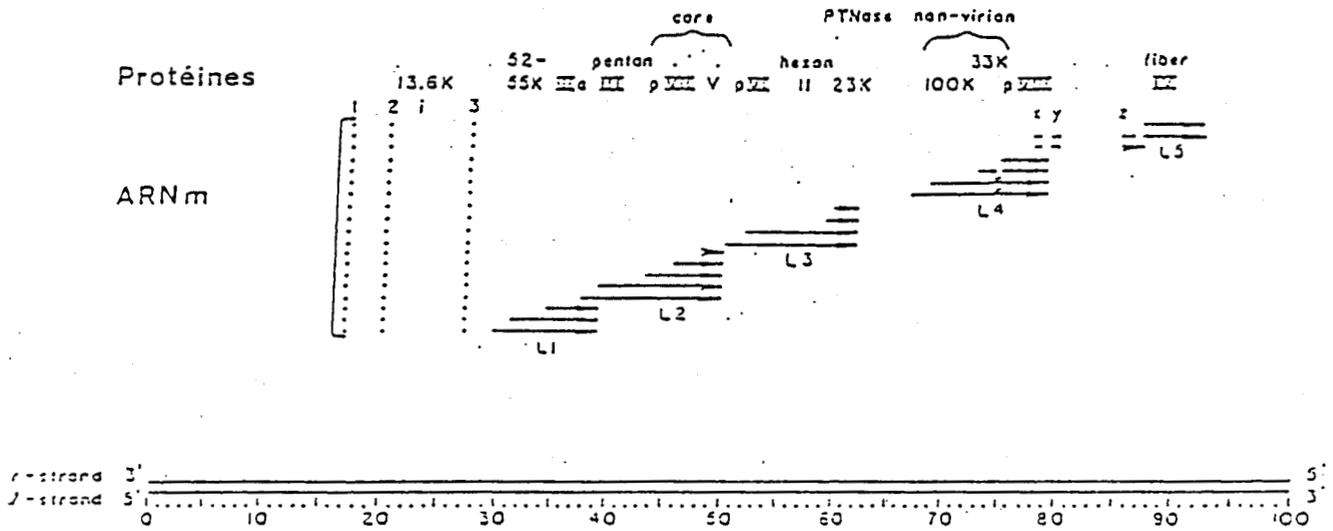
5- Les promoteurs régulés par la réplication de l'ADN viral

5-1 Introduction

Lors de l'infection par l'adénovirus, la transition entre phases précoce et tardive n'est pas strictement définie. Certains promoteurs, en effet, peuvent être actifs aussi bien aux stades précoce que tardif.

C'est le cas de l'unité de transcription E2A qui grâce à un changement de promoteur entre les deux périodes, permet la synthèse de la DBP durant tout le cycle (CHOW et al., 1979).

La régulation de l'expression du promoteur majeur tardif est également particulière car, bien que principalement actif au stade tardif de l'infection, la famille d'ARNm L1 est également transcrite à partir de ce promoteur, dans la phase précoce de l'infection.



D'après BROKER et al., (1984).

FIGURE G4 : REPRESENTATION DES CINQ FAMILLES DE GENES TRANSCRITES AU STADE TARDIF SOUS LE CONTROLE DE M.L.P.

- les flèches noires représentent les ARNm
- les protéines sont indiquées au-dessus des ARNm les codant.

FAMILLE	PROTEINES CODEES DANS LA FAMILLE	COORDONNEES DE L'EXTREMITE 3'OH (en ug)
L ₁	IIIa, 52-55 kDa	39,00
L ₂	III, pVII, V	49,50
L ₃	pVI, Hexon (II) 23 kDa (protéase)	61,50
L ₄	100 kDa, pVIII, 33 kDa	78,30
L ₅	Fibre (IV)	91,20

TABLEAU GII :

LES PROTEINES CODEES PAR LES CINQ FAMILLES DE GENES DE M.L.P.

Les ARNm des polypeptides IX et IVa2 sont transcrits à partir de deux promoteurs distincts appelés "intermédiaires" car actifs avant le démarrage de la réplication de l'ADN viral mais après les zones précoces E1, E2, E3 et E4.

5-2 Le Promoteur Majeur Tardif (MLP)

Le promoteur MLP est le plus actif au stade tardif de l'infection par l'adénovirus. Cependant une activité du promoteur MLP a été détectée au stade précoce dont le taux est comparable à celui des autres promoteurs précoces (NEVINS, 1981 ; SHAW and ZIFF, 1980). A ce stade de l'infection le transcrite primaire du promoteur MLP n'est épissé qu'en l'une des cinq familles d'ARNm colinéaires, la famille L1 (LEWIS and MATHEWS, 1980 ; SHAW and ZIFF, 1980). L'étude de la cinétique d'expression des promoteurs précoces a montré que, chronologiquement, les régions E1A, E1B, L1 puis E2A, E3 et E4 étaient transcrites (GLENN and RICCIARDI, 1988).

Après le démarrage de la réplication de l'ADN viral, le taux de transcription à partir du promoteur MLP augmente d'au moins vingt fois par rapport au taux précoce. Le transcrite primaire est alors mûré en dix-huit ARNm par épissage et polyadénylation alternatifs. Ces ARNm tardifs codent pour la plupart des protéines de structure du virion.

L'ARN précurseur L1 est également épissé différemment suivant le stade de l'infection : il en résultera au stade précoce les ARNm des protéines de 52 et 55 kDa impliquées dans l'assemblage de la particule virale (HASSON et al., 1989) mais les ARNm des protéines 52, 55 kDa et IIIa seront tous trois présents au stade tardif de l'infection (AKUSJARVI and PERSSON, 1981).

De nombreux facteurs cellulaires interviennent en formant des interactions avec le promoteur MLP pour le réguler. Pour son activité au stade précoce, deux éléments de séquence interviennent : le premier est la séquence TATAA (de -31 à -21 nt en amont du site de coiffe MLP) qui est la cible du facteur cellulaire TFIID (SAWAGODO and ROEDER, 1985) ou BTF1 (MIYAMOTO et al., 1985) le deuxième (de -63 à -52 nt) lie spécifiquement le facteur appelé MLTF (CARTHEW et al., 1985), USF (SAWAGODO and ROEDER, 1985) ou UEF (MIYAMOTO et al., 1985).

Des résultats récents montrent que le taux très élevé de transcription du promoteur MLP au stade tardif de l'infection nécessite également la liaison de facteurs protéiques en aval du site d'initiation sur les séquences promotrices correspondant au premier intron des ARNm. Cette région contient trois sites de fixation de facteurs présumés cellulaires mais dont l'activité de liaison est très fortement augmentée dans les cellules infectées par l'adénovirus entre 12 et 20 heures (stade tardif). Cette activité de liaison est inhibée par l'arrêt artificiel de la réplication de l'ADN viral en présence de cyto-arabinoïde (LEONG and BERK 1990).

JANSEN-DURR et al. (1989) ont purifié un facteur cellulaire de 40 kDa dont la concentration et/ou la constante de liaison au promoteur MLP (+80 à +106 nt) est très fortement augmentée au stade tardif de l'infection et ceci lorsque il y a eu réplication de l'ADN viral. Ce facteur interviendrait dans l'expression très élevée du promoteur MLP au stade tardif.

En ce qui concerne le changement d'épissage des ARN de la famille L1 lors du passage précoce-tardif, il semble également qu'un facteur viral ou cellulaire induit par le virus soit impliqué et permette la transition dans la synthèse 52-55 kDa et 52-55 kDa - polypeptide IIIa (DELSERT et al., 1989).

5-3 Le promoteur du polypeptide IX

Certains ARNm viraux ont été décrits comme préférentiellement transcrits au stade intermédiaire de l'infection, c'est-à-dire après la transcription des ARNm précoces et avant le démarrage de la réplication de l'ADN viral.

C'est le cas des ARNm des polypeptides IX et IVa2 uniques transcrits de deux promoteurs distincts.

Le gène du polypeptide IX localisé sur le brin droit de l'ADN viral entre 9,5 et 11,2 u.g. est le seul actuellement identifié chez l'adénovirus ne contenant pas d'intron. Bien que situé dans la zone précoce E1B, le gène du polypeptide IX en est distinct et possède son propre promoteur actif au stade intermédiaire de l'infection. PERSSON et al. (1978) ont en effet démontré que le polypeptide IX pouvait être détecté dans les extraits de cellules infectées dès 6 heures post-infection soit 2 à 4 heures plus tôt que les autres composants de la capsid. De plus le polypeptide IX est synthétisé lorsque la réplication

de l'ADN viral est bloquée par la cyto-arabinoside .

CROSSLAND et RASKAS (1983) ont utilisé un inhibiteur moins labile de la réplication virale, l'hydroxyurée, et ont observé que la transcription du gène IX était alors inhibée. Ils ont également montré que la transcription du gène IX n'avait lieu que sur des molécules d'ADN viral nouvellement répliquées. Un changement de conformation de la matrice, dû à la réplication, semble nécessaire à la transcription du gène IX et rend peut-être le promoteur accessible à l'ARN polymérase. La matrice nouvellement répliquée peut également entrer dans un compartiment cellulaire spécifique où le promoteur du IX serait au contact de facteurs nécessaires à son activité. La présence précoce de la protéine IX dans les cellules infectées a aussi été attribuée à l'absence de modification post-transcriptionnelle de son ARNm: celui-ci n'étant pas épissé il peut être transporté au cytoplasme et traduit plus rapidement que les ARNm tardifs (FLINT, 1986).

Dans la capside virale le polypeptide IX joue un rôle de stabilisation (COLBY and SHENK, 1981). La présence de la protéine IX dans les groupes de 9 hexons constituant les faces de la capside virale a été visualisée grâce à la combinaison de la cristallographie aux rayons X et de la microscopie électronique (FURCINATTI et al., 1989).

La présence de la protéine IX a également été détectée dans certaines cellules de rat transformées par la région précoce E1 de l'adénovirus de type 12 (GRAND et al., 1987).

5-4 Le promoteur du polypeptide IVa2

Le promoteur du gène du polypeptide IVa2, situé à 16,3 u.g. sur le brin gauche de l'ADN viral (CHOW and BROKER, 1978) dirige la transcription principalement tardive d'un ARNm unique contenant un intron (CHOW et al., 1979).

Une activité précoce du promoteur du gène IVa2 a été détectée. SEHGAL et al., (1979) ont utilisé un analogue de nucléoside provoquant dans les cellules infectées un arrêt prématuré de la transcription des ARNm viraux, à proximité de leur site d'initiation, permettant ainsi de localiser les promoteurs actifs. A 5 heures post infection, une activité a été détectée pour le promoteur du polypeptide IVa2.

SHAW et ZIFF (1980) ont analysé par hybridation avec des segments d'ADN viral, les ARN produits dans le noyau et le cytoplasme des cellules infectées. Des séquences complémentaires du gène IVa2 ont été détectées dans le noyau dès 3 heures post-infection mais la forme mature polyadénylée et cytoplasmique de l'ARNm IVa2 n'est retrouvée qu'à 6 heures post-infection.

GLENN et RICCIARDI (1988) ont isolé les ARNm cytoplasmiques de la même façon, de 0 à 12 heures post-infection et n'ont obtenu la protéine IVa2 par traduction in vitro qu'à partir des ARNm sélectionnés à 8 heures post-infection par hybridation au segment gauche (11 à 16 u.g.) de l'ADN viral.

Par inhibition de la réplication de l'ADN viral, avec la cyto-arabine ou en utilisant le mutant H5 ts 125 bloqué dans la réplication à température restrictive, BINGER et FLINT (1984) n'ont pas détecté l'ARNm mature, épissé du gène IVa2. L'hydroxyurée, autre inhibiteur de la réplication virale, bloque également la transcription de l'ARNm mature de 1,61 kb du gène IVa2 (CROSSLAND and RASKAS, 1983). Il semble qu'une régulation de l'expression et/ou de la maturation de l'ARN IVa2 ait lieu durant le cycle lytique au moment de la réplication virale.

Le rôle supposé du polypeptide IVa2 est d'intervenir dans l'assemblage de la capsid virale (PERSSON et al., 1979).

6- Le gène du polypeptide IVa2 (Fig. G5)

6-1 Description

Le gène codant pour la protéine IVa2 (Mr de 52 à 56 kDa en gel de polyacrylamide-SDS) a été initialement identifié par LEWIS et al., (1977). Les auteurs ont sélectionné les ARNm par hybridation à des séquences définies de l'ADN viral et les ont traduits in vitro : le fragment de génome viral compris entre 2798 et 6231 pb dirigeait principalement la transcription des gènes des polypeptides IX et IVa2.

Par formation d'hétéroduplex ADN-ARNm et analyse par microscopie électronique, CHOW et al., (1979) ont observé que l'ARNm du IVa2 contenait un petit intron (de 277 nucléotides) entre 5695 et 5418 pb. Le promoteur a été localisé à 5826 pb et la terminaison en 3' à 4060 pb.

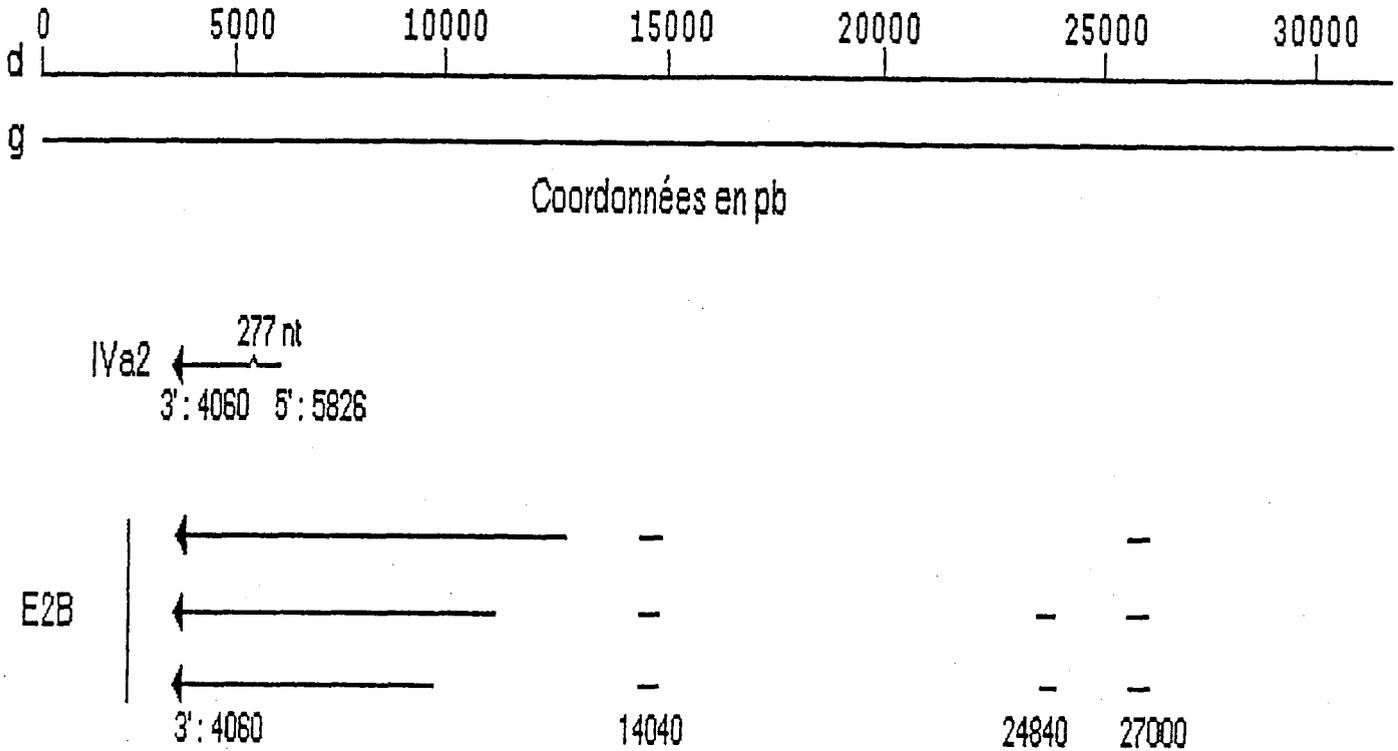


FIGURE G5 : SCHEMATISATION DES ARNm DES REGIONS IVa2 et E2B TRANSCRITS SUR LE BRIN GAUCHE (g) DE L'ADN VIRAL

- les crochets localisent les promoteurs,
- les traits noirs représentent les ARNm,
- les sites de polyadénylation en 3' sont situés au niveau des flèches,
- la taille de l'intron de l'ARNm IVa2 est notée.

Le gène a ensuite été totalement séquencé chez les adénovirus de type 5 (VAN BEVEREN et al., 1981) et de type 7 (ENGLER and VAN BREE, 1982). Pour le sérotype 5 les sites nécessaires à l'expression du gène ont ainsi été positionnés sur la séquence nucléotidique. Le site de polyadénylation en 3' de l'ARNm chevauche celui du polypeptide IX (ALESTROM et al., 1980) qui se situe sur le brin opposé de l'ADN viral.

La séquence primaire de la protéine a été déduite de la séquence nucléotidique. Une phase ouverte de lecture de 449 acides aminés a été identifiée et la composition potentielle de cette protéine est résumée dans le tableau GIII. Elle posséderait un Pm théorique de 50873 Da en accord avec la Mr du IVa2 en gel de polyacrylamide-SDS (VAN BEVEREN et al., 1981).

La comparaison des séquences nucléotidiques du gène IVa2 des sérotypes 5 et 7 montre un remarquable degré d'homologie (78% au total). Les protéines IVa2 des deux types sont également très homologues (81% d'acides aminés identiques) mais le degré de conservation varie selon la région de la protéine analysée : les régions des nucléotides (nt) 5789 à 5282 sont homologues à 82%, les régions de 281 à 5084 nt à 54% seulement et les régions de 5053 à 3947 nt à 88%. Il apparaît donc une meilleure conservation de la partie C terminale de la protéine (des résidus 126 à 448) (ENGLER and VAN BREE, 1982).

6-2 Organisation du promoteur

Parmi les trois ARN polymérases eucaryotes, seule l'ARN polymérase de type II transcrit les gènes codant pour des protéines. Ces gènes forment la classe II. L'ARN polymérase de type I transcrit les ARN ribosomiques et l'ARN polymérase de type III, les petits ARN dont les ARN de transfert (CHAMBON, 1975).

Les promoteurs des gènes de classe II sont composés de plusieurs éléments localisés en amont ou en aval du site d'initiation de la transcription et qui la régulent. Un premier élément, localisé dans la plupart des gènes de classe II à 30 nt en amont du site de démarrage de la transcription -ou site de coiffe- contient la séquence TATAA. Cette séquence permet la fixation du complexe de transcription ARN polymérase II- facteurs de transcription, assurant ainsi le démarrage spécifique de la transcription au site de coiffe 30 nt en aval.

ACIDE AMINE	NOMBRE DE RESIDUS	:	ACIDE AMINE	NOMBRE DE RESIDUS
phe	11	:	his	19
leu	50	:	glu	24
ile	21	:	asn	18
met	16	:	lys	20
val	19	:	asp	29
ser	24	:	glu	19
pro	39	:	cys	7
thr	20	:	trp	5
ala	33	:	arg	35
tyr	14	:	gly	26

```

10      20      30      40      50      60
METRGRRPAA LQHQQDQPQA HPGQRAARSA PLHRDPDYAD EDPAPVERHD PGPSGRAPTT

70      80      90      100     110     120
AVQRKPPQPA KRGDMLDRDA VEQVTELWDR LELLGQTLKS MPTADGLKPL KNFASLQELL

130     140     150     160     170     180
SLGGERLLAD LVRENMRVRD MLNEVAPLLR DDGSCSSLNY QLHPVIGVIY GPTGCGKSQL

190     200     210     220     230     240
LRNLLSSQLI SPTPETVFFI APQVDMIPPS ELKAWEMQIC EGNYPGPDG TIIPQSGTLR

250     260     270     280     290     300
PRFVKMAYDD LILEHNYDVS DPRNIFAQAA ARGPIAII MD ECMENLGGHK GVSKEFFHAFP

310     320     330     340     350     360
SKLHDKFPKC TGYTVLVVLH NMNPRRDMAG NIANLKIQSK MHLISPRMHP SQLNRFVNTY

370     380     390     400     410     420
TKGLPLATSL LLKDIFRHHA QRSCYDWIY NTPQHEALQ WCYLHPRDGL MPMYLNIOQH

430     440     450
LYHVLEKIHR TLNDRDRWSR AYRARKTPK*

```

TABLEAU GIII :

COMPOSITION ET SEQUENCE EN ACIDES AMINES DE LA PROTEINE IVa2
D'ADENOVIRUS 5. (VAN BEVEREN et al., 1981)

Un ou plusieurs éléments situés de -50 à -110 nt en amont du site de coiffe sont nécessaires à l'expression optimale de gènes particuliers. Ils sont également la cible de facteurs cellulaires, de deux types : soit généraux (impliqués dans la formation du complexe de transcription) soit spécifiques d'un promoteur défini.

Les sites de démarrage de la transcription des promoteurs IVa2 et MLP de l'adénovirus sont séparés de 210 pb et sont d'orientation opposée sur les deux brins de l'ADN viral. Le promoteur MLP possède une séquence TATAA à -30 nt en amont du site de démarrage de la transcription ; le promoteur du gène du IVa2 n'en possède pas (BAKER and ZIFF, 1981). En utilisant la technique d'extension d'amorce in vitro, BAKER et ZIFF (1981) ont montré que l'ARNm du polypeptide IVa2 possédait différentes séquences de terminaison en 5'. L'unité de transcription E2A ne contient pas non plus de séquence TATAA (BAKER et al., 1979). Les deux promoteurs E2A et IVa2 initient très peu efficacement la transcription de gènes placés en aval lors d'essais en systèmes in vitro (HU and MANLEY, 1981).

In vivo, cependant lors de l'infection virale le promoteur de la région E2A est très actif alors que celui du IVa2 l'est très peu (BAKER and ZIFF, 1981). Des éléments autres que la présence de la séquence TATAA interviennent donc dans la régulation de la transcription in vivo.

6-3 Régulation de la transcription (Fig. G6)

NATARAJAN et al. ont extensivement étudié la régulation de la transcription du gène IVa2. En utilisant un système de transcription in vitro, deux séquences ont initialement été identifiées en amont du promoteur : la première dite proximale (de -49 à -38 nt) régule positivement la transcription (NATARAJAN et al., 1984). La deuxième dite distale a d'abord été localisée entre -152 et -242 nt avant d'être définie en deux éléments : la séquence distale 1 (de -152 et -179 nt) qui augmente la transcription du IVa2 (NATARAJAN et al., 1985) et du MLP situé dans la même région du génome mais en sens opposé (HEN et al., 1982) et la séquence distale 2 (de -211 à -242 nt) qui diminue la transcription du IVa2 de 90%.

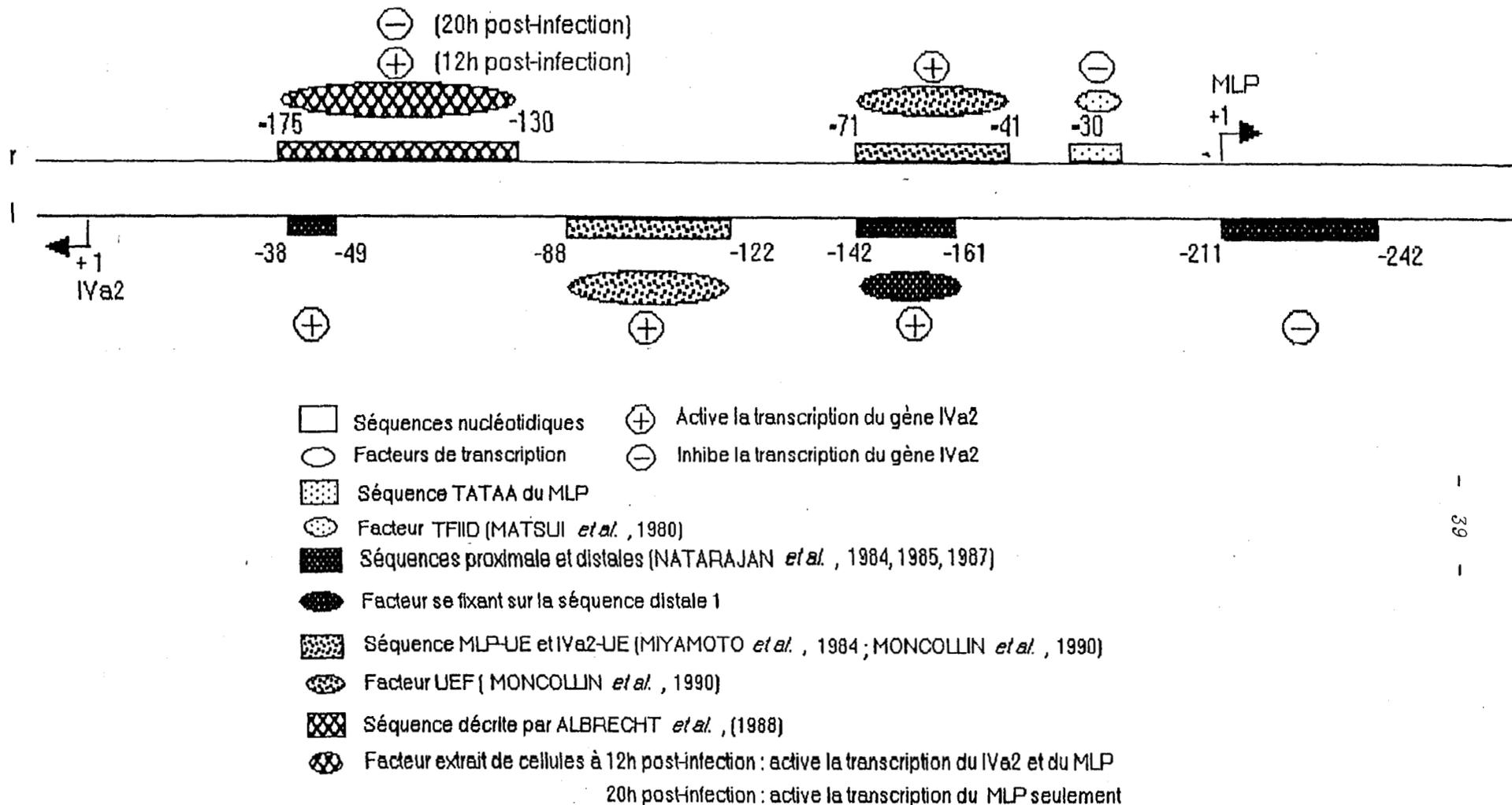


FIGURE G.6 : REGULATION DE LA TRANSCRIPTION DU GENE IVa2
 INTERACTIONS AVEC LE MLP

Un modèle de compétition entre les promoteurs IVa2 et MLP pour l'entrée du complexe cellulaire de transcription a été proposé, cette compétition ayant lieu au niveau de la séquence distale 1 et jouant naturellement en faveur du promoteur MLP. En effet, lorsque la séquence TATAA du promoteur MLP est mutée ponctuellement, réduisant le taux de transcription à partir de MLP de 80%, celui du promoteur IVa2 s'est vu augmenter de 8 à 10 fois (NATARAJAN et al., 1985). Une interaction entre la séquence distale 1 (-152 à -179 nt) et un facteur protéique a ensuite été montrée. Plus précisément, les 20 bases 5'CCCGGTCACGTGGCCTACAC 3' entre -142 et -161 nt en amont du site de coiffe du gène IVa2 sont protégées par une protéine présente dans les cellules non infectées (NATARAJAN et al., 1987).

ALBRECHT et al., (1988) ont étudié la protection des séquences promotrices MLP-IVa2 par des extraits nucléaires de cellules infectées. Alors qu'à 12 heures post-infection des facteurs protéiques semblent impliqués dans la transcription des deux promoteurs, à 20 heures post-infection ils paraissent interagir différemment sur chacun des promoteurs et se fixer plus fortement sur le promoteur MLP pour en activer la transcription. Le facteur spécifique du IVa2 peut devenir limitant et expliquer la faible expression du promoteur IVa2 par rapport au promoteur MLP à mesure que le nombre de copies d'ADN viral nouvellement synthétisées augmente.

MONCOLLIN et al. (1990) ont montré que la séquence de génome située entre les deux promoteurs IVa2 et MLP d'Ad2 contient deux éléments de fixation du facteur UEF (Upstream Element Factor) connu pour augmenter spécifiquement la transcription à partir du MLP (MIYAMOTO et al., 1985). Le premier élément, nommé MLP-UE, est situé de -41 à -71 nt en amont du site de démarrage de transcription MLP, le second, désigné IVa2-UE est localisé de -98 à -122 nt par rapport à MLP (soit -88 à -122 nt par rapport au site de coiffe du IVa2).

Le facteur UEF, protéine de 42-45 kDa purifiée par chromatographie d'affinité sur un élément de séquence du promoteur MLP à partir de cellules HeLa non-infectées, se lie spécifiquement aux deux éléments IVa2-UE et MLP-UE avec une affinité plus grande pour ce dernier.

Le facteur est cependant capable d'activer la transcription des deux promoteurs, in vitro, quand il est ajouté aux autres facteurs de transcription. Il est tentant de croire qu'in vivo le facteur agit sur l'activité transcriptionnelle des deux promoteurs. Cependant, la très forte augmentation de transcription des deux promoteurs durant la phase tardive de l'infection ne peut être due à la seule présence de l'UEF. Les auteurs n'excluent pas la présence d'un facteur inductible régulant la transcription des promoteurs MLP et IVa2 au stade tardif de l'infection.

6-4 Régulation post-transcriptionnelle

Le mutant H5 ts 1 (WILLIAMS et al., 1971) synthétise très faiblement les protéines virales à température restrictive (40°C). HAYES et al. (1990) ont localisé la mutation responsable de ce phénotype dans le gène L4 codant pour la protéine non-structurale de 100kDa impliquée dans l'assemblage de la particule (MORIN and BOULANGER, 1986). Les auteurs ont montré que l'un des rôles de la protéine de 100kDa était de faciliter la traduction des ARNm tardifs transcrits à partir du promoteur MLP ainsi que de ceux des polypeptides IX et IVa2. Une cible potentielle de la protéine de 100kDa est la séquence de tête du promoteur MLP constituée de 200 nt et présente à l'extrémité 5' des ARNm transcrits à partir du promoteur MLP. Cette séquence était déjà connue pour activer fortement la traduction des messagers placés en aval durant la phase tardive de l'infection (LOGAN and SHENK, 1984). Les ARNm IX et IVa2 ne possèdent pas cette séquence de tête mais leurs extrémités 5' présentent des homologues de séquence avec celle de 200 nt du promoteur MLP; elles pourraient interagir avec la protéine de 100kDa (HAYES et al., 1990)

7- L'assemblage

L'assemblage est l'ultime étape du cycle lytique et aboutit à la formation d'un grand nombre de particules virales.

Les protéines structurales, formées au stade tardif de l'infection, vont s'autoassembler pour former la capsid. Celle-ci est la répétition de nombreuses sous-unités protéiques identiques codées par la même portion de génome viral.

L'assemblage des virions est un processus complexe qui fait intervenir de nombreuses interactions entre protéines qui subiront ensuite des maturations par clivage protéolytique. Certaines protéines, dites d'échafaudage, peuvent intervenir pour aider le processus.

Les capsomères peuvent s'assembler entre eux :

- de façon hélicoïdale et la capside est ouverte (virus de la mosaïque du tabac par exemple)
- de façon icosaédrique et la capside est fermée (adénovirus).

En ce qui concerne l'adénovirus, au cours de la phase tardive du cycle infectieux, la synthèse des protéines cellulaires est fortement réprimée et les ARNm viraux sont préférentiellement traduits. Les polypeptides viraux sont rapidement détachés des polyribosomes et sont transportés au noyau (HORWITZ et al., 1969; VELICER and GINSBERG, 1970) où les monomères d'hexon de penton et de fibre s'assemblent en unités de la capside (VELICER and GINSBERG, 1970).

Lors d'une cinétique d'infection, l'analyse des différentes progénitures virales obtenues a montré que plusieurs bandes virales s'équilibrent à des densités apparentes différentes en gradient isopycnique apparaissent, correspondant aux étapes d'assemblage du virus. Des expériences de marquage radioactif suivies de chasse ont montré qu'une relation précurseur produit final existe entre les capsides vides (intermédiaires d'assemblage de densité faible) et le virus mature (de densité plus élevée) (SUNDQUIST et al., 1973).

L'analyse de la composition en protéines des capsides vides par rapport au virus mature (ISHIBASHI and MAIZEL, 1974) a révélé que :

- les capsides vides ou pleines contiennent les polypeptides viraux majeurs de structure (II, III, IV, IX),
- les capsides vides ne contiennent ni les protéines V et VII associées à l'ADN viral dans la particule mature ni les protéines VI, VIII, X et XII,
- par contre, les capsides vides contiennent des polypeptides non retrouvés dans les particules matures : deux d'entre elles les protéines pVI et pVIII sont les précurseurs des protéines VI et VIII (EDVARDSON et al., 1976). Des protéines de 50 kDa, 40 kDa et 33 kDa sont totalement absentes du virus mature et sont appelées protéines d'échafaudage (EDVARDSON et al., 1976 ; D'HALLUIN et al., 1978b).

Des études de cinétique de marquage et d'analyse en gel de polyacrylamide-SDS des protéines virales ont montré que lorsque les capsides virales s'assemblent, elles contiennent des précurseurs polypeptidiques et certainement des protéines d'échafaudage. L'ADN viral et les protéines V et VII qui lui sont associées sont ensuite insérées ensemble ou séparément et l'étape finale de la morphogénèse fait intervenir des clivages protéolytiques des précurseurs.

L'insertion de l'ADN viral dans les capsides vides se fait grâce à un signal d'encapsidation localisé entre 194 et 358 nt à partir de l'extrémité gauche du génome (HEARING et al., 1987), il contient un élément de séquence répétée et doit être placé à une extrémité du génome pour fonctionner.

Ce signal ressemble au site de reconnaissance présent dans l'ADN du phage Lambda où une séquence spécifique présente à l'extrémité gauche du génome se lie à certaines protéines nécessaires à l'encapsidation de l'ADN du phage (FEISS, 1986).

L'assemblage de l'adénovirus se fait donc en plusieurs étapes. Des intermédiaires ont pu être isolés lors de cinétiques d'infection et purifiés en gradient isopycniqne après solidification des structures par des agents pontants clivables tels que le dithiobisbutyrimidate (D'HALLUIN et al., 1978b). Plusieurs bandes virales apparaissent, s'équilibrant à des densités différentes :

- à $1,315 \text{ g/cm}^3$ les "intermédiaires légers" sont retrouvés : la capsid est associée à un ADN viral de coefficient de sédimentation 11 S, elle contient les précurseurs des polypeptides VI et VIII. Ces particules contiennent également des protéines de 50 kDa, 40 kDa et 32-33 kDa présumées être des protéines d'échafaudage. (D'HALLUIN et al., 1978b).
- à $1,37 \text{ g/cm}^3$ se trouvent les "intermédiaires lourds" contenant l'ADN viral entier mais pas les protéines V et VII qui lui sont normalement associées. Les précurseurs des polypeptides VI, VII, VIII, IIIa et de la protéine terminale ne sont pas encore clivés dans ces intermédiaires et ne le seront pas non plus dans l'étape "jeune virion" qui suit (D'HALLUIN et al., 1978b).
- à $1,34 \text{ g/cm}^3$ les virus matures et les intermédiaires "jeunes virions" sont équilibrés. Les deux populations contiennent l'ADN viral intact mais ont des compositions polypeptidiques différentes : les "jeunes virions" contiennent tous les précurseurs

polypeptidiques des virus matures sous la forme non clivée (D'HALLUIN et al., 1978b),

Grâce à plusieurs mutants thermosensibles (ts) de l'adénovirus bloqués en différentes étapes, un schéma d'assemblage a pu être dégagé bien que certains points restent encore obscurs (Fig. G7), (D'HALLUIN, 1980 ; PHILIPSON, 1983).

Après la formation des sous-unités, les capsides vides s'autoassemblent. L'ADN y entre probablement nu bien que ce point soit litigieux. L'étape suivante est la maturation par clivage protéolytique des polypeptides qui étaient encore présents sous forme de précurseurs (pVI, pVII, pVIII, pIIIa).

L'assemblage de la capside de l'adénovirus est un processus complexe qui nécessite l'intervention de protéines autres que les protéines majeures de structure. La formation des trimères d'hexon, en particulier, s'effectue grâce à l'aide d'une protéine de 100 kDa (CEPKO and SHARP, 1982).

Cette protéine, codée par la même région du génome viral que les protéines de structure, est appelée "protéine tardive non structurale" car elle n'est pas retrouvée dans la capside mature. La trimérisation de l'hexon n'est pas le rôle unique de la 100 kDa : elle a en effet un rôle à jouer dans la formation des capsides vides (MORIN and BOULANGER, 1986). HAYES et al. (1990) ont également montré que la 100kDa était nécessaire à une traduction efficace des ARNm viraux tardifs.

Cette protéine multifonctionnelle présente des similitudes avec des protéines d'échafaudage phagiques comme la p22 du phage T4 et la gp8 du phage P22.

Au cours d'études d'assemblage effectuées grâce au mutant H2 ts 112, D'HALLUIN et al. en 1978(a) ont montré que deux protéines de 50 kDa et 39 kDa étaient présentes en grande quantité dans les intermédiaires légers d'assemblage ($d = 1,315 \text{ g/cm}^3$) mais absentes de la particule mature. Ces deux protéines seraient des protéines d'échafaudage. PERSSON et al., en 1979, montrent également l'existence dans les intermédiaires d'assemblage de l'adénovirus de type 2, d'une protéine de 50 kDa qui n'est plus qu'à l'état de trace dans la particule mature. Cette protéine serait codée par le gène - IVa2 entre 11,3 et 16,1 u.g. Les auteurs émettent l'hypothèse que la protéine IVa2 (50 kDa) est une protéine d'échafaudage et que les traces retrouvées dans

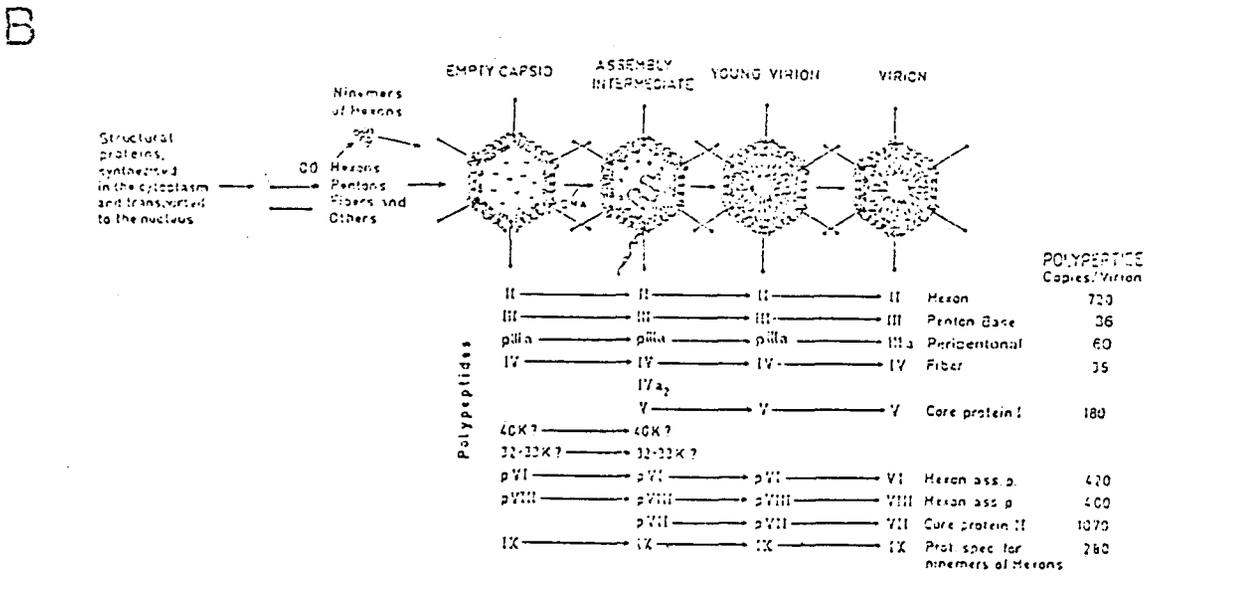
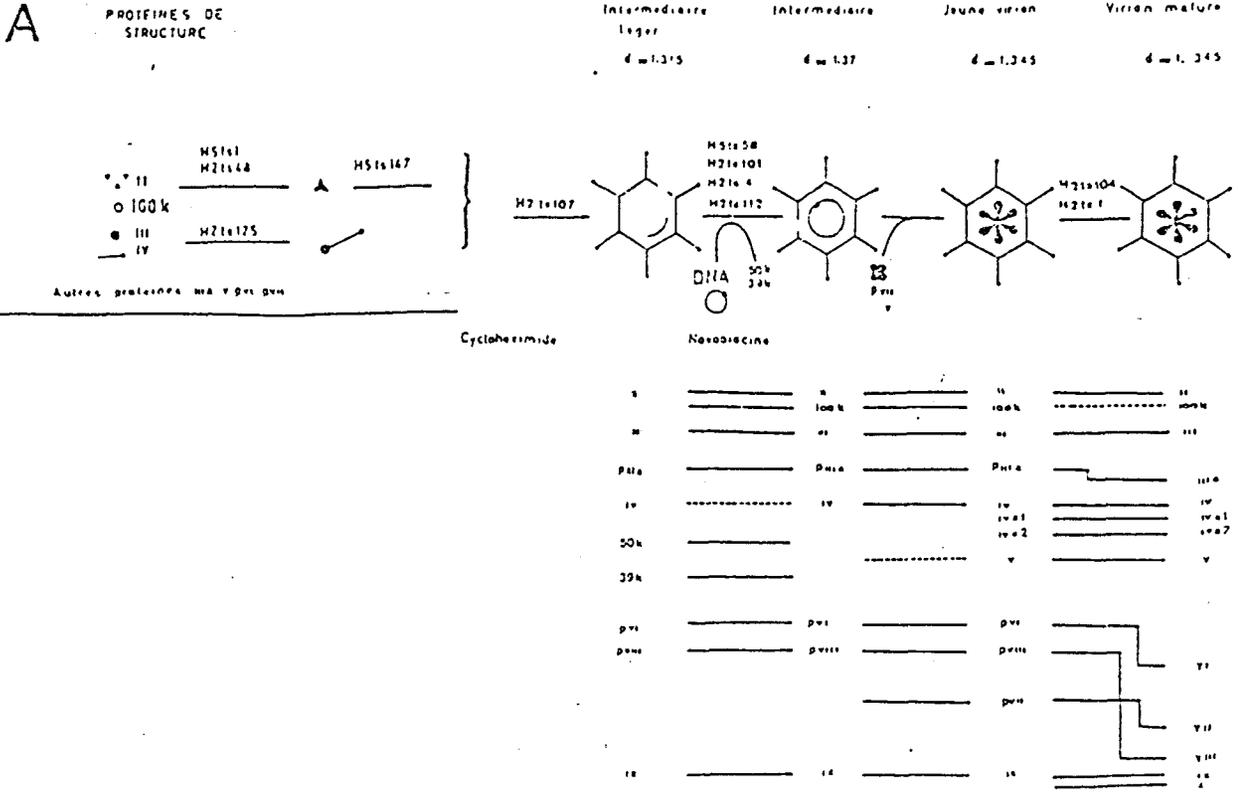


FIGURE G7 : MODELES D'ASSEMBLAGE DE L'ADENOVIRUS

A : Schéma d'assemblage de la particule infectieuse selon D'HALLUIN (1980)

B : Modèle de PHILIPSON (1983).

La composition en polypeptides est indiquée en-dessous de chaque particule.

Le virus mature ne sont qu'un artéfact dû à une purification partielle des particules.

8- Les protéines mineures de l'adénovirus

8-1 Introduction

Au cours de la morphogénèse du virus, plusieurs protéines virales ou induites par le virus dont la Mr en gel de polyacrylamide-SDS avoisine les 50 kDa, ont été décrites. Les gènes codant pour certaines d'entre elles ont mis en évidence. Leurs rôles ne sont pas toujours déterminés.

8-2 Les protéines de 52 et 55 kDa

Les protéines de 52 et 55 kDa de L1 ont des Mr et des compositions peptidiques très proches (AKUSJARVI and PERSSON, 1981). Elles sont toutes deux codées par l'extrémité gauche de la région L1 du génome viral sous le contrôle du MLP (MILLER et al., 1980).

Elles sont détectables dans des extraits de cellules infectées dès 6 heures post-infection (LEWIS et al., 1985 ; LUCHER et al., 1986). Bien qu'ayant la même extrémité N-Terminale elles ne sont pas liées par une relation précurseur-produit de clivage comme le montrent des expériences d'immunoprécipitation après marquage radioactif et chasse. Elles ont été localisées dans la membrane nucléaire de cellules infectées par immunofluorescence et sont absentes de la particule mature (LUCHER et al., 1986).

L'obtention du mutant H5 ts 369 (HASSON et al., 1989) localisé dans la région L1 52/55 kDa a montré, à température restrictive, une accumulation de particules légères partiellement remplies d'ADN viral (extrémité gauche) et ne contenant pas les protéines du nucléoïde V et VII.

Les protéines 52 et 55 kDa de L1 interviennent dans l'encapsidation de l'ADN viral peut-être au niveau de sa compaction (HASSON et al., 1989).

8-3 Les différentes protéines de 50 kDa des intermédiaires de maturation

8-3-1 Le mutant H2 ts 112

Le mutant thermosensible H2 ts 112 accumule, à la température restrictive de 40°C, une protéine de 50 kDa (dans ses particules vides) qui disparaît lorsqu'une baisse de température à 33°C est effectuée aboutissant à la maturation de la particule virale (D'HALLUIN et al., 1978a).

Cette protéine de 50 kDa semble impliquée transitoirement dans la morphogénèse de la capsid virale mais son origine est inconnue. Des études ont également montré qu'elle était phosphorylée.

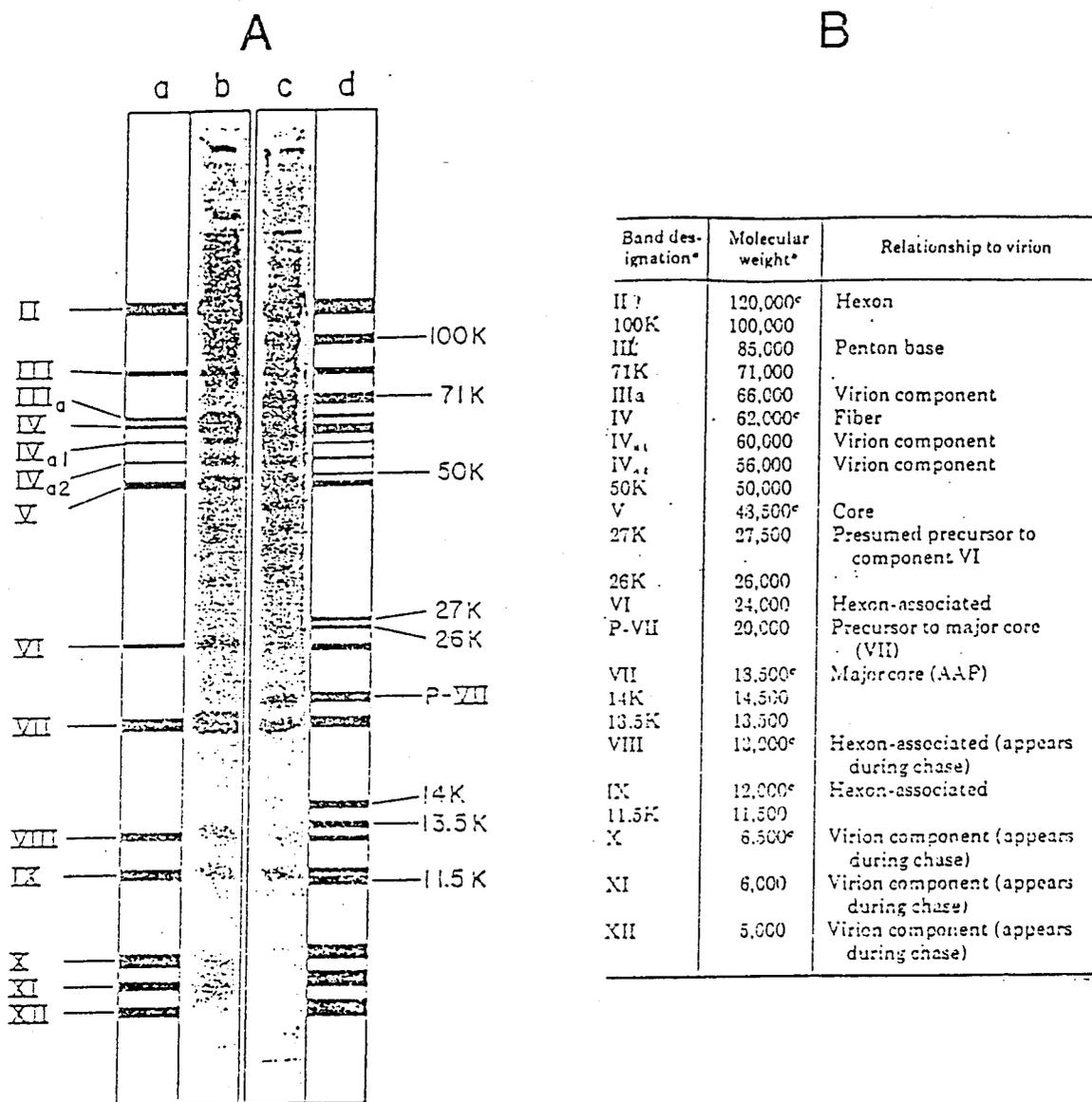
8-3-2 Les capsides vides de l'adénovirus 2

ANDERSON et al., (1973) avaient comparé la composition polypeptidique de l'Ad2 mature et des extraits de cellules infectées 20 heures et avaient montré, qu'en plus des treize polypeptides présents dans le virus mature, neuf, dont une protéine de 50 kDa, étaient induits par le virus (Fig. G8).

En 1976, EDVARSON et al., étudient les intermédiaires d'assemblage de l'Ad3 et analysent plusieurs classes de particules : les intermédiaires de maturation de densité apparente 1,30 g/cm³ en gradient de CsCl, les capsides vides ($d = 1,29 \text{ g/cm}^3$) et les virus matures ($d = 1,34 \text{ g/cm}^3$). Seules les intermédiaires de maturation contiennent en grande quantité, une protéine de 50 kDa environ, que les auteurs supposent être le polypeptide IVa2.

En 1979, PERSSON et al., isolent, sur gradient de saccharose, après 20 heures d'infection par l'Ad2, deux types de particules virales : les virions nucléaires et des intermédiaires de maturation. Dans ces derniers, une protéine de 50 kDa est présente en grande quantité, elle n'est pas retrouvée dans le virus mature.

En 1977, LEWIS et al., avaient montré que le fragment du génome viral compris entre 2798 et 6231 pb dirigeait la synthèse de la protéine IVa2. La transcription avait lieu sur le brin gauche de l'ADN.



ANDERSON et al., (1973)

- FIGURE G8 :**
- A -** GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS DE PARTICULES VIRALES D'AD2 ET D'EXTRAITS DE CELLULES INFECTEES 20 HEURES
- a - protéines virales idéalisées par schéma
 b - protéines virales résolues en gel-SDS 15%
 c - protéines virales et viro-induites extraites de cellules infectées 20 h
 d - protéines virales et viro-induites idéalisées.
- B -** POIDS MOLECULAIRES ET ORIGINES DES PRINCIPALES PROTEINES OBSERVEES EN GEL.

PERSSON et al. (1979) comparent alors la protéine de 50 kDa isolée dans les intermédiaires de maturation et celle de 50 kDa obtenue après sélection des ARN messagers tardifs (18 heures post-infection) par hybridation avec le brin gauche de l'ADN viral et traduction in vitro. Bien que cette dernière migre plus lentement en gel de polyacrylamide-SDS que la protéine de 50 kDa isolée des intermédiaires, les digestions tryptiques des deux protéines montrent des homologies. Une expérience d'arrêt de la traduction in vitro par hybridation ADN-ARN montre enfin qu'en hybridant le fragment d'ADN localisé entre 4112 et 6231 pb sur le génome viral aux ARN viraux tardifs, la traduction in vitro de la protéine de 50 kDa est bloquée, en accord avec les résultats de LEWIS et al. (1977) : PERSSON et al., identifient la protéine de 50 kDa des intermédiaires de maturation comme le polypeptide IVa2.

Un rôle de protéine d'échafaudage lui est attribué, ou plus exactement, un rôle de protéine de maturation ; les protéines d'échafaudage étant impliquées dans la formation d'une précapside et les protéines de maturation pouvant jouer un rôle supplémentaire comme celui de l'introduction de l'ADN dans la particule.

Il reste cependant à déterminer pourquoi le polypeptide IVa2 est détecté dans le virus mature purifié. Il peut s'agir, pour les auteurs, d'une contamination, lors de la préparation, de la fraction virus mature par les intermédiaires de maturation mais aussi du maintien de quelques molécules de la protéine IVa2 dans le virus où elle peut posséder une fonction restant à déterminer.

8-3-3 Le mutant H2 ts 3

Le mutant H2 ts 3 (WEBER et al., 1977) d'Ad2 possède un polypeptide V de Mr en gel de polyacrylamide-SDS (50 kDa), plus élevée que la Mr du polypeptide V de type sauvage (48,5 kDa). En 1983, WEBER et KHITTOO comparent les différentes populations virales obtenues lors de la purification de l'adénovirus et détectent dans les capsides vides des bandes protéiques de Mr 50 kDa en gel, correspondant à celle observée dans le mutant H2 ts 3.

Des cartes tryptiques montrent que ces bandes multiples aux alentours de 50 kDa n'ont aucune parenté avec la protéine IVa2 (55 kDa) mais possèdent par contre de nombreux peptides en commun avec le polypeptide V. Les auteurs en déduisent que ces bandes représentent

des formes alourdis par phosphorylation du polypeptide V. L'hypothèse formulée est que les capsides vides contiennent une forme phosphorylée du polypeptide V et que cette phosphorylation disparaît en même temps qu'entre le DNA dans la capsid ; en effet, le marquage du polypeptide V au ^{32}P disparaît en même temps que l'ADN pénètre. La protéine de 50 kDa observée dans les intermédiaires de maturation serait donc, pour les auteurs, une forme dérivée de la protéine V du nucléoide viral.

8-4 Le polypeptide IVa2

La protéine IVa2 de Mr 54-56 kDa migre entre la fibre (protéine IV) et la protéine V du nucléoide viral (Fig. G9). Elle est présente en très faible quantité dans la capsid mature (ANDERSON et al., 1973).

EVERITT et al. (1973) ont purifié par deux cycles de centrifugation en CsCl le virus mature afin d'obtenir moins de 0,01% de contaminants cellulaires. Le profil protéique obtenu montre principalement les dix protéines majeures structurales de l'Ad2 et, à raison de quelques copies par virion, le polypeptide IVa2 de 54-56 kDa.

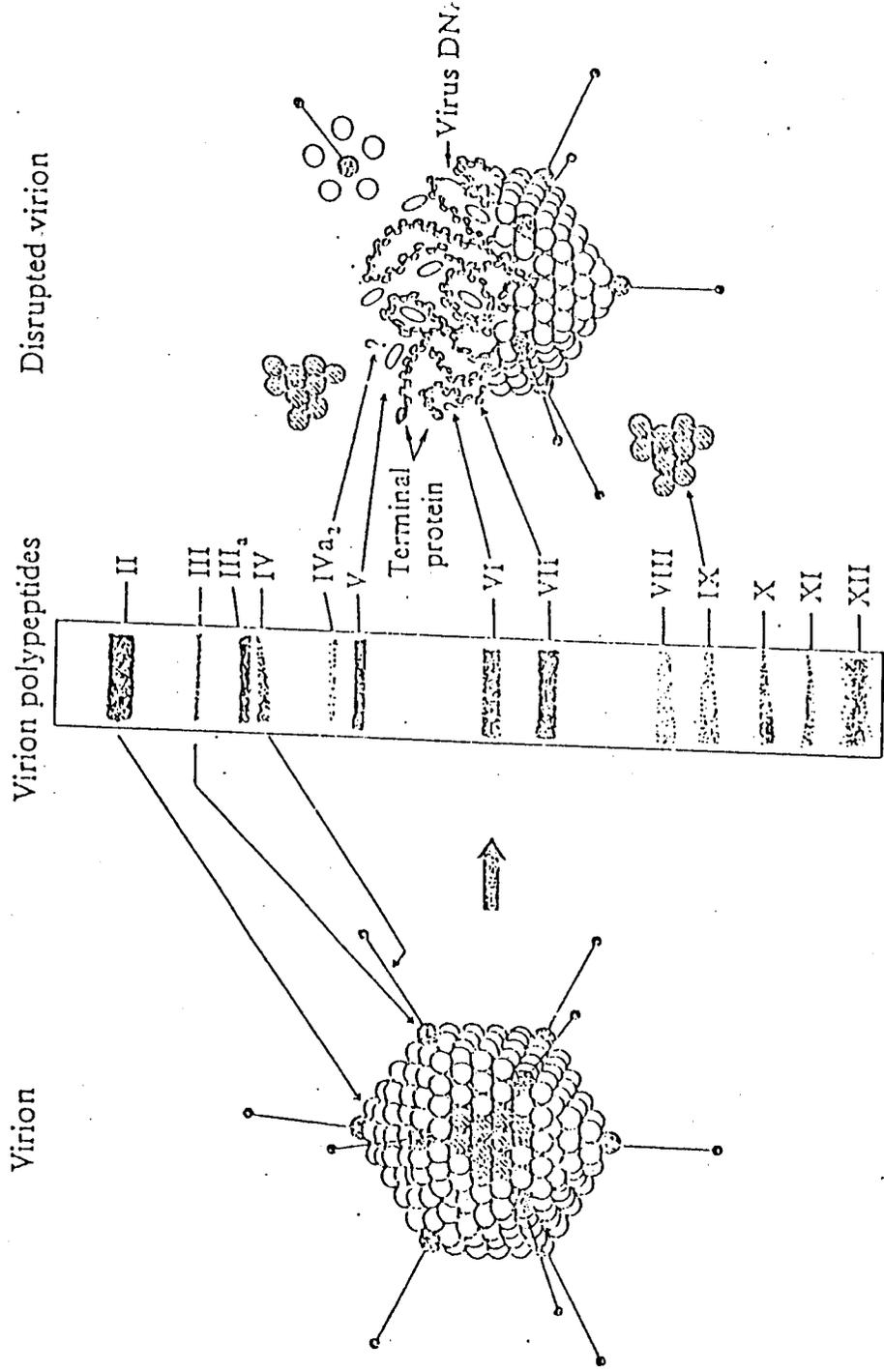
8-5 Les propriétés du polypeptide IVa2

En utilisant une méthode douce d'extraction des nucléoides viraux, WEBER et al. (1982) ont montré que le polypeptide IVa2 était impliqué dans une liaison très labile à l'ADN. La même affinité de la protéine IVa2 pour l'ADN viral a été retrouvée in vitro (RUSSELL and PRECIOUS, 1982).

Les protéines liant les nucléotides triphosphate (NTP) sont extrêmement répandues dans le règne vivant et assurent des fonctions enzymatiques variées ainsi que des rôles de transmission de signaux vers l'intérieur d'une cellule. Ces protéines ont toutes conservé quelques motifs structuraux dont le rôle de liaison aux NTP a été clairement identifié (Revue: GILMAN, 1987).

En 1989, GORBALENYA et KOONIN ont analysé par ordinateur la séquence primaire d'une centaine de protéines virales et y ont recherché les motifs consensus de la fixation aux NTP.

L'une de ces séquences a été retrouvée dans la protéine IVa2, en faisant une potentielle "NTP-protéine" et laissant présager une fonction nouvelle.



RUSSELL et PRECIOUS (1982)

FIGURE G9 :

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES POLYPEPTIDES VIRAUX D'APRES LEUR MIGRATION EN GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS

Leur localisation dans la capside est indiquée.

Le polypeptide IVa₂ (Mr : 54-56 kDa) migre entre les polypeptides IV (fibre) et V du nucléotide viral.

Son rôle supposé est d'aider à l'assemblage de la capside.

III- La transformation

(Revue : BRANTON et al., 1985 ; GRAND, 1987)

1- Introduction

Le premier agent viral oncogène d'origine humaine mis en évidence est l'adénovirus : le sérotype 12 (Ad12) est capable d'induire des tumeurs après injection à des hamsters nouveaux-nés. Bien que tous les sérotypes d'adénovirus humains ne soient pas tumorigènes, tous sont capables de transformer des cellules en culture. Pour certains sérotypes, les cellules transformées peuvent induire des tumeurs après injection à un animal. Les nombreux sérotypes existant ont ainsi été classés notamment selon leur pouvoir tumorigène chez le hamster nouveau-né. Le sous-groupe A (prototype, Ad12) représente le groupe fortement oncogène, le sous groupe B le groupe faiblement oncogène (Ad3, Ad7) et le C, enfin, le sous-groupe d'oncogénicité nulle (Ad2, Ad5).

Il ne semble pas, à ce jour, que les adénovirus soient impliqués directement dans la cancérogénèse chez l'homme. La transformation n'aboutit dans le cas de cellules humaines permissives, que quand certaines régions du génome viral sont transfectées. Si la totalité du l'ADN viral est mise en présence de ces cultures de cellules, un cycle lytique se déroule.

Néanmoins, le modèle adénovirus est toujours d'actualité dans l'étude du processus de transformation avec, en particulier, la découverte récente de l'association de l'oncoprotéine virale E1A et du produit du gène cellulaire Rb (qualifié d'anti-oncogène) dans les cellules transformées par l'adénovirus (voir § 4-8-1).

Les travaux sur la transformation sont abondants surtout en ce qui concerne les sérotypes 2 et 5 les mieux étudiés.

2- Les gènes viraux impliqués dans la transformation

Ces gènes sont localisés dans une zone appelée E1 car c'est la première région transcrite lors du cycle lytique du virus. Elle s'étend de 1,3 à 11,2 u.g. constituant les 10% gauches du génome viral, et joue un rôle capital aussi bien dans le cycle infectieux que dans la transformation.

3- Intégration de l'ADN viral

L'une des étapes précoces de la transformation est probablement l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire.

Il semble que cette intégration nécessite l'interaction des deux extrémités de l'ADN viral avec un site particulier des chromosomes cellulaires. La formation d'un intermédiaire circulaire est nécessaire.

Le processus exact de l'intégration n'est pas connu. Il est cependant démontré que la réplication de l'ADN viral n'est pas indispensable.

La grande majorité des cellules transformées par l'adénovirus contiennent et expriment E1.

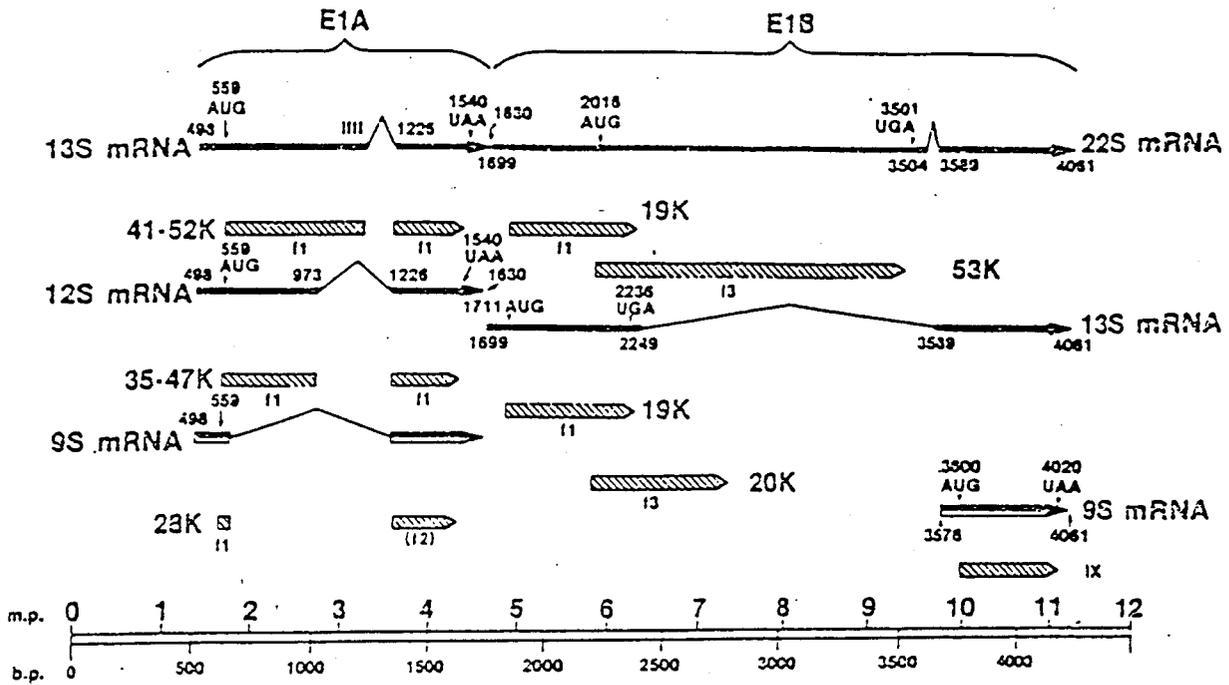
4- Structure et fonctions des gènes de E1 (Fig. G10)

4-1 Les séquences essentielles à la transformation par l'ADN

La région E1 est sous-divisée en deux unités de transcription E1A et E1B, chacune des deux produisant différents ARNm par épissage alternatif. La région E1 entière ne semble pas être essentielle à la transformation : les 8% gauches du génome de l'Ad2 ou de l'Ad5 ont une activité transformante donnant à la cellule les mêmes propriétés que quand de plus grands fragments de génome, ou même les virions, sont utilisés.

Dans certaines conditions la région E1A seule peut transformer des cellules primaires de rein de rat (BRK) mais celles-ci n'auront pas toutes les caractéristiques de cellules transformées par la région E1 entière. La région E1A est en fait immortalisante, l'expression d'un phénotype pleinement transformé nécessitant la présence de la région E1B- au moins de la partie gauche de E1B. La région E1 est suffisante à transformer lorsque les fragments d'ADN viral purifié ou clonés dans des plasmides bactériens sont utilisés.

Dans la transformation par le virus, certaines observations montrent que E1 n'est pas la seule région impliquée. Certaines mutations dans l'ADN polymérase ou la protéine DBP ont en effet, une influence sur le processus. Aucune de ces fonctions n'est cependant nécessaire au maintien de la transformation.



D'après GREEN et al. (1983)

FIGURE G10 : STRUCTURE DES GENES E1A ET E1B D'Ad2.

- les ARNm viraux sont représentés en flèches pleines
- les protéines sont représentées en boîtes hachurées. Leurs MM sont indiquées.
- les numéros de nucléotides montrent l'initiation et la terminaison de la transcription et de la traduction.

4-2 Les ARNm de E1

Deux promoteurs séparés définissent deux unités distinctes : E1A de 1,3 à 4,5 u.g. et E1B de 4,6 à 11,2 u.g. Les deux sont transcrits sur le brin droit de l'ADN viral.

4-2-1 La région E1A

Les ARNm de la région E1A sont des transcrits de 13S, 12S, 11S, 10S et 9S produits par épissage alternatif d'un même précurseur commun. Les 13S et 12S sont les mieux caractérisés : ce sont deux ARNm coterminaux en 5' et 3' mais dont l'épissage interne diffère. Ils ont cependant la même phase de lecture et les protéines qui en dérivent auront des séquences primaires identiques à l'exception de 46 acides aminés présents uniquement dans le produit de l'ARNm 13S. Les produits des ARNm 13S et 12S d'Ad5 ont respectivement 289 et 243 résidus.

4-2-2 La région E1B

Deux transcrits majeurs de la région précoce E1B sont observés : un ARNm de 13S et un de 22S. Ils ont les mêmes extrémités 5' et 3' mais différent dans le nombre de bases épissées. Deux polypeptides principaux de 496 et 176 résidus (pour l'Ad2 ou l'Ad5) ont été identifiés pour la région E1B. Chacun des deux peut être codé par l'ARNm de 22S mais dans deux phases de lecture différentes et à deux codons AUG de démarrage différents. Le plus petit polypeptide peut également être codé par l'ARNm 13S.

4-3 Analyse génétique de E1

De nombreux virus mutants dans la région E1 ont été isolés dans les cellules 293, une lignée établie après transformation par de l'ADN d'Ad5 et qui exprime E1. Certains d'entre eux expriment un produit de l'ARNm 13S de E1A normal et un produit de l'ARNm 12S incorrect, et vice-versa. Les cellules transformées par les virus mutants exprimant un produit tronqué de l'ARNm 13S de E1A n'ont pas le même phénotype que des cellules transformées par la région E1A de type sauvage.

Il en est de même pour les cellules transformées par un mutant n'exprimant pas le produit de l'ARNm 12S. Bien qu'aucun des ARNm 13S et 12S ne soit absolument nécessaire à la transformation par le virus, les deux semblent jouer un rôle dans le maintien du phénotype pleinement transformé.

Pour la région E1B, il semble que le produit de l'ARNm 22S joue un rôle dans l'initiation de la transformation par les virions. Cette fonction peut être inutile quand la transformation a lieu par des fragments d'ADN purifiés ou par des grandes quantités de virus. Une classe de mutants dans E1B, les mutants cyt (cytotoxiques) sont caractérisés par la production d'un effet cytopathique intense des cellules infectées qui forment des plaques plus claires et plus grandes que celles infectées par le type sauvage. Cette dégradation rapide de l'ADN viral et cellulaire est due à une mutation dans le produit de 176 résidus de E1B.

Tous les mutants cyt sont défectifs pour la transformation de cellules en culture.

4-4 Les polypeptides de la région E1

Les 2 ARNm majeurs de 12S et 13S de la région E1A (13S et 12S) codent pour une série de protéines de Mr très variables en gel de polyacrylamide-SDS, plus élevées que celles prédites d'après la séquence des ARNm (31,9 et 26,5 kDa respectivement). Ces différences sont certainement dues à des modifications post-traductionnelles et au taux très élevé de proline de ces protéines.

Les protéines de E1B (à l'exception du polypeptide IX) sont les deux produits de 496 et 176 résidus des ARNm 22S et 13S. Ils ont été retrouvés dans les cellules infectées et transformées et ont des Mr différentes de celles prédites d'après la séquence des ARNm. Le produit de 496 résidus migre entre 53 et 65 kDa, celui de 176 résidus entre 15 et 21 kDa.

4-5 La localisation intracellulaire des protéines de E1 dans les cellules transformées.

Lors du fractionnement de cellules transformées, les protéines de E1A et la plus grande de E1B ont été retrouvées aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme. Dans le noyau, les protéines de E1A

sont associées à la matrice nucléaire ou au nucléoplasme mais pas à l'ADN. Dans le cytoplasme, une partie des polypeptides de E1A semble attachée au cytosquelette. La plus petite protéine de E1B est retrouvée dans l'enveloppe nucléaire, dans la membrane plasmique et dans le réticulum endoplasmique.

Des études avec des virus mutants n'exprimant que le produit de l'ARNm 13S ou 12S de E1A ont montré que les deux protéines de 289 et 243 résidus sont exprimées dans des cellules de hamster transformées par l'Ad5. La protéine de 176 résidus de E1B est également souvent retrouvée mais plusieurs des lignées étudiées ne contiennent pas la protéine de 496 résidus.

Les cellules ne contenant que la région E1A n'ont pas toutes les caractéristiques d'une cellule véritablement transformée : les produits de la région E1A n'ont qu'une fonction d'immortalisation.

4-6 Fonctions biologiques des protéines de E1 dans le cycle lytique et la transformation.

4-6-1 Régulation des gènes viraux

Il est clairement démontré que l'expression de E1A est nécessaire à l'accumulation des ARNm viraux précoces codés par les régions E1B, E2, E3 et E4. En outre, les protéines de E1A autorégulent le gène dont elles proviennent.

L'activation des gènes viraux par la région E1A a lieu en trans par l'intermédiaire d'un facteur diffusible, certainement une chaîne peptidique codée par la région E1A. Cette activation des gènes cibles a lieu au niveau transcriptionnel.

Le rôle de l'un ou de l'autre des produits des ARNm 13S et 12S n'est pas clair. Des expériences indiquent que seul le produit de l'ARNm 13S est impliqué, d'autres montrent que le produit de l'ARNm 12S l'est également. Ces contradictions peuvent s'expliquer par l'utilisation de méthodes de mesure différentes.

L'activation des gènes viraux par E1A a lieu aussi lorsque le gène cible est intégré dans la chromatine cellulaire.

4-6-2 Régulation de gènes cellulaires

Lors de l'infection de cellules HeLa par l'Ad5 une augmentation nette de la transcription de certains gènes cellulaires est observée. Le gène de la protéine de choc thermique de 70 kDa en particulier, est fortement induit lors de la phase précoce de l'infection, par la région E1A. Les protéines de E1A peuvent également réprimer l'expression de certains gènes.

4-6-3 La transformation

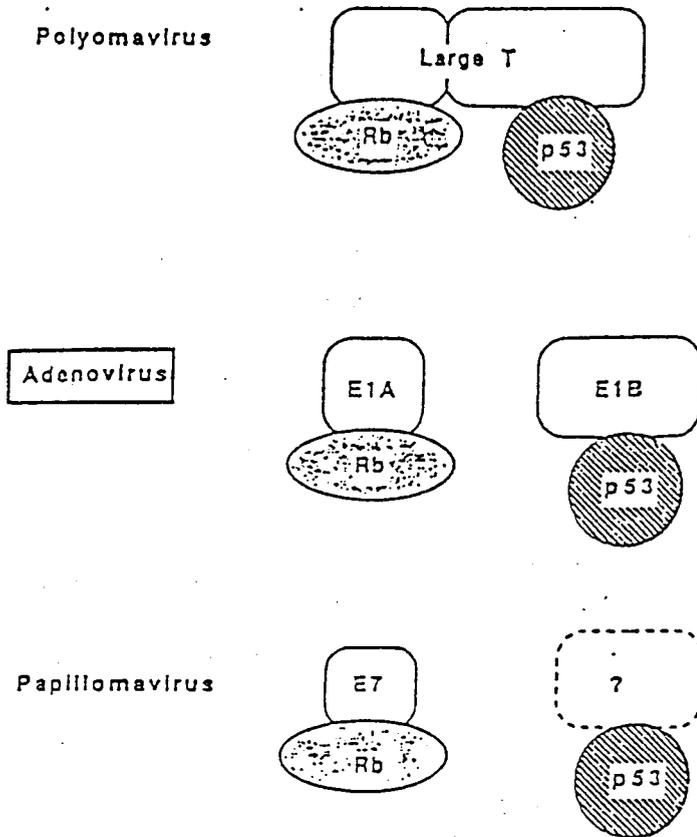
La plupart des études décrites ont eu lieu sur des cellules infectées par l'adénovirus et bien que certains auteurs aient spéculé sur le rôle des protéines de E1A dans le contrôle des gènes cellulaires lors de la transformation, les travaux sur ce sujet sont assez rares (sauf pour la régulation par la région E1A de l'expression des antigènes majeurs d'histocompatibilité de classe I). Il est cependant raisonnable d'estimer que la protéine de 289 résidus contrôle certains oncogènes. La protéine de 243 acides aminés peut également jouer un rôle puisqu'elle est impliquée dans la stimulation de la synthèse de l'ADN dans des cellules quiescentes. Cette action pourrait faciliter la transformation. La région E1B est nécessaire à la transformation complète : la protéine de 176 résidus semble jouer un rôle capital dans l'établissement et le maintien de l'état transformé peut-être en maintenant l'intégrité de l'ADN chromosomique. La protéine de 496 résidus est essentielle à la transformation par le virion complet.

4-7 Association des protéines de E1 avec des protéines cellulaires (Fig.G11)

4-7-1 E1A et Rb

(Revue: WEINBERG, 1990)

En 1986 est apparu un concept nouveau de gènes cellulaires impliqués de façon négative dans la transformation : les anti-oncogènes. Dans les cellules normales, ces gènes inhibent la prolifération. Des cellules n'exprimant pas correctement ces gènes sont en effet sujettes à la transformation. Ces anti-oncogènes, contrairement



D'après LANE and BENCHIMOL (1990)

FIGURE G11 : COMPLEXES ENTRE LES ONCOGENES DES VIRUS TUMORIGENES A ADN ET LES ANTI-ONCOGENES CELLULAIRES.

Pour l'adénovirus, l'activité de liaison au produit du gène Rb et à la p53 est due aux deux oncoprotéines E1A et E1B respectivement.

aux oncogènes, doivent être inactivés ou défailants pour que le processus de cancérisation ait lieu. La forme défailante de ces anti-oncogènes existe dans les cellules de la lignée germinale et est donc transmissible.

Le premier anti-oncogène découvert a été celui du gène Rb (Rétinoblastome). Ce gène, situé sur le chromosome 13, conduit, quand il est inactivé, au développement chez l'enfant de tumeurs de la rétine.

La forme normale de la protéine de 105 kDa codée par ce gène semble donc impliquée dans le contrôle de la croissance cellulaire. La protéine de 105 kDa est présente dans la cellule normale. Plusieurs groupes de recherche étudiant la transformation par l'adénovirus ont obtenu des anti-séras dirigés contre l'oncoprotéine E1A et ont remarqué qu'en analysant des extraits de cellules transformées par l'adénovirus, les séras co-immunoprécipitaient E1A et le produit de 105 kDa du gène Rb. Ces expériences permirent de formuler l'hypothèse séduisante du mode d'action de l'oncoprotéine E1A par capture de l'"anti-oncoprotéine" 105 kDa du gène Rb. D'autres oncoprotéines (protéine T du Simian Virus 40, protéine E7 du papillome humain) sont capables de se lier à la protéine de 105 kDa-Rb. Des études montrent que des mutants dans la protéine E1A incapables de lier la protéine de 105 kDa de Rb sont également incapables de transformer.

4-7-2 E1B et p53

(Revue: LANE and BENCHIMOL, 1990)

La protéine p53, une phosphoprotéine nucléaire de 375 acides aminés, a été très étudiée pour sa capacité de liaison forte à la protéine T du Simian Virus 40. Une association existe également entre p53 et la protéine de 496 résidus de E1B. Comme le produit du gène Rb, p53 est capable de se lier à une oncoprotéine virale et son rôle dans la cellule normale serait de contrôler la croissance.

4-8 La coopération d'oncogènes.

Des similitudes entre les processus de transformation de cellules de rat par l'adénovirus ou par des proto-oncogènes cellulaires

activés ont amené à définir deux classes d'oncogènes agissant en coopération pour aboutir à une transformation complète. La première classe d'oncogènes exerce ses effets au niveau nucléaire et joue un rôle primordial dans l'établissement de l'immortalisation. La deuxième classe exerce le plus souvent ses effets au niveau de la membrane plasmique et est responsable de l'acquisition de caractéristiques de croissance in vitro correspondant à la tumorigénicité in vivo.

Parmi les oncogènes de la classe I, on trouve l'oncogène cellulaire myc et E1A de l'adénovirus, parmi ceux de la classe II on peut citer les proto-oncogènes cellulaires activés Ha-ras, Ki-ras et E1B de l'adénovirus. Il est possible de compléter l'un des oncogènes de l'un des deux groupes par n'importe quel oncogène de l'autre groupe. Des cellules tumorales exprimant E1A et ras ont ainsi été établies.

Cette possibilité de complémentation montre qu'en dépit des différences d'origine, de structure, de mode d'action et du caractère artificiel de la transformation de cellules de rongeurs par des gènes provenant des espèces les plus diverses, tous ces oncogènes fonctionnent en affectant des mécanismes cellulaires communs.

5- Conclusions

Il a donc été montré, il y a approximativement quinze ans, que la transformation par l'adénovirus était due à la partie gauche du génome (11%). Les protéines codées par cette région jouent les rôles essentiels dans ce processus mais il est possible que d'autres protéines soient également impliquées. Des protéines codées par une autre zone que E1 pourraient influencer la transformation quand elle a lieu avec le virus entier, peut-être en facilitant l'intégration dans le génome cellulaire ou en régulant négativement l'expression des ARNm de E1A.

L'obtention et la caractérisation de nouveaux virus mutants permettraient de mieux comprendre ce processus de transformation.

TRAVAUX PERSONNELS

Les travaux présentés ont fait l'objet des communications et publications suivantes :

COMMUNICATIONS

- WINTER, N., NIEL, C., and D'HALLUIN, J.C. (1989).
Construction of human cell lines which express adenovirus IVa2 protein in an inducible manner.
The Imperial Cancer Research Fund, 1989, Tumor Virus Meeting on SV40 Polyoma and Adenovirus (24/07/89 - 29/07/89, Cambridge, U.K.)

- WINTER, N., and D'HALLUIN, J.C. (1990). Caractérisation de la protéine IVa2 de l'adénovirus de type 5 : biosynthèse et localisation cellulaire durant le cycle infectieux.
XVIIe forum des jeunes chercheurs de la Société de Chimie Biologique (03/07/90 - 06/07/90, Villeneuve d'Ascq, France)

- WINTER, N., and D'HALLUIN, J.C. (1990). Expression and characterization of adenovirus type 5 protein IVa2 in infected cells.
20th FEBS Meeting (19/08/90 - 24/08/90, Budapest, Hungary)

- WINTER, N., and D'HALLUIN, J.C. (1990). Characterization of adenovirus type 5 protein IVa2 : expression and localization in infected cells.
VIIth International Congress of Virology (26/08/90 - 31/08/90, Berlin, Germany)

PUBLICATIONS

- WINTER, N., and D'HALLUIN, J.C. (1990). Regulation of the biosynthesis of adenovirus type 5 protein IVa2 during infection.
J. Virol. (soumis à publication).

- WINTER, N., and D'HALLUIN, J.C. (1990). Integration and expression of adenovirus 5 gene IVa2 in human cell lines. Manuscrit en préparation.

AUTRES TRAVAUX

- NASCIMENTO, J.P., LEITE, J.P.G., WINTER, N., and D'HALLUIN, J.C. (1990). Adenovirus transformed monkey cell lines permissive to enteric adenovirus type 40. J. Virol. Meth., 28, 321.
- COUSIN, C., WINTER, N., and D'HALLUIN, J.C. (1990). Cellular transformation by enteric adenoviruses. Virology, sous presse.

INTRODUCTION

L'assemblage de l'adénovirus a fait l'objet de nombreux travaux dans notre laboratoire et l'isolement de mutants ts a permis d'avancer un schéma d'élaboration de la particule virale (D'HALLUIN, 1980).

Dans les intermédiaires de maturation (IM) de la capsid, une protéine, de Mr 50 kDa en gel de polyacrylamide-SDS apparaît en grande quantité et n'est pas retrouvée dans le virus mature (D'HALLUIN et al., 1978a). L'origine de cette protéine est inconnue et des hypothèses contradictoires ont été proposées. PERSSON et al., (1979) ont isolé cette 50 kDa des IM et l'ont comparée par digestion protéolytique ménagée, au produit de Mr plus élevée en gel de polyacrylamide-SDS obtenu après traduction in vitro de l'ARNm IVa2 isolé par hybridation spécifique au fragment de génome viral IVa2 situé entre 4112 et 6231 pb (LEWIS et al., 1977). Des profils protéolytiques similaires ayant été observés, les auteurs en ont conclu que la protéine de 50 kDa des IM était le produit du gène IVa2. Les traces de protéine 50 kDa - IVa2 retrouvées dans les capsides matures ont été attribuées à une purification incomplète des particules.

Selon cette hypothèse, cette protéine semblerait être une protéine d'échafaudage semblable à la protéine de 100 kDa bien étudiée au laboratoire (MORIN and BOULANGER, 1986). Le polypeptide de 100 kDa, cependant, tout comme les protéines majeures de structure du virus, est transcrit et traduit à partir de la région majeure tardive du génome dirigée par le promoteur MLP à 6039 pb (EVANS et al., 1977). La localisation du gène IVa2 sur le génome est bien distincte de celle de la région majeure tardive : le promoteur du gène IVa2, distant du promoteur MLP de 210 pb, dirige la transcription intermédiaire d'un gène unique sur le brin gauche de l'ADN viral, dans une direction opposée aux cinq familles de gènes dépendant du promoteur MLP.

Cette situation particulière du gène IVa2 ainsi que la fonction mal connue de la protéine IVa2 ont aiguisé notre curiosité.

La caractérisation de la protéine IVa2 et la régulation de sa biosynthèse font l'objet de ces Travaux Personnels divisés en cinq chapitres :

- I- L'obtention d'un antisérum polyclonal dirigé contre le(s) produit(s) du gène IVa2.

- II- L'étude de la régulation de l'expression de l'ARN messager IVa2 au cours du cycle lytique.

- III-1- L'établissement de lignées cellulaires ayant intégré le gène IVa2 placé sous le contrôle de divers promoteurs.

2- Les essais d'obtention d'un virus mutant délété dans le gène IVa2.

- IV- Le rôle du produit du gène IVa2 dans la transformation.

- V- Les essais de liaison in vitro à l' $(\alpha^{32}\text{P})$ -GTP

I- Le sérum anti-IVa2

L'incertitude concernant la Mr en gel de polyacrylamide-SDS du polypeptide IVa2 et sa présence en très faible quantité dans les particules virales rendaient impossible l'obtention d'un sérum par les techniques classiques de purification d'une protéine virale et immunisation d'un animal.

C'est pourquoi notre choix s'est porté sur les vecteurs d'expression recombinants en système bactérien.

1- Obtention

1-1 Caractérisation des épitopes (Fig. R1)

La séquence primaire de 449 résidus du polypeptide IVa2 de l'Ad5 a été déduite de la séquence nucléotique du gène par VAN BEVEREN et al. (1981).

L'analyse par ordinateur, au laboratoire, de cette séquence a permis par la méthode de HOPP et WOODS (1981) de prédire les sites potentiels antigéniques majeurs, trois séquences fortement hydrophiles situées, pour les deux premières, dans la partie N-terminale de la protéine et pour la dernière dans la partie C-terminale. Le premier épitope potentiel couvre les résidus 2 à 7 et résulte de la jonction des deux exons de l'ARNm-IVa2. Sa séquence est :

E - T - R - G - R - R

Le deuxième des résidus 77 à 82 possède la séquence :

D - R - D - A - V - E

et le dernier, des résidus 432 à 437,

L - N - D - R - D - R

1-2 Clonage du pVM809 (Fig. R2 et Fig. M1)

Le plasmide pRIT2T (Pharmacia) permet l'expression après clonage dans une séquence multisites, d'une protéine fusionnée contenant en son N-terminal un fragment de la protéine A de Staphylococcus Aureus. Le C-terminal de la protéine A peut également

ex1 -| -ex2

2 7
- METR GRRPAALQHQDQDQPAHFGQRAARSAPLHRDPDYADEDPAVERH -50
ep1

77 82
- DPGPSGRAPTTAVQRKPPQPAKRGDMLDRDAVEHVTELWDRLELLGQTLK -100
ep2

- SMPTADGLKPLKNFASLQELLSLGGERLLAHLVRENMQVRDMLNEVAPLL -150

- RDDGSCSSLNYQLQPVIGVIYGP TGCGKSQLLRNLLSSQLISPTPETVFF -200

- IAPQVDMIPPSELKAWEMQICEGNYAPGPDGTIIPQSGTLRPRFVKMAYD -250

- DLILEHNYDVSDPRNIFAQAAARGPIAIIIMDECMENLGGHKGVSKEFFHAF -300

- PSKLHDKFPKCTGYTVLVVLHNMNPRRDMAGNIANLKIQSKMHLISPRMH -350

- PSQLNRFVNTYTKGLPLAISLLKDI FRHHAQRSCYDWIITNTTPQHEAL -400

432 437
- QWCYLHPRDGLMPMYLNIQSHLYHVLEKIHRTLNDRDRWSRAYRARKTPK -449
ep3

FIGURE R1 : CARACTERISATION DES EPITOPES DE LA PROTEINE IVa2.

La séquence primaire de la protéine IVa2 d'Ad5 (VAN BEVEREN et al., 1981) a été analysée au laboratoire et la méthode de HOPP et WOODS (1981) a permis de déterminer 3 sites potentiels antigéniques majeurs (ep). Les deux parties de la protéine codées par les exons 1 et 2 de l'ARNm sont notées.

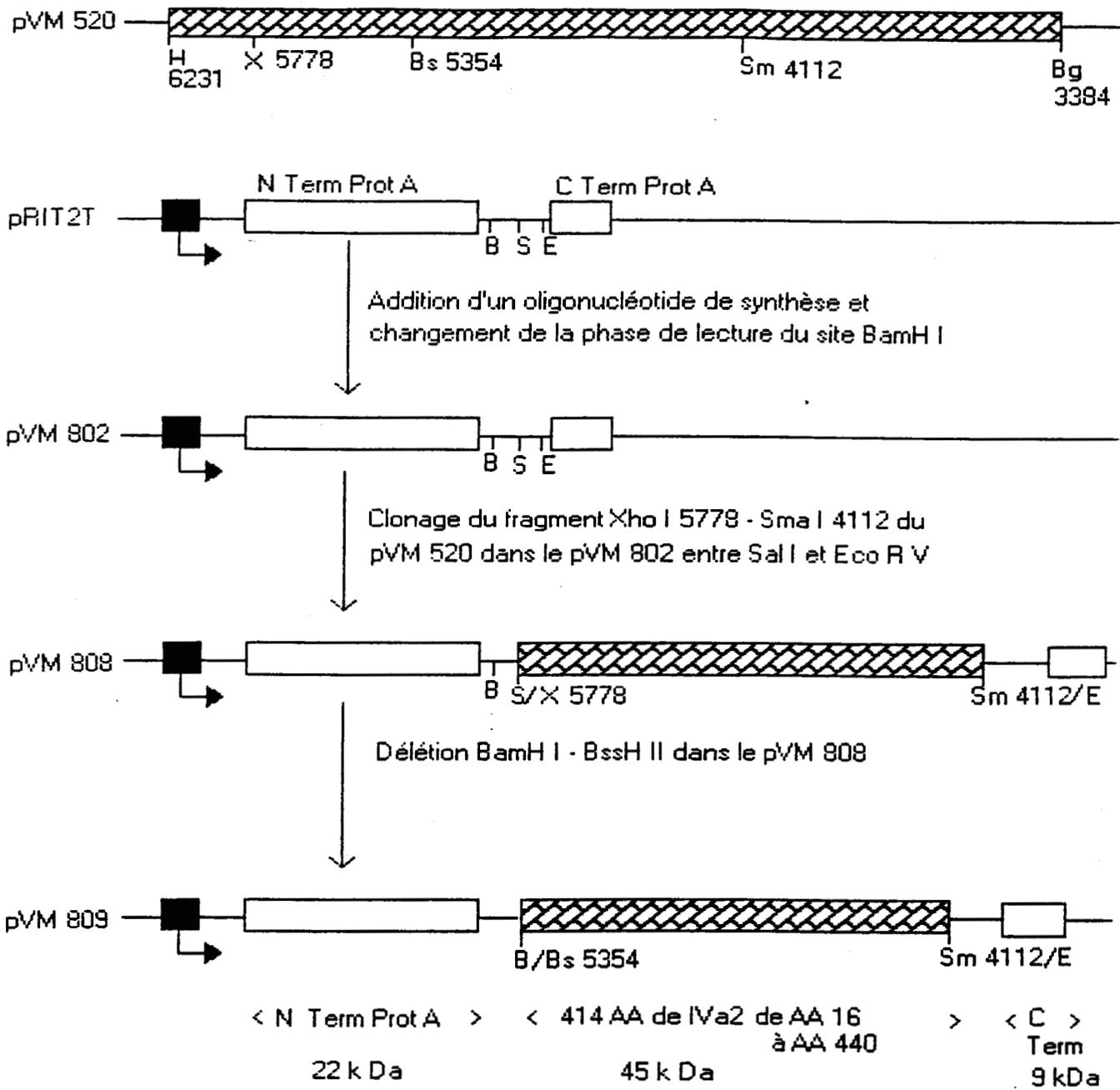


FIGURE R2 :

CLONAGE DU pVM 809



: promoteur pL du phage Lambda



: séquence codant pour fragment de protéine A de Staph. Aureus



: séquence codant pour fragment de protéine IVa2 d' Ad5

B : BamH I

Bg : Bgl II

Bs : BssH II

E : Eco R V

S : Sal I

Sm : Sma I

X : Xho I

AA: acide aminé

être exprimé si la phase de lecture reste inchangée entre les différentes parties clonées. Le plasmide pRIT2T initial a été modifié par adjonction d'un oligonucléotide de synthèse contenant le site de restriction ApaI et changeant la phase de lecture du site BamHI pour donner le plasmide pVM802. Le fragment d'ADN d'Ad5 entre les sites XhoI (nt 5778) et SmaI (nt 4112) provenant du pVM520 a été ligaturé dans le pVM802 entre EcoRV (compatible avec SmaI) et SalI (compatible avec XhoI) pour donner le pVM808. Ce dernier a ensuite été coupé par BssHII (nt 5354) et BamHI (du vecteur de départ) et religaturé après action de l'ADN polymérase de Klenow afin de donner le pVM809.

Ce plasmide permet l'expression d'un fragment de 22 kDa de protéine A (en N-terminal) fusionné à 414 acides aminés (45 kDa) de la protéine IVa2, des résidus 26 à 440.

Les épitopes potentiels majeurs 2 et 3 sont inclus dans la partie de la protéine IVa2 exprimée.

1-3 Expression et purification de la protéine fusionnée

La souche E.coli utilisée est la N4830 (GOTTESMAN et al., 1980) contenant un répresseur thermosensible du promoteur pL du phage Lambda. Le plasmide utilisé (pVM809) permet la production de la protéine fusionnée sous le contrôle du promoteur pL. A 30°C, le répresseur est actif et la synthèse de la protéine est inhibée. Une induction de 2 h à 42°C inactive le répresseur et permet la synthèse de la protéine.

Cette protéine de fusion a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne d'IgG-Sépharose grâce à la propriété que possède le fragment protéine A de Staphylococcus Aureus de se lier au fragment Fc des immunoglobulines. L'élution spécifique par l'acide acétique a permis d'obtenir une fraction pure de protéine fusionnée repérée en gel coloré et immunoblot. La bande majoritaire obtenue (Fig. R3) possédait une Mr de 80 kDa en gel de polyacrylamide-SDS : le fragment C-terminal de la protéine A était en phase de lecture avec le reste de la protéine et donnait un produit de Pm prédit de 76 kDa compatible avec les 80 kDa observés. Une dégradation importante apparaissait dans la révélation en immunoblot montrant une instabilité de la protéine traduite et purifiée.

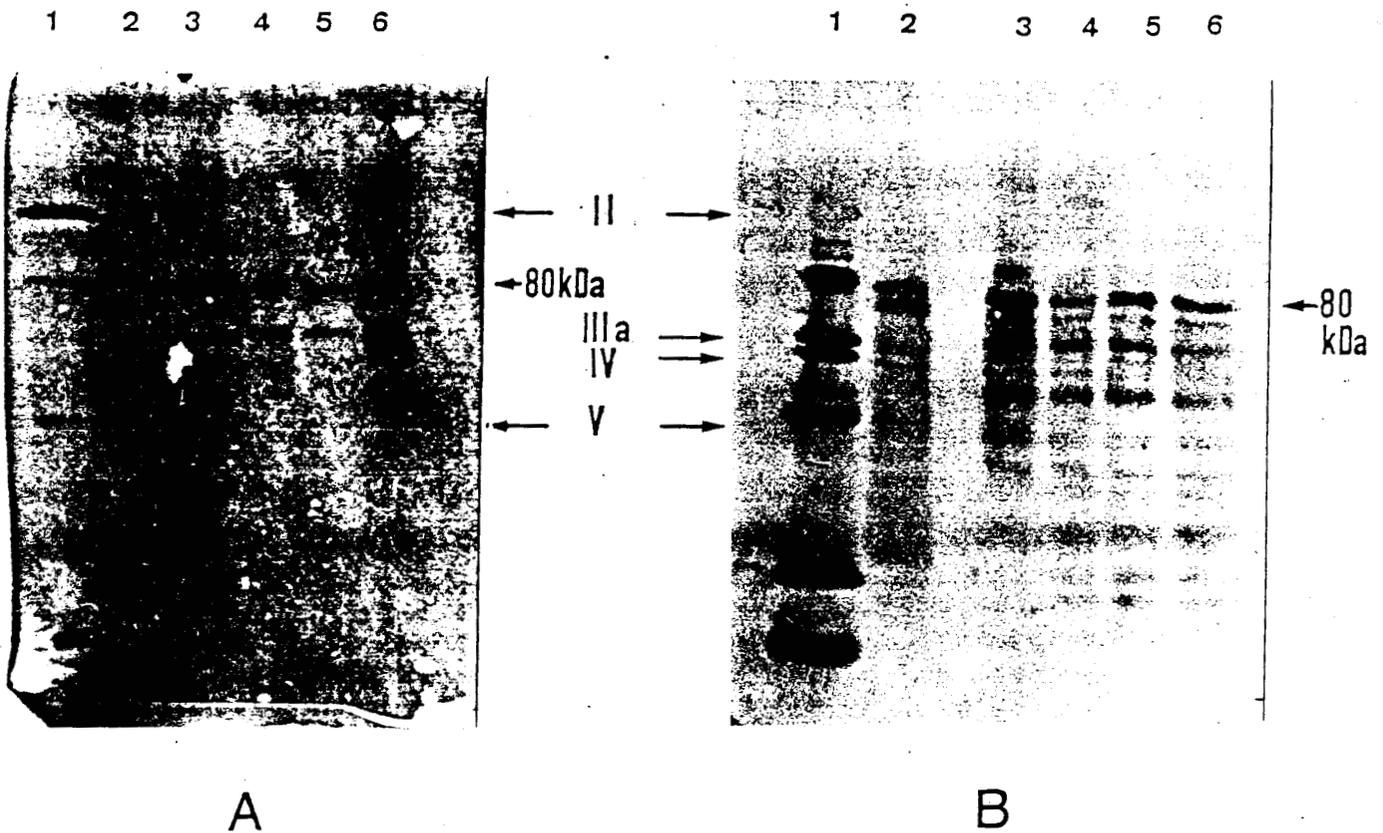


FIGURE R3 : EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PROTEINE FUSIONNEE

- A - Protéines colorées au bleu de Coomassie après migration en gel de polyacrylamide-SDS 15%
- B - Western Blot révélé par un sérum anti-Ad2 1/5000
- 1 - Ad2 type sauvage
- 2 - N4830 transformées par le pVM809 et ayant subi un choc thermique de 2 h à 42°C
- 3 à 6 - Différentes fractions de protéine fusionnée éluées de colonne IgG-sépharose par AcH 0,5 M pH 3,4.

Les fractions les plus pures ont ensuite été mélangées à l'adjuvant de Freund et injectées par voie intradermique à différents lapins. Après plusieurs rappels le sérum a été prélevé et la fraction IgG a été préparée (voir Matériels et Méthodes, §IV-2).

2- Caractérisation de la protéine IVa2

2-1 Dans différentes particules virales (Fig. R4)

Certains mutants conditionnels sont bloqués à température restrictive de 40°C à différentes étapes de l'assemblage. Ils accumulent des protéines virales non maturées ou de Mr différentes de celles observées dans les particules de type sauvage.

Le mutant H2 ts 112 (D'HALLUIN et al., 1978a) accumule à température restrictive de 40°C des particules intermédiaires riches en protéine de 50 kDa non retrouvée dans le virus mature. Cette même protéine est retrouvée dans les intermédiaires de maturation du virus de type sauvage.

Le mutant H2 ts 3 (WEBER and KHITTOO, 1983) présente à 33°C, un polypeptide V de Mr 50 kDa supérieure à la Mr du même polypeptide dans le virus de type sauvage (48,5 kDa).

Le mutant H2 ts 1 (WEBER, 1976) est bloqué, à 40°C, dans l'expression de l'endoprotéase virale et des particules "jeunes virions" sont accumulées dans lesquelles les précurseurs des polypeptides VI, VII et VIII ne sont pas clivés.

La protéine IVa2 a été recherchée à l'aide du sérum polyclonal dans les capsides du virus mature et de ces trois mutants. La parenté entre la protéine IVa2 et la protéine de 50 kDa a ainsi été étudiée.

L'analyse en immunoblot a montré, dans toutes ces particules virales, la présence de la protéine IVa2 (Fig.R4) sous forme d'un doublet de Mr 54-56 kDa. L'analyse a été conduite en parallèle avec un sérum monoclonal dirigé contre le polypeptide V (LUNT et al., 1988) qui révèle uniquement la protéine de 48,5 kDa et de 50 kDa des particules de H2 ts 3.



FIGURE R4 : CARACTERISATION DE LA PROTEINE IVa2 DANS DIFFERENTES PARTICULES VIRALES

- A - Western Blot anti-polypeptide V (LUNT et al, 1988)
- B - Gel de polyacrylamide-SDS 15% coloré au bleu de Coomassie
- C - Western Blot anti-protéine IVa2
- 1 - Ad5 type sauvage : particules matures
- 2 - Ad5 type sauvage : intermédiaires de maturation
- 3 - H2 ts 112 à 40°C : particules légères
- 4 - H2 ts 1 à 40°C : stade "jeune virion"
- 5 - H2 ts 3 à 33°C : polypeptide V de MM apparente plus élevée.

Ces résultats montrent :

- que le polypeptide IVa2 est bien différent de la protéine de 50 kDa accumulée dans les particules immatures du virus type sauvage et de l'H2 ts 112, contrairement à l'hypothèse de PERSSON et al. (1979) (Fig. 4, C, 3)

- qu'il est présent dans toutes les particules testées y compris dans la capsid mature virale (Fig. R4, C, 1)

De plus, il ne subit pas de maturation protéolytique par la protéase virale, contrairement aux polypeptides pIII, pVI, pVII et pVIII : le même doublet protéique de IVa2 est en effet révélé dans les capsides matures et dans les capsides d'H2 ts 1 produites à 40°C (Fig. R4, C, 1 et 4).

L'analyse faite avec le sérum monoclonal dirigé contre le polypeptide V permet également de conclure que la protéine de 50 kDa des intermédiaires de maturation n'est pas une forme modifiée du polypeptide V contrairement à l'hypothèse émise par WEBER et KHITTOO (1983). En effet, la forme de 50 kDa dérivant du polypeptide V n'est révélée que dans le mutant H2 ts 3 et pas dans les particules de H2 ts 112 à 40°C (Fig. R4, A, 5 et 3).

La présence de la protéine IVa2 (54-56 kDa) est donc nettement révélée dans les particules matures par notre sérum anti-IVa2. Cette protéine est cependant très minoritaire puisqu'elle n'est pas détectée en coloration au bleu de Coomassie.

2-2 Réaction croisée avec l'hexon d'Ad5 (Fig. R5)

Lors des analyses en immunoblot, nous nous sommes aperçus que le sérum anti-IVa2 présentait une réaction croisée avec l'hexon, protéine majeure de structure de la capsid. Cette réaction est spécifique du sérotype étudié puisque seul l'hexon d'Ad5 réagit, celui d'Ad2 n'étant pas révélé (Fig. R5, B). L'analyse des homologues de séquences par ordinateur n'a cependant révélé aucune communauté entre l'hexon d'Ad5 et le produit du gène IVa2, au niveau des séquences primaires, ce qui n'exclut pas la présence d'épitopes conformationnels communs entre les deux protéines.

Les séquences primaires de la protéine IVa2 déduites d'après les séquences du gène sont identiques pour l'Ad2 et l'Ad5 ; notre sérum révèle la même espèce de 54 kDa dans les deux sérotypes étudiés (Fig. R5, B).

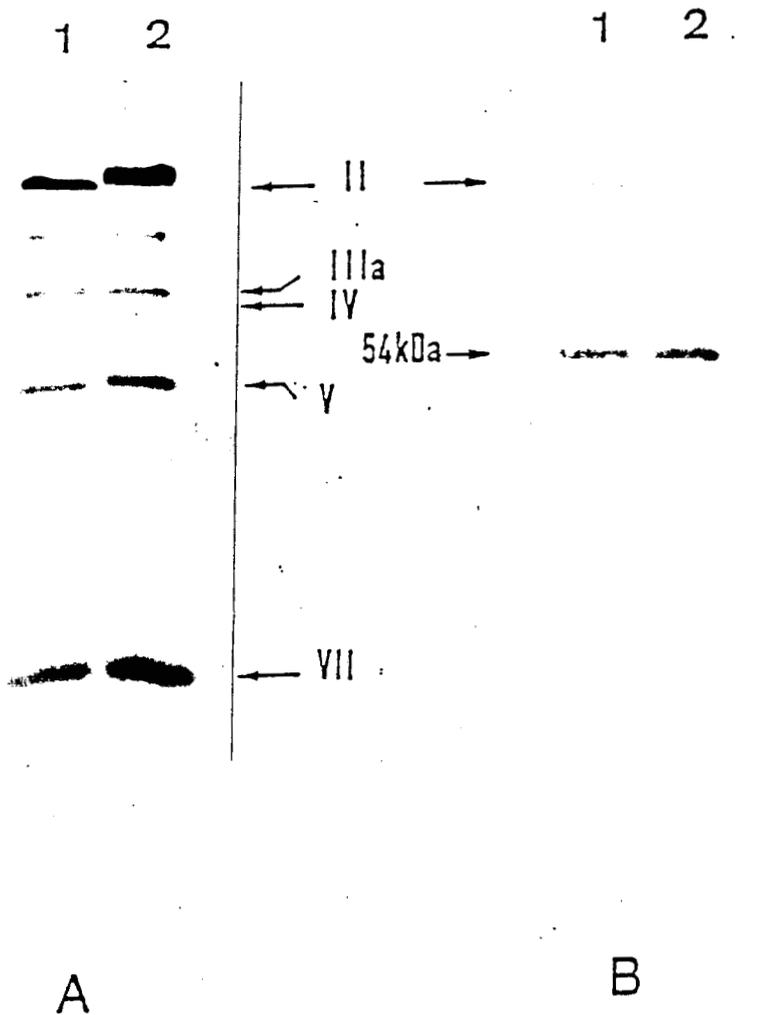


FIGURE R5 : REACTION CROISEE AVEC L'HEXON D'Ad5

- A : Protéines colorées au bleu de Coomassie après migration en gel de polyacrylamide-SDS 15%
- B : Western Blot anti-IVa2 révélé à la peroxydase
- 1 : Particules matures d'Ad5 type sauvage
- 2 : Particules matures d'Ad2 type sauvage

La protéine IVa2 (54 kDa) est révélée dans les 2 types de particules, l'hexon (II) n'est révélé que dans les particules d'Ad5.

2-3 Dans les extraits de cellules infectées

2-3-1 Fractionnement cellulaire (Fig. R6)

La biosynthèse de la protéine IVa2 lors du cycle lytique a ensuite été étudiée.

L'analyse a été effectuée sur des extraits de cellules HeLa, permissives à l'adénovirus, infectées par l'Ad2 de type sauvage. Un fractionnement cellulaire dans le tampon hypotonique RSB (voir Matériels et Méthodes, §III-2) nous a permis de séparer les protéines cellulaires en quatre fractions : les protéines solubles du cytoplasme (fraction "cytosol"), les protéines de la membrane plasmique et du cytoplasme insoluble (fraction "membrane plasmique"), celles solubles du noyau ("noyau-sol") et enfin celles insolubles du cytosquelette et de la membrane nucléaire ("matrice nucléaire"). Après électrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide-SDS et transfert, les membranes de nitrocellulose ont été incubées la nuit avec le sérum anti-IVa2 dilué au 1/1000. Après plusieurs rinçages, la protéine IVa2 a été révélée par un deuxième anti-sérum anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase. A 24 h post-infection, la protéine IVa2 était révélée principalement dans le "cytosol" sous sa forme 54 kDa (Fig. R6, 1). Dans les autres fractions, une réaction croisée très forte apparaissait avec une protéine de 43 kDa. Cette protéine était également présente en très grande quantité dans la fraction "membrane plasmique" de cellules de rein de rat (BRK) transformées par les fragments E1A et IVa2 du génome de l'Ad3 (voir § IV des Travaux Personnels).

Une cinétique d'infection par l' Ad2 de type sauvage a alors été effectuée. L'infection, à 50 particules (pfu) par cellule, a été arrêtée toutes les 3 h de 0 à 30 h post-infection. Après fractionnement cellulaire, les protéines cytosolubles et noyau-solubles ont été analysées par immunoblot avec le sérum anti-IVa2 (Fig. R6). Dans le cytosol, la protéine IVa2 (54kDa) apparaissait dès 12 h post-infection. Sa synthèse s'accroissait fortement à partir de 17 h post-infection jusqu'au temps tardif de 30 h. Dans la fraction noyau-soluble, la protéine IVa2 n'était révélée qu'à partir de 20 h post-infection. A 30 h post-infection la majeure partie de la protéine IVa2 était transportée au noyau: ce transport tardif était semblable à celui des protéines majeures de structure.

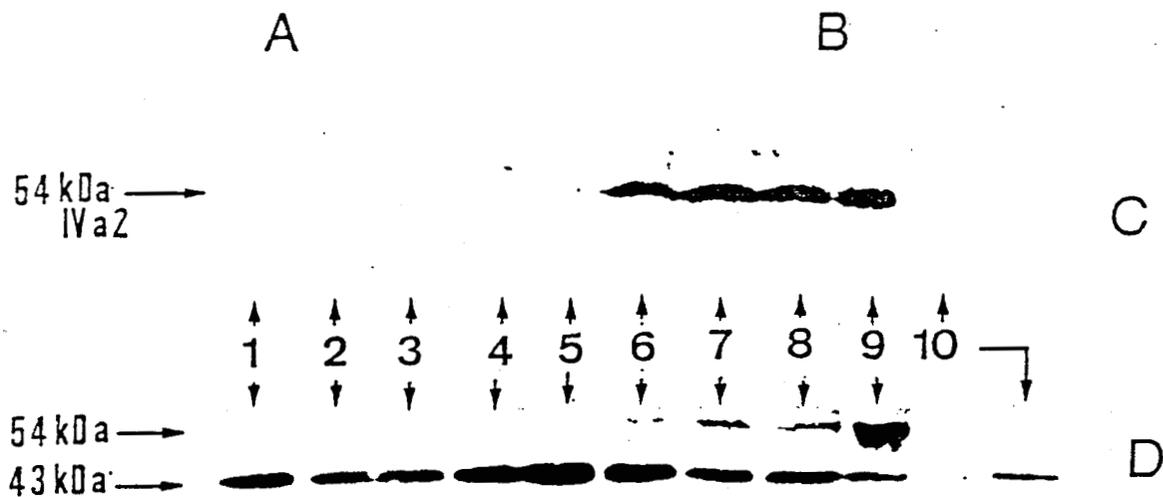
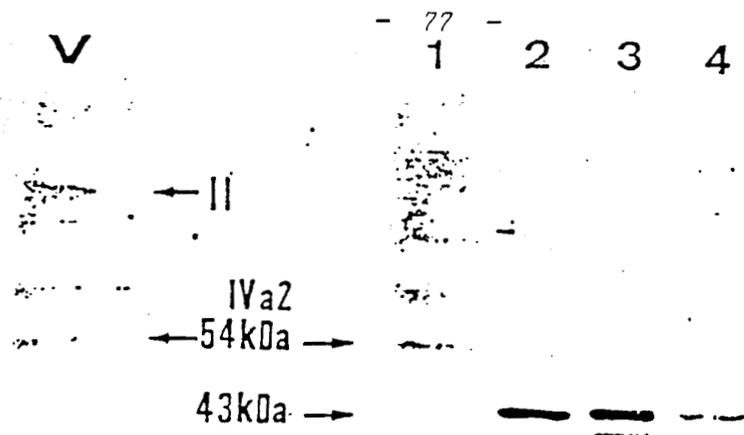


FIGURE R6 : CARACTERISATION DE LA PROTEINE IVa2 DANS LES EXTRAITS DE CELLULES INFECTEES EN WESTERN BLOT

- A : Particules d'Ad5 type sauvage
- B : Fractionnement cellulaire
 - 1 : "Cytosol"
 - 2 : "Noyau-sol"
 - 3 : "Membrane plasmique"
 - 4 : "Matrice nucléaire"
- C : Cinétique d'apparition du IVa2 dans le "cytosol"
- D : Cinétique d'apparition du IVa2 dans le "noyau-sol"
 - 1 : Cellules non-infectées
 - 2 à 9 : Cellules infectées par l'Ad2 type sauvage respectivement : 3-6-9-12-17-24-30 h
 - 10 : Cellules infectées par l'Ad2 type sauvage 24 h en présence d'hydroxyurée (10 mM)

La protéine de 43 kDa, également révélée dans la fraction noyau-soluble, était retrouvée dans les extraits de cellules non-infectées laissant supposer une origine cellulaire. Sa synthèse paraissait cependant régulée par l'infection : à 12 h post-infection la quantité de protéine 43 kDa était augmentée par rapport à la quantité présente dans les cellules non-infectées.

CROSSLAND et RASKAS (1983) ont montré que la synthèse de l'ARNm IVa2 était inhibée lorsque la répllication était bloquée par l'hydroxyurée. Nous avons analysé la synthèse de la protéine IVa2 en présence de la même drogue (10 mM) ajoutée une heure après le début de l'infection. Les cellules ont été récoltées 23 h plus tard et les fractions cytosoluble et noyau-soluble analysées en immunoblot: la protéine IVa2 n'était retrouvée dans aucune des fractions testées (Fig. R6, 10).

En accord avec les résultats de CROSSLAND et RASKAS (1983), la protéine IVa2 n'est pas détectable lors du blocage de la répllication virale et/ou cellulaire par l'hydroxyurée.

2-3-2 Localisation intracellulaire.

La distribution intracellulaire de la protéine IVa2 a ensuite été observée en immunofluorescence indirecte.

Des cellules HeLa, cultivées sur lamelles, ont été infectées à 50 pfu par cellule par l'Ad2 type sauvage et l'infection arrêtée toutes les 3 h de 0 à 30 h post-infection. Le sérum anti-IVa2 (dilué au 1/1000) a été mis au contact des cellules fixées par la paraformaldéhyde puis la protéine IVa2 a été révélée par un deuxième anti-sérum dirigé contre les IgG de lapin et couplé à la fluorescéine (1/500). Une fluorescence cytoplasmique diffuse a été observée dans les cellules à partir de 12 h post-infection. Le nombre de cellules fluorescentes augmentait avec le temps d'infection mais une fluorescence parasite diffuse était également présente dans les cellules non-infectées, certainement due à des réactions croisées avec des protéines cellulaires. Nous avons alors entrepris une purification de notre sérum.

2-4 Purification du sérum

Des cellules HeLa infectées par l'Ad2 type sauvage ont été arrêtées à 24 h post-infection puis les fractions "membrane plasmique" (de cellules BRK transformées par E1A et IVa2 d'Ad3 décrites au § IV des Travaux Personnels) et "cytosol" (24 h post-infection) ont été récoltées. Après migration en gel préparatif de polyacrylamide-SDS et transfert, les bandes de nitrocellulose contenant la protéine de 43 kDa (enrichie dans les cellules BRK) et 54 kDa (de cellules infectées 24h) ont été repérées, découpées et mises au contact du sérum anti-IVa2 dont la fraction IgG avait préalablement été concentrée.

Après une nuit d'incubation, les IgG spécifiques des protéines de 43 et 54 kDa ont été éluées séparément par la glycine à pH acide à partir des bandes de nitrocellulose.

2-4-1 Spécificité des deux fractions du sérum (Fig. R7)

Des extraits de cellules HeLa infectées ou non par l'Ad2 type sauvage ainsi que le virus purifié ont été analysés en immunoblot avec les deux fractions de sérum obtenues. Les complexes protéines-IgG ont été révélés par la protéine A marquée à la ^{35}S -Met.

La fraction de sérum purifiée contre la protéine de 43 kDa révélait celle-ci dans les extraits de cellules non-infectées ou à 12 h post-infection (Fig. R7, B, 3 et 4) et en grande quantité dans la "membrane plasmique" des cellules de rein de rat BRK dont elle avait été extraite (Fig. R7, B, 6). La protéine de 43 kDa n'était retrouvée ni dans le virus purifié ni dans les cellules infectées 24 h (Fig. R7, B, 2 et 5).

Les IgG purifiées contre la protéine de 54 kDa la révélaient dans le virus mature et dans les cellules infectées 12 et 24 h (Fig. R7, A, 2, 4 et 5).

Les deux types d'IgG contenues dans le sérum dirigées contre les protéines de 43 kDa (cellulaire) et 54 kDa (virale) sont donc séparés par cette technique. Cette purification élimine également la réaction croisée avec l'hexon de l'Ad5.

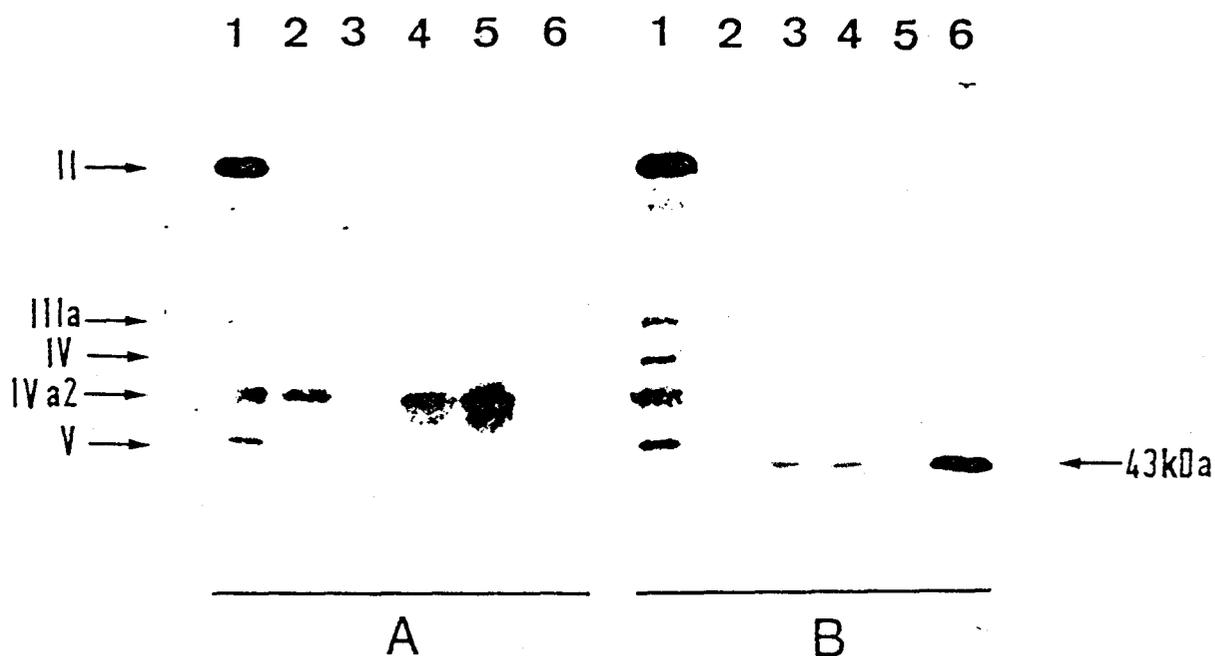


FIGURE R7 : SPECIFICITE DES DEUX FRACTIONS DU SERUM REVELEE EN WESTERN BLOT A LA ^{35}S -Met PROTEINE A.

- A : IgG purifiées contre la protéine IVa2 (54 kDa)
- B : IgG purifiées contre la 43 kDa de cellules BRK transformées
- 1 : Protéines d'Ad5 type sauvage marquées à la ^{14}C -Val
- 2 : Protéines d'Ad2 type sauvage
- 3 : Cellules HeLa non-infectées
- 4 : Cellules HeLa 12 h post-infection
- 5 : Cellules HeLa 24 h post-infection
- 6 : Fraction "membrane plasmique" de cellules BRK transformées

2-4-2 Détection de la protéine IVa2 par immunofluorescence

La fraction de sérum purifiée contre la protéine IVa2 nous a permis d'analyser sa localisation intracellulaire par immunofluorescence lors d'une cinétique d'infection par l'Ad2. La protéine a été décelée dès 12 h post-infection dans le cytoplasme de quelques cellules (Fig. R8, A) où la fluorescence était très intense et cytoplasmique (Fig. R8, B). A 17 h post-infection, le nombre de cellules positives augmentait ; à 24 h post-infection pratiquement toutes les cellules fluoresçaient mais l'intensité diminuait (Fig. R8, C). A ce stade de l'infection la fluorescence était également observée dans le noyau montrant le transport de la protéine IVa2 (Fig. R8, D). En présence d'hydroxyurée, aucune fluorescence n'était retrouvée (Fig. R8, E).

La haute multiplicité d'infection employée favorise la synchronisation du processus. Malgré cela, à 12 h post-infection, la protéine IVa2 n'a été détectée dans le cytoplasme que de quelques cellules (environ 1 sur 100). Les cellules ne sont pas toutes dans la même phase du cycle cellulaire; le démarrage de la synthèse de la protéine IVa2 peut requérir un état particulier de la cellule.

D'autre part, puisqu'en présence d'hydroxyurée la protéine IVa2 n'a pas été pas détectée, il semble que la réplication de l'ADN viral et/ou cellulaire soit nécessaire à l'expression correcte du gène IVa2.

2-4-3 Localisation de la protéine de 43 kDa (Fig. R9)

La seconde fraction de sérum purifiée contre la 43 kDa extraite de BRK transformées nous a permis de la localiser dans les cellules BRK (Fig. R9, A) et HeLa infectées (Fig. R9, C) ou non (Fig. R9, B). Des granules ont ainsi été observés semblables aux lysosomes.

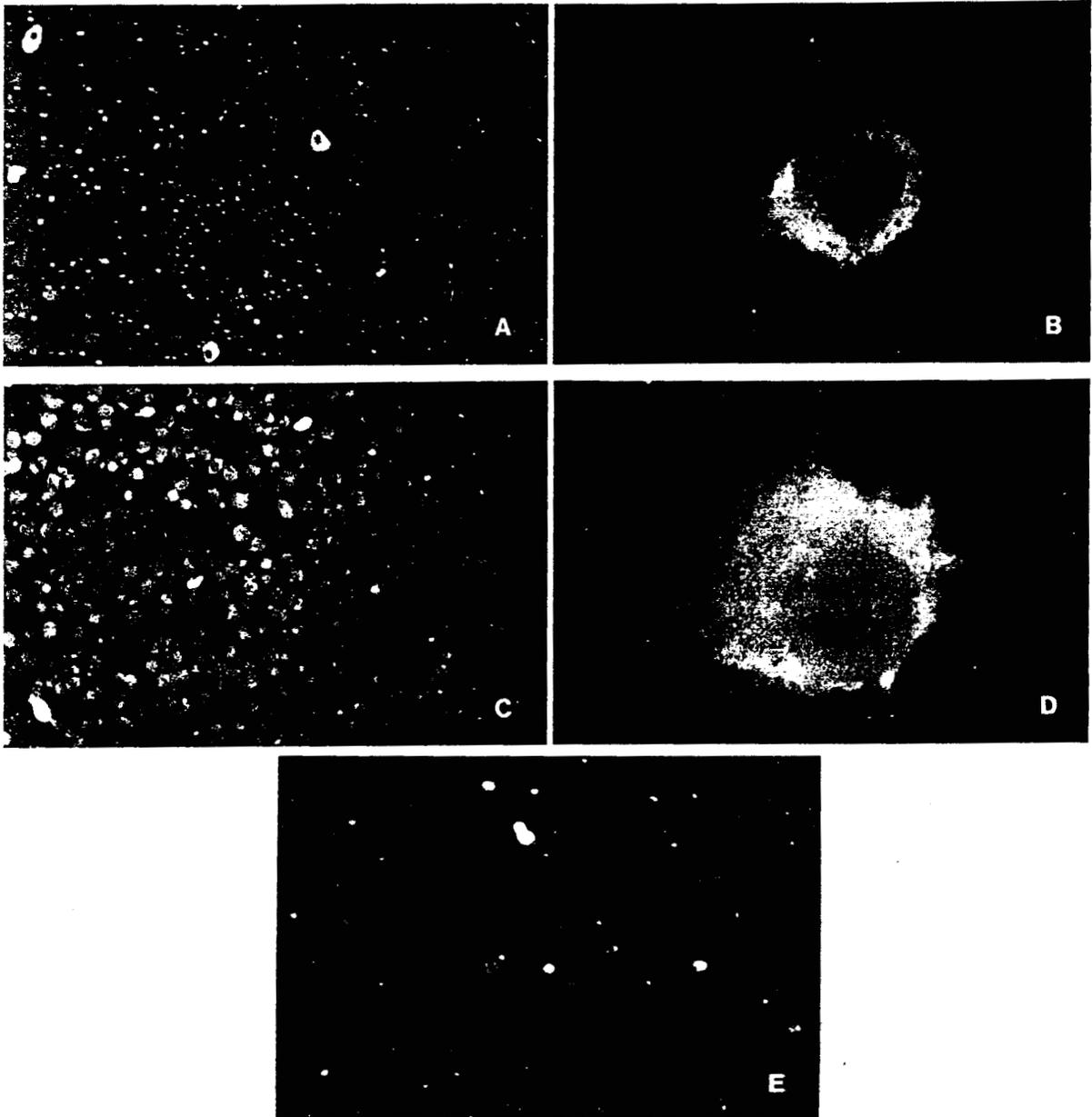


FIGURE R8 : DETECTION DE LA PROTEINE IVa2 PAR IMMUNOFLUORESCENCE

- A : Cellules HeLa infectées 12 h par l'Ad2 type sauvage.
Grossi 10x.
- B : Idem A. Grossi 100x.
- C : Cellules HeLa infectées 24 h par l'Ad2 type sauvage.
Grossi 10x.
- D : Idem C. Grossi 100x.
- E : Cellules HeLa infectées 24 h en présence d'hydroxyurée.
Grossi 10x.

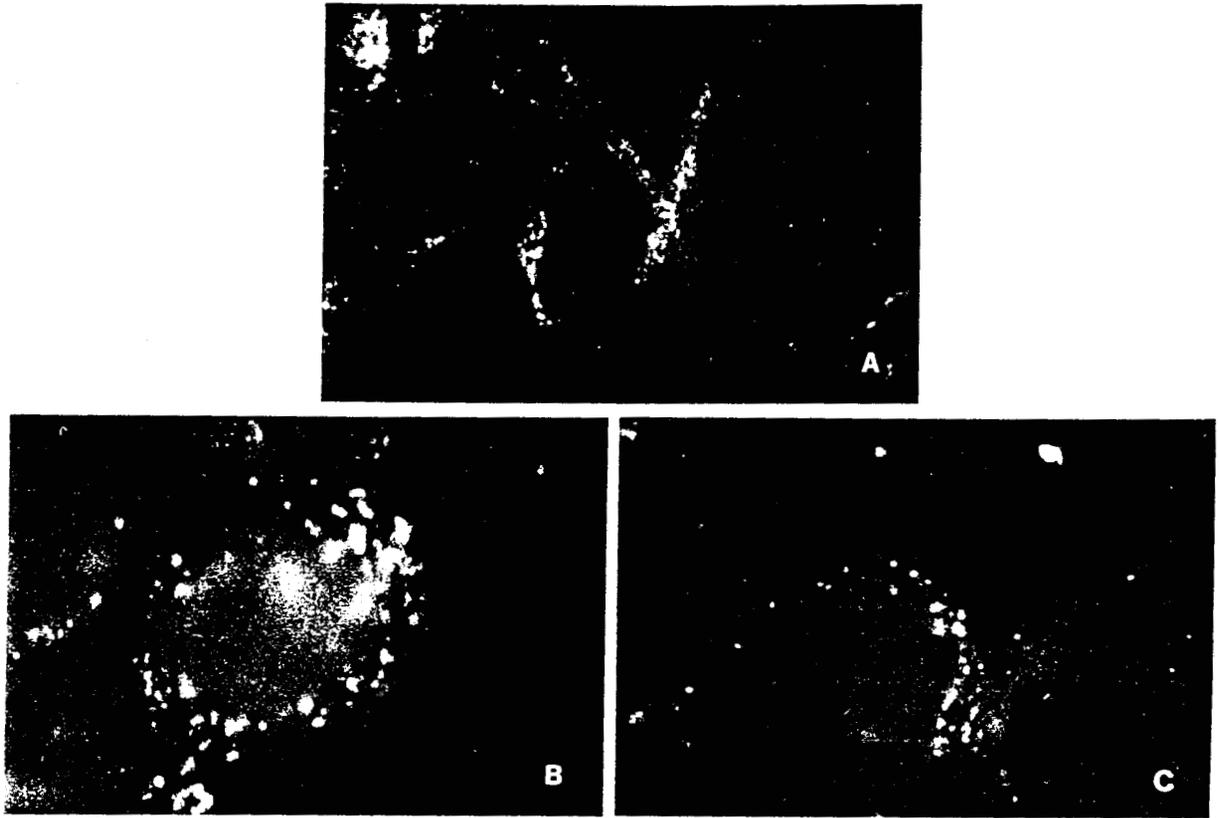


FIGURE R9 : LOCALISATION DE LA PROTEINE DE 43 kDa .

- A : Cellules BRK contenant le gène IVa2 d'Ad3 (lignée 313-1). Grossi 100x.
- B : Cellules HeLa non-infectées. Grossi 100x.
- C : Cellules HeLa infectées 12 h par l'Ad2 type sauvage. Grossi 100x.

II. Expression de l'ARNm IVa2 lors de l'infection.

L'expression des gènes de l'adénovirus est en général nettement précoce ou tardive. La région E1A, par exemple, est la première à s'exprimer et est appelée précoce immédiate. Son expression est suivie de celle des autres zones précoces. La plupart des gènes de structure, par contre, s'exprimant sous le contrôle du MLP ne sont actifs que quand la réplication de l'ADN viral a eu lieu. La réplication est le point de transition entre les phases précoce et tardive. L'appartenance à l'une ou l'autre -précoce ou tardive - des deux catégories de gènes devient cependant plus difficile à déterminer pour certains gènes appelés intermédiaires car présumés actifs avant le démarrage de la réplication de l'ADN viral mais dont l'activité augmente fortement après.

Les gènes codant pour les polypeptides IX et IVa2 ont été placés dans cette catégorie (Revue : PHILIPSON, 1979) : une activité précoce du promoteur IVa2 a été trouvée (SEHGAL et al., 1979) et l'ARNm du polypeptide IX a été détecté en présence de cyto-arabinoside inhibiteur de la réplication (PERSSON et al., 1978).

CROSSLAND et RASKAS (1983), par contre, n'ont pas retrouvé l'ARNm du polypeptide IX en présence d'hydroxyurée, un inhibiteur moins labile de la réplication. BINGER et FLINT (cité par FLINT, 1986) ont trouvé que l'expression de l'ARNm mature du IVa2 était bloquée en présence d'hydroxyurée ou avec l'H5 ts 125, déficient à 40°C dans la réplication de l'ADN viral.

Lors de cette étude, les auteurs ont également détecté d'autres formes d'ARNm provenant du gène IVa2.

FLINT (1986), dans une revue sur les travaux concernant la régulation de la transcription des gènes de l'adénovirus, écrit que la phase intermédiaire de l'infection n'existe pas et que la transcription et la traduction plus précoce du polypeptide IX, par rapport aux autres protéines structurales, est due à la nature de l'ARNm du polypeptide IX non épissé donc plus stable et traduit plus rapidement.

Une contradiction existe donc dans la littérature quant à la définition de certains gènes par rapport à leur cinétique d'expression lors du cycle lytique.

L'expression du gène IVa2 a alors été étudiée. La réplication de l'ADN semblant une fonction importante dans l'expression du gène IVa2, nous

l'avons bloquée par l'hydroxyurée. La réplication de l'ADN viral a également été bloquée en utilisant le mutant H5 ts 125 à 40°C.

L'ARN IVa2 a ensuite été détecté dans les cellules infectées dans ces différentes conditions ainsi que lors d'un cycle lytique normal.

1- Détection des ARNm IVa2 et E2B des cellules HeLa infectées par l'Ad2.

1-1 Structure du gène IVa2 (Fig. R10)

La séquence de l'ARNm IVa2 est totalement comprise dans celle de la région E2B dont le promoteur est situé à 27000 pb (STILLMAN et al., 1981) mais en diffère par la présence d'un intron de 277 nt entre les sites donneurs (5695 nt) et accepteur (5418 nt) d'épissage (CHOW et al., 1979 ; VAN BEVEREN et al., 1981). Le site de démarrage de la transcription a été placé au nt 5826 (BAKER and ZIFF, 1981 ; VAN BEVEREN et al., 1981).

1-2 Analyse des ARNm par la technique de P.C.R. (Fig. R11 et Fig. R12)

Afin de différencier les ARNm provenant de la région IVa2 de ceux provenant de la zone E2B, nous avons utilisé la technique de P.C.R. Pour cela, des oligonucléotides de synthèse hybridant de part et d'autre de l'intron du IVa2 ont été choisis.

Le premier (01) de séquence 5'TCCTCGTTTCGCGGGTT3' hybridait avec les ARNm IVa2 ou E2B, le deuxième (02) de séquence 5'CCGCTCGAGGACAGGCC 3' hybridait avec le brin complémentaire.

Une copie d'ADN complémentaire (ADNc) a été rétrotranscrite par la transcriptase inverse de M-MLV à partir de 2 à 10 µg d'ARN totaux extraits par la méthode à l'isothiocyanate de guanidine.

Cet ADN a ensuite été amplifié après addition de 1 unité de Taq polymérase.

Les produits d'amplification observés en gel d'agarose à 2% avaient soit 574 pb si l'ARNm non épissé était amplifié, soit 297 pb si l'ARNm du IVa2 était épissé entre les nt 5695 et 5418.

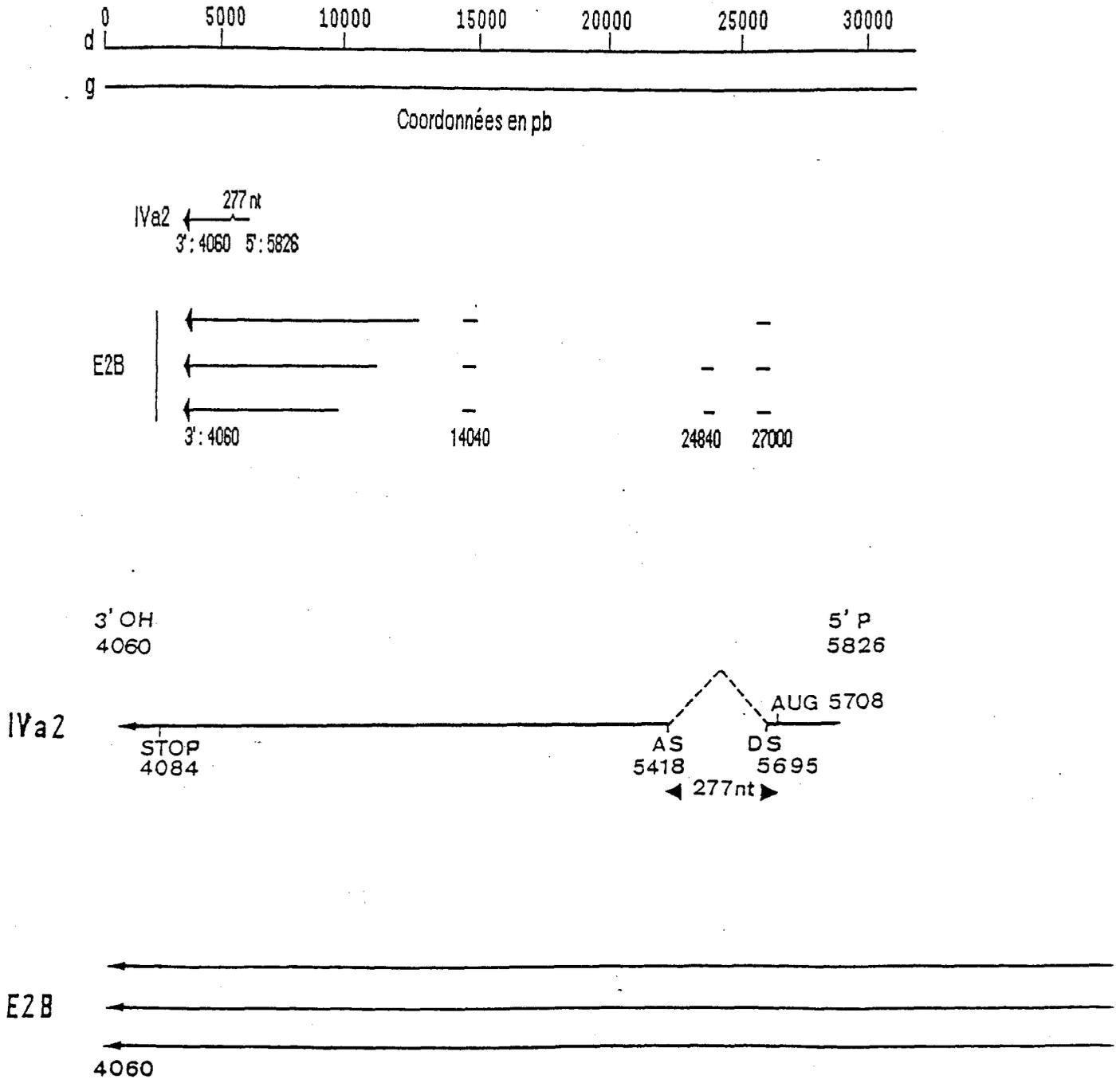


FIGURE R10 : COORDONNEES DU GENE IVa2 ET SCHEMATISATION DES ARNm IVa2 et E2B.

- Les coordonnées sont données en pb :
- DS : site donneur d'épissage
 - AS : site accepteur d'épissage
 - AUG : codon initiateur de traduction
 - STOP : codon d'arrêt de traduction

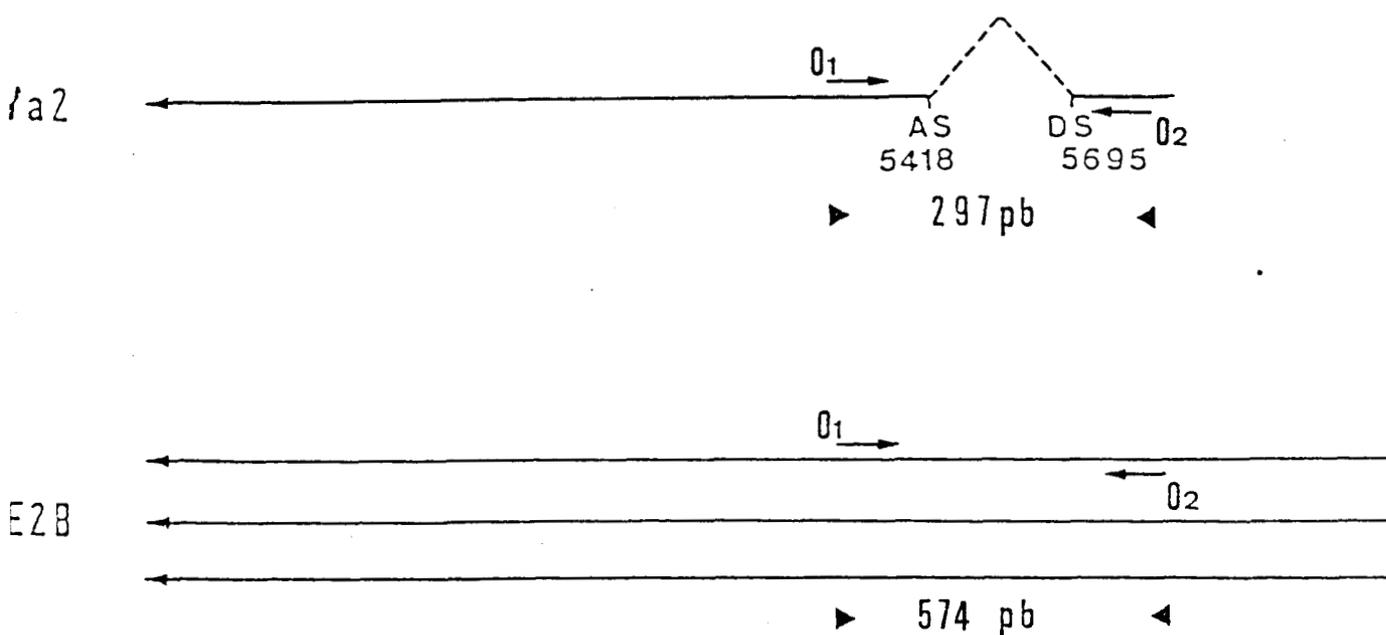


FIGURE R11 : OLIGONUCLEOTIDES O1, O2 ET PRODUITS D'AMPLIFICATION EN P.C.R. DES ARNm IVa2 ET E2B.

- L'oligonucléotide O1 : 5'TCCTCGTTTCGCGGGTT 3' hybride avec les ARNm
- L'oligonucléotide O2 : 5'CCGCTCGAGGACAGGCC 3' hybride avec le brin complémentaire
- Les produits d'amplification attendus sont de 297 pb si l'ARNm IVa2 est détecté (épissé de 277 nt entre 5695 et 5418) ou de 574 pb si les ARNm E2B sont détectés.

Les ARN totaux de cellules HeLa infectées par l'Ad2 type sauvage (50 pfu par cellule) ont été récoltés après 3 à 24 h d'infection. L'hydroxyurée (HU) à 10 mM a également été ajoutée 1 h après l'infection et les ARN ont été récoltés 23 h plus tard.

L'analyse en gel d'agarose des produits d'amplification par P.C.R. (Fig. R12) a montré une bande majoritaire de 297 pb détectée dès 9 h d'infection. La bande de 574 pb provenant des ARNm de la région E2B n'a pas été détectée dans les conditions de l'expérience.

En présence d'hydroxyurée, aucun ARN n'a été détecté montrant un blocage de l'expression et/ou de la maturation de l'ARNm IVa2 entre les sites 5695 et 5418 cernés par les oligonucléotides O1 et O2.

1-3 Analyse par protection de la digestion aux ribonucléases A et T1 (Fig. R13)

Le clonage de fragments du gène IVa2 dans le plasmide pSP65 (Amersham) permet, grâce à l'ARN polymérase du phage SP6 et à l'(α - 32 P)-UTP d'obtenir des sondes d'ARN radioactif complémentaires des ARN IVa2 étudiés.

La première sonde analysait l'épissage des ARNm viraux au site donneur (nt 5695) déjà décrit pour le gène IVa2 (VAN BEVEREN et al., 1981). Pour cela, la séquence d'Ad5 entre les sites SacI (5638 nt) et XhoI (5778 nt) a été placée dans le plasmide pSP65 entre les sites SacI et SalI pour donner le plasmide pVM425. Après digestion par HindIII, l'ARN synthétisé grâce à ce plasmide et à l'ARN polymérase de SP6 s'étendait du site d'initiation SP6 au site HindIII du plasmide pSP65 et possédait une longueur totale de 200 nt. La sonde protégée de la digestion aux ribonucléases A et T1 par les ARN viraux possédait une longueur totale de 140 nt si toute la séquence virale de la sonde était protégée ou de 83 nt si l'ARNm à analyser s'étendait du site XhoI (5778 nt) au site donneur d'épissage du IVa2 (5695 nt).

La deuxième sonde hybridait avec les séquences proches du site de démarrage de la transcription. Le plasmide pVM427 contenait, dans le même vecteur pSP65, la séquence d'Ad5 entre XhoI (5778 nt) et HindIII (6231 nt). Après digestion au site AflIII (5929 nt), la sonde radioactive possédait une longueur totale de 194 nt. Les fragments protégés

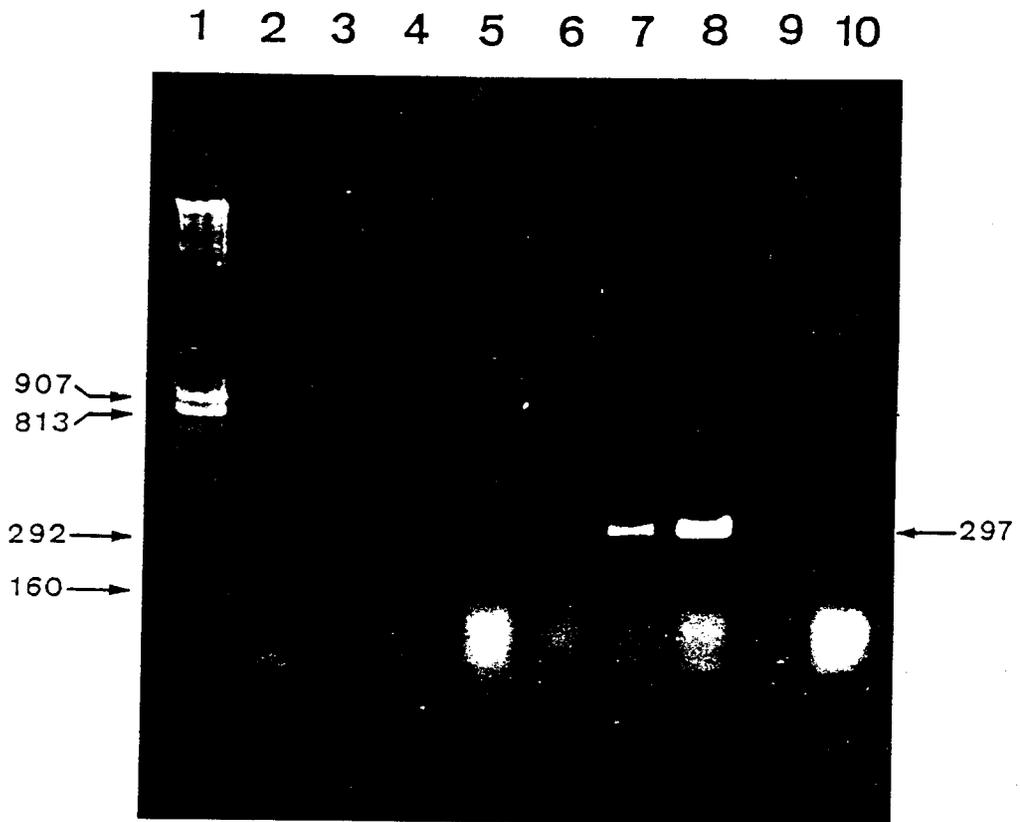


FIGURE R12 : ANALYSE DE L'ARNm IVa2 PAR LA TECHNIQUE DE P.C.R.

- 1 : pVM520 digéré par HindIII, XhoI et PvuII
- 2 : cellules HeLa non infectées
- 3 à 9 : cellules HeLa infectées par l'Ad2 type sauvage
3-6-9-12-17-24 h respectivement.
- 10 : cellules HeLa infectées 24 h en présence
d'HU (10 mM).

Les tailles des fragments observées en gel d'agarose à 2%
sont indiquées en pb.

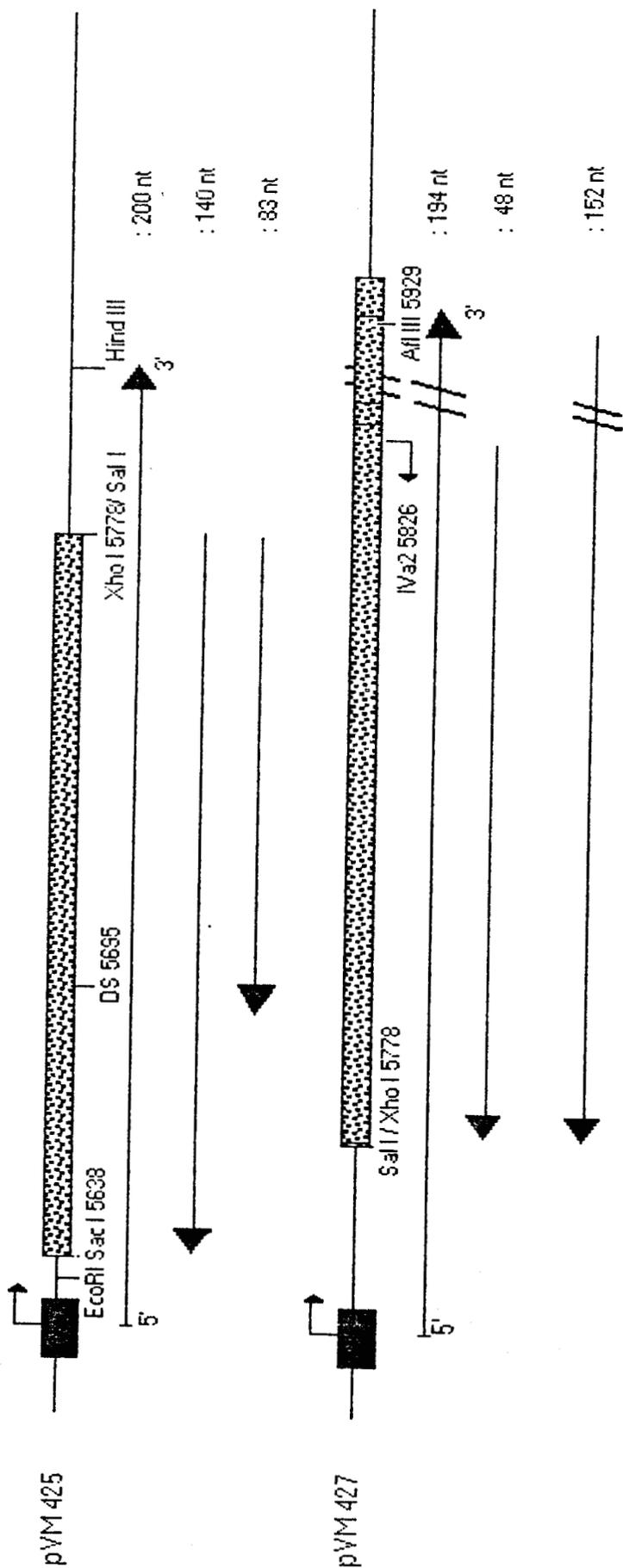


FIGURE R13: PLASMIDES pVM 425 ET pVM 427 POUR L'ANALYSE EN PROTECTION DE LA DIGESTION AUX RIBONUCLEASES A ET T1.

— : ADN du vecteur pSP 65 (Amersham)

■ : promoteur du phage SP6

▨ : ADN d'Ad5

→ : ARN synthétisé par la polymérase SP6

← : Fragments protégés par les sondes 425 ou 427

attendus dans cette expérience étaient de 48 nt si la transcription de l'ARNm démarrait au site connu pour le gène IVa2 (5826 nt) ou de 152 nt, soit toute la sonde sauf la séquence provenant du vecteur, si la transcription démarrait au site de coiffe de la région E2B (non cloné dans le pVM427).

Les ARN totaux de cellules HeLa infectées par l'Ad2 type sauvage extraits de 9 à 24 h post-infection ont été hybridés à 5×10^5 cpm de sonde 425 ou 427 radioactives.

A 9 h post-infection, 10 μ g d'ARNm ont montré une hybridation très faible avec la sonde 425. La faible bande observée correspondait d'ARNm protégé non épissé (Fig. R14, A, 3).

A 24 h post-infection, la bande de 140 nt était renforcée. Un doublet de migration proche de 83 nt a également été détecté montrant deux ARNm épissés à des sites très proches. Aucun épissage dans la zone E2B n'ayant été décrit dans cette région, il était raisonnable d'estimer que ce doublet provenait d'ARNm IVa2. Des produits mineurs de protection ont également été observés, correspondant peut-être à d'autres épissages du précurseur ARN IVa2 (Fig. R14, A, 4).

En présence d'hydroxyurée, 50 μ g d'ARN de cellules infectées 24 h ne présentaient pas de doublet proche de 83 nt provenant du messenger IVa2 normalement épissé mais la bande de 140 nt existait toujours (Fig. R14, A, 5). L'absence d'ARNm IVa2 normalement épissé en présence d'hydroxyurée avait déjà été observée par la technique de P.C.R. La bande de 140 nt devait provenir des ARNm de E2B.

Le démarrage de la transcription du gène IVa2 au nt 5826 a également été analysé grâce à la sonde 427.

A 9 h post-infection, une bande faible entre les deux attendues de 152 et 48 nt a été visualisée, détectant un éventuel démarrage de la transcription à un site de coiffe différent de ceux des gènes E2B de IVa2.

A 24 h post-infection, la bande majoritairement observée de 48 nt montrait une transcription préférentielle à partir du site de coiffe du IVa2 (Fig. R14, B, 4).

Cette bande disparaissait totalement en présence d'hydroxyurée (Fig. R14, B, 5). Dans ce dernier cas, cependant, une transcription a partir d'autres sites de coiffe a été détectée : outre celle de 152 nt, d'autres bandes entre 152 et 48 nt ont été observées dont une commune à celle visualisée à 9 h post-infection.

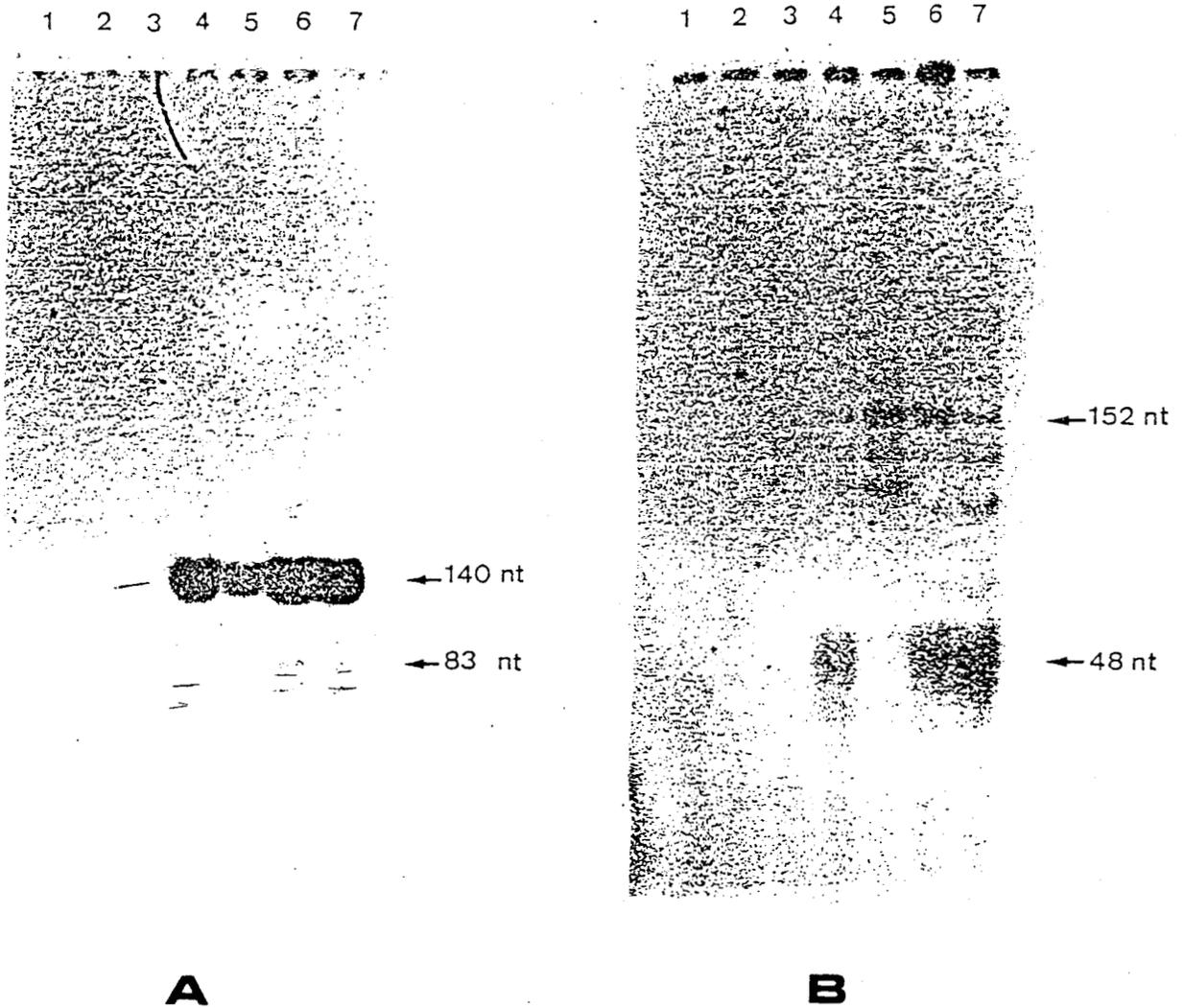


FIGURE R14 : ANALYSE DES ARNm IVa2 ET E2B EN PROTECTION DE LA DIGESTION AUX RIBONUCLEASES A ET T1.

A : hybridation avec la sonde 425. Gel d'acrylamide à 8%
B : hybridation avec la sonde 427. Gel d'acrylamide à 12%

- 1 : ARN de levure (10 µg)
- 2 : ARN de cellules HeLa non-infectées (10 µg)
- 3 : ARN de cellules HeLa infectées par l'Ad2, 9 h post-infection (10 µg)
- 4 : ARN de cellules HeLa infectées par l'Ad2, 24 h post-infection (10 µg)
- 5 : ARN de cellules HeLa infectées par l'Ad2, 24 h post-infection avec HU (50 µg)
- 6 : ARN de cellules HeLa infectées par H5 ts 125, 72 h post-infection, 33°C (10 µg)
- 7 : ARN de cellules HeLa infectées par H5 ts 125, 24 h post-infection, 40°C (10 µg)

De ces expériences, il est possible de conclure :

- que l'épissage dans la zone IVa2 - E2B est plus hétérogène que ce qui a été décrit jusqu'à présent dans la littérature. En effet, seules deux espèces provenant de la région E2B, non épissées dans cette région et un ARNm, épissé entre les nt 5695 et 5418, provenant de la région IVa2 ont jusqu'à présent été détectés.
- que le démarrage au site de coiffe connu du IVa2 (5826nt) est net en phase tardive de l'infection mais que d'autres sites d'initiation peuvent être observés en phase précoce (à 9 h post-infection, ou en présence d'hydroxyurée).
- que la réplication de l'ADN (viral et/ou cellulaire) semble réguler l'expression du gène IVa2. Ces phénomènes peuvent donner naissance à de nouvelles espèces provenant des ARN précurseurs IVa2 ou E2B.

2- Infection par le mutant H5 ts 125

L'hydroxyurée inhibant autant la réplication virale que la réplication cellulaire, nous avons étudié l'effet du blocage de la réplication virale seule sur la production de l'ARNm IVa2. Pour cela, le mutant H5 ts 125 produisant à température restrictive de 40°C une protéine DBP mutée non fonctionnelle et donc incapable de se répliquer correctement, a été utilisé (ENSINGER and GINSBERG, 1972).

Des cellules HeLa ont été infectées par 50 pfu par cellule par l'H5 ts 125 et laissées 24 h à 40°C. Les ARNm ont ensuite été récoltés et analysés par la technique de P.C.R. grâce aux oligonucléotides O1 et O2 ou en protection de la digestion aux ribonucléases A et T1 par les sondes 425 et 427. La même expérience a été menée sur les ARNm de cellules infectées 24 h par l'Ad2 de type sauvage.

La technique de P.C.R. a révélé à 40°C la présence d'un ARNm IVa2 épissé de l'intron de 277 nt (Fig. R15, 2 et 3).

La protection de la digestion aux ribonucléases A et T1 a également montré que le mutant H5 ts 125 à 40°C exprimait un ARNm provenant du site de coiffe du IVa2 (sonde 427, Fig. R14, B, 7) épissé normalement au site donneur à 5695 nt identique à celui observé à température permissive (Fig. R14, A, 6 et 7).

Ces résultats montrent que le gène IVa2 s'exprime avant la réplication de l'ADN viral et est mûri au site donneur d'épissage à 5695 nt.

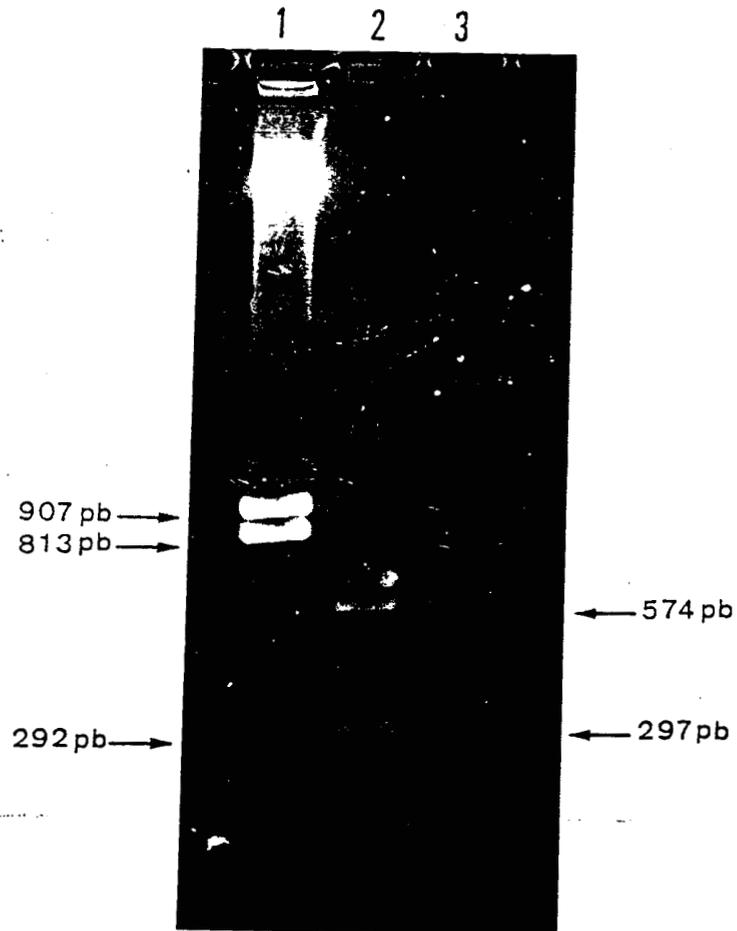


FIGURE R15 : DETECTION PAR LA TECHNIQUE DE P.C.R. DE L'ARNm IVa2 DE CELLULES INFECTÉES PAR LE H5 ts 125.

Gel d'agarose à 2%

1 : pVM520 digéré par Hind III, Pvu II et Xho I

2 : ARN de cellules infectées par l'Ad2 type sauvage, 24 h

3 : ARN de cellules infectées par le H5 ts 125, 24 h à 40°C.

La bande de 297 pb correspondant à l'ARNm IVa2 épissé entre 5695 nt et 5418 nt est détectée lors de l'infection par le mutant.

L'hydroxyurée, par contre, inhibe la transcription au site de coiffe du IVa2 (Fig. R14, B, 5) suggérant un rôle de la réplication cellulaire sur l'expression du gène IVa2, plus que de la réplication virale.

La production de la protéine IVa2 a ensuite été analysée. Des cellules HeLa ont été infectées par 20 pfu d'H5 ts 125 à 40°C et les protéines ont été extraites 24 h plus tard dans le tampon RSB. L'analyse en Western Blot a révélé une production de protéine IVa2 par le mutant, à température restrictive, la synthèse paraissait même plus élevée que pour le type sauvage. La forme de 56 kDa était majoritairement révélée et ceci dans la fraction "noyau-sol" (Fig. R16, A). Un contrôle sur les cellules HeLa infectées par le même mutant a montré que l'hexon, protéine structurale majeure et tardive, n'était pas produit à 40°C (Fig. R16, B).

La non-réplication de l'ADN viral et/ou la présence d'une protéine DBP non-fonctionnelle augmente donc la production de la protéine IVa2.

3- Infection des cellules CV1 par l'Ad2 ou l' Ad7 type sauvage

L'adénovirus produit un cycle abortif sur les cellules de singe CV1 : pour le sous-groupe C (Ad2), le blocage a lieu au niveau de la maturation de l'ARNm de la fibre (KLESSIG and CHOW, 1980), pour le sous-groupe B (Ad7), c'est la réplication de l'ADN viral qui n'a pas lieu (DELSERT and D'HALLUIN, 1984).

Nous avons étudié le comportement du gène IVa2 dans de telles cellules afin de voir si le blocage de la réplication chez l'Ad7 dans les cellules CV1 empêchait la maturation de l'ARNm IVa2. Cette expérience évitait l'utilisation du mutant H5 ts 125 qui, outre le blocage de la réplication virale, présente à 40°C une protéine DBP non fonctionnelle. Or la protéine DBP est impliquée dans le contrôle de l'expression de nombreux gènes précoces et peut, de ce fait, réguler l'expression du gène IVa2 (voir Discussion, § III).

La comparaison des l'ARNm IVa2 de l'Ad2 dans les cellules HeLa et CV1 permettait de voir si la maturation différait dans les deux cas, comme celle de l'ARNm tardif de la fibre.

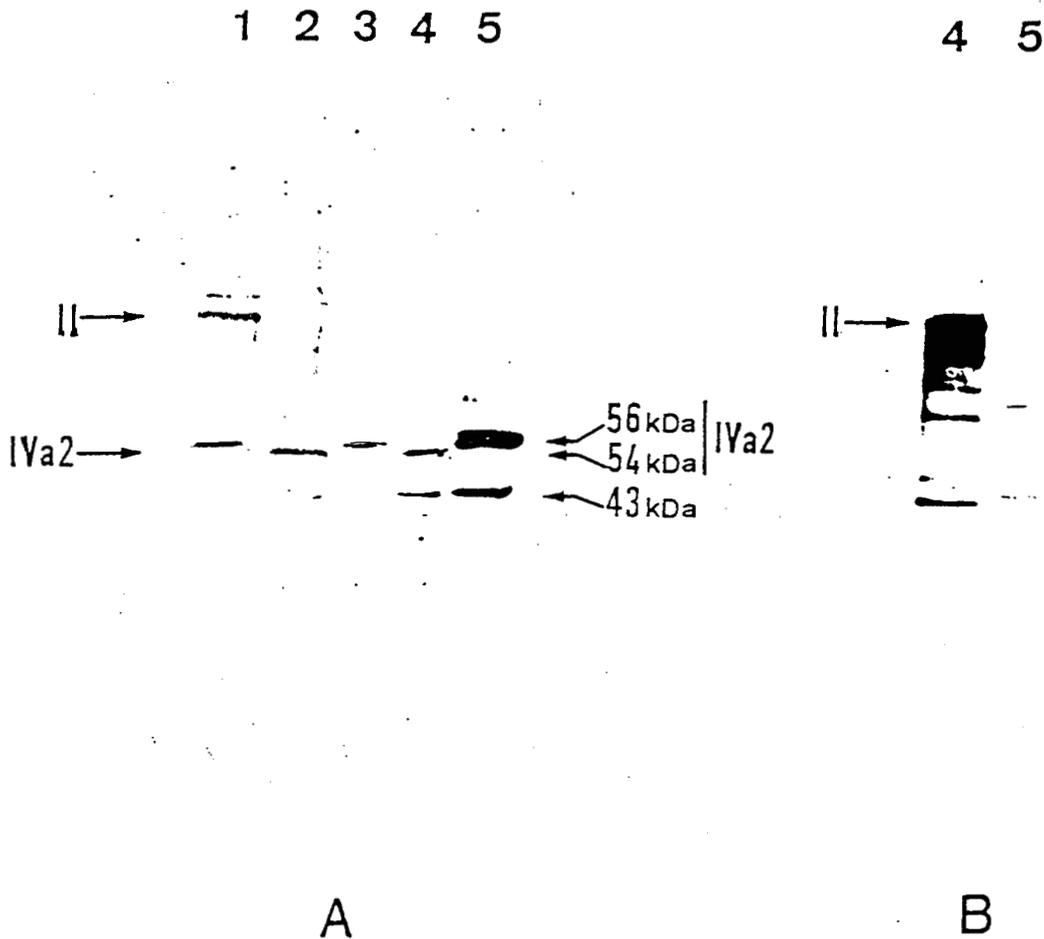


FIGURE R16 : DETECTION DE LA PROTEINE IVa2 DANS LES CELLULES INFECTEES PAR L'H5 ts 125

- A : Western-Blot anti-IVa2
- B : Western-Blot anti-II
- 1 : particules matures d'Ad5 type sauvage
- 2 : "cytosol" de cellules HeLa infectées 24 h par l'Ad2 type sauvage
- 3 : "cytosol" de cellules HeLa infectées 24 h par l'H5 ts 125 à 40°C
- 4 : "noyau-sol" de cellules HeLa infectées 24 h par l'Ad2 type sauvage
- 5 : "noyau-sol" de cellules HeLa infectées 24 h par l'H5 ts 125 à 40°C

La protéine IVa2 (forme 56 kDa) est sur-exprimée dans les noyaux de cellules infectées par l'H5 ts 125 à 40°C. L'hexon n'est pas détecté dans les mêmes extraits.

24 h après l'infection par 20 pfu d'Ad7 ou 50 pfu d'Ad2, les ARNm ont été préparés et 2 à 10 µg ont été analysés en P.C.R. avec les oligonucléotides O1 et O2 qui avaient été sélectionnés pour leur totale homologie de séquence avec les ARNm IVa2/E2B d'Ad2 et d'Ad7.

Avec l'Ad2, le seul produit d'amplification observé était le même que dans les cellules HeLa (Fig. R17, 2) soit une bande de 297 pb. Avec l'Ad7 par contre, le produit observé était plus petit suggérant la présence d'un intron plus grand d'environ 170 nt (Fig. R17, 3).

En gel d'acrylamide 12%, une petite différence de taille était également observée entre les produits d'amplification provenant de cellules HeLa et CV1 infectées par l'Ad2. Cette différence n'était que de quelques nucléotides.

Ces résultats suggèrent que la régulation de l'épissage de l'ARN IVa2 diffère dans les cellules CV1 et dans les cellules HeLa pour l'Ad2 comme pour l'Ad7. Ils rejoignent ceux de KLESSIG et CHOW (1980) concernant le messenger de la fibre. Ces auteurs, cependant, ont surtout détecté une forme non maturée de l'ARN de la fibre. L'ARN IVa2 d'Ad2 est mûré dans les cellules CV1, bien que l'intron semble avoir quelques nt de plus que dans les cellules HeLa.

Le blocage de la réplication de l'Ad7 dans les CV1 ne semble pas empêcher la maturation de l'ARN IVa2. Cependant, le produit d'amplification observé est de taille inférieure. Ceci peut provenir de l'épissage d'un intron plus important pour l'ARN d'Ad7 par rapport à celui de l'Ad2.

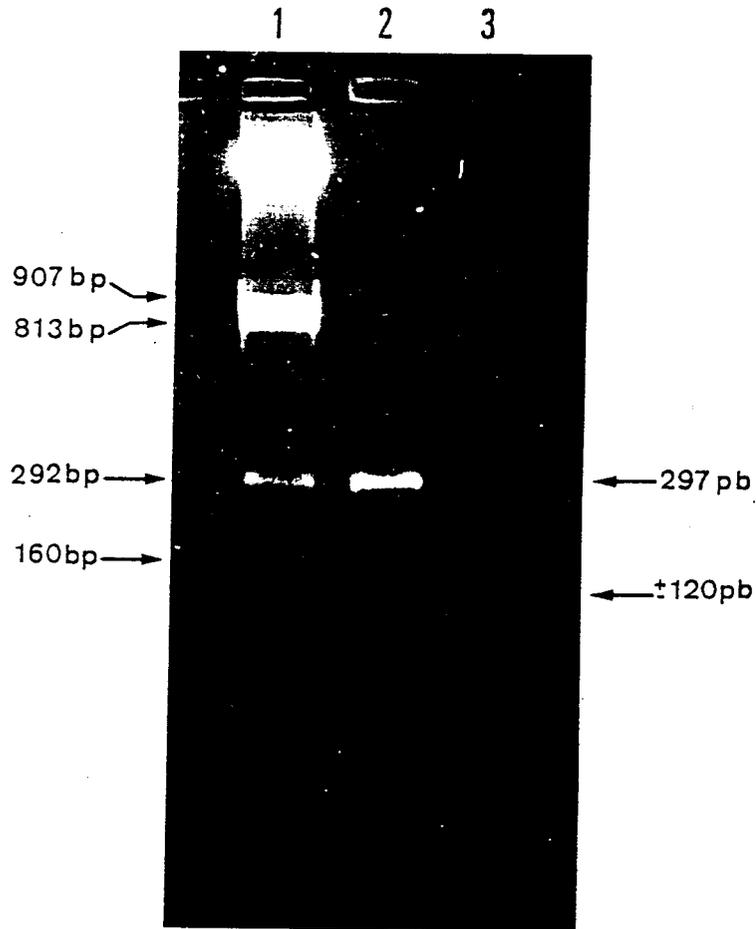


FIGURE R17 : INFECTION DE CELLULES CV1 PAR L'Ad2 ET L'Ad7 DE TYPE SAUVAGE.

Analyse des produits d'amplification par P.C.R. avec O1 et O2 en gel d'agarose à 2%.

1 : pVM520 digéré par Hind III, Pvu II et Xho I

2 : ARN de cellules CV1 infectées 24 h par l'Ad2 type sauvage

3 : ARN de cellules CV1 infectées 24 h par l'Ad7 type sauvage

L'ARNm IVa2 détecté est épissé dans les cellules CV1 pour les deux sérotypes étudiés. Cependant, pour l'Ad7 l'intron semble plus grand d'environ 175 nt.

III- Lignées cellulaires contenant le gène IVa2

A ce jour aucun mutant dans le gène IVa2 de l'adénovirus n'a été décrit.

Il est possible que les mutations dans ce gène existent mais qu'elles n'affectent en rien la croissance des virus les portant et qu'elles soient donc passées inaperçues. Les mutations dans le gène IVa2 peuvent également être léthales et empêcher la croissance des virus les portant sur des cellules HeLa normalement permissives.

La présence de la protéine IVa2 dans le virus mature et son haut degré de conservation d'un sérotype à l'autre nous ont paru intéressants : il nous a semblé que la protéine IVa2 avait un rôle important à jouer dans le développement de l'adénovirus.

Nous avons alors tenté de construire un mutant de délétion dans le gène IVa2 de l'adénovirus de type 5. Le travail entrepris en vue de l'isoler a débuté par l'établissement de lignées cellulaires capables de compléter le défaut d'un tel virus.

Plusieurs exemples concernant l'introduction de gènes de l'adénovirus dans des cellules humaines ont été décrits. En 1983, BABISS et al. ont sélectionné plusieurs lignées dérivées de cellules KB et exprimant les régions E1A et/ou E1B de l'Ad2. En 1984, KLESSIG et al. ont obtenu l'expression dans les cellules HeLa de la DBP de façon inductible par la dexaméthasone (DM) contrôlant ainsi le niveau de synthèse de cette protéine virale hautement toxique pour la cellule l'exprimant. BRUNET et BERK (1988) ont utilisé la même technique que KLESSIG et al. (1984) et ont obtenu l'expression inductible par la DM des protéines de E1A de l'Ad2 dans les cellules HeLa. Les lignées ainsi établies étaient capables de compléter des virus mutés dans le gène E1A.

Ces techniques d'obtention de lignées utilisent la co-transfection de l'ADN codant pour la protéine étudiée et d'un gène de sélection. Ce gène confère aux cellules la résistance à une drogue: le gène tk de l'herpès permet aux cellules de croître en milieu hypoxanthine -amino ptérine- thymidine ; le gène XGPRT d'E.coli donne aux cellules la résistance à l'acide mycophénolique.

Le gène néo confère aux bactéries la résistance à la kanamycine et à la néomycine en codant pour l'aminoglycoside-3-phosphotransférase de type I, enzyme inhibant l'antibiotique par phosphorylation. JIMENEZ et DAVIES (1980) donnèrent à un eucaryote inférieur (Saccharomycès) la résistance à un antibiotique analogue à la gentamicine (le G418), grâce à l'introduction du gène bactérien néo. COLBERE-GARAPIN et al. (1981) réussirent à conférer aux cellules humaines et simiennes la même résistance en leur introduisant le gène néo placé sous le contrôle du promoteur du gène tk de l'herpès. Le gène néo, sous le contrôle du promoteur précoce du Simian Virus 40, a été utilisé par BRUNET et BERK (1988) lors de l'établissement de lignées exprimant la région E1A de l'Ad2. Nous avons suivi ces approches pour l'établissement de lignées exprimant le produit du gène IVa2.

1- Etablissement des lignées

1-1 Construction des plasmides (Fig. R18)

Le gène IVa2 (Fig. R18, A) est situé dans la région du génome comprise entre les sites HindIII (nt 6231) et PvuII (nt 3959). Les sites de régulation du gène et les sites de restriction de la partie du génome le comprenant sont représentés sur la figure R18.

Un premier essai d'isolement de lignée cellulaire exprimant la protéine IVa2 d'Ad5 avait été réalisé (NIEL, communication personnelle). Le plasmide pVM520néo contenant le gène IVa2 sous le contrôle de son promoteur naturel et le gène néo sous le contrôle du promoteur précoce du Simian Virus 40 (SV40) avait permis d'isoler, après sélection au G418, une lignée cellulaire stable (H-520) ayant intégré le gène IVa2. Cependant, aucune trace de protéine IVa2 n'avait été décelée dans cette lignée avec les séra disponibles. Ce résultat pouvait s'expliquer par une production trop faible de protéine IVa2. Le gène IVa2 a donc été placé sous le contrôle d'un promoteur fort d'Ad2, le promoteur de la région E1A. KLESSIG et al. (1984) ayant rencontré des difficultés dans la construction de lignées exprimant la protéine DBP, dues à sa toxicité, nous avons aussi placé le gène IVa2 sous le contrôle d'un promoteur viral inductible par la DM, le "Long Terminal Repeat" (LTR) du Virus de la Tumeur Mammaire de la Souris (MMTV) afin de contrôler le niveau d'expression de la protéine IVa2 dans les lignées.

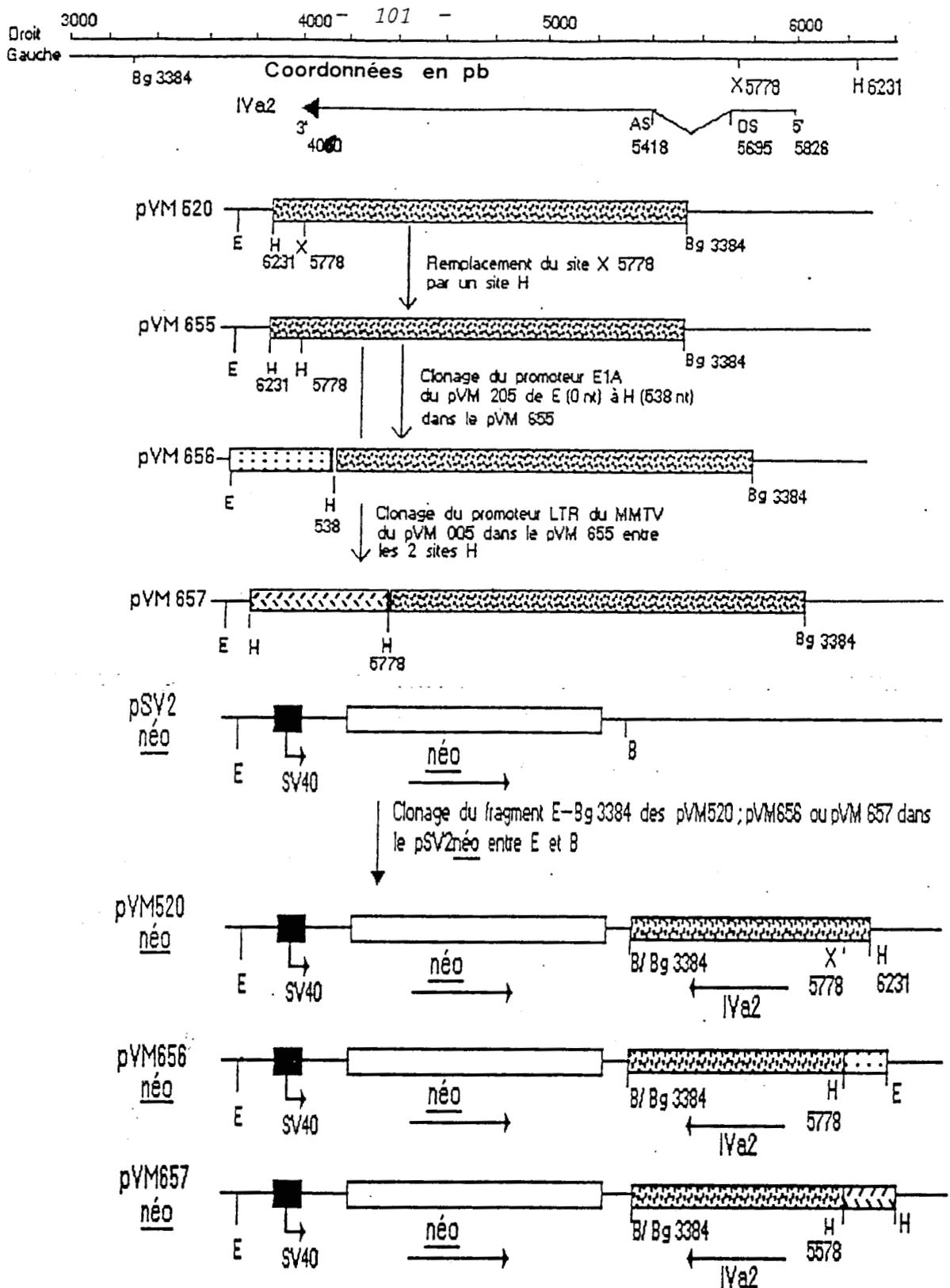


FIGURE R18 : CONSTRUCTION DES pYM520_{neo}, pYM656_{neo} ET pYM657_{neo}

- : séquence de pBR322
- ▨ : séquence d'Ad5
- ⋯ : promoteur E1A d'Ad2
- ▨▨▨ : LTR du MMTV
- : gène neo
- : promoteur précoce de SV40
- B : Bam HI
- Bg : Bgl II
- H : Hind III
- E : Eco RI
- X : Xho I

Dans le pYM520_{neo}, le gène IVa2 est sous le contrôle de son propre promoteur ; dans le pYM656_{neo}, il est sous le contrôle du promoteur de E1A et dans le pYM657_{neo} sous celui du LTR du MMTV.

Le site XhoI (nt 5778) du pVM520 a tout d'abord été remplacé par un site HindIII, grâce à l'addition d'un oligonucléotide de synthèse, pour donner le pVM655 (Fig. R18). Puis le promoteur E1A d'Ad2 compris entre les sites EcoRI et HindIII (nt 538) du pVM205 a été cloné entre les sites EcoRI et HindIII (nt 5778) du pVM655 pour donner le pVM656.

Le promoteur LTR du MMTV a été excisé du pVM005 par HindIII et replacé entre les sites HindIII (5778 nt et 6231 nt) du pVM655 pour donner le pVM657. Les fragments EcoRI-BglII (nt 3384) des pVM656 et pVM657 ont ensuite été réintroduits dans le pSV2néo entre EcoRI et BamHI pour donner respectivement les pVM656néo et 657néo. Les plasmides ont ensuite été transfectés dans les cellules HeLa, les clones de cellules résistants au G418 ont été sélectionnés et établis en lignées H-656 et H-657. Les lignées n'exprimant que le gène néo sous le contrôle du promoteur de SV40 ont été établies suivant le même protocole et appelées H-pSV2.

1-2 Caractérisation des lignées

1-2-1 Présence du gène IVa2

17 lignées cellulaires ayant été établies, la présence de l'ADN viral a été recherchée par la méthode d'hybridation ADN-ADN (Southern Blot). Les ADN cellulaires des 17 lignées ont été purifiés par centrifugation en CsCl et digérés par HindIII. Les fragments ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 0,6% et transférés sur des membranes de nylon.

Une sonde marquée radioactivement à l' (α -³²P)-dCTP constituée d'un mélange des plasmides pVM656néo et 657néo coupés par HindIII a ensuite été préparée et mise au contact des membranes de nylon. Après lavage et autoradiographie, la présence des gènes IVa2 et néo a pu être mise en évidence dans 11 des 17 lignées testées (Fig. R19). Les plasmides pVM656néo et 657néo digérés par HindIII dans les pistes témoins, présentaient respectivement 2 et 3 fragments de 4028 et 3173 paires de bases (pb) pour le premier et 4028, 2635 et 1450 pour le second. Les gènes IVa2 et néo contigus et identiques pour les deux plasmides donnaient le fragment de 4028 pb, celui de 1450 pb représentait le promoteur LTR présent dans le plasmide pVM657néo uniquement.

Dans plusieurs ADN cellulaires testés, les gènes IVa2 et néo ont été retrouvés intacts, comigrant avec la bande de 4028 pb des témoins. Des remaniements ont cependant parfois été observés : dans la lignée H-657-3 par exemple, le promoteur LTR a été observé (1450 pb) mais le bloc formé des gènes IVa2 et néo n'a pas été retrouvé intact. Des nombres de copies très variables des gènes intégrés ont également été retrouvés d'une lignée à l'autre donnant des bandes radioactives plus ou moins intenses. La lignée H-657-3 par exemple semblait avoir intégré un nombre de copies des gènes IVa2 et néo beaucoup plus élevé que la lignée H-657-2 (Fig. R19).

Des bandes de tailles variables ont été observées après Southern Blot. Elles pouvaient être expliquées par l'intégration des gènes IVa2 et néo en divers endroits du génome cellulaire à proximité de sites de restriction Hind III. Les tailles des fragments obtenus après digestion par Hind III dépendaient alors de la position des gènes IVa2 et néo dans le génome cellulaire et pouvaient différer des 4028 pb observées pour les gènes IVa2 plus néo contigus dans les plasmides transfectés.

1-2-2 Recherche de la protéine IVa2

L'expression de la protéine IVa2 a été testée dans les lignées positives en Southern Blot, grâce au sérum anti-IVa2 obtenu précédemment.

En immunofluorescence indirecte, aucune réaction spécifique n'a pu être détectée dans les lignées. Le bruit de fond observé avec le sérum total a été éliminé par l'utilisation de la fraction IgG purifiée contre la protéine IVa2 (54 kDa) pour donner une immunofluorescence négative identique à celle observée dans les cellules HeLa n'ayant pas intégré le gène IVa2.

En immunoblot, le sérum total n'a pas révélé non plus la protéine IVa2. Par contre, la protéine cellulaire de 43 kDa était toujours présente dans la fraction "membrane plasmique" principalement.

La protéine de 54 kDa n'ayant pas été détectée, nous avons alors étudié l'expression de l'ARNm IVa2 dans les lignées établies.

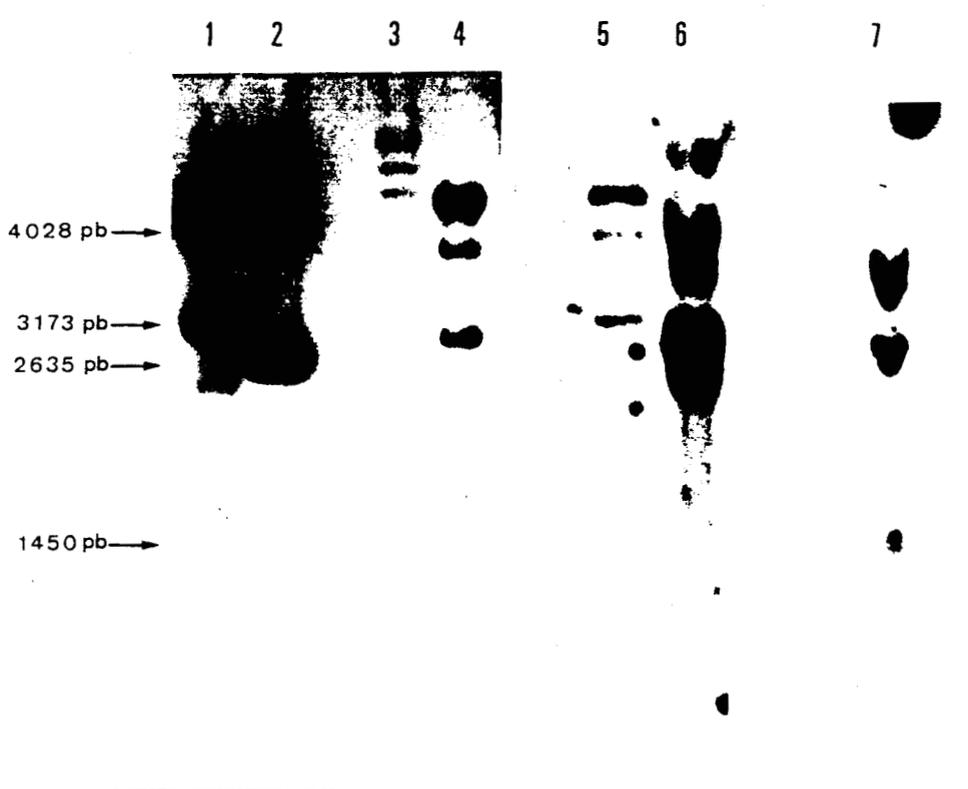


FIGURE R19 : ANALYSE DES LIGNEES EN SOUTHERN BLOT.

Hybridation des ADN cellulaires digérés par Hind III (20 μ g par piste) avec une sonde marquée radioactivement obtenue à partir de 2 μ g de pVM657 néo et pVM656 néo digérés par Hind III.

- | | |
|---|--------------------|
| 1 : pVM656 <u>néo</u> digéré par <u>Hind</u> III (2 ng) | |
| 2 : pVM657 <u>néo</u> digéré par <u>Hind</u> III (2 ng) | |
| 3 : ADN de H-520 | 6 : ADN de H-657-2 |
| 4 : ADN de H-656-1 | 7 : ADN de H-657-3 |
| 5 : ADN de H-657-1 | |

La bande de 4028 pb représente les gènes IVa2 + néo, celle de 1450 pb représente le LTR du MMTV du pVM657 néo.

1-2-3 Expression de l'ARNm IVa2

Le gène IVa2 contient un intron de 277 nt entre les nt 5695 et 5418 (CHOW et al., 1979) présent dans l'ADN génomique cloné dans les plasmides décrits précédemment et utilisés pour l'obtention de lignées cellulaires. Cette stratégie avait déjà été utilisée par BRUNET et BERK (1988) pour l'obtention de lignées cellulaires exprimant les protéines de la région E1A d'Ad2 et l'épissage correct de l'ARNm de E1A avait été obtenu spontanément dans les cellules.

La production de l'ARNm IVa2 a été testée dans les lignées contenant le gène IVa2.

1-2-3-1 Analyse par protection de la digestion aux ribonucléases A et T1

La stratégie précédemment décrite pour la caractérisation de l'ARNm IVa2 des cellules infectées par l'Ad2 de type sauvage a été appliquée aux ARN des lignées cellulaires. L'ARN marqué radioactivement à partir du pVM425 (Fig. R13) a été hybridé aux ARN cellulaires totaux (100 µg par essai).

Après digestion des ARN simples brins (non hybridés) par les ribonucléases A et T1 et migration en gel dénaturant de polyacrylamide-urée, les fragments de sonde protégés étaient observés. Le plasmide pVM425 utilisé permettait de produire une sonde s'hybridant aux ARNm de la région IVa2 entre les nt 5638 et 5778, le site d'initiation étant à 5826 nt, les séquences des ARN en 5' n'étaient pas détectées. La séquence virale totale de la sonde avait une longueur de 140 nt. Si un ARNm IVa2 épissé (à partir du donneur d'épissage au nt 5695) était produit, seuls 83 nt de sonde étaient protégés.

Dans toutes les lignées testées et positives, une bande majeure de 140 nt a été observée, correspondant à un ARNm non mûré au site donneur à 5695 nt. La bande de 83 nt a également été retrouvée mais toujours en quantité très minoritaire (Fig. R20, 3 à 5). La présence de bandes de migration proche celle de 140 nt a été attribuée à une digestion partielle de la sonde par les ribonucléases A et T1. La différence de migration de ces formes était accentuée par l'urée contenue dans le gel (SHEN-ONG et al., 1987).

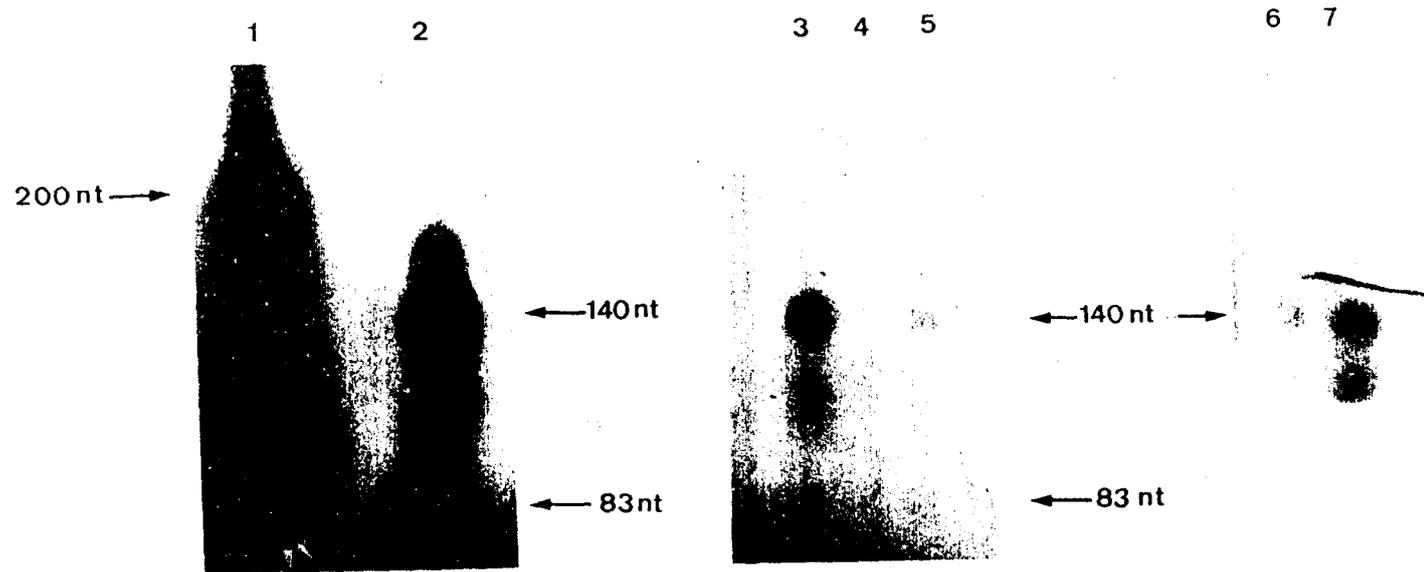


FIGURE R20 : ANALYSE DES ARNm IVa2 DANS LES LIGNÉES PAR PROTECTION DE LA DIGESTION AUX RIBONUCLEASES A ET T1.

100 µg d'ARN totaux de lignées contenant le gène IVa2 ont été hybridés à la sonde d'ARN radioactif obtenue grâce au pVM425. Après digestion aux ribonucléases A et T1, les fragments de sonde protégés ont été analysés en gel de polyacrylamide 8%-urée 7M. La taille totale de la sonde est de 200 nt, les fragments protégés par un ARN mûré ou non au site donneur à 5695 nt, sont de 83 et 140 nt respectivement.

- | | |
|----------------------------|---|
| 1 : sonde 425 non digérée. | 2 : ARN de cellules HeLa infectées par l'Ad2 (5 µg) |
| 3 : ARN de H-656-1 | 4 : ARN de H-657-1 |
| | 5 : ARN de H-657-1 + DM |
| | 6 : ARN de H-657-2 |
| | 7 : ARN de H-657-2 + DM |

Dans certaines des lignées H-657 testées, l'induction de la production de l'ARNm IVa2 par la DM (10^{-6} M, 6 à 8 h) a été observée. La lignée H-657-1 en particulier a révélé une bande de 140 nt plus importante en présence de l'hormone (Fig. R20, 4 et 5). La lignée H-657-3 qui présentait un remaniement des gènes IVa2 et néo en Southern Blot a révélé une production importante d'ARNm mais non inductible par la DM. Rappelons ici que seule la région du messenger IVa2 entre les nt 5638 et 5778 était détectée par la sonde provenant du pVM425. La bande protégée obtenue avec les ARN cellulaires de la lignée H-657-3 pouvait provenir d'un ARNm IVa2 incomplet.

1-2-3-2 Analyse par la technique de P.C.R.

L'expression incorrecte de l'ARNm IVa2 dans les cellules contenant le gène IVa2 a été confirmée par la méthode de P.C.R. utilisée au préalable dans la détection des ARNm IVa2 des cellules infectées par l'Ad2 type sauvage.

Pour chaque lignée testée, 5 µg d'ARN cellulaires totaux ont été hybridés avec les oligonucléotides-amorces O1 et O2 (Fig. R11). Une copie d'ADN complémentaire a d'abord été obtenue par la transcriptase inverse de M-MLV et 30 cycles d'amplification par la Taq polymérase ont été effectués. Les bandes amplifiées provenant des ARNm-IVa2 ont été visualisées en gel d'agarose à 2%. Les produits d'amplification observés étaient très hétérogènes comparativement à ceux obtenus avec les ARNm de cellules infectées. Alors que dans ce dernier cas, la seule bande observée était de 297 pb, correspondant à l'ARNm épissé du IVa2, dans les lignées cellulaires plusieurs produits d'amplification ont été retrouvés. La bande majoritairement retrouvée, cependant était celle de 574 pb correspondant à la forme non maturée de l'ARNm IVa2 ; elle a été révélée après Southern Blot des produits d'amplification P.C.R. grâce à une sonde d'ADN viral marquée à l' $(\alpha^{32}\text{-P})$ -dCTP (Fig. R20 Bis).

Ces résultats confirment ceux obtenus par la protection de la digestion aux ribonucléases A et T1 et permettent de conclure à une production très faible de l'ARNm IVa2 dans les lignées cellulaires contenant le gène. De plus, cet ARNm semble ne pas être épissé de la même manière que dans les cellules infectées, entre 5695 et 5418 nt. Ceci peut provenir d'un défaut d'expression d'évènements viraux et/ou cellulaires régulant la maturation de l'ARN précurseur du IVa2.

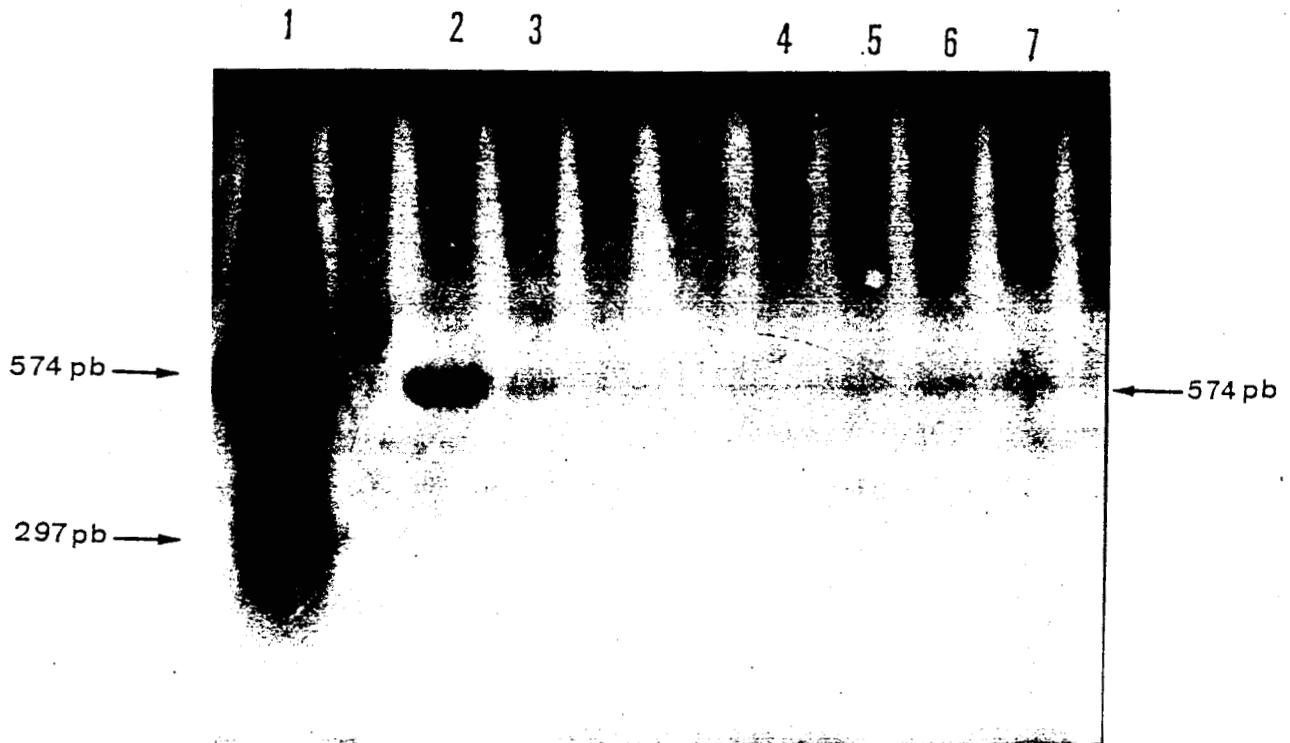


FIGURE R20 BIS : ANALYSE DES ARNm IVa2 DANS LES LIGNEES PAR LA
TECHNIQUE DE P.C.R.

Les ARN (5 μ g) de lignées HeLa contenant le gène IVa2 ont été rétrotranscrits. L'ADNc a été amplifié par la Taq polymérase après hybridation des amorces O1 et O2. Les bandes obtenues ont été visualisées en Southern Blot après hybridation à une sonde radioactive d'ADN viral.

- 1 : ARN de cellules HeLa infectées 12 h
- 2 : ARN de H-656-1
- 3 : ARN de H-520
- 4 : ARN de H-657-1
- 5 : ARN de H-657-1 + DM
- 6 : ARN de H-657-2
- 7 : ARN de H-657-2 + DM

La production majeure d'ARN IVa2 non mûr dans les lignées cellulaires explique que la protéine IVa2 n'ait pas été détectée.

2- Essais d'obtention de virus mutants

2-1 Construction de plasmides (Fig. R21)

Une délétion entre les 2 sites de restriction ApaI à 4609 pb et 4915 pb a été effectuée dans le pVM217 contenant la partie gauche du génome d'Ad5 entre 0 et 6231 pb. Le pVM644 ainsi obtenu était délété de 306 pb dans le gène IVa2 ôtant 102 acides aminés de la protéine entre les résidus 173 et 275. Cette délétion du quart de la protéine, dans la moitié N-terminale ne changeait pas la phase de lecture de la partie C-terminale et pouvait coder pour un produit tronqué de la protéine IVa2 dans les virus obtenus.

Le fragment EcoRI XhoI 5778 pb du pVM644 a ensuite été cloné entre EcoRI et XhoI 5778 pb du pVM501 contenant les 60% gauches du génome jusqu'au site BamHI 21606 pb. Dans le pVM645 ainsi construit toute la partie gauche du génome d'Ad5 était ainsi reconstituée avec une délétion de 306 pb dans le gène IVa2.

2-2 Transfections

Après avoir isolé et introduit les mutations désirées dans les fragments d'ADN viral étudiés, il fallait reconstruire le chromosome viral entier afin d'obtenir un virus infectieux dans la lignée cellulaire adéquate.

Deux méthodes ont été décrites dans la littérature ; la première consiste à isoler le fragment d'ADN viral étudié, à le modifier puis à le ligaturer au reste du génome (JONES and SHENK, 1979). La deuxième utilise des fragments d'ADN viral se chevauchant largement afin d'obtenir un chromosome viral entier par recombinaison à l'intérieur de la cellule (CHINNADURAI et al., 1979). Pour les deux méthodes, l'étape suivante est la précipitation du matériel génétique au phosphate de calcium et la mise au contact des cellules. Après une période d'incubation de 8 à 10 jours à 37°C, les virus produits apparaissent et forment des plages de lyse.

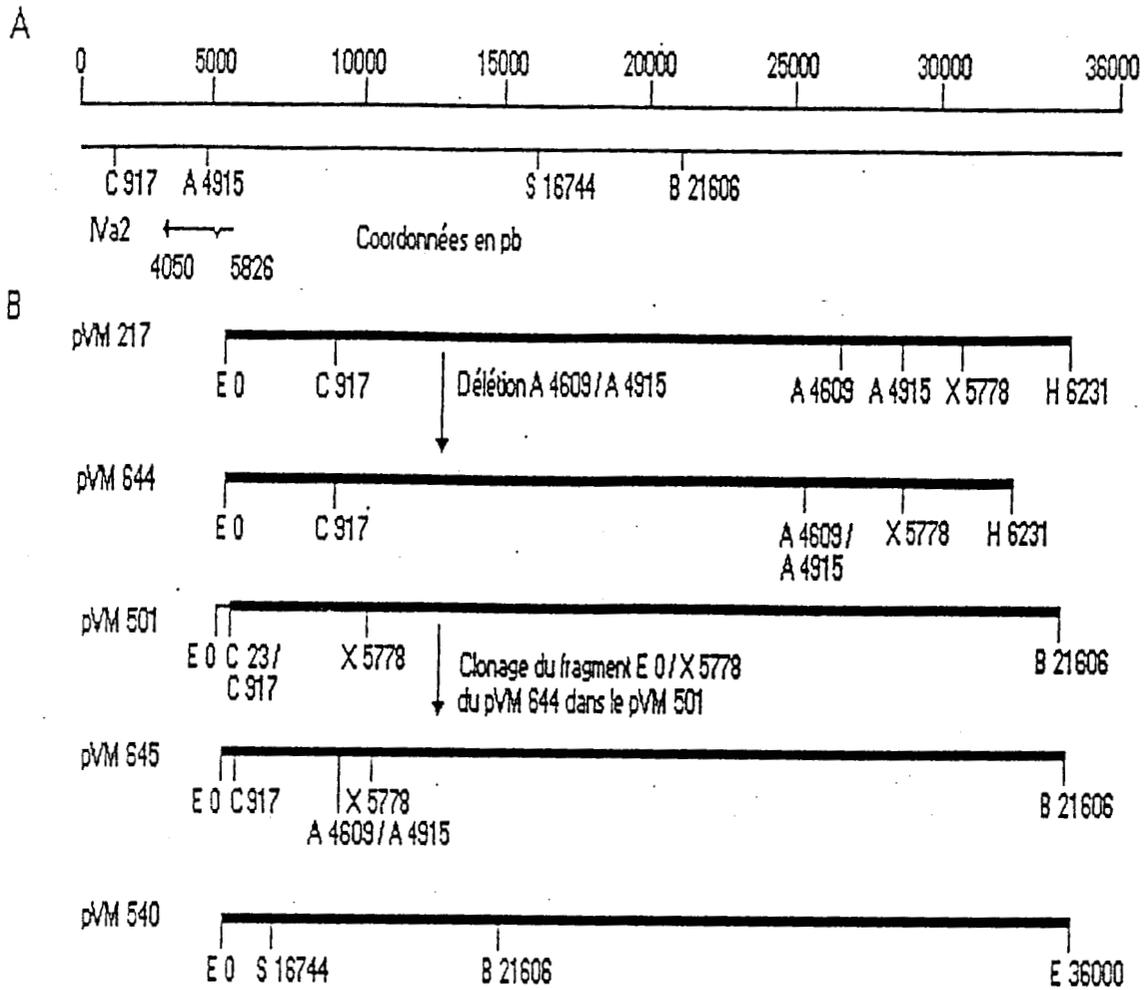


FIGURE R 21 : OBTENTION DE VIRUS MUTANTS : LES PLASMIDES UTILISES

— : Séquence de pBR 322 A : Apa I B : Bam HI C : Cla I
 — : Séquence d'Ad5 H : Hind III S : Sal I

A : Représentation du génome de l'Ad5

B : Schéma de construction des plasmides

Les deux méthodes ont été testées au laboratoire. Les extrémités de l'ADN viral liées à la protéine terminale (ADN Ad5-PT) ont également été utilisées ; une meilleure production virale après transfection du matériel génétique lié à cette protéine a en effet été montrée (D'HALLUIN et al., 1982).

Pour cela, l'ADN viral d'Ad5 a été préparé par disruption des capsides au chlorure de guanidine 4M et centrifugation à l'équilibre en CsCl. L'ADN viral a ensuite été récolté et digéré par les enzymes ClaI BamHI et SalI. Les fragments droits (BamHI 21606 pb à 36000 pb) et gauche (0 pb à ClaI 917 pb) liés à la protéine terminale ont été fixés spécifiquement sur colonne de BND-cellulose préalablement équilibrée en chlorure de lithium 0,3 M. Cette résine de haute affinité pour les protéines (FROST and WILLIAMS, 1978) retient spécifiquement les fragments terminaux. Après élimination de l'ADN double ou simple brin sans protéine, par le SDS (0,1%) et la caféine (2%), les complexes ADN double brin-PT ont été élués par l'urée 8M-SDS 1%. Ces agents dénaturants ont été retirés par dialyse contre un tampon pH 7,4 et l'ADN-PT a été précipité à l'éthanol. La pureté des fragments liés à la protéine terminale a été vérifiée sur gel d'agarose-0,5% sarcosyl. Le fragment ClaI 917 pb-BamHI 21606 pb du pVM645 a ensuite été ligaturé aux deux fragments précédemment purifiés : l'ADN viral entier d'Ad5 lié à la protéine terminale aux deux extrémités et délété dans le gène IVa2 a ainsi été obtenu.

D'autres essais ont été réalisés avec l'ADN viral non-lié à la protéine terminale : en recombinaison, le pVM645 digéré par EcoRI (0 pb) et BamHI (21606 pb) a été utilisé avec le pVM540 contenant toute la partie droite du génome de l'Ad5 (de SalI 16744 pb à 36000 pb) (Fig. R21). Le génome complet a également été reconstitué avec l'ADN nu : le pVM645 digéré par EcoRI (0 pb) et BamHI (21606 pb) a été ligaturé avec le fragment droit de l'ADN d'Ad5 entre 21606 pb et 36000 pb.

Quelqu'ait été la préparation des fragments d'ADN viraux, ils ont toujours été transfectés à raison de 20 µg totaux sur cellules HeLa, H-520, H-656 et H-657 (précédemment décrites) en boîte de Pétri (60 mm) une couche de gélose molle a été placée sur les boîtes, soit 5 h après la transfection dans la boîte mère, soit après récupération de la suspension de cellules 16 h après transfection et passage sur une nouvelle boîte de la même lignée cellulaire.

Les quelques plages observées au bout de 8 à 10 jours d'incubation à 37°C ont été reprises et repassées successivement sur les même lignées cellulaires jusqu'à obtenir une population virale analysable en méthode rapide d'extraction d'ADN (HIRT, 1967 ; WADELL and DE JONG, 1983), les profils de restriction par HindIII des ADN des virus ainsi obtenus et de l'Ad5 de type sauvage se sont avérés identiques.

2-3 Conclusions

Aucun virus mutant délété dans le gène IVa2 n'a pu être obtenu. Or, l'ADN viral intact d'Ad5 transfecté en parallèle dans les mêmes lignées cellulaires a toujours permis la production de plages de lyse montrant la capacité de ces cellules à produire du virus à partir du génome transfecté. Les quelques plages de lyse observées lors de ces transfections d'ADN délété du fragment ApaI (12,8 à 13,6 ug.) se sont révélées être de l'Ad5 de type sauvage. Une contamination de la préparation d'ADN recombinant par de l'ADN viral entier est improbable puisque la pureté des fragments a été testée en gel d'agarose avant ligature et transfection. Cependant, la présence de quelques molécules d'ADN viral entier ne peut être exclue.

L'incapacité des lignées cellulaires ayant intégré le gène IVa2 à compléter le mutant de délétion peut être due à la non-maturation de l'ARN IVa2 que nous avons observée dans les lignées où il s'exprime. La protéine IVa2 n'étant alors pas (ou très peu) produite, les lignées peuvent ne pas compléter le défaut du mutant que nous voulions obtenir.

Ces résultats indiquent cependant que le produit du gène IVa2 est nécessaire au développement du virus puisqu'une délétion dans cette partie du génome résulte en un ADN viral non infectieux.

IV- Rôle du produit du gène IVa2 dans la transformation

La région E1, sous-divisée en E1A et E1B, est responsable de la transformation de cellules non permissives par les adénovirus (Revue : BRANTON et al., 1985 ; GRAND, 1987). L'oncogène E1A immortalise, la région E1B apporte la transformation complète et la tumorigénicité aux cellules. A proximité de la zone transformante E1, la région IVa2 est transcrite sur le brin opposé de l'ADN viral à partir d'un promoteur dirigeant la transcription de ce gène seul.

La séquence primaire de la protéine IVa2 d'Ad5 (VAN BEVEREN et al., 1981) a été analysée par ordinateur au laboratoire (programme PC Gene) et a révélé la présence d'un site potentiel de liaison aux NTP (Fig. R22). Ce site, très conservé dans une centaine de protéines virales (GORBALENYA and KOONIN, 1989) est également très homologue à celui de la protéine p21 de l'oncogène H-ras dont le rôle dans la transformation a été démontré (Revue : BARBACID, 1987).

La séquence primaire de la protéine IVa2 d'Ad5 a ensuite été comparée à celle d'Ad7 (ENGLER et al., 1982). Un remarquable degré de conservation a été révélé entre les deux protéines avec 81,9% d'acides aminés identiques faisant de la protéine IVa2, le produit le mieux conservé chez l'adénovirus ; la région E1A, par exemple, n'est homologue qu'à 50% entre les divers sérotypes.

La fonction potentielle de liaison au GTP de la protéine IVa2 pouvait jouer un rôle dans la transformation.

1- Essais de transformation de cellules primaires de rein de rat (BRK)

1-1 Régions de génome employées (Fig. R23)

Divers plasmides contenant des séquences d'Ad3 dont le gène IVa2 ont été transfectés dans les cellules primaires BRK (Baby Rat Kidney).

Ces plasmides dérivent tous du pVM303 (Fig. R23) contenant le fragment d'Ad3 de EcoR I 0 u.g. à Sal I 17,5 u.g. Celui-ci exprimait les régions E1A (de 0 à BglII 4,5 u.g.) E1B (de BglII 4,5 u.g. à BglII 11,12 u.g.) et IVa2 (de BglII 11,12 u.g. à XhoI 15,8 u.g.).

Séquence primaire de la protéine IVa2 d'Ad 2

aa 100

SMPTADGLKPLKNFASLQELLSLGGERLLADLVRENMRVRDMLNEVAPLLR

DDGSCSSLNYQLHPVIGVIY GPTGCGKS QLLRNLLSSQLISPTPETVFFI

APQVDMIPPSELKAWEMQICEGNYAPGPDGTIIPQSGTLRPRFVKMAYD

aa 250

: site potentiel de liaison aux NTP, motif A

FIGURE R22 : SITE POTENTIEL DE LIAISON AUX NTP DANS LA PROTEINE IVa2 .

Le motif A, très conservé parmi les protéines liant les NTP a été retrouvé dans la protéine IVa2 d'Ad2 (GORBALENYA and KOONIN, 1989). Ce motif existe également dans la protéine IVa2 d'Ad7.

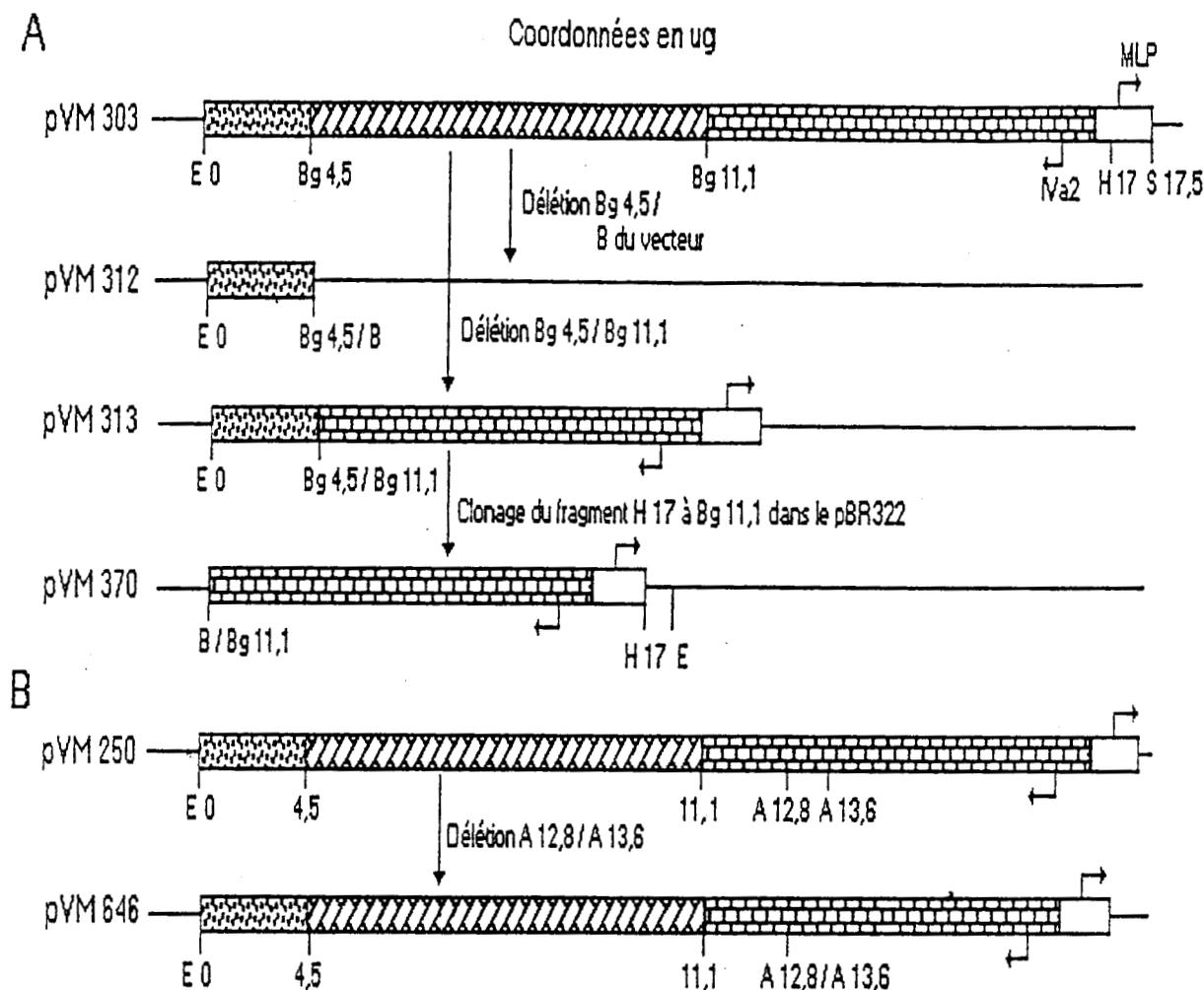


FIGURE R 23 : ESSAIS DE TRANSFORMATION DE CELLULES BRK LES PLASMIDES EMPLOYES .

A : plasmides contenant des séquences d'Ad3

B : plasmides contenant des séquences d'Ad2

— : séquence de pBR 322

▨ : région E1A

▩ : région E1B

▧ : région IVa2

A : Apa I

B : Bam HI

Bg : Bgl II

C : Cla I

E : Eco RI

H : Hind III

S : Sal I

X : Xho I

Le promoteur MLP était également contenu dans ce vecteur (à proximité de XhoI 15,8 u.g.). Le pVM312 construit par délétion BglII 4,5 u.g. BamHI du pVM303 n'exprimait plus que la région E1A de l'Ad3. Le pVM303 a également été délété entre BglII 4,5 u.g. et BglII 11,12 u.g. pour donner le pVM313 contenant les zones E1A et IVa2 (plus MLP), la zone E1B étant totalement absente. Le gène IVa2 d'Ad3 a été isolé dans le pVM370 par clonage du fragment HindIII 17 u.g. BglII 11,12 u.g. du pVM313 dans le pBR322 entre HindIII (29nt) et BamHI (375nt).

Pour l'Ad2, le rôle du gène IVa2 a également été étudié grâce aux plasmides pVM250 exprimant E1A-E1B-IVa2 (plus MLP) et pVM646 délété dans le gène IVa2 du pVM250 entre ApaI 12,8 u.g. et ApaI 13,6 u.g. ont également été utilisés (Fig. R23). Dans des essais de cotransfection le plasmide pVM592 exprimant la protéine 19 kDa de E1B d'Ad5 a été utilisé. L'effet de l'oncogène v-ras activé a également été étudié grâce au plasmide S25 (don du Dr J.P. KERKAERT, Lille).

1-2 Numération des foyers de transformation obtenus

Après trypsinisation des tissus de rein de rats nouveaux-nés (à 10 jours) les cellules primaires BRK ont été mises en culture en mono-couche en flacons fermés. Arrivées à 70% de confluence, les cellules ont été transfectées par 20 µg de chaque plasmide précipités au phosphate de calcium et le milieu a été renouvelé au bout de 16 h.

Les premiers foyers, apparus environ 12 jours après la transfection ont été dénombrés dans les diverses expériences puis recomptés 12 jours plus tard. Les résultats d'une dizaine de transfection ont été comparés et sont représentés dans le Tableau RI.

Pour l'Ad3, les résultats montrent une augmentation du nombre de foyers par un facteur 2 à 3 quand le gène IVa2 est présent avec la région E1A soit sur le même plasmide (pVM313) soit sur une autre vecteur (pVM312 + pVM370). Quand les régions E1A d'Ad3 et E1B d'Ad5 (pVM312 + pVM592) sont cotransfectées avec le gène IVa2 (pVM313 + pVM592 ou pVM312 + pVM370 + pVM592) une augmentation d'un facteur 3 à 4 est observée. Avec l'oncogène v-ras activé apportant très rapidement un grand nombre de foyers, le même phénomène est reproduit (pVM312 + S25 comparé à pVM313 + S25 ou pVM312 + pVM370 + S25).

Jours après transfection	12	25
Plasmides transfectés		
Ad3		
312	0	1
312 + 592	2	5
312 + S25	2 - 3	25
313	2	5
313 + 592	2	12 - 27
313 + S25	7	100
312 + 370	3	6
312 + 370 + 592	2	10 - 20
312 + 370 + S25	5	50 - 80
303	1	3 - 18
Ad2		
250	22 - 10	50 - 24
646	9 - 6	46 - 11

Tableau RI : NUMERATION DES FOYERS DE TRANSFORMATION DE CELLULES BRK

Nombre de foyers observés après transfection de plasmides dérivés d'Ad2 et Ad3 sur cellules primaires de rein de rat (BRK)

Pour l'Ad2, l'efficacité de transformation étant plus importante que pour le sérotype 3, le grand nombre de foyers obtenu peut masquer l'effet faible du gène IVa2. Cependant, le nombre de foyers obtenu avec les plasmides pVM250 et 646 a montré une influence négative de la délétion ApaI (12,8-13,6 ug.) dans le gène IVa2 sur l'efficacité de transformation. Ce résultat reste à confirmer.

2- Etablissement de foyers de transformation de BRK en lignées continues

Après avoir été dénombrés, certains des foyers de cellules BRK ont été repris et établis en lignées continues par repiquages successifs sur boîtes de Pétri de diamètre de plus en plus élevé. Les cellules sont immortalisées puisqu'elles résistent à plusieurs divisions (le nombre de passages étant supérieur à 50).

Les quelques foyers obtenus avec la région E1A seule d'Ad3 (pVM312) n'ont pas pu être établis en lignées, seuls quelques foyers provenant de co-transfections avec pVM312 et S25 ont pu être cultivés (lignées B-312 + S25). Les foyers obtenus avec les régions E1A-IVa2 d'Ad3 (pVM313), par contre, ont été facilement établis en huit lignées (B-313 de 1 à 8). Les foyers observés avec E1A, E1B et IVa2 entier (pVM250) ou délété (pVM646) ont donné 5 lignées B-250 1 et 2 et B-646 1, 2 et 3.

2-1 Analyse de leur contenu en ARNm IVa2

La méthode de P.C.R. décrite pour la détection des ARNm IVa2 dans les lignées HeLa IVa2 précédemment établies a été appliquée aux lignées de BRK-IVa2. Les oligonucléotides O1 et O2, situés de part et d'autre de l'intron de l'ARNm IVa2 et choisis dans une région très conservée entre Ad2 et Ad3 de façon à hybrider avec les ARNm des 2 sérotypes, ont été mis en présence des ARNm cytoplasmiques totaux (2 µg par essai) des différentes lignées cellulaires et les produits d'amplification obtenus après une première copie des ARNm en ADNc ont été analysés en gel d'agarose à 2% . Les analyses ont révélé dans toutes les lignées BRK ayant intégré le gène IVa2 dans son intégrité ou délété de la zone ApaI 12,8-13,6 u.g., en plus des gènes

E1A et/ou E1B, une seule mais intense bande de 574 pb correspondant à l'ARNm IVa2 entier compris entre les deux amorces utilisées (Fig. R24). Les lignées B-313, B-250 et B-646 testées présentent cette bande de 574 pb en quantité plus ou moins élevée. La délétion Apal dans la zone avale de l'ARNm par rapport aux amorces 01 et 02 ne semble pas influencer l'expression et/ou la stabilité de l'ARNm détecté.

Ces résultats montrent donc, dans les lignées BRK ayant intégré le gène IVa2 d'Ad2 ou d'Ad3 avec E1A (B-313) et parfois E1B (B-250 et B-646) une expression élevée de l'ARNm IVa2 sous sa forme non maturée. La transcription de cette forme d'ARNm-IVa2 est aussi élevée que celle de l'ARNm IVa2 mature observé dans les cellules infectées par l'Ad2. Dans les cellules HeLa-IVa2, la transcription de l'ARNm IVa2 mûré ou non n'a pas été aussi clairement observée (Fig. R24). Deux systèmes cellulaires ont été analysés et des facteurs spécifiques de l'un ou de l'autre intervenant dans la transcription et/ou les modifications post-transcriptionnelles peuvent expliquer ces différences entre HeLa et BRK. Il est à noter également que dans le cas des cellules BRK, la région E1A est présente dans les lignées établies et peut influencer l'expression de l'ARNm IVa2.

2-2 Analyse de leur contenu en protéines

L'expression du produit du gène IVa2 a ensuite été analysée dans ces différentes lignées.

2-2-1 Analyse en Western Blot

Les lignées B-312+S25 et B-313 ont été soumises au fractionnement cellulaire dans le tampon RSB et analysées en Western Blot grâce au sérum anti-IVa2 précédemment décrit. Aucune des lignées n'a révélé la présence de la protéine IVa2 de 54 kDa spécifique du virus (Fig. R25).

La protéine de 43 kDa, par contre, a été retrouvée en très grande quantité dans certaines lignées cellulaires (B-313 1 en particulier) (Fig. R25). Sa présence a également été montrée dans les B-250 et B-646 mais dans aucune des B-312 + S25 testées. Cette analyse a montré une sur-expression de la protéine de 43 kDa dans les lignées cellulaires présentant un ARNm IVa2 non mûré, très facilement

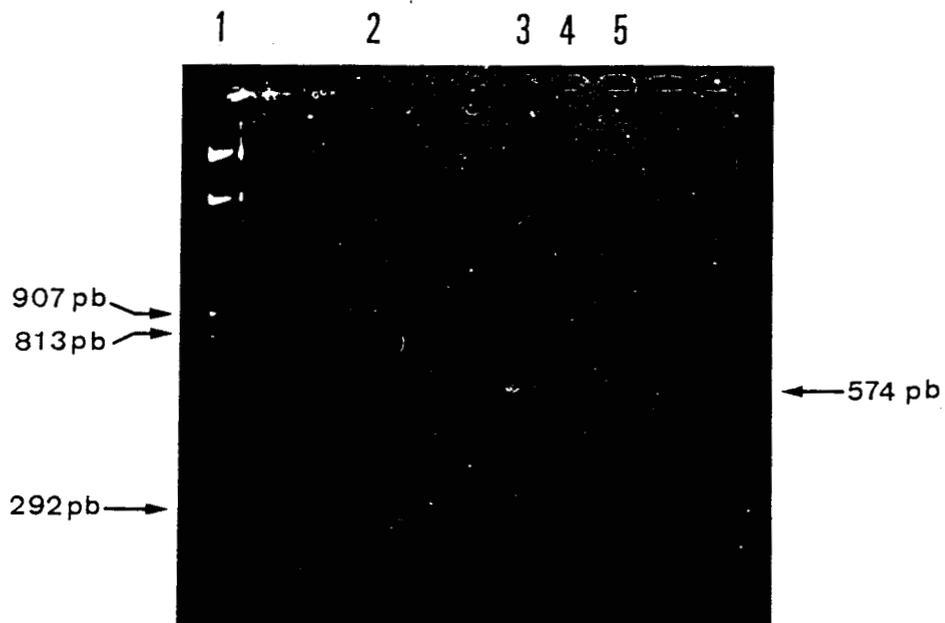


FIGURE R24 : EXPRESSION DE L'ARNm IVa2 DANS LES LIGNEES DE BRK
ETABLIES

Détection des produits d'amplification par P.C.R. en
gel d'agarose à 2%.

- 1 : pVM520 digéré par Hind III, Pvu II et Xho I
- 2 : ARN de lignée B-312 + S25 -1
- 3 : ARN de lignée B-313-1
- 4 : ARN de lignée B-250-1
- 5 : ARN de lignée B-646-1

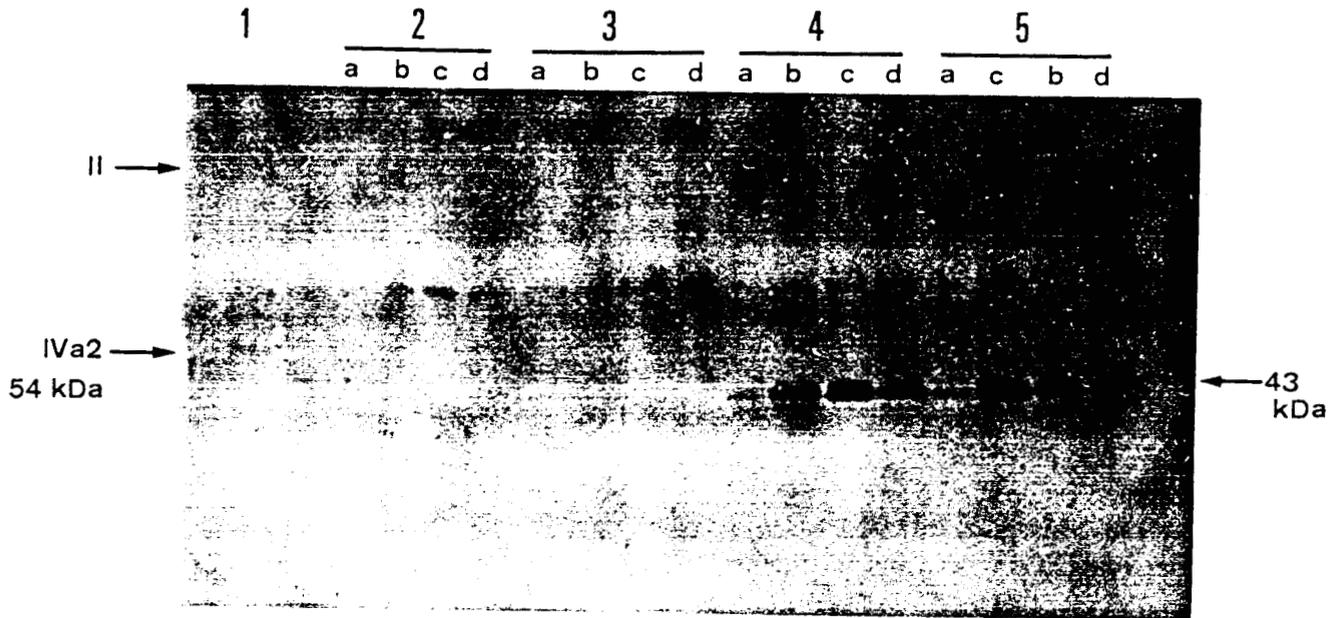


FIGURE R25 : ANALYSE DES PROTEINES DES LIGNEES DE BRK

Les cellules BRK de différentes lignées établies ont été soumises au fractionnement dans le tampon RSB. Les 4 fractions obtenues ont été analysées en Western-Blot avec le sérum anti-IVa2 (1/1000).

1 : particules d'Ad5 purifiées

2 : lignée B-312 + S25-1

4 : lignée B-250-1

3 : lignée B-312 + S25-2

5 : lignée B-313-1

a : fraction "cytosol"

b : fraction "noyau-sol"

c : fraction "membrane
plasmique"

d : fraction "matrice
nucléaire"

amplifiable par P.C.R. Aucune relation directe entre les deux observations n'a cependant été établie.

2-2-2 Localisation de la 43 kDa

Grâce à la fraction de sérum purifiée contre la 43 kDa des "membranes plasmiques" de lignées de BRK positives en Western Blot, l'immunofluorescence indirecte a pu être effectuée sur les mêmes lignées et a révélé la protéine de 43 kDa très concentrée dans une structure ressemblant aux lysosomes cellulaires (Fig. R9, A)

V. Essais de liaison in vitro à l' $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{-GTP}$ (Fig. R26)

Les résultats de transformation ayant été encourageants et la présence d'un site potentiel de liaison aux NTP, dans la protéine IVa2, ayant été détecté (GORBALENYA and KOONIN, 1989), nous avons étudié la liaison in vitro de la protéine IVa2 à l' $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{-GTP}$.

Les protéines de particules d'Ad5 purifiées, de cellules HeLa infectées 24h par l'Ad2 type sauvage et de cellules BRK transformées par E1A et IVa2 d'Ad3 (voir γ IV) ont été séparées en gel de polyacrylamide-SDS à 15% puis transférées sur nitrocellulose. Après renaturation dans un tampon à pH 7,5 contenant du MgCl_2 , les membranes ont été incubées avec 40 μCi d' $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{-GTP}$, afin d'observer la liaison in vitro des protéines fixées sur la membrane au GTP radioactif (LAPETINA and REEP, 1987).

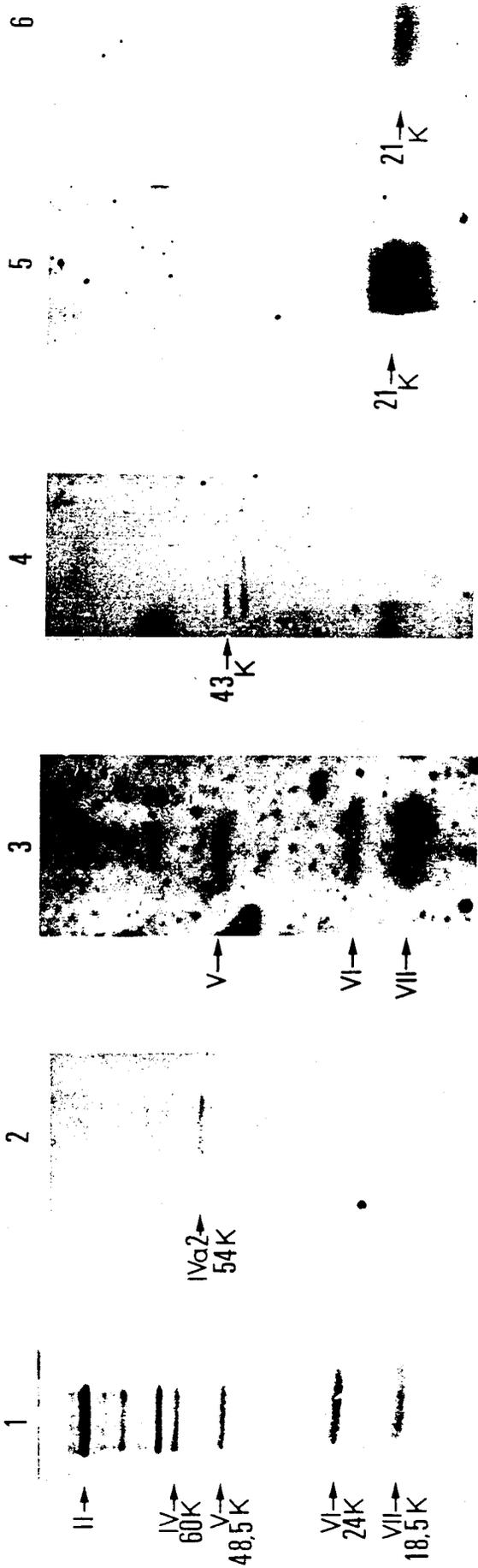
L'électrophorèse des protéines virales marquées à la ^{14}C -Val ainsi que des Western Blot anti-IVa2 (54 kDa) et anti-43 kDa ont été effectués en parallèle.

Les résultats (Fig. R26) ont montré une liaison de l' $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{-GTP}$ aux protéines V, VI et VII du virus purifié (Fig. R26, 3). Ces protéines faisant partie du nucleoïde viral, elles ont certainement une affinité pour les nucléotides.

Aucune liaison à la protéine IVa2 de 54 kDa du virus purifié n'a été observée (Fig. R26, comparer 2 et 3). La liaison n'a pas non plus été détectée dans les extraits de cellules HeLa infectées par l'Ad2 type sauvage (Fig. R26, 6) ou de cellules BRK transformées par E1A et IVa2 d'Ad3 (Fig. R26, 5).

Aucune liaison à la protéine de 43 kDa enrichie dans les BRK transformées, n'a été détectée par cette méthode (Fig R26 comparer 4 avec 5 et 6).

Par contre une liaison importante a pu être montrée entre l' $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{-GTP}$ et une protéine de 21 kDa environ, retrouvée dans les extraits de cellules HeLa infectées et BRK transformées (Fig. R26, 5 et 6).



K = kDa

FIGURE R26 : RESULTATS DE LIAISON A L'(α - 32 P)-GTP.

Les protéines de cellules BRK (lignée 313-1) ou HeLa infectées ont été séparées électrophorétiquement et transférées. Les membranes ont ensuite été incubées avec du GTP radioactif et mises en autoradiographie afin de visualiser les liaisons in vitro GTP-protéine.

- 1 : particules virales purifiées marquées à la 14 C-Va1 (témoin de migration).
- 2 : Western Blot anti IVa2 (54 kDa) sur protéines de cellules HeLa infectées 24 h par l'Ad2.
- 3 : liaison du GTP radioactif aux protéines de particules purifiées d'Ad5.
- 4 : Western Blot anti 43 kDa sur protéines de cellules BRK 313-1.
- 5 : liaison du GTP radioactif aux protéines de cellules BRK 313-1.
- 6 : liaison du GTP radioactif aux protéines de cellules HeLa infectées 24 h par l'Ad2.

DISCUSSION

La protéine IVa2 de Mr en gel de polyacrylamide-SDS de 54 à 56 kDa, est présente en un très petit nombre de copies dans la particule virale : quand les protéines virales sont marquées radioactivement, la protéine IVa2 ne représente que 0,1% de la radioactivité totale (ANDERSON et al., 1973). Cependant, elle est retrouvée dans les capsides matures (EVERITT et al., 1973), dernière étape d'un schéma d'assemblage établi par D'HALLUIN (1980) et PHILIPSON (1983).

Le promoteur du gène IVa2 est localisé à 5826 pb sur le brin gauche de l'ADN viral et dirige la transcription d'un ARN épissé d'un intron de 277 nt (CHOW et al., 1979). La transcription du gène IVa2 a été appelée intermédiaire car active avant le démarrage de la réplication de l'ADN viral (revue : PHILIPSON, 1979). Cependant, d'autres auteurs ont écrit que le blocage de la réplication de l'ADN viral inhibait l'expression de la forme mature de l'ARNm IVa2 (revue : FLINT, 1986).

I- La protéine IVa2 dans les particules virales et les cellules infectées par l'Ad2 de type sauvage.

PERSSON et al. (1979), ont comparé les profils de digestion protéolytique ménagée de la protéine de 50 kDa présente en grande quantité dans les intermédiaires de maturation du virus (EDVARSON et al., 1976 ; D'HALLUIN et al., 1978b) et de la protéine de Mr supérieure à 50 kDa obtenue après traduction in vitro de l'ARNm hybridant avec le fragment d'ADN viral entre 4112 et 6231 pb. Des profils similaires ayant été observés, les auteurs en ont conclu que la protéine de 50 kDa des intermédiaires de maturation n'était autre que le produit du gène IVa2. Un rôle de protéine d'échafaudage lui a été attribué.

Cependant, les protéines de structure du virus, dans leur majorité, sont codées par le brin droit de l'ADN viral à partir de cinq familles de gènes dirigées par le promoteur MLP à 6039 pb (EVANS et al., 1977 ; ZIFF and EVANS, 1978).

La situation particulière du promoteur IVa2, distinct du promoteur MLP, nous a paru intéressante.

Les protéines IVa2 des Ad5 et Ad7 sont très conservées. Elles possèdent 82% d'acides aminés identiques (ENGLER and VAN BREE, 1982). Récemment, le sérotype murin MAV1 a été séquencé (BALL-OBERHAUSER et al., 1989 ; KRING and SPINDLER, 1990). La protéine IVa2 est très homologue également à celle des sérotypes humains.

Ce haut degré de conservation nous a paru intéressant et nous suggère un rôle biologique important de la protéine IVa2.

La première partie de notre travail a consisté en l'obtention d'un sérum polyclonal dirigé contre la protéine IVa2 d'Ad5.

Grâce à ce sérum, la protéine IVa2, sous forme d'un doublet de Mr 54-56 kDa a pu être révélée dans les capsides des virus matures. En accord avec la première définition de la protéine IVa2, le doublet possède une migration intermédiaire en gel de polyacrylamide-SDS entre les polypeptides IV et V (ANDERSON et al., 1973 ; EVERITT et al., 1973).

Contrairement à l'hypothèse de PERSSON et al. (1979), le sérum spécifique de la protéine IVa2 ne révèle pas la protéine de 50 kDa retrouvée en grande quantité dans les intermédiaires de maturation. En effet, le même doublet de protéine IVa2 (54-56 kDa), est observé dans les capsides matures et dans les intermédiaires de maturation du virus de type sauvage ou de différents mutants ts bloqués à température restrictive de 40°C dans diverses étapes de l'assemblage.

La protéine IVa2 ne semble pas subir de maturation protéolytique comme les précurseurs pVI, pVII, pVIII clivés, après le stade "jeune virion" par l'endoprotéase virale de 23 kDa (BHATTI and WEBER, 1979). Le même doublet protéique est en effet révélé dans les capsides du mutant H2 ts 1 à 40°C, bloqué à l'étape "jeune virion" de l'assemblage.

Le doublet révélé peut être dû à la présence d'une forme modifiée post-traductionnellement de la protéine IVa2 ralentissant la migration en gel de polyacrylamide-SDS.

La phosphorylation des protéines virales de la capside a été étudiée au laboratoire (BOUDIN et al., 1980) et n'a pas révélé de phosphorylation de la protéine IVa2. De même, seule la glycosylation de la fibre et de la protéine de 19 kDa de la région E3 a été décrite. RUSSELL et PRECIOUS (1982) ont détecté une affinité du IVa2 pour l'ADN viral. Une modification post-traductionnelle envisageable est la fixation d'un fragment d'ADN sur une fraction de la protéine IVa2 expliquant son retard de migration. Les conditions dénaturantes utilisées lors de la préparation et de la migration électrophorétique des échantillons défavorisent cependant cette hypothèse. Un clivage protéolytique peut également expliquer le doublet 54-56 kDa.

Ces deux formes peuvent également être dues à un épissage alternatif de l'ARNm IVa2. Deux espèces différentes peuvent alors coder pour deux protéines de Mr très proches. Plusieurs produits de transcription du gène IVa2 ont en effet été observés lors de l'infection (voir Discussion, § II).

La protéine IVa2 n'a pas été révélée dans les particules virales d'Ad7 malgré la grande conservation théorique existant entre les séquences primaires des protéines d'Ad5 et d'Ad7. La protéine n'est peut-être pas présente dans les particules d'Ad7.

La protéine IVa2 a été détectée dans les cellules HeLa dès 12 h d'infection mais dans un nombre très restreint de cellules où la fluorescence était très intense.

L'importance de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve une cellule, pour l'expression de certains antigènes viraux, a été montrée lors de l'infection de cellules Raji ou MOLT3, deux lignées dérivées de lymphocytes humains et non permissives à l'adénovirus : une corrélation a pu être établie entre le taux de cellules en mitose et la production de particules virales (SILVER and ANDERSON, 1988).

Bien que les cellules HeLa soient totalement permissives à l'adénovirus, il est possible que l'expression de certains gènes viraux nécessite un état particulier de la cellule dans lequel certains facteurs seraient exprimés et faciliteraient leur transcription.

Certaines régions du génome viral s'intègrent dans l'ADN cellulaire lors de l'infection. Le rôle de cette intégration n'est pas connu (revue : DOERFLER et al., 1983). Toutefois, il est probable que les gènes viraux intégrés subissent alors les mêmes régulations, concernant leur expression, que la chromatine cellulaire. La protéine IVa2 peut être synthétisée à partir de l'ADN viral libre ou intégré dans le génome cellulaire. Dans les deux cas, des facteurs cellulaires peuvent intervenir dans l'expression du gène. Dans le cas où la protéine IVa2 serait synthétisée à partir du gène intégré, son expression pourrait alors fortement dépendre de l'activité de la zone du génome cellulaire environnant le gène viral : ceci expliquerait la détection de la protéine IVa2 dans quelques cellules seulement 12 h après l'infection. L'infection perturbant ensuite fortement la cellule et le nombre de copies du génome viral augmentant, cet effet de régulation de l'expression, par la cellule, du gène IVa2 pourrait ne plus être détecté.

Alors qu'à 12 h post-infection la protéine IVa2 est nettement cytoplasmique, à 24 h post-infection le transport au noyau apparaît. Ce comportement ressemble à celui des protéines majeures de structure qui retournent en partie au noyau pour y être assemblées (VELICER and GINSBERG, 1970). Cependant, à 24 h d'infection, la fluorescence, bien qu'étendue à la majorité des cellules, diminue fortement en intensité. Cette diminution de l'intensité de fluorescence est d'ailleurs observée dès 17 h d'infection.

A ce temps de l'infection, le promoteur MLP est le plus actif : son activité tardive est de vingt fois supérieure à celle des promoteurs précoces avant la réplication virale (SHAW and ZIFF, 1980). L'activité des autres promoteurs peut en conséquence se trouver réduite. De plus, une action négative de la transcription in vitro du promoteur MLP sur le promoteur du gène IVa2 a été montrée : une mutation ponctuelle de la séquence activatrice TATAA du promoteur MLP diminuant de 80% sa transcription in vitro, augmente de 8 à 10 fois celle démarrant au site de coiffe IVa2 (NATARAJAN et al., 1985).

ALBRECHT et al. (1988) ont étudié, in vitro, les interactions entre les facteurs nucléaires extraits de cellules infectées et les séquences promotrices MLP et IVa2 : alors que 12 h après l'infection, les facteurs protéiques semblent se fixer avec la même intensité sur les deux promoteurs, à 20 h d'infection, la protection du promoteur MLP paraît plus élevée que celle du promoteur IVa2. La perte de fixation de facteurs de transcription sur le promoteur IVa2 20 h après l'infection peut expliquer la diminution de la transcription de ce gène.

Il est tentant d'étendre les études menées in vitro à nos observations d'immunofluorescence et d'expliquer la diminution de la synthèse de la protéine IVa2, après 17 h d'infection, par une compétition avec le promoteur MLP.

Lors de nos études de la biosynthèse de la protéine IVa2 en Western Blot, une réaction croisée forte avec une protéine cellulaire de 43 kDa a été détectée dans la fraction "membrane plasmique", principalement, de nos extraits. Cette protéine est révélée dans les cellules non infectées mais sa synthèse est activée par 12 h d'infection virale.

L'origine de cette protéine n'a pas été déterminée. Il est même possible que plusieurs protéines, de Mr 43 kDa soient révélées par notre immunsérum. Nous avons, après électrophorèse et transfert, préparé la protéine de 43 kDa à partir de la fraction "membrane plasmique" de cellules BRK transformées par l'Ad3 ou de cellules HeLa infectées par l'Ad2 et purifié notre immunsérum contre l'une ou l'autre. L'immunofluorescence observée dans les deux cas est différente : avec les anticorps détachés de la protéine de cellules BRK, l'analyse révèle une structure semblable aux lysosomes dans les cellules HeLa infectées ou non. Avec le deuxième type d'anticorps, une protéine cytoplasmique et nucléaire est révélée et ceci uniquement dans les cellules HeLa infectées, à partir de 12 h. La fluorescence n'est alors pas restreinte à quelques cellules.

L'une des protéines de 43 kDa pourrait être d'origine virale et provenir du gène IVa2. BINGER et FLINT (cité par FLINT, 1986) ont observé des formes d'ARNm IVa2 maturées différemment de la forme tardive, en phase précoce de l'infection : il est probable que, si ces formes existent, elles codent pour des produits éventuellement reliés à la protéine IVa2. Nous avons étudié la séquence nucléotidique du gène IVa2 d'Ad2 et d'Ad7. Pour ce dernier sérotype, le deuxième codon initiateur de traduction AUG, en phase avec le premier, est entouré de la séquence consensus fortement activatrice : ACC AUG G (KOZAK, 1986). Le consensus, par contre, n'existe pas pour le premier AUG. Il est possible que, outre la 54-56 kDa, d'autres produits de traduction proviennent du gène IVa2 et que notre immunsérum ait détecté l'un d'entre eux.

La purification et la caractérisation de la - ou des protéines- de 43 kDa seraient la seule réponse à cette question.

II- Expression de l'ARNm IVa2 lors de l'infection.

Nous avons ensuite analysé l'expression de l'ARN IVa2 en phases précoce et tardive de l'infection virale.

La technique de P.C.R., grâce à deux amorces hybridant de part et d'autre de l'intron de l'ARNm IVa2, permet de distinguer les ARNm provenant de la région E2B (non épissés entre les deux amorces) de celui du IVa2 (épissé entre 5695 nt et 5418 nt) présent au stade tardif de l'infection (CHOW et al., 1979).

L'analyse des ARNm de cellules HeLa infectées par l'Ad2 type sauvage, a montré, dès 9 h d'infection, une expression de la forme maturée de l'ARNm IVa2. Cette expression augmente au cours de l'infection.

Les oligonucléotides O1 et O2 de la technique de P.C.R. ne permettant l'analyse de l'ARNm IVa2 qu'autour de l'intron décrit entre 5695 nt et 5418 nt, nous avons voulu observer les autres transcrits potentiels du gène IVa2. Pour cela, la méthode de protection de la digestion aux ribonucléases A et T1 a été employée.

Deux sondes différentes permettent de visualiser soit la transcription au site de coiffe IVa2, soit l'épissage au site donneur à 5695 nt, l'accepteur n'étant pas couvert dans ce cas.

A 9 h post-infection, la faible transcription observée semble démarrer à un site de coiffe en amont de celui décrit pour le gène IVa2 situé à 5826 nt. A 24 h post-infection, la transcription au site de coiffe IVa2 est majoritairement observée; la transcription de la région E2B, démarrant à un site de coiffe (27000 pb) très en amont de celui du gène IVa2 (STILLMAN et al., 1981) semble moins efficace que celle du gène IVa2.

Lors de l'analyse, une protection hétérogène de la sonde a également été observée indiquant d'éventuels démarrages de transcription à des sites différents de ceux des régions IVa2 et E2B. Le démarrage à différents sites de coiffe a été montré pour le gène IVa2 en phase tardive de l'infection (ZIFF and EVANS, 1978) mais seuls quelques nt séparaient ces différents sites de démarrage. Nous avons observé, en phase précoce de l'infection, un démarrage de la transcription de la région IVa2 à un nouveau site de coiffe. Il est situé à une centaine de nt en amont du site à 5826 nt utilisé au stade tardif de l'infection.

La transcription des ARNm de la région E1A initie principalement au nt 498, soit 30 nt en aval de la séquence TATAA activatrice de transcription (BAKER and ZIFF, 1981). Des transcrits mineurs ont cependant été observés démarrant en amont du site de coiffe majeur en phase précoce de l'infection (OSBORNE et al., 1982). OSBORNE et BERK (1983) ont bloqué la réplication virale par la cyto-arabinoside et ont alors observé de nouvelles formes d'ARNm E1A dont l'extrémité 5' diffère de celle des ARNm précoces. Ces nouvelles formes sont présentes exclusivement après la transition -stade précoce, stade tardif- du cycle lytique.

Nos observations de la transcription du gène IVa2 sont similaires à celles de OSBORNE et BERK (1983). Il est possible qu'un produit de transcription précoce du gène IVa2 soit détecté.

L'épissage de l'ARN IVa2 au site donneur à 5695 nt a été observé à 24 h après l'infection sous forme d'un doublet proche de 83 nt suggérant la présence de deux formes tardives d'ARNm IVa2. Seuls quelques nucléotides séparent les deux formes observées. Les deux formes de 54 et 56 kDa de protéine IVa2 peuvent cependant être codées par ces deux formes très proches d'ARNm. En effet, 54 et 56 kDa sont des Mr apparentes en gel de polyacrylamide-SDS. Une transition Ala-Val dans la fibre de l'H2 ts 125, par exemple, est seule responsable d'un changement de migration de 2,5 kDa (BOUDIN et al., 1983). Le doublet de Mr 54-56 kDa observé pour la protéine IVa2 peut donc provenir de deux formes d'ARNm ne variant que de quelques nt.

9 h et 24 h après l'infection, les ARNm de E2B ont été détectés par la méthode de protection de la digestion aux ribonucléases A et T1 mais pas par la méthode de P.C.R. Ceci peut être dû à une conformation particulière de ces ARNm les rendant moins facilement amplifiables dans les conditions de l'expérience : la concentration en MgCl₂ a en effet été augmentée et a permis une détection des produits d'amplification de 574 pb.

La technique de P.C.R. n'est pas quantitative dans nos expériences. Des problèmes de compétition d'hybridation des amorces existent peut-être entre les ARNm IVa2 et E2B.

Les résultats de protection de la digestion aux ribonucléases A et T1 ont montré que la transcription de la région E2B/IVa2 est plus complexe que ce qui avait déjà été décrit : plusieurs sites d'initiation ainsi que des sites d'épissage différents sont utilisés. Nous avons étudié la séquence de l'ARNm IVa2 (programme PC Gene) et détecté la présence d'éventuels sites donneurs et accepteurs d'épissage, de séquences très proches du consensus décrit par PADGETT et al. (1986).

Ces résultats indiquent également la présence d'un produit de transcription de la région IVa2, dont le site de démarrage diffère de celui décrit dans la littérature. Les bandes protégées obtenues avec les deux sondes 425 et 427 hybridées aux ARN de cellules infectées 24 h ont été comparées (Fig. R14, A,3 et B,3). La transcription démarrant au site de coiffe IVa2 à 5826 nt est majoritaire 24 h après l'infection

(Fig. R14, B,3) alors que l'épissage de l'ARN IVa2 au site donneur à 5695 nt est minoritaire (Fig. R14, A,3). La concentration d'ARN IVa2 épissé au site donneur à 5695 nt est donc inférieure à celle des ARN transcrits à partir du site de coiffe à 5826 nt.

Ces résultats suggèrent la présence d'ARN IVa2 non maturé au site donneur à 5695 nt. Ils sont en accord avec ceux de BINGER et FLINT (cité par FLINT, 1986) qui avaient observé, au stade précoce de l'infection, des formes d'ARN IVa2 maturées différemment des formes tardives.

III- Rôle de la réplication sur l'expression du gène IVa2.

L'hydroxyurée, inhibiteur chimique de la réplication, permet, dans le cas de l'infection par l'adénovirus, de prolonger artificiellement la phase précoce du cycle lytique. Nous avons étudié le comportement du gène IVa2 en présence de cette drogue.

Aucun ARN provenant de la région IVa2/E2B n'a été détecté par la technique de P.C.R. En utilisant la technique de protection de la digestion aux ribonucléases A et T1, l'initiation de la transcription au site de coiffe IVa2 n'a pas été détectée non plus. La transcription au site de coiffe E2B a été observée.

Des sites de démarrage entre 5929 et 5826 nt sont cependant actifs et montrent la présence éventuelle d'ARN IVa2 démarrant en aval du site à 5826 nt. Ces formes d'ARN sont retrouvées également lorsque le cycle lytique se déroule normalement.

L'ARN IVa2 épissé au site donneur à 5695 nt n'est pas détecté non plus dans ces conditions.

La protéine IVa2 n'a pas été révélée en présence d'hydroxyurée. L'inhibition de la réplication de l'ADN viral et/ou cellulaire semble donc réguler l'expression du produit du gène IVa2.

L'expression du gène IVa2 peut également dépendre d'autres fonctions cellulaires qui pourraient être bloquées par l'hydroxyurée. Cette substance est cependant utilisée pour prolonger le stade précoce du cycle lytique et n'inhibe pas la production des protéines de la région E1A par exemple.

Afin de n'inhiber que la réplication de l'ADN viral, nous avons infecté les cellules HeLa par le mutant H5 ts 125 qui exprime une protéine DBP thermolabile et qui, à 40°C, est bloqué dans la réplication (VAN DER VLIET and LEVINE, 1973). L'ARNm IVa2 a été détecté par la technique de P.C.R. dans les cellules infectées par le mutant 24 h à 40°C. En protection de la digestion aux ribonucléases A et T1, méthode plus quantitative, les taux d'ARNm produits à partir du site de coiffe IVa2 sont identiques pour les cellules infectées par le mutant à 33°C, à 40°C, ou par l'Ad2 de type sauvage à 37°C. Cet ARNm est également épissé de façon similaire dans les deux cas (voir Fig. R14).

Le blocage de la réplication de l'ADN viral ne semble donc pas avoir d'effet sur la transcription de la région IVa2/E2B. La régulation de l'expression du gène IVa2 est donc différente de celle des cinq familles de gènes sous le contrôle du promoteur MLP.

La protéine IVa2 est sur-exprimée dans les cellules infectées par le mutant à 40°C. Le promoteur MLP est bien réprimé dans ce cas : la synthèse de l'hexon est quasi-totalement inhibée (voir Fig. R16). Cependant, le profil de protection des sondes, identique pour l'Ad2 type sauvage et l'H5 ts 125 à 40°C, n'explique pas la sur-expression de la protéine IVa2 (56 kDa) dans les noyaux de cellules infectées par le mutant à 40°C. Cette augmentation de synthèse est peut-être due à une meilleure traduction de l'ARNm IVa2 tardif lors du blocage de la réplication virale.

La protéine DBP, touchée par la mutation de l'H5 ts 125, est impliquée dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes précoces. Elle diminue, en particulier, la stabilité des ARNm des régions E1A et E1B (BABICH and NEVINS, 1981), en se liant à eux dans la cellule infectée (LAZARIDIS et al., 1988). Elle régule également négativement le démarrage de la transcription de la région E4, in vitro et in vivo (NEVINS and WINKLER, 1980 ; HANDA et al., 1983).

La protéine de 55 kDa codée par la région E1B, est impliquée dans le transport des ARNm au cytoplasme où ils sont traduits (BABISS et al., 1985). Elle a été retrouvée complexée, dans les cellules infectées au produit de 25 kDa de la région E4 (SARNOW et al., 1984). Il a été suggéré que ce complexe, localisé dans le noyau, était important pour le transport des ARNm tardifs au cytoplasme (WILLIAMS et al., 1986).

La mutation dans la DBP entraîne une dérégulation de la

transcription des zones E1B et E4. La sur-expression de la protéine IVa2 dans les cellules infectées par le mutant H5 ts 125 à 40°C peut alors être due à un transport accru de l'ARNm IVa2 tardif au cytoplasme grâce aux produits des régions E1B et E4.

Dans les cellules CV1, infectées par l'Ad7 (sous-groupe B), la maturation de l'ARNm IVa2 a également été observée, bien que la répllication de l'ADN viral soit bloquée dans ces cellules pour les adénovirus du sous-groupe B (DELSERT and D'HALLUIN, 1984). Cependant, un intron plus grand d'environ 175 nt est épissé pour l'ARNm IVa2, dans ce cas.

Si le même phénomène se produit dans les cellules HeLa infectées par l'Ad7, la structure de l'ARNm IVa2 peut être différente de celle de l'ARNm IVa2 de l'Ad2. La protéine codée par les deux ARNm peut varier également. La protéine IVa2 de l'Ad7 ne serait alors pas détectable par notre immunsérum. Ceci expliquerait nos résultats négatifs de détection de la protéine IVa2 en immunoblot dans les particules d'Ad7.

IV- Lignées cellulaires contenant le gène IVa2.

Afin d'isoler un virus délété dans le gène IVa2, nous avons tout d'abord établi des lignées cellulaires contenant ce gène, capables de compléter le défaut du mutant. La partie codante du gène IVa2 a été clonée dans un plasmide exprimant le gène néo qui permet la sélection des clones cellulaires recombinants par le G418.

Le promoteur naturel du gène IVa2 a été remplacé par deux promoteurs viraux, l'un homologue (le promoteur fort de la région E1A) et l'autre hétérologue (le promoteur LTR du MMTV inducible par la DM). Cette stratégie a déjà été décrite : KLESSIG et al. (1984) ont établi des lignées HeLa exprimant la DBP de façon inducible par la DM. Ils ont pour cela cloné la partie codante du gène en aval du promoteur LTR. BRUNET et BERK (1988) ont cloné le gène E1A entier sous le contrôle du LTR du MMTV ; les introns des messagers 12S et 13S de E1A sont spontanément excisés dans les cellules qui expriment les protéines de 289 et 243 résidus de façon inducible.

Les lignées que nous avons établies au expriment un ARNm IVa2 non épissé malgré la présence des sites donneur et accepteur d'épissage à 5695 et 5418 nt. La maturation de l'ARNm IVa2 n'a pas lieu spontanément

dans ces cellules, contrairement à celle de la région E1A qui, bien que sortie de son contexte viral, est épissée efficacement (BRUNET and BERK, 1988).

La région E1A est la première transcrite lors de l'infection. Aucune autre fonction virale n'est nécessaire à son expression. Au contraire, ce sont ses produits qui régulent l'expression de la plupart des autres gènes précoces (revue : NEVINS, 1981).

La forme de l'ARNm IVa2 épissée entre 5695 et 5418 nt ne s'exprime qu'à partir de 9 h post-infection (voir Fig. R14). L'infection par le H5 ts 125 à 40°C laisse supposer que des fonctions virales précoces sont impliquées dans la régulation de l'expression de l'ARNm IVa2. Il est possible que dans les lignées cellulaires établies à partir de l'ADN génomique contenant la région IVa2, l'épissage de l'ARNm IVa2 n'ait pas lieu en l'absence de ces fonctions précoces.

La forme majeure de l'ARNm retrouvée dans ces lignées n'est pas maturée au site donneur d'épissage à 5695 nt et correspond peut-être à une forme retrouvée précocement dans le cycle lytique (voir § II).

Après transfection de l'ADN viral délété d'une partie de la région IVa2, aucune particule virale délétée dans ce gène n'a pu être obtenue. Pourtant, les fonctions précoces peut-être nécessaires à l'expression de la protéine IVa2 étaient alors présentes dans les cellules transfectées et devaient s'exprimer. Il faut cependant souligner que, dans les lignées H-656 et H-657, le promoteur du gène IVa2 n'est pas complet et que les régulations par les régions précoces virales peuvent ne pas avoir lieu. Dans la lignée H-520, cependant, le promoteur naturel du gène IVa2 est intact mais cette lignée n'a pas non plus permis de compléter les mutants délétés dans la région IVa2.

Outre la réplication cellulaire et l'expression de certaines fonctions virales précoces, d'autres paramètres peuvent réguler l'expression du gène IVa2 placé dans un contexte cellulaire.

Aucun virus délété dans le gène IVa2 n'a été obtenu, certainement par défaut de synthèse de protéine IVa2 dans les lignées cellulaires. La délétion que nous avons introduite dans le gène IVa2 affecte également les ARNm de la zone E2B puisque la séquence de l'ARNm IVa2 est totalement incluse dans celle des ARNm de la zone E2B (voir Fig. R10). Cependant, cette délétion est située en aval de la partie codante des ARNm de la protéine terminale et de l'ADN polymérase virales et ne doit

donc pas empêcher la synthèse de ces deux protéines nécessaires à la répllication de l'ADN viral.

Des études précédentes ont montré le rôle de séquences présentes dans la zone non codante en 3' sur la dégradation des ARNm (LUSCHER et al., 1985 ; TREISMAN, 1985). Plus récemment, une séquence AUUUA répétée en 3' de la région non codante du gène de la lymphokine humaine GM-CSF a été directement impliquée dans la dégradation rapide de l'ARNm (SHAW and KAMEN, 1986). Ces séquences sont présentes 200 à 300 nt en amont du site de polyadénylation. Leur délétion entraîne une meilleure stabilité des ARNm . Dans le cas des ARNm E2B, la délétion que nous avons effectuée ôte 306 nt aux ARN à plus de 500 nt en amont de leur site de polyadénylation et un seul motif AUUUA a été retrouvé dans cette séquence. Il nous semble alors peu probable que la délétion effectuée dans les ARNm E2B module leur stabilité.

Parmi tous les mutants ts obtenus après mutagénèse au hasard, aucun virus muté dans le gène IVa2 n'a été décrit. Des virus mutés dans la plupart des protéines structurales ont pourtant été caractérisés : des mutations dans les protéines IIIa, 100 kDa, pVI, pVIII, et aussi dans la fibre ou l'hexon permettent aux virus mutés de se développer.

Le polypeptide IX est également un composant structural de la capsid intervenant dans la formation des groupes de 9 hexons (FURCINATTI et al., 1989).

Le mutant d1 313 d'Ad5 n'exprime pas le polypeptide IX. Il se développe et s'assemble pourtant dans les cellules permissives bien que la capsid soit alors moins stable que celle de l'Ad5 de type sauvage (COLBY and SHENK, 1981).

L'impossibilité d'isoler des mutants de délétion dans le gène IVa2, ainsi que le degré de conservation dans la séquence primaire de cette protéine, suggèrent qu'elle a un rôle important à jouer pour le développement du virus, autre que dans l'échaffaudage de la particule virale.

Les lignées que nous avons construites, bien que ne complétant pas la délétion du gène IVa2 viral, n'en demeurent pas moins un bon système d'étude des différences de régulation de l'expression du gène IVa2 lors de l'infection ou lors de l'intégration du gène viral dans le génome cellulaire.

V- Site potentiel de liaison aux NTP dans la protéine IVa2 et transformation de cellules primaires BRK

Les protéines liant les NTP sont très répandues dans le règne vivant où elles ont des fonctions biologiques variées. Les grandes homologies de séquence retrouvées dans ces protéines ont permis de les classer en une famille : les NTP protéines. Cette famille est composée de A- protéines liant l'ATP et de G- protéines liant le GTP.

Certaines séquences d'acides aminés sont très conservées dans toutes ces protéines. Le motif (A) en particulier, de séquence

G X X X X G K (S ou T)

est toujours retrouvé. Il est impliqué dans la liaison au NTP (Revue : GILMAN, 1987). Le motif (G) de séquence N K X D retrouvé dans les G-protéines leur donne la spécificité pour le GTP.

Pour réguler le métabolisme cellulaire, les protéines sont associées à un récepteur et à un effecteur.

La NTP-protéine transmet le signal du récepteur vers l'effecteur qui délivre le message à la cellule.

Parmi les petites G-protéines, la protéine p21 de l'oncogène ras, associée à la membrane plasmique, est impliquée dans la transformation cellulaire (Revue : BARBACID, 1987). Elle semble participer à la transmission de signaux de croissance au travers de la membrane plasmique, ceci grâce à sa capacité de liaison au GTP.

Le motif (A) consensus des NTP-protéines a été retrouvé dans une centaine de protéines virales (GORBALENYA and KOONIN, 1989). La fonction biologique de certaines d'entre elles est connue : il s'agit en général de fonctions enzymatiques (thymidine kinase du virus herpétique, synthèse de l'ARN par la protéine 2C des picornaviridae).

Chez l'adénovirus, le motif (A) a été retrouvé dans la protéine IVa2 de l'Ad2. Nous avons analysé la séquence primaire des protéines IVa2 d'Ad7 et de MAV1 et avons également observé ce motif (A) (Fig. D1).

Les essais de liaison in vitro au GTP ou à l'ATP n'ont pas révélé d'affinité de la protéine IVa2 (54 kDa) pour ces nucléotides.

Le motif (A) observé dans la protéine IVa2 n'est peut-être pas biologiquement actif. Il est possible aussi que la technique que nous avons utilisée ne permette pas la liaison du NTP à la protéine fixée sur nitrocellulose. Cette technique a surtout été utilisée pour les petites G-protéines comme la protéine p21 de ras. Ces petites protéines peuvent

aa 150				aa 250
Ad5 :	RDDGSCSSLNYQLHPYIGVIY	<u>GPTGCGKS</u>		<u>QLLRNLLSSQLISPTPETVFFI</u>
(sérotype humain)		ATP/GTP motif A		
aa 150				aa 250
Ad7 :	REGGSCRSNLNYHLQPYIGVIY	<u>GPTGCGKS</u>		<u>QLLRNLLSSQLITPAPEVFFI</u>
(sérotype humain)				
aa 146				aa 196
MAY1 :	SPEGNCESLNYSLOPLIAIYY	<u>GPTGSGKS</u>		<u>QLLRNLLSCHLIDPSPETVFFV</u>
(sérotype murin)				
p21 <i>ras</i> :	aa 1	MTEYKLVVY	<u>GGAGYGKS</u>	aa 46
(H- <i>ras</i> : 1 homme ou rat)				ALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVI

**FIGURE D1 : SITE POTENTIEL DE LIAISON AUX NTP (MOTIF A)
DANS LA PROTEINE IVa2 DE DIFFERENTS SEROTYPES
D'ADENOVIRUS**

Le motif A est retrouvé dans la protéine IVa2 des deux sérotypes humains et du sérotype murin présentés ici. Les régions soulignées sont également très conservées.

Le motif A de la protéine p21 de *ras* est très homologue à celui des adénovirus.

retrouver leur structure tertiaire plus facilement que les plus grandes, après avoir subi la dénaturation de l'électrophorèse.

La présence du motif (A) dans la protéine IVa2 de plusieurs sérotypes d'adénovirus est cependant intéressante.

Les résultats encourageants que nous avons obtenus lors de la transformation cellulaire, sont peut-être à rapprocher de la fonction biologique de la protéine IVa2.

La transformation cellulaire résulte d'une cascade d'évènements où les produits de plusieurs oncogènes sont impliqués. Le rôle du gène IVa2 dans cet enchaînement est envisageable.

L'influence positive du gène IVa2 sur l'efficacité de transformation a été plus nettement observée pour l'Ad3 que pour l'Ad2. Des différences dans la capacité de transformation in vitro entre les deux sérotypes ont été montrées (COUSIN et al., sous presse).

Les mécanismes de transformation sont peut-être différents pour l'Ad3 et pour l'Ad2. Il est possible que pour le sérotype 3, des gènes autres que E1A et E1B soient impliqués dans le contrôle de ce processus.

Dans toutes les lignées BRK que nous avons établies avec les gènes IVa (plus E1A et parfois E1B), un ARNm IVa2 non épissé entre 5695 et 5418 nt a été facilement amplifié par P.C.R. après hybridation aux amorces 01 et 02 : le gène IVa2 est efficacement transcrit dans ces lignées.

La présence du gène E1A peut expliquer la forte expression du gène IVa2 dans ces cellules. Les produits de E1A trans-activent la plupart des régions virales précoces. Il est possible qu'ils activent également la transcription du gène IVa2.

Le promoteur MLP est également présent dans les plasmides employés pour la transformation. Bien que peu probable, l'effet de cis-activation du promoteur MLP sur la transcription des gènes E1A de IVa2 ne peut être exclu.

La protéine IVa2 (54 kDa) n'a pas été détectée dans les différentes lignées de BRK. Une grande quantité de protéine de 43 kDa par contre, a été observée dans les lignées contenant le gène IVa2 d'Ad2 ou d'Ad3. Dans les lignées ne contenant que les gènes E1A et ras (B-312 + S-25), cette protéine n'a pas été détectée.

L'origine de la protéine de 43 kDa n'est pas déterminée. Il est possible que plusieurs protéines de Mr proche de 43 kDa soient détectées par le sérum anti-IVa2 (voir Discussion, § I). Elles peuvent être cellulaires ou virales.

La protéine de 43 kDa détectée dans les lignées BRK peut cependant provenir du gène Iva2, ces cellules exprimant également un ARNm Iva2 non épissé entre 5695 et 5418 nt.

CONCLUSIONS
PERSPECTIVES

La protéine IVa2 est l'une des plus mal connues de l'adénovirus. Seules des hypothèses ont été décrites à propos de sa fonction.

Les études que nous avons menées nous ont permis de mieux caractériser cette protéine.

La biosynthèse de la protéine IVa2 s'est révélée particulière : une interaction semble exister entre le cycle cellulaire et l'expression du gène IVa2. Des événements liés à la réplication cellulaire semblent en effet impliqués dans l'activation du gène.

L'étude de la synthèse de l'ARNm IVa2 a montré de nouvelles espèces provenant de cette région du génome viral. Ces ARN pourraient coder pour d'autres produits "IVa2" impliqués dans des fonctions autres que celle de la protéine IVa2 tardive.

Nos premiers résultats de transformation de cellules BRK vont dans ce sens. Dans les lignées établies après transformation par les gènes E1A et IVa2 d'Ad3 ou d'Ad2, l'ARN IVa2 non mûré a été détecté. Son produit pourrait être impliqué dans la transformation cellulaire en coopération avec la région E1.

Une protéine de 43 kDa a été détectée, grâce à notre immunosérum, dans certaines lignées de BRK contenant le gène IVa2. Est-elle un produit du gène IVa2 différent de la protéine tardive encapsidée dans le virus mûre? La purification et la caractérisation de cette protéine de 43 kDa apporterait les réponses à ces questions. Cette purification est envisageable grâce à la quantité importante de protéine de 43 kDa produite dans certaines lignées de BRK.

La protéine IVa2 est supposée intervenir dans l'assemblage de la particule.

Nos travaux ont montré que, contrairement à l'hypothèse de PERSSON et al. (1979), la protéine IVa2 n'est pas la protéine de 50 kDa retrouvée principalement dans les intermédiaires d'assemblage du virus. La protéine IVa2 est en effet présente sous forme d'un doublet de Mr 54-56 kDa dans les intermédiaires de maturation et dans les capsides mûres.

D'autre part, la protéine IVa2 est potentiellement très conservée chez les adénovirus dont le gène IVa2 a été séquencé. Elle possède un site caractéristique de liaison aux NTP qui, dans des protéines d'autres virus, est impliqué dans des fonctions enzymatiques variées. Bien que la question de la fonction biologique de la protéine IVa2 reste posée, son rôle unique dans l'assemblage de la particule virale nous semble improbable.

Nous avons obtenu des lignées cellulaires contenant le gène IVa2. L'ARN IVa2 "tardif" n'y est pas mûri correctement et elles n'expriment pas de protéine IVa2. La régulation de l'épissage de l'ARN IVa2 est complexe et semble faire intervenir des fonctions virales et cellulaires qui restent à déterminer.

Ces lignées établies n'ont pas permis d'obtenir de virus délétés dans le gène IVa2 ; ceci suggère l'importance de la protéine IVa2 dans le développement de l'adénovirus. Des virus mutés dans ce gène, construits par délétion ou par mutagenèse dirigée, seraient pourtant utiles pour mieux comprendre le rôle de la protéine IVa2. Le premier travail à envisager est la construction de lignées cellulaires exprimant la protéine IVa2 en quantité suffisante pour compléter le défaut de virus mutés dans ce gène.

Le traitement de maladies génétiques, par l'apport aux cellules déficientes de fragments d'ADN leur faisant défaut, est une thérapie d'avenir. Des problèmes d'innocuité et de faisabilité doivent cependant être résolus.

L'adénovirus pourrait être un vecteur idéal pour introduire de tels fragments d'ADN dans les cellules atteintes (CHASSE et al., 1989).

La construction d'adénovirus vecteurs de gènes peut être réalisée en substituant des parties du génome viral par l'ADN à introduire dans les cellules. La propagation des virus recombinants doit alors être effectuée par l'infection de cellules permissives.

La solution envisagée à ce jour est la substitution de tout ou partie de la région E1. La propagation des virus obtenus a lieu dans les cellules 293 qui ont intégré la région E1 dans leurs chromosomes.

La taille du fragment d'ADN à insérer dans la région E1 est

cependant limitée. La région IVa2 est juxtaposée à la région E1. Sa délétion permettrait d'insérer de plus grands fragments d'ADN dans les virus recombinants. Une lignée cellulaire permissive serait alors indispensable à leur propagation.

La construction de lignées exprimant les produits des gènes E1 et IVa2 est envisageable par l'intégration de l'ADN complémentaire de l'ARNm IVa2 dans les cellules 293.

Plus de renseignements sur la fonction biologique de la protéine IVa2 sont cependant nécessaires. En particulier : qu'advierait-il d'un virus délété dans ce gène? Sa propagation est-elle réellement possible?

Plus généralement, l'infection chez l'homme par un adénovirus recombinant n'est-elle pas trop risquée?

MATERIELS ET METHODES

I- Techniques électrophorétiques

1- Electrophorèse en gel d'agarose

Le gel d'agarose est utilisé pour la séparation des fragments d'ADN. Sa concentration varie de 0,6 à 2,5% en fonction de la taille des fragments à séparer. La migration a lieu dans du tampon TBE (Tris 89 mM ; Acide borique 89 mM ; EDTA 2,5 mM ; pH 8,3). L'ADN est mélangé V/V avec une solution de bleu de bromophénoï (BBO) à 0,05%, saccharose 50% avant d'être déposé. La migration dure environ 4 h à 90V. L'ADN est visualisé grâce au bromure d'éthidium (BrET) contenu dans le gel (8 µg/ml).

2- Electrophorèse en gel de polyacrylamide

2-1 Pour les acides nucléiques

La concentration des gels varie de 3,5% à 12% (rapport bis acrylamide/acrylamide 1/29) selon la taille des fragments à séparer. La migration a lieu en tampon TBE avec pour témoin un mélange de BBO 0,05% et xylène cyanol 0,05% (BBO-X). Quand un gel dénaturant est nécessaire, l'urée (7M) est ajoutée dans le même système que précédemment.

2-2 Pour les protéines

Les échantillons sont mélangés Vol/Vol à la solution de dénaturation (Tris-HCl, pH 6,8 ; 4% SDS ; mercapto-éthanol 10% ; BBO 0,05%) et chauffés 3 mn à 100°C. Ils sont déposés sur un gel d'espacement à 5% d'acrylamide (rapport acrylamide/bis : 50/1,33) dans Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 0,1% de SDS et entrent ensuite dans le gel de résolution dont la concentration varie de 12% à 15% (rapport acrylamide/bis : 50/0,235) dans Tris-HCl 0,43 M, pH 8,9 ; 0,1% SDS (LAEMMLI, 1970) le tampon d'électrophorèse est une solution de Tris 0,025 M ; glycocole 0,192 M ; SDS 1%. L'électrophorèse est conduite 16 h à 50V. Les gels sont ensuite soit colorés au bleu de Coomassie R250 soit transférés électriquement.

3- Electroélution

L'électroélution de fragments d'ADN de gel d'agarose ou d'acrylamide a lieu par insertion d'une petite membrane de DEAE-cellulose (NA 45, SCHLEICHER et SCHUEHLL) dans le gel, devant le fragment à récupérer et migration à 90V. L'ADN accolé à la membrane en est élué par addition d'une solution chargée en sel (Tris-HCl, pH 7,5 ; EDTA 1 mM ; NaCl 1,5 M) 30 mn à 68°C et précipitation de 20 mn à -70°C par 2,5 Vol d'éthanol. Après centrifugation de 15 mn à 12000 g, rinçage du culot par l'éthanol à 70% et séchage, l'ADN est prêt à être coupé par les enzymes de restriction.

II- Transformation bactérienne

1- Vecteurs de clonage

Le plasmide pRIT2T (Pharmacia) (Fig. M1) a été utilisé pour la production de protéine fusionnée contenant une partie de protéine IVA2. Ce plasmide, dérivé du pBR322, contient une partie de la séquence codant pour la protéine A de Staphylococcus Aureus (partie N-Termi-nale) et un oligonucléotide multi-sites permettant le clonage de la séquence codant pour la protéine recherchée. La synthèse de la protéine de fusion est sous le contrôle du promoteur pL du phage Lambda, sensible au répresseur cI 857.

L'oligonucléotide de synthèse utilisé pour changer la phase de lecture du site BamH I du pRIT2T est

5' C C G G G C C C G 3'

5' C G G G C C T A G 3'

placé entre les sites Sma I et BamH I.

Les plasmides pSP64 et pSP65 (Amersham) (Fig. M2) dérivent également du pBR322 et contiennent, en amont d'une séquence de clonage muti-sites, le promoteur du phage SP6. Grâce à l'ARN polymérase SP6 il est possible de synthétiser, à partir de ces deux plasmides, l'ARN dont la séquence est clonée en aval du promoteur. Les deux séquences de clonage sont inversées dans le pSP64 et dans le pSP65 et permettent d'orienter le fragment cloné de façon à transcrire l'un ou l'autre des deux brins d'ADN en ARN.

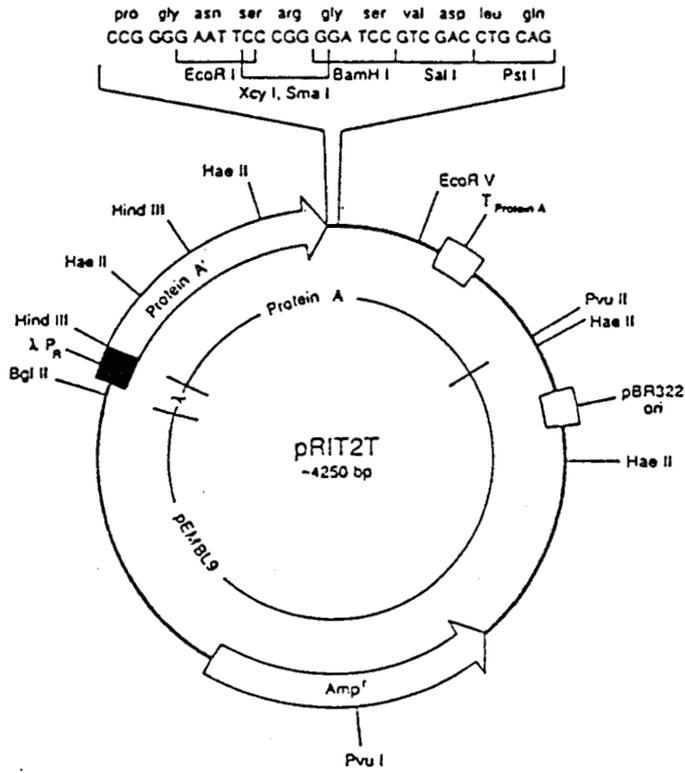


FIGURE M1 : LE PLASMIDE pRIT2T (PHARMACIA)

- La boîte blanche représente la séquence codant pour la protéine A de Staphylococcus Aureus
- La boîte noire représente le promoteur pL du phage Lambda
- La séquence multi-sites de clonage est représentée

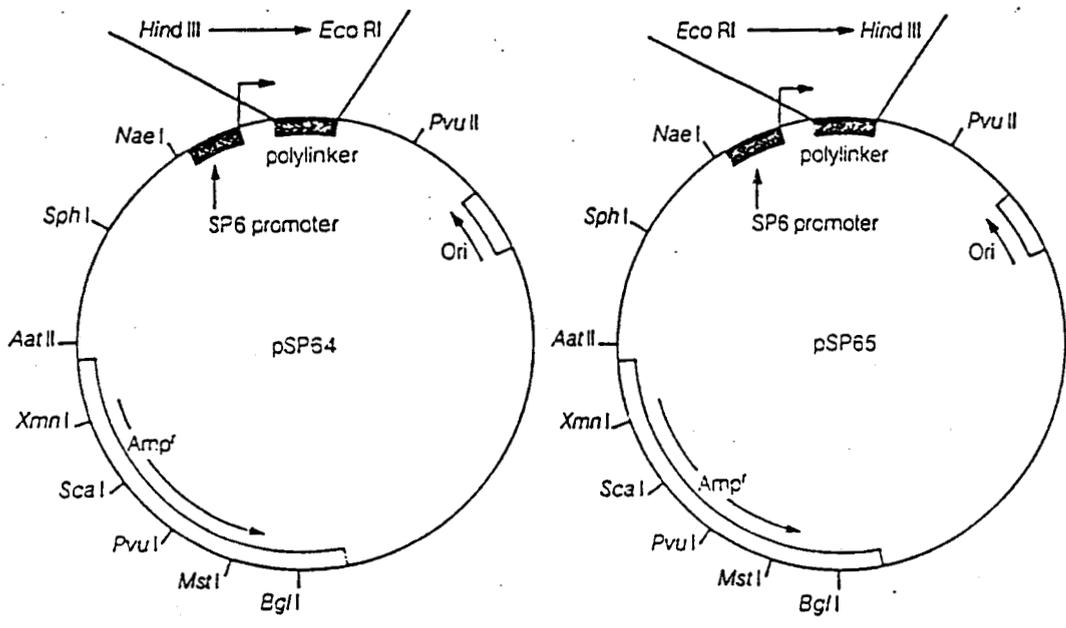


FIGURE M2 : LES PLASMIDES pSP64 ET pSP65 (AMERSHAM)

2- Transformation de la souche HB101 d'E.coli

HB101 est un hybride d'E.coli K12, E.coli B utilisé pour la préparation des plasmides (amplification et purification).

Les bactéries sont cultivées à 37°C sous agitation en milieu LB (extrait de levure DIFCO 5 g/l ; peptone DIFCO 10 g/l ; NaCl 5 g/l). Quand la D.O. à 580 nm du milieu de culture atteint 0,6 il est centrifugé à 6000 rpm 10 mn à 4°C. Les bactéries sont lavées dans du CaCl₂ 0,1 M. Le culot bactérien est repris dans CaCl₂ 0,1 M et laissé 20 mn à 4°C, puis centrifugé une dernière fois (d'après COHEN et al., 1972).

30 ml de culture bactérienne fournissent environ 0,7 ml de bactéries "compétentes" aliquotées par 0,1 ml. Chacun des aliquots de bactéries est mis en contact avec 25 µl de solution d'ADN transformant. Après 20 mn dans la glace, on effectue cinq chocs thermiques de 30 sec chacun (37°C/4°C). La suspension est laissée 20 mn à 4°C. 1,5 ml de 2XTY (extrait de levure DIFCO 10 g/l ; tryptone DIFCO 16 g/l ; NaCl 5 g/l) sont ajoutés et la suspension est mise à agiter 45 mn à 37°C. 0,2 et 0,8 ml sont étalés sur boîtes de Pétri contenant du LB gélosé (15 g/l-DIFCO) renfermant l'antibiotique comme marqueur de résistance (ampicilline à 50 µg/ml). Les boîtes sont incubées 18 h à 37°C et les clones résistants sont isolés.

3- Transformation de la souche N4830 d'E.coli

N4830 (GOTTESMAN et al., 1980) est un dérivé de HB101 utilisé pour la production de protéines fusionnées sous le contrôle du promoteur pL de Lambda.

Cette souche contient le répresseur thermosensible cI 857 du phage et les gènes N.

La croissance a lieu dans le milieu LB à 30°C, l'induction de la synthèse de la protéine fusionnée nécessite un passage de 2 h à 42°C.

La technique de transformation est la même que pour HB101 mais toutes les étapes ayant lieu à 37°C se font ici à 30°C.

4- Sélection des clones

4-1 Méthode des tailles

Après amplification des clones obtenus dans du milieu LB (+ ampicilline 50 µg/ml) 16 h à 37°C, les bactéries sont centrifugées 10 mn, à 6000 rpm à 4°C puis lavées dans 500 µl de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH8 ; EDTA 1 mM) et recentrifugées 10 mn à 6000 rpm, à 4°C. Le culot est suspendu dans 60 µl d'une solution TBE-saccharose 25% contenant du lysosyme à 10 mg/ml et de la ribonucléase A à 50 µg/ml final. La suspension est déposée dans un gel d'agarose à 1% (BrEt 8 µg/ml). A chaque échantillon sont additionnés 20 µl d'une solution de SDS à 1%, BBO à 0,005%, saccharose à 50%. L'électrophorèse est effectuée à 90V pendant 4 h (ECHARDT, 1979).

4-2 Méthode de dénaturation par la chaleur

Sur une culture de 30 ml de bactéries (dans du milieu + ampicilline), 10 ml sont prélevés et centrifugés 10 mn, à 6000 rpm, à 4°C. Le culot de bactéries est resuspendu dans 700 µl de tampon STET (Saccharose 8% ; Triton X100 à 5% ; EDTA 50 mM ; Tris-HCl 50 mM ; pH 8), traité par 40 µl d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml, puis chauffé 40 sec à 100°C. Après centrifugation à 10000 rpm, 15 mn, l'ADN en solution dans le surnageant est précipité par 1 Vol d'isopropanol 10 mn, à -70°C, centrifugé et séché. Après remise en solution, l'ADN est dialysé et analysé à l'aide d'endonucléases de restriction par électrophorèse en gel d'agarose.

4-3 Méthode de "mini-préparation" (SERGHINI et al., 1989)

A partir de 1,5 ml de culture de bactéries centrifugées 10 mn, 6000 rpm, à 4°C, le culot est repris dans 50 µl de TNE (Tris-HCl 10 mM ; NaCl 100 mM ; EDTA 1 mM ; pH8). Les protéines sont éliminées par une extraction phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). Les 50 µl de phase aqueuse sont précipités par l'acétate d'ammonium 2 M final avec 2 Vol d'éthanol froid 15 mn dans la glace.

L'ADN est alors centrifugé 10 mn, lavé par l'éthanol à 70% et redissous après séchage dans 25 µl d'eau. Il peut ensuite être digéré par des enzymes de restriction. Les ARN sont hydrolysés par la ribonucléase A (50 µg/ml) avant les dépôts sur gel d'agarose.

5- Purification de plasmides

Les plasmides sont amplifiés dans E. coli (HB101). 1 ml de cette culture est dilué dans 200 ml de milieu LB contenant 50 µg/ml d'ampiciline et incubé à 37°C sous agitation pendant 18 h. Les bactéries sont centrifugées 10 mn à 6000 rpm à 4°C en rotor A6-14 de Kontron. Le culot est resuspendu dans 2,5 ml de Tris-HCl 50 mM, pH8 ; saccharose 25%. Les bactéries sont placées à 0°C, on ajoute d'abord 1 ml de lysozyme à 10 mg/ml dans le tampon Tris-HCl 50 mM, pH8 ; puis, après 10 mn, 1 ml d'EDTA 0,2 M, pH8. Au bout de 10 mn, la lyse est complétée par addition de 4,5 ml d'une solution de Tris-HCl 50 mM ; EDTA 20 mM ; Triton X100 0,1% ; pH8. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 35000 rpm pendant 30 mn à 4°C dans un rotor SW41 Beckman. 9 ml de surnageant sont mélangés avec 9 g de CsCl et 90 µl de BrEt à 5 mg/ml. La centrifugation 20 h à 16°C à 55000 rpm en TTF65 Kontron permet d'obtenir la bande d'ADN plasmidique visualisée par le BrEt.

La bande d'ADN ponctionnée à travers le tube est purifiée 2 à 3 fois par l'isopropanol (V/V) pour éliminer le BrEt. Les plasmides sont alors dialysés contre Tris-HCl 10 mM ; EDTA 1 mM pH8. La mesure de la D.O. à 260 nm permet une évaluation de la concentration en ADN (D.O.260 = 0,21 --> 10 µg/ml d'ADN).

III- Préparation de protéines

1- Purification de protéine fusionnée produite par E.coli N4830

L'obtention de la protéine de fusion grâce à un plasmide contenant le promoteur pL de Lambda a lieu dans la souche N4830 d'E. coli.

La culture dans le milieu LB (+ ampiciline 50 µg/ml) sous 200 ml est mise en agitation à 30°C jusqu'à une D.O. à 580 nm de 0,5. Un choc thermique de 2 h à 42°C est alors effectué et déréprime la production de la protéine de fusion par inactivation du répresseur cI 857 de Lambda.

Les bactéries sont centrifugées 10 mn à 6000 rpm à 4°C le protocole de la préparation des plasmides est appliqué au culot. Après une centrifugation dans le rotor SW41 (Beckman) de 30 mn à 35000 rpm à 4°C, le surnageant est récolté et dialysé contre du tampon Tris-HCl 10 mM ; EDTA 1 mM ; NaCl 50 mM ; pH 7,6 contenant les inhibiteurs de protéases PMSF (fluorure de phényl méthyl sulfonyl) et TPCK (L-1-chloro-3-tosyl-amido-4-phényl-2-butanone) 2 mM. Il est ensuite précipité au sulfate d'ammonium 40% puis 60% final. Les culots obtenus après centrifugation de 10 mn à 6000 rpm à 4°C sont suspendus dans le tampon TS (Tris-HCl 50 mM ; NaCl 150 mM ; PMSF 2 mM ; TPCK 2 mM ; pH 7,6) et dialysés contre ce même tampon 2 à 16 h à 4°C. Chaque suspension est ensuite injectée sur une colonne d'IgG sépharose 6 Fast Flow (Pharmacia) préalablement rincée successivement par 2 à 3 volumes de TST (TS + 0,05% Tween 20), d'acide acétique (AcH) 0,5M, pH 3,4 ; TST ; AcH 0,5 M, pH 3,4 et une dernière fois par TST. Après injection de l'échantillon, la colonne est mise en circuit fermé 16 h à très faible débit. Elle est ensuite rincée par 10 à 20 volumes de TST (jusqu'à une D.O. à 280 nm de 0 à la sortie). L'élution se fait par AcH 0,5 M, pH 3,4 et des fractions de 1,5 ml sont récoltées sur Tris 3M, pH 11. Toutes ces étapes ont lieu à 4°C. Le pic d'élution de la protéine est suivi par la mesure de la D.O. à 280 nm, les fractions les plus concentrées sont ensuite dialysées contre de l'eau avec PMSF et TPCK avant d'être lyophilisées.

2- Fractionnement de protéines de cellules eucaryotes

Les cellules HeLa infectées ou non, sont décollées par le versène (EDTA 3 mM ; NaCl 137 mM ; Na₂HPO₄-2H₂O 16 mM ; KCl 2,7 mM) et centrifugées 10 mn à 2000 rpm à 4°C. Les culots sont lavés dans le PBS (Na₂HPO₄ 16mM ; NaH₂PO₄ 4 mM, pH7,3 ; NaCl 150 mM ; CaCl₂, 7mM) puis resuspendu dans le tampon RSB (Tris-HCl 10 mM ; NaCl 10 mM ; MgCl₂ 1,5 mM ; pH7,5) à raison de 750 µl pour 40 X10⁶ cellules. Après 4 mn à 0°C les cellules sont cassées dans un appareil de Dounce et 0,25 M final de saccharose sont ajoutés. Une centrifugation de 10 mn à 1000 rpm à 4°C permet de séparer deux fractions : le surnageant formé du cytoplasme et le culot formé des noyaux. Ces derniers sont resuspendus dans 1 ml de RSB et passés aux ultrasons 30 sec. Les deux fractions (cytoplasme et noyaux) sont centrifugées 10 mn à 12000 rpm à 4°C et les surnageants et culots sont à nouveau séparés.

Le surnageant de cytoplasme (1 ml) est appelé "cytosol", le culot repris dans 1 ml de RSB est appelé "membrane plasmique" le surnageant de noyau (1 ml) est le "noyau-sol" et le culot (resuspendu dans 1ml de RSB) la "matrice nucléaire".

IV- Production de séra

1- Le sérum monoclonal anti-V

Ce sérum produit par LUNT et al. (1988) est un don généreux du Dr. FLINT à qui nous adressons ici nos plus vifs remerciements.

2- Immunisations

La protéine fusionnée obtenue après élution de la colonne d'IgG-sépharose Fast Flow (Pharmacia) et lyophilisation est resuspendue dans le PBS. 250 µg sont injectés aux lapins, par voie intradermique, mélangés V/V avec de l'adjuvant complet de FREUND. Les injections de rappel dans l'adjuvant incomplet de FREUND ont lieu tous les 10 jours jusqu'à ce que le sérum soit assez puissant.

3- Récolte des séra et concentration des IgG

Les prélèvements de sang des lapins sont placés 30 mn à 37°C afin d'obtenir un coagulat séparé du plasma par une centrifugation douce de 20 mn à 400 rpm. Les protéines du plasma sont ensuite précipitées par 50% final de sulfate d'ammonium, pH 7,4 à 4°C sous agitation douce de 4 à 16 h. Après une centrifugation de 20 mn à 6000 rpm à 4°C, le culot est lavé 3 fois par du sulfate d'ammonium à 33%, pH 7,4. Le culot restant contenant principalement les IgG est suspendu et dialysé contre du PBS avec 2 mM de PMSF et de TPCK. Des aliquots de 200 µl sont conservés à -40°C.

V- Techniques immunologiques

1- Immunotransfert ou Western Blot

Le transfert de protéines d'un gel de polyacrylamide sur une

feuille de nitrocellulose se fait dans le tampon suivant : Tris 25 mM ; glycolle 192 mM ; méthanol 20% ; pH 8,9. Il dure 4 h, sous réfrigération.

La feuille de nitrocellulose est saturée en lait (lait 5% en tampon Tris salin : 10 mM Tris ; 150 mM NaCl ; pH 7,4), à 45°C pendant 1 h. Le tampon est alors renouvelé et le sérum est ajouté, après dilution variant du 1/5000 au 1/1000 suivant indication, pour un temps d'incubation de 16 h à température ambiante. Le transfert est lavé quatre fois 10 mn, par du tampon Tris salin, deux des lavages comportant du Tween 0,1%. Les anticorps fixés sur la feuille de nitro-cellulose sont révélés par des anticorps anti-lapin marqués à la peroxydase.

La feuille de nitrocellulose peut également être saturée 1 h à 45°C dans le tampon TBS/Tween/lait (Tris 50 mM ; glycolle 192 mM ; pH7,5/Tween 0,05%/lait 0,5%). Le sérum est ajouté comme précédemment après renouvellement du même tampon puis le transfert est lavé à température ambiante dans TBS/Tween/lait 10 mn et TBS/Tween 2 fois 10 mn.

10 µl de protéine A marquée à la ³⁵S Met (Amersham) sont alors mis au contact de la feuille de nitrocellulose sous 10 ml de TBS/Tween/lait. Après 3 lavages dans TBS/Tween et un dans TBS, le transfert est rapidement séché et mis au contact d'un film photographique Kodak X-OMAT 100, 16 h à -70°C.

2- Purification du sérum sur nitrocellulose

La protéine contre laquelle le sérum doit être purifié est résolue dans un gel de polyacrylamide-SDS à 12% en un seul dépôt avec peigne préparatif. Après électro-transfert, deux bandelettes témoin sont découpées de chaque côté de la feuille de nitrocellulose et mises au contact du sérum à purifier au 1/1000. La révélation par des anticorps anti-IgG de lapin marqués à la peroxydase permet de localiser la bande de protéine recherchée sur toute la largeur de la feuille et de la découper en petits morceaux. La fraction IgG concentrée à purifier est ensuite mise au contact de la nitrocellulose découpée, 16 h à température ambiante en agitation douce.

La nitrocellulose est lavée 5 fois 10 mn dans du Tris salin ; 5% lait ; 0,02% azide de sodium, puis 10 mn dans Tris salin. Les anticorps accrochés à la nitrocellulose sont élués par 700 µl de glycine 0,2 M, pH 2,3, 5 mn à 0°C et neutralisés par 40 µl de Tris 3 M ; pH 11. 2 mM de PMSF et de TPCK sont ajoutés. Les aliquots de ce sérum purifiés sont conservés à -40°C.

3- Immunofluorescence indirecte

Les cellules HeLa ou BRK sont mises en culture sur lamelle de verre stérilisée (3,1 cm X 1 cm) en flacon de verre bouché et infectées par 20 à 50 pfu selon indication à 50 % de confluence. L'infection est stoppée par lavage dans 2 ml de PBS (5 à 6 lavages de 5 mn) à température ambiante. Les cellules sont fixées par 1 ml de solution de paraformaldéhyde 3% dans du PBS contenant 0,1 mM de CaCl₂ et MgCl₂, 20 mn à température ambiante. Elles sont ensuite lavées 3 fois par 2 ml de PBS et placées 10 mn dans 2 ml de NH₄Cl 50 mM dans PBS. Après 3 nouveaux lavages dans PBS les cellules sont perméabilisées par le Triton X-100 ; 0,1% dans PBS pendant 4 mn puis relavées 3 fois dans 2 ml de PBS. Une saturation de 16 h à 4°C avec un sérum décomplémenté provenant de l'animal ayant produit le deuxième immunsérum (marqué à la fluorescéine) est effectuée : les lamelles sont mises au contact du PBS contenant 0,5% de SAB (sérum albumine bovine) et 5% de sérum de chèvre ou de mouton. Elles sont ensuite prêtes à recevoir l'anticorps spécifique utilisé non dilué dans le cas d'un sérum purifié comme précédemment ou dilué au 1/500 ou 1/1000 dans PBS ; 0,5% SAB. Le contact anticorps-cellules se fait à 37°C pendant 2 à 4 h. Les lamelles sont ensuite lavées 5 fois 5 mn dans 2 ml de PBS à température ambiante et mises au contact de l'immunsérum anti-IgG de lapin FITC (conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine). Elles sont ensuite à nouveau lavées 5 fois dans 2 ml de PBS et retournées sur des lames porte-lamelles sur lesquelles 10 µl de DABCO/glycérol (WOLOSEWICK, 1986) ont été déposés afin de préserver la fluorescence. Les lames sont analysées sous microscope à fluorescence Olympus BH-2.

VI- Culture cellulaire

1- Cellules en culture monocouche

1-1 Lignées continues

Les cellules HeLa sont cultivées dans des flacons (FALCON de 75 cm²), 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 ; Na₂HPO₄ 16 mM ; KCl 2,7 mM- trypsine 1 mg/ml) sont multipliées deux fois par semaine ou réparties en flacons, boîtes de Pétri (FALCON), lamelles, selon besoin.

1-2 Cultures primaires

Les cellules BRK sont mises en culture après traitement à la trypsine-PSA (2,5 μ g/ml - KCl 5,4 mM ; NaCl 137 mM ; NaHCO₃ 4,2 mM ; glucose 5,5 mM ; rouge de phénol 5 mg/l ; pH 7,5 ; pénicilline 75000 u/ml ; streptomycine 50 mg/ml ; fungizone 5 μ g/ml). Les cellules, centrifugées à 20°C, 5 mn à 1000 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 cm²) et incubées à 37°C.

2- Cellules en suspension

Les cellules KB₃ 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.

3- Obtention de lignées continues

3-1 Sélection au G418

Les cellules HeLa sont réparties en boîtes de Pétri (FALCON) de 60 nm de diamètre à raison de 5×10^6 cellules par boîte.

Elles sont transfectées (voir ci-dessous) à 70% de confluence par 20 µg d'ADN contenant le gène de résistance néo à l'antibiotique G418. 5 h après transfection, les cellules sont décollées au versène et réparties en 3 boîtes (1 boîte mère et 2 boîtes filles). Le milieu de culture est ensuite changé tous les 5 jours avec 400 µg/ml de G418 jusqu'à apparition des foyers de résistance.

3-2 Etablissement des lignées

Les clones cellulaires résistants à l'antibiotique sont prélevés à la pipette Pasteur après avoir été placés dans le versène 10 mn et repris dans des boîtes multi-cuvettes de FALCON (96 cuvettes de 0,6 cm de diamètre) quand les cellules sont à confluence, elles sont réparties dans 3 cuvettes. Les cellules à confluence de ces 3 cuvettes sont ensuite mises dans une cuvette de diamètre plus important (1,4 cm) et "montées" ainsi dans des récipients de plus en plus grands jusqu'au flacon (FALCON) de 75 cm².

A partir de la cuvette de diamètre 1,4 cm, la G418 n'est plus ajoutée dans le milieu de culture.

VII- Transfections dans les cellules HeLa et BRK

La transfection a lieu dans les cellules à 70% de confluence. La méthode, dérivée de celle décrite par GRAHAM et VAN DER EB (1973), consiste en une précipitation de l'ADN avec du phosphate de calcium.

Environ 10 à 20 µg d'ADN sont mis dans 250 µl de tampon CaCl₂ 62,5 mM et mélangés avec 250 µl d'HBS X 2 (NaCl 0,28 M ; Hépès 50 mM ; Na₂HPO₄ 1,3 mM ; pH 7,1). Après 30 mn de contact à température ambiante, le précipité est versé directement dans le milieu de culture.

Le milieu est renouvelé au bout de 5 h pour les HeLa ou 16 h pour les BRK et les cellules sont placées à 37°C (avec 5% de CO₂ pour les cellules en boîte de Pétri) jusqu'à apparition des foyers de résistance au G418 (HeLa) ou de transformation (BRK) (le milieu étant alors renouvelé régulièrement).

VIII- Techniques virales

1- Infection

1-1 Cellules HeLa en monocouche

Les cellules HeLa réparties en boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre (FALCON) sont infectées par 5 à 50 pfu par cellule d'adénovirus sous 0,2 ml de milieu DULBECCO (Flow) sans sérum et laissées 1 h à 37°C dans une étuve à 5% de CO₂. 5 ml de milieu DULBECCO contenant 2,5% de sérum de veau foetal et 2,5% de sérum de veau nouveau-né irradié (Flow) sont alors ajoutés dans les boîtes. L'infection sera arrêtée 3 à 30 h après selon indication par lavage au PBS. La même méthode est utilisée pour d'autres supports (Flacons FALCON ou lamelles pour microscope) sans que l'étuve à CO₂ soit nécessaire dans ce cas.

Pour les adénovirus mutants thermosensibles (ts) les étapes de multiplication et de production ont lieu à 33°C (température permissive) et les cellules sont placées à 40°C quand la mutation virale doit s'exprimer (température restrictive).

1.2 Cellules KB3 en suspension

Les cellules, à la concentration de $4,5 \times 10^5$ cellules/ml, sont centrifugées à 2000 g, 10 mn, 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'absorption virale à 37°C, sous agitation, la suspension cellulaire est diluée 20 fois dans du milieu F13 contenant 2% de sérum de veau et laissée 40 h en agitation à 37°C.

Pour la production les mutants ts la température requise est de 33°C.

2- Purification de virus

Le cycle viral se déroule pendant 40 h à 37°C (ou 96 h à 33°C). Les cellules KB₃ en suspension infectées sont alors centrifugées à 2000 g 10 mn, 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 3000 rpm 10 mn, à 4°C. La phase aqueuse est reprise, déposée sur un coussin de CsCl de densité (d) 1,43 et centrifugée 1 h à 25000 rpm, à 4°C, dans un rotor SW41 de Beckman. 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 35000 rpm, 16 h, à 4°C, dans un rotor TST60 de Kontron. La bande de particules virales est récoltée, diluée dans du glycérol (V/V) et titrée avec un immunsérum anti-adénovirus selon la technique du nombre de foyers fluorescents (THIEL and SMITH, 1967).

3- Titration par le nombre de foyers fluorescents

Les cellules HeLa sont infectées par 0,2 ml de suspension virale de plus en plus diluée. 40 h après infection, les cellules sont fixées par une solution de méthanol/PBS (95 : 5 V/V). Après plusieurs lavages dans le tampon PBS, les cellules sont incubées avec du sérum anti-virus total dilué au centième pendant 30 mn. Après plusieurs lavages à l'eau physiologique, les cellules infectées liées aux anticorps anti-virus sont révélées par un sérum fluorescent de chèvre anti-IgG de lapin. Le nombre de foyers fluorescents lus en lumière ultra-violette sous microscope Olympus BH2 permet de déduire le titre de la suspension virale de départ.

4- Production de virus par plages de lyse

4-1 Transfections

Les cellules HeLa sont réparties en boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre (FALCON) et sont transfectées à 70% de confluence par 10 µg d'ADN contenant toute l'information virale.

Au bout de 16 h, le milieu de culture est retiré et remplacé par un mélange Vol/Vol d'agar noble fondu à 1,5% (Difco) et de DULBECCO 2 fois concentré contenant 4 mM Arg ; 2 mM Gln ; 2 mM MgCl₂ Fungizone 1 ml/litre et 5% de sérum de veau nouveau-né irradié,

à 37°C. Les boîtes sont placées dans l'étuve à CO₂ 5% et l'apparition de plages de lyse est obtenue au bout de 8 à 10 jours.

4-2 Amplification et analyse rapide de l'ADN viral

Les plages de lyse apparues en gélose molle sont reprises à la pipette Pasteur dans 0,5 ml de Tris hypotonique et soumises à 3 cycles de congélation-décongélation (-70°C/ 37°C).

0,2 ml de suspension sont alors mis sur cellules (HeLa ou autre suivant indication) en boîte de Pétri de 60 mm et laissés 14 h à 37°C dans une étuve à 5% de CO₂. 5ml de milieu DULBECCO à 2,5% de sérum de veau foetal et 2,5% de sérum de veau nouveau-né irradié sont versés dans les boîtes qui sont laissées de 40 à 72 h à 37°C jusqu'à apparition de l'effet cytopathique sur les cellules.

Pour l'analyse rapide de l'ADN viral une technique de HIRT (1967) modifiée par WADELL et DE JONG (1980) est employée : les cellules infectées (5×10^6 cellules) sont récoltées et centrifugées à 1800 rpm, 10 mn, 4°C. Les culots sont lavés 2 fois au PBS et resuspendus dans 450 µl de Tris-HCl 10 mM ; EDTA 10 mM ; pH 7,4, dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. 0,6% de SDS sont ajoutés et les tubes sont laissés 10 mn à température ambiante puis 5 mn à 68°C. La protéinase K (50 µg/ml) est alors ajoutée et agit 1 h à 37°C. 160 µl de NaCl 5 M (soit 1 M final) sont additionnés goutte à goutte avec agitation douce de 10 mn et les tubes sont mis à 4°C pour 16 h.

Après centrifugation de 1 h à 12000 rpm à 4°C le surnageant est repris et subit 3 extractions au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) puis 3 extractions au diéthyle oxyde. L'ADN viral en phase aqueuse est ensuite précipité à -70°C, 20 mn avec NaCl 0,3 M final, centrifugé à 12000 rpm, 4°C pendant 20 mn, séché et repris dans 200 µl d'eau. 50 µl sont ensuite dialysés contre de l'eau et l'ADN est prêt à être digéré par les enzymes de restriction. Après action de la ribonucléase A (50 µg/ml) 15 mn à 37°C les échantillons sont déposés sur gel d'agarose à 0,6% avec BrET. La migration a lieu 6 h à 70V.

5- Purification de l'ADN viral

5-1 Complexe ADN-protéine terminale (PT)

L'ADN lié à la protéine terminale (55 kDa) est purifié sur colonne de BND-cellulose (Serva). Les particules virales purifiées en

CsCl, sont dialysées contre du tampon TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,1 ; EDTA 1 mM) et les capsides sont rompues par 1 volume de chlorure de guanidine 8 M (dans le tampon TE). La solution est placée dans le CsCl 3,06 M final ($d = 1,7$) et centrifugée 40 h à 40000 rpm à 16°C dans un rotor TST60 (Kontron). Des fractions de 0,5 ml sont collectées par le fond du tube et dialysées contre du TE contenant 2 mM PMSF et 2 mM TPCK.

Les fractions contenant l'ADN-TP sont repérées au BrET et purifiées sur résine BND-cellulose équilibrée en TE, 0,3 M chlorure de lithium (LiCl). L'ADN-TP, fragmenté par les enzymes de restriction suivant indication, est injecté sur la colonne qui est lavée à faible débit par TE, 0,3 M LiCl afin de permettre au complexe de se lier à la colonne. Les étapes d'élution successives sont : 20 ml de TE, LiCl 1 M, SDS 0,1% qui décrochent l'ADN double brin sans protéine terminale, 20 ml de TE, LiCl 1 M, SDS 0,1%, caféine 2% qui éliminent l'ADN simple brin et l'élution enfin a lieu par 20 ml de TE, urée 8 M, SDS 1%. Des fractions de 1 ml sont récoltées à ce moment et dialysées contre du TE (+ PMSF + TPCK) avant d'être précipitées à l'éthanol (0,3 M NaCl, 2,5 Vol d'éthanol froid).

5-2 ADN viral nu

Les particules virales sont dialysées contre du TE 2 h. La solution subit un traitement à la protéinase K (100 µg/ml) et sarcosinate de sodium 0,5% 2 à 3 h à 37°C. La solution limpide et visqueuse obtenue est équilibrée en CsCl (2,545 g/ 2 ml de solution) et centrifugée 40 h à 44000 rpm à 16°C en rotor TST60 Kontron. La récupération de la bande d'ADN viral se fait par le fond du tube de polyallomère en collectant des fractions de 0,5 ml. Les fractions contenant l'ADN (reperées au BrET) sont dialysées contre du TE, pH 8,1.

IX- Analyse de l'ADN et des ARN cellulaires et viraux

1- l'ADN

1-1 Purification d'ADN cellulaire

Les cellules HeLa (ou autre suivant indication) en flacon de 175 cm² (Falcon) soit 40 X 10⁶ cellules, sont lavées au PBS, décollées au versène, et centrifugées 10 mn à 1800 rpm à 4°C. Les culots sont

repris dans 2 ml de tampon Tris-HCl 10 mM ; EDTA 1 mM ; 2 X SSC ; pH 7,4 (20 X SSC : NaCl 3 M ; Na₃ citrate 2H₂O, 0,3 M ; pH 7) et 0,5% de sarcosinate de sodium sont ajoutés. Les protéines sont digérées par la protéinase K à 500 µg/ml 2 fois 1 h à 37°C. La solution limpide et visqueuse est mise dans le CsCl (2 ml de solution dans 2,545 g de CsCl soit d=1,7) et centrifugée 40 h à 44000 rpm à 16°C dans le TST60 Kontron. L'ADN cellulaire est récolté par fractions de 0,5 ml par le fond du tube et dialysé contre le TE, pH8,1.

1-2 Transfert et hybridation

1-2-1 Transfert (Southern Blot)

L'ADN est digéré par les enzymes de restriction et déposé sur gel d'agarose. Pour dénaturer les fragments d'ADN, le gel est placé dans NaOH 0,5M et NaCl 1,5M. Après neutralisation avec Tris-HCl 0,5M ; NaCl 3M ; pH7,5, le transfert sur membrane de nitro-cellulose est réalisé par capillarité, en présence de SSC 10X (NaCl 1,5 M ; citrate de sodium 0,15 M ; pH 7). La membrane est lavée dans SSC 2X et soumise à une température de 80°C 2 à 3 h afin d'y fixer par covalence l'acide nucléique transféré.

1-2-2 Préparation de la sonde radioactive et hybridation

L'ADN plasmidique (25 ng) linéarisé par un enzyme de restriction est dénaturé 10 mn à 100°C et placé dans la glace. Le marquage selon le protocole "Random Primed Labelling Kit" de Boehringer (Cat n°100460) a lieu comme suit :

3 µl de dATP dGTP et dTTP sont ajoutés ainsi que 2 µl de tampon de réaction et 2 µl de (α ³²P) dCTP à 3000 Ci/mmol (Amersham) et 1 µl d'ADN polymérase I, fragment de Klenow. Après incubation de 30 mn à 37°C la réaction est stoppée par l'EDTA 0,2 M, pH 8 (2 µl). La sonde radioactive est séparée des nucléotides non incorporés par passage à travers une colonne de DEAE-Séphadex (Nick-Column, Pharmacia) et peut être mise au contact de la membrane de nylon contenant l'ADN et préalablement mise dans une solution de préhybridation 4 h à 68°C (6X SSC ; 0,5% SDS ; Ficoll 0,1% ; polyvinyl pyrrolidone 0,1% ; SAB 0,1% ; 100 µg/ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé par le chaleur).

L'hybridation a lieu 16 h à 68°C en sac scellé. La membrane est ensuite lavée 10 mn à température ambiante par une solution 2X SSC ; SDS 0,5% puis 15 mn à température ambiante en 2X SSC ; SDS 0,1% et enfin plusieurs fois 10 mn à 68°C dans 0,1X SSC ; 0,5% SDS. Elle peut être mise directement (dans un sac scellé) au contact d'un film photographique KODAK X-OMAT 100 à -70°C.

2- L'ARN

2-1 Purification d'ARN de cellules infectées ou non

Toutes les solutions sont traitées au diéthylpyrocarbonate (0,1%), 16 h à température ambiante et autoclavées, 2 h à 120°C.

Les cellules (40×10^6) en flacon de 75 cm² sont lavées par du sérum physiologique et mises au contact de 6 ml de tampon GT (isothiocyanate de guanidine 4 M ; tri-sodium citrate 5 mM ; β -Mercaptoéthanol 1 mM ; sarcosinate de sodium 0,5 % ; pH 5,2). La solution visqueuse est reprise au bout de 5 mn à température ambiante, passée 5 à 6 fois au travers d'une aiguille de 0,8 mm de diamètre puis déposée sur 3,2 ml de CsCl 5,7 M (dans EDTA 0,1 M ; pH 7,5) dans un tube de polyallomère. Après une centrifugation de 16 h à 30000 rpm à 20°C en rotor SW41 de Beckman, le culot obtenu est repris par 300 μ l de TES (Tris HCl 10 mM ; EDTA 5 mM ; SDS 1% ; pH 7,5).

La phase aqueuse subit une extraction au butanol/chloroforme (4/1) et une précipitation de 20 mn à -70°C par 0,3 M d'acétate de sodium et 2 Vol d'éthanol. Après centrifugation de 20 mn à 12000 rpm et lavage du culot, l'ARN peut être resuspendu dans l'eau ou conservé dans l'éthanol à -20°C.

2-2 Analyse en protection de la digestion aux ribonucléases A et T1

2-2-1 Obtention des sondes radioactives

Les sondes de haute radioactivité spécifique sont préparées par clonage de la séquence à analyser en aval du promoteur du phage SP6 dans les plasmides pSP64 ou 65 (Pharmacia). Le plasmide est clivé par

un enzyme de restriction et l'ARN transcrit par la polymérase du phage SP6 en présence des 3 nucléotides non radioactifs et de l' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP}$. De l'UTP non radioactif est ajouté pour une meilleure homogénéité des sondes.

2-2-2 Hybridation et digestion aux ribonucléases A et T1

5×10^5 cpm d'ARN radioactif (ARN^{*}) sont mis au contact de 2 à 150 µg d'ARN cellulaires totaux (selon indication) dans un tampon formamide 80% ; pipès 50 mM : NaCl 0,4 M ; EDTA 1 mM ; pH 6,4 et laissés 16 h de 45°C à 55°C selon indication.

Les hybrides ARN-ARN^{*} sont placés dans le mélange Tris-HCl 10 mM ; EDTA 5 mM ; NaCl 0,5 M ; pH 7,6 contenant 40 µg/ml de ribonucléase A et 2 µg/ml de ribonucléase T1 et incubés 1 h à 37°C. 20 µl de SDS 10% et 5 µl de protéinase K à 10 mg/ml sont alors ajoutés. Après 20 mn d'incubation à 37°C, une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) est effectuée et la phase aqueuse est précipitée à l'éthanol. Après centrifugation et séchage, les culots sont repris soit en milieu dénaturant (Tris-HCl 10 mM, pH 8 ; 0,1% SDS ; 97% formamide ; 0,01% xylène cyanol ; 0,005% BBO) et analysés en gel de polyacrylamide 8% à 12% avec urée (7 M) soit en milieu non dénaturant (Tris-HCl 10 mM ; pH 8 ; EDTA 1 mM ; 0,01% xylène cyanol ; 0,005% BBO) (SHEN-ONG, 1987) et analysés en gel de polyacrylamide 8% à 12% (rapport acrylamide/bis : 29/1).

Les films KODAK X-OMAT 100 sont révélés après 16 h d'impression à -70°C.

2-3 Analyse en Polymerase Chain Reaction (P.C.R.)

La technique de P.C.R. (ERLICH et al., 1988 ; SAIKI et al., 1988) est effectuée sur 2 à 10 µg d'ARN totaux après qu'une copie d'ADNc ait été obtenue grâce à la transcriptase inverse de M-MLV.

L'ARN à analyser est placé dans un tube Eppendorf de 0,5 ml avec 2 µl de chacune des diverses amorces utilisées (à 300 ng/ml), 1 µl de SAB (1 mg/ml), 1,5 µl du mélange des 4 désoxyribonucléotides (25 mM chacun), 1 µl de tampon M-MLV 5 x (Tris-HCl 250 mM ; pH 8,3 ; KCl 375 mM ; MgCl₂ 15 mM ; DTT 50 mM). Le volume est ajusté à 9,5 µl, le mélange est chauffé 10 mn à 65°C et 0,5 µl (100 unités) de

transcriptase inverse de M-MLV (BRL) sont ajoutés. Après une incubation de 1 h à 37°C le milieu réactionnel est dilué 10 fois, 10 µl de tampon Taq polymérase (Bioexcellence) 10x sont ajoutés ainsi que 0,2 µl d'enzyme Taq polymérase (Bioexcellence) à 1 unité/µl. 100 µl d'huile minérale (Sigma) sont placés au-dessus du mélange réactionnel.

Un cycle de dénaturation de 7 mn à 92°C, 2 mn à 54°C et 2 mn à 72°C est suivi de 29 cycles d'amplification (2 mn à 92°C, 2 mn à 54°C, 2 mn à 72°C). Les produits d'amplification sont déposés sur gel d'agarose à 2% avec BrET. La migration a lieu 4 h à 70V.

X- Technique de liaison in vitro de protéines à l'[\alpha-³²P]-GTP

La technique utilisée est celle de LAPETINA et REEP (1987).

Les protéines dont on veut tester la capacité de liaison aux NTP sont séparées sur gel de polyacrylamide SDS à 12% ou 15% dans le tampon Tris-glycocolle-SDS (cf §I-2-2) et le gel est transféré électriquement sur nitrocellulose (cf §V-1).

La feuille de nitrocellulose est lavée dans le tampon de liaison (BB) : Tris-HCl 50 mM ; 0,3% Tween 20 ; MgCl₂ 5 mM ; EGTA 1 mM ; pH 7,5), 2 fois 20 mn est incubée 60 à 90 mn ou 16 h à température ambiante sous agitation douce avec [\alpha-³²P]-GTP (1 µCi/ml, 3000 Ci/mmol NEN) dans le BB sous 10ml. La feuille est ensuite lavée plusieurs fois (5 à 6 lavages de 10 mn) dans le BB puis séchée et autoradiographiée sur film Kodak X-OMAT 100, 16 h à -70°C.

BIBLIOGRAPHIE

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

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

Nature, 292, 420.

ALBRECHT, G., DEVAUX, B., and KEDINGER, C. (1988).

Genomic footprinting detects factors bound to major late and IVa2 promoters in adenovirus-infected HeLa cells.

Mol. Cell. Biol., 8, 1534.

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

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

Cell, 19, 671.

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

Processing of adenovirus 2-induced proteins.

J.Virol., 12, 241.

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

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

Cell, 26, 371.

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

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

J.Virol., 46, 454.

BABISS, L.E., GINSBERG, H.S., and DARNELL, J.E. Jr. (1985).

Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport.

Mol. Cell. Biol., 5, 2552.

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

Messenger RNA for the Ad2 DNA Binding Protein : DNA sequences encoding the first leader and heterogeneity at the mRNA 5' end.
Cell, 18, 569.

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

Promoters and late hererogeneous 5' termini of the messenger RNAs of adenovirus serotype 2.
J. Mol. Biol., 149, 189.

BALL-OBERHAUSER, A., BEARD, C.W., REDICK, S.D., and SPINDLER, K.R. (1989).

Genome organization of mouse adenovirus type 1 early region 1 : a novel transcription map.
Virology, 170, 523.

BARBACID, M. (1987).

Ras genes.
Ann. Rev. Biochem., 56, 779.

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.

BHATTI, A.R., and WEBER, J.M. (1979).

Protease of adenovirus type 2. Subcellular localization.
J. Biol. Chem., 254, 12265.

BINGER, M.H., and FLINT, S.J. (1984).

Accumulation of early and intermediate mRNA species during subgroup C adenovirus productive infections.
Virology, 136, 387.

BOUDIN, M.L., D'HALLUIN, J.C., COUSIN, C., and BOULANGER, P.A. (1980).

Human adenovirus type 2 protein IIIa. II. Maturation and encapsidation.
Virology, 101, 144.

BOUDIN, M.L., RIGOLET, M., LEMAY, P., GALIBERT, F., and BOULANGER, P.L. (1983).

Biochemical and genetical characterization of a fiber-defective temperature-sensitive mutant of type 2 adenovirus.

EMBO J., 2, 1921.

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

Transformation by human adenoviruses.

Biochem. Biophys. Act., 780, 67.

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. O'BRIEN, S.J.

BRUNET, L.J., and BERK A.J. (1988).

Concentration dependence of transcriptional transactivation in inducible E1A-containing human cells.

Mol. Cell. Biol., 8, 4799.

CARTHEW, R.W., CHODOSH, L.A., and SHARP P.A. (1985).

An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter.

Cell, 43, 439.

CEPKO, C.L., and SHARP, P.A. (1982).

Assembly of adenovirus major capsid protein is mediated by a non virion protein.

Cell, 31, 407.

CHAMBON, P. (1975).

Eucaryotic nuclear RNA polymerases.

Ann. Rev. Biochem., 44, 613.

CHASSE, J.F., LEVRERO, M., KAMOUN, P., MINET, M., BRIAND, P. et PERRICAUDET, M. (1989).

L'adénovirus : vecteur de thérapie génique?

Med. Sci., 5, 331.

CHINNADURAI, G., CHINNADURAI, S., and BRUSCA, J. (1979).
Physical mapping of a large plaque mutation of adenovirus type 2.
J. Virol., 32, 623.

CHOW, L.T., and BROKER, T.R. (1978).
The spliced structures of adenovirus 2 fiber message and the other late
mRNAs.
Cell, 15, 497.

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.

COHEN, S.N., CHANG, A.C.Y., and HSU, L. (1972).
Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria genetic transformation
of E. coli by R factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110.

COLBERE-GARAPIN, F., HORODNICEANU, F., KOURILSKY, P., and
GARAPIN, A.C. (1981).
A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells.
J. Mol. Biol., 150, 1.

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.

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

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.

DELSERT, C., MORIN, N., and KLESSIG, D.F. (1989).

Cis-acting elements and a transacting factor affecting alternative splicing of adenovirus L1-transcripts.

Mol. Cell. Biol., 9, 4364.

D'HALLUIN, J.C., MILLEVILLE, M., BOULANGER, P., and MARTIN, G.R. (1978a).

Temperature sensitive mutant of adenovirus type 2 blocked in virion assembly. Accumulation of light intermediate particles.

J. Virol., 26, 344.

D'HALLUIN, J.C., MARTIN, G.R., TORPIER, G. and BOULANGER, P.A. (1978b).

Adenovirus type 2 assembly analyzed by reversible cross-linking of labile intermediates.

J. Virol., 26, 357.

D'HALLUIN, J.C. (1980).

Génétique de l'adénovirus.

Bulletin de l'Institut Pasteur, 78, 347.

D'HALLUIN, J.C., COUSIN, C., and BOULANGER, P.A. (1982).

Physical mapping of adenovirus type 2 temperature-sensitive mutations by restriction endonuclease analysis of interserotypic recombinants.

J. Virol., 41, 401.

DOERFLER, W., GAHLMANN, R., STABEL, S., DEURING, R., LICHTENBERG, U., SCHULZ, M., EICK, D., and LEISTEN, R. (1983).

On the mechanism of recombination between adenoviral and cellular DNAs : the structure of junction sites.

Current Topics in microbiology and immunology. The molecular biology of adenoviruses. 109, 193. Ed. DOERFLER, W.

ECHARDT, T. (1979).

A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria.

Plasmid, 1, 584.

EDVARDSSON, B., EVERITT, E., JORNVALL, H., PRAGE, L., and PHILIPSON, L. (1976).

Intermediates in adenovirus assembly.

J. Virol., 19, 533.

ENGLER, J.A., and VAN BREE, M.P. (1982).

The nucleotide sequence of the gene encoding protein IVa2 in human adenovirus type 7.

Gene, 19, 71.

ENSINGER, M., and GINSBERG, H.S. (1972).

Selection and preliminary characterization of temperature sensitive mutants of adenovirus type 5.

J. Virol., 10, 323.

ERLICH, H.A., GELFAND, D.H., and SAIKI, R.K. (1988).

Specific DNA amplification.

Nature, 331, 461.

EVANS, R.M., FRASER, N., ZIFF, E.B., WEBER, J., WILSON, M., and DARNELL, J.E. Jr. (1977).

The initiation sites for RNA transcription in adenovirus 2 DNA.

Cell, 12, 733.

EVERITT, E., SUNDQUIST, B., PETTERSSON, U., and PHILIPSON, L. (1973).

Structural proteins of adenoviruses. X : isolation and topography of molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2.

Virology, 52, 130.

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.

EZOE, H., LAIFATT, R.B., and MAK, S. (1981).

Degradation of intracellular DNA in KB cells infected with cyt mutants of human adenovirus type 12.

J. Virol., 40, 20.

FEISS, M. (1986).

Terminase and the recognition, cutting and packaging of lambda chromosomes.

Trends Genet., 2, 100.

FLINT, S.J. (1986).

Regulation of adenovirus mRNA formation.

Adv. Virus Res., 31, 169.

FROST, E., and WILLIAMS, J.F. (1978).

Mapping of temperature-sensitive and host-range mutations of adenovirus type 5 by marker rescue.

Virology, 91, 39.

FURCINATTI, P.S., VAN OOSTRUM, J., and BURNETT, R.M. (1989).

Adenovirus polypeptide IX revealed as capsid cement by difference images from electron microscopy and crystallography.

EMBO J., 8, 3563.

GILMAN, A.G. (1987).

G proteins : transducers of receptor-generated signals.

Ann. Rev. Biochem., 56, 615.

GLENN, G.M., and RICCIARDI, R.P. (1988).

Detailed kinetics of adenovirus type 5 steady state transcripts during early infection.

Virus Res., 9, 73.

GORBALENYA, A.E., and KOONIN, E.V. (1989).

Viral proteins containing the purine NTP-Binding sequence pattern.

Nucl. Acids. Res., 17, 8413.

GOTTESMAN, M.E., ADHYA, S., and DAS, A. (1980).

Transcription ant.termination by bacteriophage lambda N gene product.
J. Mol. Biol., 140, 57.

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.

GRAND, R.J.A. (1987).

The structure and functions of the adenovirus early region 1 proteins.
Biochem. J., 241, 25.

GRAND, R.J.A., SMITH, K.J., and GALLIMORE, P.H. (1987).

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.

GREEN, M., BRACKMANN, 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.

Current topics in microbiology and immunology, 109, p. 167. Ed.
DOERFLER, W.

GUGGENHEIMER, R.A., STILLMAN, B.W., NAGATA, K., TAMANOI,
F., and HURWITZ, J. (1984).

DNA sequences required for the in vitro replication of adenovirus DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3069.

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.

HASSON, T.B., SOLOWAY, P.D., ORNELLES, D.A., DOERFLER, W.,
and SHENK, T. (1989).

Adenovirus L1 52-55 kilodalton proteins are required for assembly of
virions.

J. Virol., 63, 3612.

HAYES, B.W., TELLING, G.C., MYAT, M.M., WILLIAMS, J.F., and FLINT, S.J. (1990).

The adenovirus L4 100-kilodalton protein is necessary for efficient translation of viral late mRNA species.

J. Virol., 64, 2732.

HEARING, P., SAMULSKI, R.J., WISHART, W.L., and SHENK, T. (1987).

Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome.

J. Virol., 61, 2555.

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.

HENNACHE, B., and BOULANGER, P.A. (1977).

Biochemical study of KB cells receptor for adenovirus.

Biochem. J., 166, 237.

HIRT, B. (1967).

Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures.

J. Mol. Biol., 26, 365.

HOPP, T.P., and WOODS, K.R. (1981).

Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3824.

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.

HORWITZ, M.S. (1987).

Adenoviruses and their replication.

Fundamental Virology, 563. Raven Press.

HU, S.L., and MANLEY, J.L. (1981).

DNA sequence required for initiation of transcription in vitro from the major late promoter of adenovirus 2.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 4392.

ISHIBASHI, M., and MAIZEL, J.V.Jr (1974).

The polypeptides of adenovirus.

V- Young virions, structural intermediates between top component and aged virions.

Virology, 57, 409.

JANSEN-DURR, P., MONDESERT, G., and KEDINGER, C. (1989).

Replication-dependent activation of the adenovirus major late promoter is mediated by the increased binding of transcription factor to sequences in the first intron.

J. Virol., 63, 5124.

JIMENEZ, A., and DAVIES, J. (1980).

Expression of a transposable antibiotic resistance element in Saccharomyces.

Nature, 287, 869.

JONES, N.C., and SHENK, T. (1979).

Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells.

Cell, 17, 683.

KLESSIG, D.F., and CHOW, L.T. (1980).

Incomplete splicing and deficient accumulation of the fiber messenger RNA in monkey cells infected by human adenovirus type 2.

J. Mol. Biol., 139, 221.

KLESSIG, D.F., BROUGH, D.E., and CLEGHON, V. (1984).

Introduction, stable integration and controlled expression of a chimeric adenovirus gene whose product is toxic to the recipient human cell.
Mol. Cell. Biol., 4, 1354.

KOZAK, M. (1986).

Regulation of protein synthesis in virus infected animal cells.
Adv. Vir. Res., 31, 229.

KRING, S.C., and SPINDLER, K.R. (1990).

Sequence of mouse adenovirus type 1 DNA encoding the amino terminus of protein IVa2.
Nucl. Acids Res., 18, 4003.

LAEMMLI, U.K., (1970).

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 227, 680.

LANE, D.P., and BENCHIMOL, S. (1990).

p53 : oncogene or anti-oncogene ?
Genes and development, 4, 1.

LAPETINA, E.G., and REEP, B.R. (1987).

Specific binding of (γ -³²P)-GTP to cytosolic and membrane-bound proteins of human platelets correlates with the activation of phospholipase C.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2261.

LAZARIDIS, I., BABICH, A., and NEVINS, J.R. (1988).

Role of the adenovirus 72 kDa DNA binding protein in the rapid decay of early viral mRNA.
Virology, 165, 438.

LECHNER, R.L., and KELLY, T.J. (1977).

The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules.
Cell, 12, 1007.

LEONG, K., LEE, W., and BERK, A.J. (1990).

High level transcription from the adenovirus major late promoter requires downstream binding sites for late-phase specific factors. *J. Virol.*, 64, 51.

LEWIS, J.B., ANDERSON, C.W., and ATKINS, J.F. (1977).

Further mapping of late adenovirus genes by cell-free translation of RNA selected by hybridization to specific DNA fragments. *Cell*, 12, 37.

LEWIS, J.B., and MATTHEWS, M. (1980).

Control of adenovirus early gene expression : a class of immediate early products. *Cell*, 21, 303.

LEWIS, J.B., FAHNESTOCK, M.L., HARDY, M.M., and ANDERSON, C.W. (1985).

Presence in infected cells of non-virion proteins encoded by adenovirus messenger RNAs of the major late transcription regions L0 and L1. *Virology*, 143, 452.

LOGAN, J., and SHENK, T. (1984).

Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3655.

LUCHER, L.A., SYMINGTON, J.S., and GREEN, M. (1986).

Biosynthesis and properties of the adenovirus 2 L1-encoded 52,000 and 55,000-Mr proteins. *J. Virol.*, 57, 839.

LUNT, R., VAYDA, M.E., YOUNG, M., and FLINT, S.J. (1988).

Isolation and characterization of monoclonal antibodies against the adenovirus core proteins. *Virology*, 164, 275.

LUSCHER, B., STAUBER, C., SCHINDLER, R., and SCHUMPERLI, D. (1985).

Faithful cell-cycle regulation of a recombinant mouse histone H4 gene is controlled by sequences in the 3'-terminal part of the gene.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4389.

MATSUI, T., SEGALL, P., WEIL, P.A., and ROEDER, R.G. (1980).

Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II.

J. Biol. Chem., 255, 11992.

MILLER, J.S., RICCIARDI, R.J., ROBERTS, B.E., PATERSON, B.M., and MATHEWS, M.B. (1980).

Arrangement of messenger RNAs and protein coding sequences in the major late transcription unit of adenovirus 2.

J. Mol. Biol., 142, 455.

MIYAMOTO, M.G., MONCOLLIN, V., WINTZERITH, M., HEN, R., EGLY, J.M., and CHAMBON, P. (1984).

Stimulation of in vitro transcription by the upstream element of the adenovirus 2 major late promoter involves a specific factor.

Nucl. Acids. Res., 12, 8779.

MIYAMOTO, M.G., MONCOLLIN, V., EGLY, J.M., and CHAMBON, P. (1985).

Specific interaction between transcription factor and the upstream element of the adenovirus 2 major late promoter.

EMBO J., 4, 3563.

MONCOLLIN, V., KEMPF, A., and EGLY, J.M. (1990).

The mammalian upstream element factor recognizes two sites in the adenovirus type 2 IVa2-major late promoter intergenic region and stimulates both promoters.

J. Virol., 64, 3199.

MORIN, N., and BOULANGER, P.A. (1986).

Hexon trimerization occurring in an assembly-defective 100 K temperature sensitive mutant of adenovirus 2.

Virology, 152, 11.

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.

NATARAJAN, V., MADDEN, M.J., and SALZMAN, N.P. (1985).
Positive and negative control sequences within the distal domain of the
adenovirus IVa2 promoter overlap with the major late promoter.

J. Virol., 55, 10.

NATARAJAN, V., MADDEN, M.J., and SALZMAN, N.P. (1987).
Identification of a transcription factor which interacts with the distal
domain of the adenovirus IVa2 promoter.

J. Virol., 61, 646.

NEVINS, J.R., and WINKLER, J.J. (1980).

Regulation of early adenovirus transcription : a protein product of
early region 2 specifically represses region 4 transcription.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1893.

NEVINS, J.R. (1981).

Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus
E1A gene product.

Cell, 26, 213.

OSBORNE, T., GAYNOR, R., 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.

OSBORNE, T., and BERK, A.J. (1983).

Far upstream sites for adenovirus early region 1A transcription are
utilized after the onset of viral DNA replication.

J. Virol., 45, 594.

PADGETT, R.A., GRABOWSKI, P.J., KONARSKA, M.M., SEILER, S.,
and SHARP, P.A. (1986).

Splicing of messenger RNA precursors.

Ann. Rev. Biochem., 55, 1119.

PERSSON, H., PETTERSSON, U., and MATHEWS, M.B. (1978).
Synthesis of a structural adenovirus polypeptide in the absence of DNA replication.

Virology, 90, 67.

PERSSON, H., MATHISEN, B., PHILIPSON, L., and PETTERSSON, U. (1979).

A maturation protein in adenovirus morphogenesis.

Virology, 93, 198.

PETTERSON, U., and WADELL, G. (1985).

Antigenic structure of the adenoviruses.

Immunochemistry of viruses, the basis for serodiagnosis and vaccines, Elsevier Science Publishers, Bonn, 295.

PHILIPSON, L. (1979).

Adenovirus proteins and their messenger RNAs.

Adv. Vir. Res., 25, 357.

PHILIPSON, L. (1983).

Structure and assembly of adenoviruses.

Current topics in microbiology and immunology. The molecular biology of adenoviruses, 109, p.1. Ed. DOERFLER, W.

RICHARDSON, W.D., and WESTPHAL, H. (1981).

A cascade of adenovirus early functions is required for expression of adeno associated virus.

Cell, 27, 133.

ROWE, W.P., HUEBNER, R.J., GALLIMORE, L.K., PARROTT, R.H., and WARD, T.G. (1953).

Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoïds undergoing spontaneous degeneration in tissue culture.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 84, 570.

RUSSELL, W.C., and PRECIOUS, B. (1982).

Nucleic-acid binding properties of adenovirus structural polypeptides.

J. Gen. Virol., 63, 69.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., and ERLICH, H.A. (1988).
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science, 239, 487.

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.

SAWAGODO, M., and ROEDER, R.G. (1985).

Interaction of a gene specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region.

Cell, 43, 165.

SEHGAL, P.B., FRASER, N.W., and DARNELL, J.E. Jr. (1979).

Early Ad2 transcription units : only promoter-proximal RNA continues to be made in the presence of DRB.

Virology, 94, 185.

SERGHINI, M.A., RITZENTHALER, C., and PINCK, L. (1989).

A rapid and efficient "miniprep" for isolation of plasmid DNA.

Nucl. Acids Res., 17, 3604.

SHAW, A., and ZIFF, E.B. (1980).

Transcripts from the adenovirus 2 major late promoter yield a single early family of 3' co-terminal mRNAs and five late families.

Cell, 22, 905.

SHAW, G., and KAMEN, R. (1986).

A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation.

Cell, 46, 659.

SHEN-ONG, G.L.C. (1987).

Alternative internal splicing in c-myb RNAs occur commonly in normal and tumor cells.

EMBO J., 6, 4035.

SILVER, L., and ANDERSON, C.W., (1988).

Interaction of human adenovirus serotype 2 with human lymphoid cells. Virology, 165, 377.

STILLMAN, B.W., LEWIS, J.B., CHOW, L.T., MATHEWS, M.B., and SMART, E. (1981).

Identification of the gene and mRNA for the adenovirus terminal protein precursor.

Cell, 23, 497.

SUNDQUIST, B., EVERITT, E., PHILIPSON, L., and HOGLUND, S. (1973).

Assembly of adenoviruses.

J. Virol., 11, 449.

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.

TREISMAN, R. (1985).

Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences.

Cell, 42, 889.

VAN BEVEREN, C.P., MAAT, J., DEKKER, B.M.M., and VAN ORMONDT, H. (1981).

The nucleotide sequence of the gene for protein IVa2 and of the 5' leader segment of the major late mRNAs of adenovirus type 5.

Gene, 16, 179.

VAN DER VLIET, P.C., and LEVINE, A.J. (1973).

DNA binding proteins specific for cell infected by adenovirus.

Nature New Biol., 246, 170.

VELICER, L.F., and GINSBERG, H.S. (1970).

Synthesis, transport and morphogenesis of type 5 adenovirus capsid proteins.

J. Virol., 5, 338.

WADELL, G., and DE JONG, J.C. (1980).

Restriction endonucleases in identification of a genome type of adenovirus 19 associated with keratoconjunctivitis.

Infection and Immunity, 27, 292.

WEBER, J. (1976)

Genetic analysis of adenovirus type 2. III- Temperature sensitivity of processing of viral proteins.

J. Virol., 17, 462.

WEBER, J., BEGIN, M., and CARSTENS, E.B. (1977).

IV. Genetic analysis of adenovirus type 2 coordinate regulation of polypeptides 80 K, IIIa, and V.

Virology, 76, 709.

WEBER, J., KHITTOO, G., and BHATTI, A.R. (1982).

Adenovirus core proteins.

Can. J. Microbiol., 29, 235.

WEBER, J.M., and KHITTOO, G. (1983).

The role of phosphorylation and core protein V in adenovirus assembly.

J. Gen. Virol., 64, 2063.

WEINBERG, R.A. (1990).

The retinoblastoma gene and cell growth control.

TIBS, 15, 199.

WILLIAMS, J.F., GHARPURE, M., USTACELEBI, S., and Mac DONALD, S. (1971).

Isolation of temperature-sensitive mutants of adenovirus type 5.

J. Gen. Virol., 11, 95.

WILLIAMS, J., KARGER, B.D., HO, Y.S., CASTIGLIA, C.L., MANN, T., and FLINT, S.J. (1986).

The adenovirus E1B 495R protein plays a role in regulating the transport and stability of the viral late messages.

Cancer Cells, 4, 275. Ed. BOTCHAN, M., GRODZICKER, T., and SHARP, D. DNA tumor viruses. Cold Spring Harbor, N.Y.

WHITE, E., GRODZICKER, T., and STILLMAN, B.W. (1984).

Mutations in the gene encoding the adenovirus early region 1B 19,000 molecular-weight tumor antigen cause the degradations of chromosomal DNA.

J. Virol., 52, 410.

WOLOSEWICK, J.J. (1986).

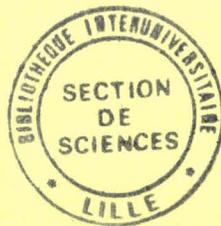
Polyethylene glycol embedding protocol for immunofluorescence microscopy.

Methods Enzymol., 134, 579.

ZIFF, E.B., and EVANS, R.M. (1978).

Coincidence of the promoter and capped 5' terminus of RNA from the adenovirus 2 major late transcription unit.

Cell, 15, 1463.



Le gène IVa2 de l'adénovirus de type 5 est situé entre 4060 et 5826 paires des bases sur le brin gauche de l'ADN viral. L'ARNm IVa2 transcrit contient un intron de 277 nucléotides et une phase ouverte de lecture codant pour un produit de 449 acides aminés.

Afin de caractériser la protéine IVa2, un sérum polyclonal dirigé contre un produit de fusion contenant 419 acides aminés de cette protéine a été obtenu. L'analyse en immunoblot a montré que la protéine IVa2 est présente sous forme d'un doublet (Mr 54-56 kDa) dans les particules virales matures et dans les intermédiaires d'assemblage. Contrairement à l'hypothèse de PERSSON *et al.* (1979), la protéine IVa2 n'est pas la protéine de 50 kDa retrouvée principalement dans les intermédiaires de maturation de la capsid.

La protéine IVa2 a été détectée après 12 h d'infection dans quelques cellules seulement. Après 24 h d'infection, la protéine est présente dans toutes les cellules mais en faible quantité.

En présence d'hydroxyurée, inhibiteur de la réplication, la protéine IVa2 n'est pas synthétisée. Elle est cependant présente dans les cellules infectées par le mutant H5 *ts* 125, bloqué à 40°C dans la réplication virale. Ces résultats suggèrent que la synthèse de la protéine IVa2 est régulée par la réplication cellulaire plus que par la réplication virale.

L'analyse de la synthèse de l'ARNm IVa2 a révélé de nouvelles espèces provenant de cette région.

Le rôle du produit du gène IVa2 dans la transformation cellulaire sera également discuté.