

50376
1990
3

70787

50376
1990
3

N° d'ordre : 481

UNIVERSITE DES SCIENCES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

THESE

PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

OPTION : BIOCHIMIE

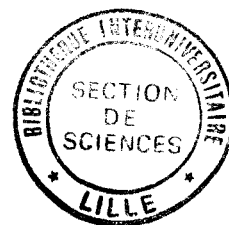
PAR

Arnaud HEYSEN

REGULATION DU PROMOTEUR E2A PRECOCE DE L'ADENOVIRUS DE TYPE 3

SOUTENUE LE 24 JANVIER 1990, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

PRESIDENT:	Professeur	J. Montreuil
RAPPORTEURS:	Professeur	S. Ball
	Docteur	A. Sergeant
EXAMINATEURS:	Docteur	M.H. Loucheux-Lefebvre
	Docteur	J.C. D'Halluin



*Pour mes parents et mes frères,
dont je remercie la patience,
le soutien, et la compréhension.*

*A tous les miens, en témoignage
de mon affection.*

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué au laboratoire de Virologie Moléculaire U 233 de l'INSERM, dirigé par le Dr J.C.D'Halluin. Je tiens à le remercier pour la confiance qu'il m'a témoignée et pour les nombreux conseils qui m'ont permis de mener à bien ces recherches.

M. le Professeur J. Montreuil m'a fait le grand honneur de présider le jury de cette thèse. Je tiens à l'en remercier vivement.

MM. A. Sergeant et S. Ball ont bien voulu juger ce travail et en être les rapporteurs. Je les remercie d'avoir accepté cette délicate tâche.

Mme M. H. Loucheux-Lefebvre m'a fait le plaisir d'accepter de siéger à ce jury. Je tiens à lui exprimer de tout coeur mes remerciements.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous mes "collègues" du laboratoire pour leurs aide et amitié. Que Christian Niel, Didier Petite, Marie-Thérèse Belin, Marie-Laure Caillet, Nathalie Winter, Valérie Leclère, Marie-Christine Chartier soient assurés de toute ma reconnaissance.

Je tiens particulièrement à témoigner toute ma sympathie à Philippe Verwaerde, qui, voisin de paillasse, a été durant ces années un proche collaborateur et un interlocuteur éclairé...

J'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui ont permis la réalisation de ce travail et plus particulièrement à Chantal Cousin pour toute l'aide et l'amitié qu'elle m'a accordées.

Dans ces pages, mes amis y ont tous une place, pour m'avoir supporté pendant tout ce temps et avoir contribué par leur bonne humeur et leur entrain à donner à ces trois années une teinte toute particulière.

Par ces quelques lignes je veux exprimer toute ma gratitude à celle, qui, depuis mon arrivée à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille pour mon DEA, et les années passées à l'U 233, m'a permis de franchir quelques épreuves difficiles. J'ai toujours pu bénéficier de son attention et de son expérience sur le plan humain. Je la remercie chaleureusement d'avoir su développer une telle capacité d'écoute et de compréhension.

Je tiens à la remercier également de la grande patience dont elle a fait preuve pour la dactylographie de cette thèse.

Merci Marie-Thérèse Picqué.

Je dédie enfin ce travail à José Paolo Gagliardi Leite, ami et chercheur brésilien, que le laboratoire a eu la grande chance d'accueillir, et à qui je dois l'enthousiasme et l'attrait pour la recherche fondamentale.

Je tiens également à remercier le Ministère de la Recherche et de la Technologie pour l'attribution d'une allocation de recherches.

PUBLICATIONS

Negative effect of a cis-acting sequence on the vector pBR322 on expression of Adenovirus E1A gene. 1989. J. P. G. LEITE, C. COUSIN, A. HEYSEN, and J. C. D'HALLUIN . *Gene*, vol 82, 353-358

Differences in the régulation of the two adenovirus serotypes 2 and 3 early E2A control regions. HEYSEN, A., COUSIN, C. and D'HALLUIN, J. C. *Virology*, soumis.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHES

A "Poison Sequence" is present between PvuII-Tth111I restriction sites of pBR 322 vector. J. P. G. LEITE, C. COUSIN, A. HEYSEN, B. HENNACHE and J. C. D'HALLUIN. 4^o encontro nacional de virologia SAO LOURENCO (BRASIL) Outubro 88

Differences in the organisation of adenovirus types 2 and 3 early E2A control region. A. HEYSEN, C. COUSIN and J. C. D'HALLUIN. ICRF DNA Tumor Virus Meeting. Churchill College, CAMBRIDGE (ENGLAND) July 89

LEXIQUE

1) CELLULES

IC4 : Lignée établie de cellules HeLa exprimant la région E1A de l'Ad2 sous contrôle du "LTR" du Virus de la Tumeur Mammaire de la Souris
CV-1 : Lignée établie de cellules de singe vert Africain
F9 : Cellules de carcinome embryonnaire de souris
HEK : Lignée établie de cellules embryonnaires de rein humain
HEK-293 : Cellules HEK transformées par les 11,5 % de l'extrémité gauche du génome de l'Ad5 (nt 270-4123)
HeLa : Lignée établie de cellules de carcinome du col utérin humain
KB3 : Lignée établie de cellules de carcinome du plancher buccal humain
LLC-MK2 : Lignée établie de cellules de rein de singe *Rhésus*
Vero : Lignée établie de cellules de rein de singe vert Africain

2) GENES

cat : Gène codant pour la chloramphénicol acétyl transférase
myb : Oncogène de la leucémie myéloblastique aviaire
myc : Oncogène de la leucémie myélo-monocytaire
néo : Gène de résistance à la néomycine
ras : Oncogène du sarcome murin de Harvey

3) VIRUS

Ad : Adénovirus
SV40 : Papovavirus dont l'hôte naturel est le singe

4) REACTIFS

BBO : Bleu de bromophénol
BrET : Bromure d'éthidium
CsCl : Chlorure de Césium
HEPES : Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-éthanesulfonique
SDS : Dodécyl sulfate de sodium

5) autres abbreviations

AA : Acides aminés
dl : délétion
E : Early; précoce
hr : Host range; mutant hôte dépendant
kDa : Kilodalton
L : Late; tardif
nt : nucléotide
ORF : Open reading frame; phase ouverte de lecture
pb : paire de base
pfu : Plaque forming unit; unité formant plaque (unité du titre infectieux viral)
p.i. : post infection
S : Coefficient de Svedberg
ts : Thermo-sensible
u.g. : unité génome

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	p 11
<u>GENERALITES</u>	p 13
<u>I - PRESENTATION DE L'ADENOVIRUS</u>	p 14
<u>A - CLASSIFICATION</u>	p 14
<u>B - LA PARTICULE VIRALE</u>	p 14
1 - <u>L'ADN viral</u>	p 14
2 - <u>Les cycles viraux</u>	p 19
2-1- <u>Le cycle abortif</u>	p 19
2-2- <u>Le cycle transformant</u>	p 19
2-3- <u>Le cycle lytique</u>	p 21
2-3-1- <u>La phase précoce</u>	p 21
2-3-2- <u>La phase intermédiaire</u>	p 21
2-3-2-1- <u>L'initiation de la réplication</u>	p 21
2-3-2-2- <u>L'élongation</u>	p 23
2-3-3- <u>La phase tardive</u>	p 23
2-3-4- <u>L'assemblage</u>	p 23
<u>II - PRESENTATION DE LA PHASE PRECOCE</u>	p 23
1 - <u>La région E1</u>	p 25
1-1- <u>La région E1A</u>	p 25
1-1-1- <u>Les messagers de E1A</u>	p 25
1-1-2- <u>Les polypeptides de E1A</u>	p 25
1-1-3- <u>Le rôle des protéines majeures</u>	p 27
1-2- <u>La région E1B</u>	p 30
1-2-1- <u>Les messagers de E1B</u>	p 30
1-2-2- <u>Les polypeptides de E1B</u>	p 30
2 - <u>La région E2</u>	p 31
2-1- <u>E2A</u>	p 31
2-2- <u>E2B</u>	p 33
3 - <u>La région E3</u>	p 33
4 - <u>La région E4</u>	p 35

<u>III - REGULATION DES GENES PRECOCES DE L'ADENOVIRUS</u>	p 35
A - <u>LE PROMOTEUR DE LA REGION E1A</u>	p 37
1- <u>Les enhancers de l'Ad2 et de l'Ad5</u>	p 37
2- <u>Les facteurs cellulaires impliqués</u>	p 38
B - <u>LE PROMOTEUR DE LA REGION E1B</u>	p 38
C - <u>LES PROMOTEURS DES REGIONS E2A ET E2B</u>	p 41
1- <u>Le promoteur précoce</u>	p 41
1-1- <u>Les sites de démarrage de la transcription</u>	p 41
1-2- <u>Détermination des séquences essentielles</u>	p 41
1-3- <u>Les séquences cibles de E1A</u>	p 43
1-3-1- <u>L'existence de l'enhancer inductible</u>	
par les produits de E1A	p 43
1-3-2- <u>Les facteurs cellulaires impliqués</u>	p 44
2- <u>Le promoteur tardif</u>	p 46
D - <u>LE PROMOTEUR DE LA REGION E3</u>	p 48
E - <u>LE PROMOTEUR DE LA REGION E4</u>	p 50
F - <u>CONCLUSIONS</u>	p 53
 <u>IV - ETUDE DU MECANISME DE LA TRANSCRIPTION: CAS DU PROMOTEUR MAJEUR TARDIF (MLP)</u>	p 55
1 - <u>L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION</u>	p 55
2 - <u>L'ELONGATION DE LA TRANSCRIPTION</u>	p 61
3 - <u>INTERVENTION DES FACTEURS EN AMONT</u>	p 61
 <u>V - HOMOLOGIE DES SITES DE LIAISON DES FACTEURS CELLULAIRES ATF ET CREB</u>	p 65
 <u>RESULTATS</u>	p 67
I - <u>LA TRANSDOMINANCE INTERSEROTYPIQUE</u>	p 68
II - <u>DETERMINATION DE LA SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE DU PROMOTEUR PRECOCE E2A DE L'Ad3 (P3E2AE)</u>	p 70
1 - <u>Etablissement de la carte de restriction de la région couvrant le P3E2AE</u>	p 70
1-1- <u>Séquençage du pVM 707</u>	p 74
1-2- <u>Construction des vecteurs phagiques (mp18-01;mp18-02) et plasmidiques (pVM 360)</u>	p 74
2 - <u>Comparaison des séquences nucléotidiques</u>	

des deux promoteurs p 79

III - DETERMINATION DU SITE D'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION DU P3E2AE p 79

IV - ETUDE DU TAUX D'EXPRESSION DU PROMOTEUR E2A DE L'Ad3 p 85

1 - Mesure de l'activité des promoteurs E2AE des deux sérotypes p 86

1-1- Mesure de l'activité du PE2AE de l'Ad3 p 86

1-2- Comparaison avec le pouvoir transactivateur de E1A sur le promoteur E2A des deux sérotypes p 89

2 - Mise en évidence de la transdominance inter-sérotypique p 92

3 - Compétition entre les deux promoteur E2A des deux sérotypes p 93

3-1- Compétition en présence de la région E1A de l'Ad2 p 93

3-2- Compétition en présence de la région E1A de l'Ad3 p 97

4 - Compétition par double variable p100

5 - Mesure de l'effet seuil p100

V - MISE EN EVIDENCE DE L'IMPLICATION DE FACTEURS NUCLEAIRES DANS LA COMPETITION INTER-PROMOTEURS p101

1 - Profil de retardement en gel d'acrylamide de chacun des deux promoteurs p101

2 - Compétition inter-sérotypique p103

VI - MISE EN EVIDENCE D'UNE SEQUENCE "POISON" DANS LES VECTEURS PLASMIDIQUES DERIVES DU pBR 322 p103

VII - COMPARAISON DES SEQUENCES POLYPEPTIDIQUES DE LA PROTEINE DE STRUCTURE pVIII DES DEUX SEROTYPES p110

DISCUSSION p114

I - DIFFERENCES DE REGULATION DE L'EXPRESSION DES DEUX PROMOTEURS E2A DE L'Ad2 ET DE L'Ad3 p115

1 - <u>Comparaison de l'organisation nucléotidique des promoteurs E2A précoces des deux sérotypes</u>	p115
1-1- <u>Détermination de la séquence du P3E2AE</u>	p116
1-2- <u>Localisation du site d'initiation de la transcription du P3E2AE</u>	p117
2 - <u>Comparaison de la régulation de base des deux promoteurs E2AE</u>	p118
2-1- <u>Mesure de l'activité CAT relative des deux promoteurs E2A de l'Ad3 et de l'Ad2</u>	p118
2-2- <u>Profil de retardement en gel de polyacrylamide</u>	p119
3 - <u>Comparaison de la régulation des deux promoteurs E2A induite par la région E1 des deux sérotypes</u>	p120
3-1- <u>Mesure de l'activité CAT relative à la région E1 des deux sérotypes</u>	p120
3-1-1- <u>Influence des deux produits de la région E1A des deux sérotypes ou du seul produit de l'ARNm 13S</u>	p120
3-1-2- <u>Influence du produit de l'ARNm 12S</u>	p122
3-1-3- <u>Influence de la protéine de 19 kDa de la région E1B de l'Ad2</u>	p122
3-2- <u>Profil de retardement en gel de polyacrylamide</u>	p123
4 - <u>Compétition entre les deux promoteurs E2A précoces des deux sérotypes</u>	p123
4-1- <u>En système CAT</u>	p123
4-2- <u>En utilisant la technique de gel retard</u>	p125
II - <u>MISE EN EVIDENCE DE LA SEQUENCE POISON</u>	p127
III - <u>LA PROTEINE pVIII DES DEUX SEROTYPES</u>	p129
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	p130
<u>APPENDICE TECHNIQUE</u>	p135
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p148

INTRODUCTION

Le contrôle de l'initiation de la transcription est un mécanisme clef dans la régulation de l'expression des gènes eucaryotes. Les nombreux résultats obtenus jusqu'à ce jour mettent en lumière l'importance fondamentale jouée par des facteurs protéiques d'origine cellulaire qui interviennent principalement au niveau de l'édification des complexes de préinitiation de la transcription, en synergie avec l'ARN polymérase. D'autres facteurs cellulaires, spécifiques des séquences clefs de la régulation des promoteurs, interviennent pour stabiliser ou au contraire dissocier les complexes de préinitiation de la transcription.

Les virus offrent en général l'avantage de travailler avec des gènes relativement simples, ce qui explique leur utilisation comme modèle et sonde moléculaire afin d'approcher les mécanismes de contrôle de régulation génique eucaryote, puisqu'ils mettent à profit la machinerie cellulaire pour assurer leur multiplication.

L'étude de la structure et de la régulation des gènes de l'adénovirus a permis l'élucidation de certaines des fonctions impliquées dans la régulation de l'expression génique, comme:

- la découverte de la coïncidence du site de démarrage de la transcription par l'ARN polymérase II avec l'extrémité 5' des ARNm,
- la découverte de l'épissage des ARN et celle du clivage à l'extrémité 3' des ARNm.

En outre, la mise en place de systèmes *in vitro*, a permis l'isolement des facteurs cellulaires indispensables à la transcription.

La phase précoce de l'infection par les adénovirus représente un système idéal pour approcher les mécanismes du contrôle transcriptionnel. L'existence d'une transdominance intersérotypique chez l'adénovirus offre une voie d'approche originale des systèmes de régulation d'expression génique eucaryote. L'observation que nous avons faite au laboratoire qu'un sérotype d'adénovirus humain (l'Ad3) puisse inhiber la réplication d'un autre sérotype (l'Ad2), nous permet d'analyser un aspect du contrôle de régulation coordonnée des gènes.

Les résultats présentés dans ce mémoire, montreront que les mécanismes impliqués dans l'inhibition transcriptionnelle d'un sérotype par l'autre, mettent en jeu l'organisation nucléotidique des promoteurs contrôlant les gènes clefs intervenant dans la réplication de l'ADN viral, et surtout, les facteurs de transcription spécifiques, qui sont vraisemblablement impliqués dans ces processus.

GENERALITES

I - PRESENTATION DE L'ADENOVIRUS

Découverts en 1953 par Rowe *et al.*, les adénovirus sont responsables de certaines conjonctivites et d'affections respiratoires et intestinales (Flewett *et al.*, 1975; Faden *et al.*, 1978). Ils sont d'un grand intérêt de par leur pouvoir oncogène (Trentin *et al.*, 1962; Huebner *et al.*, 1962) et comme sonde particulièrement adaptée pour l'étude de l'organisation et de l'expression des gènes eucaryotes. Ils ont permis ainsi la découverte de l'épissage des ARNm (Chow *et al.*, 1977) ou celle de l'épissage alternatif des messagers (Pettersson *et al.*, 1983).

A - CLASSIFICATION

Les Adénovirus forment un genre de la famille des Adenoviridae, ordre des Haplovirales.

Chez l'homme, 47 sérotypes ont été identifiés (Wigand *et al.*, 1982 et 1987; Hierholzer *et al.*, 1988) (tableau I). De nombreuses classifications ont été proposées et reposent principalement sur les critères suivants:

- pouvoir oncogène chez le hamster nouveau-né (Huebner, 1967),
- pourcentage de bases G + C (Pina and Green, 1965),
- longueur de la fibre (Norrby and Skaaret, 1967),
- migration électrophorétique de quelques polypeptides de structure en gel de polyacrylamide - SDS (Wadell, 1978),
- analyse du génome par endonucléases de restriction (Wadell *et al.*, 1980) qui permet de révéler des variants d'un sérotype donné (Adrian *et al.*, 1985; Fife *et al.*, 1985).

B - LA PARTICULE VIRALE

Dépourvue d'enveloppe, la particule virale (ou virion) des adénovirus est constituée d'une nucléocapside ayant la forme d'un icosaèdre (Horne *et al.*, 1959) de 65 à 80 nm de diamètre. La capside virale est composée de 252 capsomères: 240 hexons formant les 20 faces triangulaires de l'icosaèdre et 12 pentons localisés aux sommets. L'analyse des protéines constitutives par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS révèle que la particule est composée d'une dizaine de protéines numérotées de II à XII (fig. 1) en fonction de leur masse moléculaire apparente (Maizel *et al.*, 1968).

1- L'ADN viral

Le génome de l'adénovirus est constitué d'un ADN double brin (fig. 2). Sa masse moléculaire varie de 20 à 30.10⁶ Da selon les sérotypes (Green *et al.*, 1967; van der Eb *et al.*, 1969). A chacune des extrémités existe une séquence

TABEAU 1 . CLASSIFICATION DES ADENOVIRUS HUMAINS AVEC LEURS PRINCIPALES CARACTERISTIQUES

Sous-groupe	Sérotype	Degré d'homologie du DNA		Teneur en base G+C	Nombre de fragments de restriction obtenus avec SmaI	Masse moléculaire apparente des polypeptides majeurs internes			Oncogénicité chez le hamster nouveau-né	Groupe d'hémostase
		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 *	25,5-26 K	17,5-18 K	28-31	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	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	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	II
E	4		4 - 23%	Haute : 57%	19	48 K	24,5 K	18 K	17	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	IV

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

* K = kilodalton

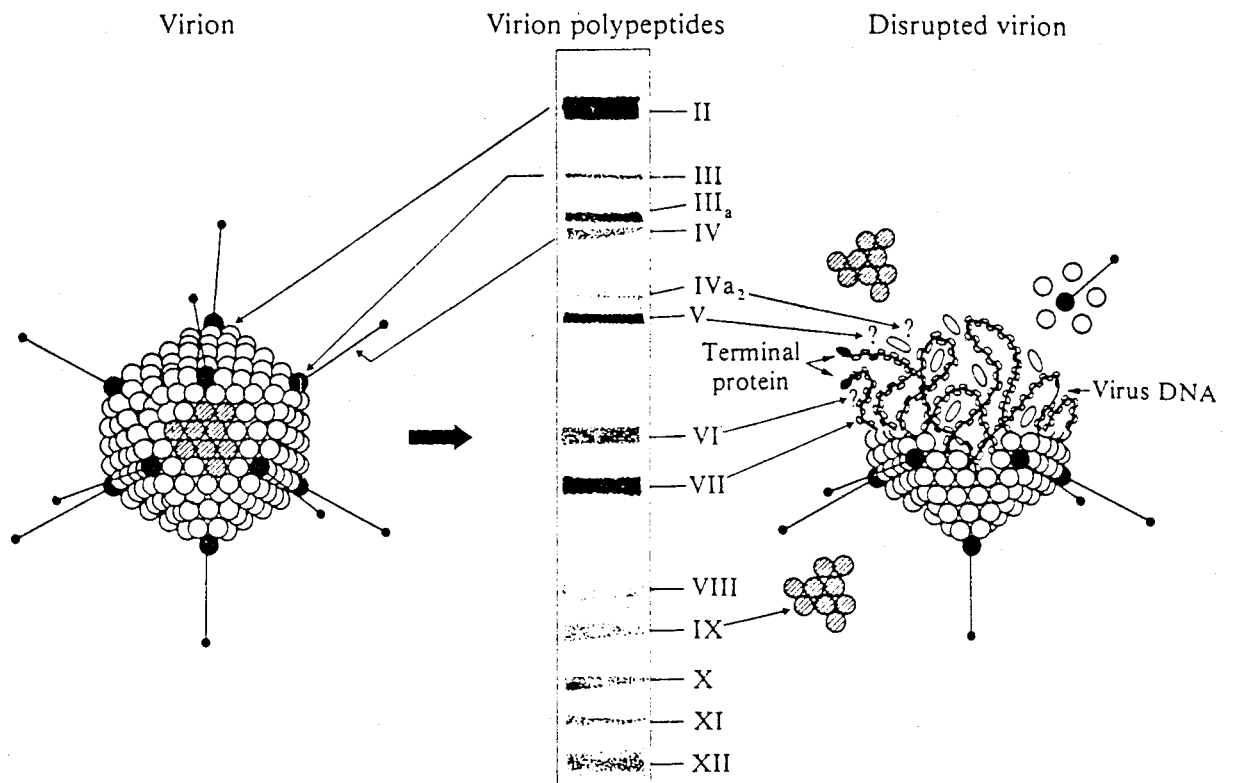


Fig 1A: Diagramme schématique de l'adénovirus montrant les polypeptides intervenant dans l'édification de la particule virale (d'après Russel and Precious, 1982).

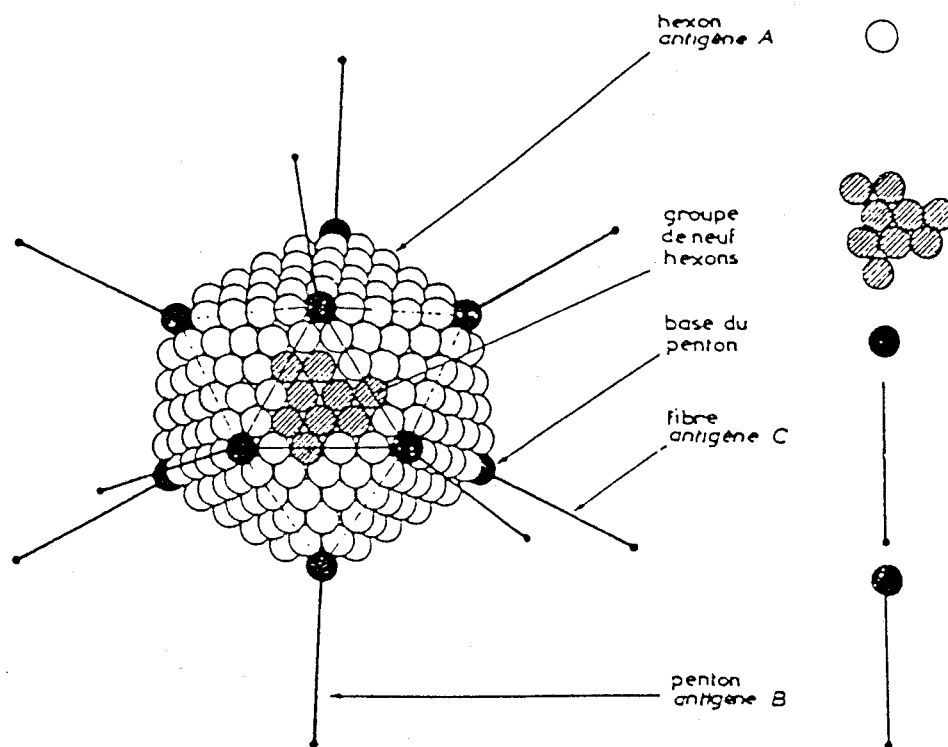


Fig 1B: Architecture et composition antigénique du virion de l'adénovirus humain de type 2.

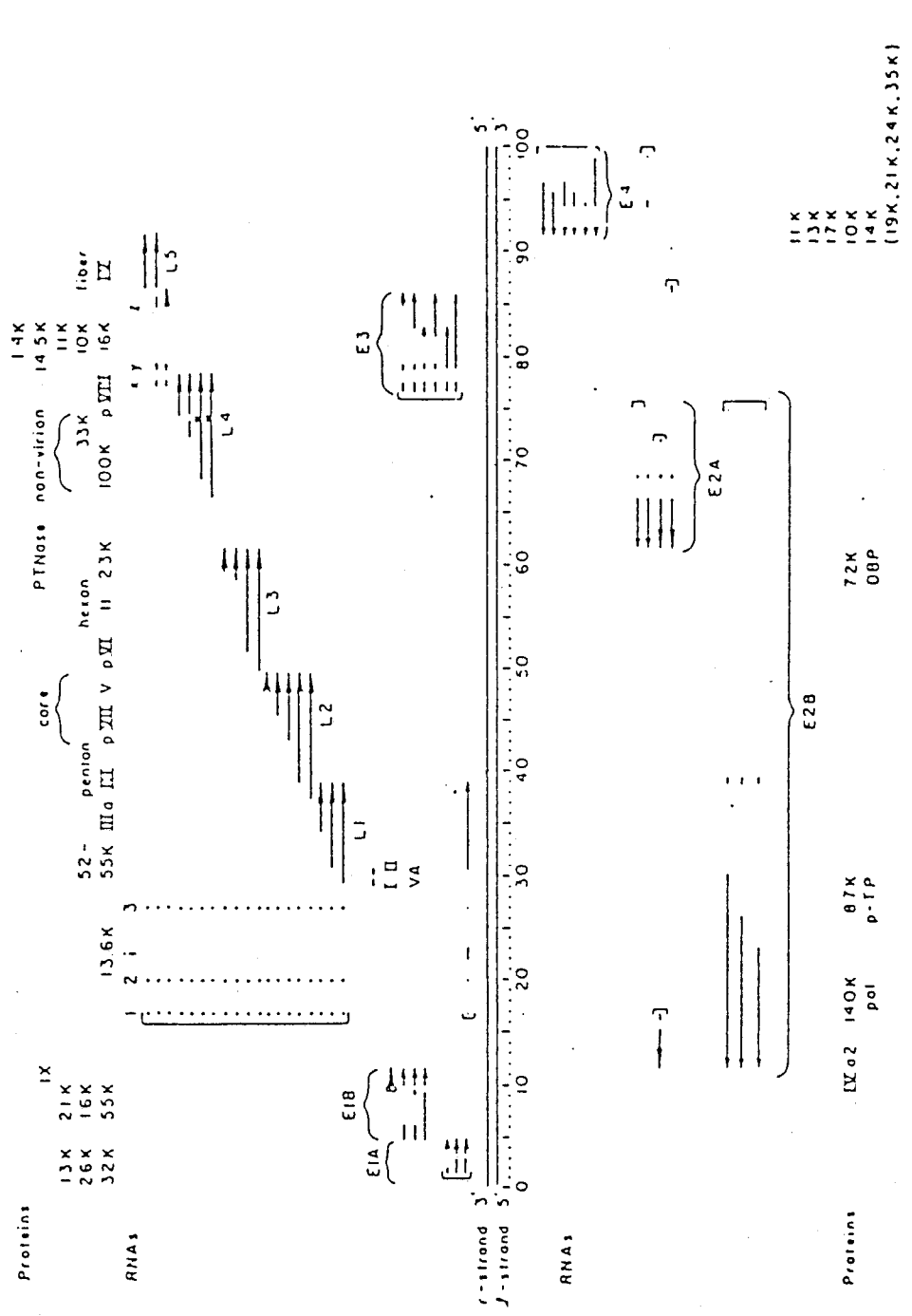


Fig.2: Carte génomique de l'adénovirus de type 2 (d'après Broker et al, 1984).

terminale répétée inversée (ITR) dont certaines régions sont retrouvées conservées pour les divers sérotypes (Wolfson and Dressler, 1972).

Une protéine est responsable de la circularisation de l'ADN viral (Robinson *et al.*, 1973). De masse moléculaire 55 kDa, cette protéine terminale (TP) est fixée à chaque extrémité 5' de l'ADN par liaison covalente entre le OH d'une sérine et un résidu déoxycytidine (Rekosh *et al.*, 1977). Cette protéine est issue d'un précurseur (pTP) de 87 kDa qui sert d'amorce à la réplication.

D'autres protéines ont été trouvées associées à l'ADN: les protéines V, VII et u, qui permettent l'organisation en nucléosomes (Nermut, 1979; Vayda *et al.*, 1983).

2- Les cycles viraux

Après fixation de la particule aux récepteurs membranaires spécifiques, celle-ci peut pénétrer dans le cytoplasme soit par endocytose (Chardonnet and Dales, 1970) soit par pénétration directe (Lomber-Holm and Philipson, 1969). Elle migre alors vers le noyau dans lequel l'ADN est introduit, laissant la capside vide dans le cytoplasme (Morgan *et al.*, 1969)(fig. 3).

Plusieurs cycles sont alors possibles:

- le cycle abortif,
- le cycle transformant,
- le cycle lytique.

2-1- Le cycle abortif

Ce cycle est caractérisé par l'expression partielle de l'information génétique de l'adénovirus. Le blocage peut se produire au niveau:

- de la maturation des messagers tardifs,
- de la réplication de l'ADN viral,
- de l'expression des zones précoces.

Dans ces conditions, il n'y a pas de progéniture virale. Ce phénomène dépend en fait de la nature respective du virus et de la cellule hôte (Delsert, 1985).

2-2- Le cycle transformant

Certains adénovirus sont oncogènes (Huebner *et al.*, 1962; Trentin *et al.*, 1962). Ainsi, les adénovirus des sous-groupes A (Ad 12...) et B (Ad 3,7,...) sont capables d'induire des tumeurs chez le hamster nouveau-né. Tous les sérotypes peuvent transformer les cellules primaires de rein de rat. Les cellules acquièrent alors l'ensemble des caractères phénotypiques nouveaux liés à la transformation cellulaire. Chez l'adénovirus, la région transformante est située dans les 11,2%

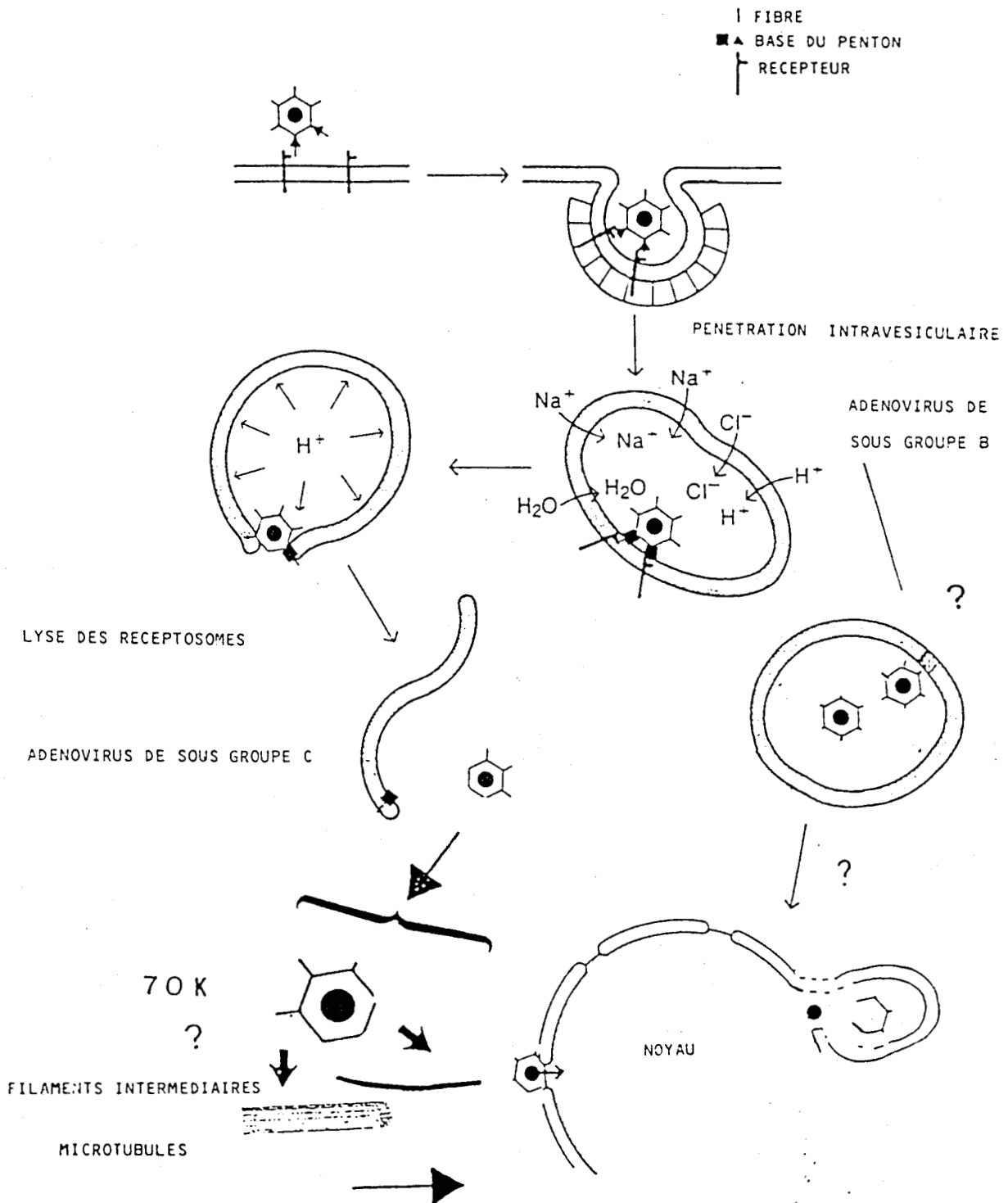


Fig 3: Inter-actions précoces adénovirus-cellules; voies de pénétration des virus des sous-groupes B et C. Schéma d'après Seth et al., 1986; modifié.

de l'extrémité gauche du génome (régions E1A et E1B)(pour revues générales: Bernards and van der Eb, 1984; Branton *et al.*, 1985).

2-3- Le cycle lytique

Le cycle lytique conduit, après lyse de la cellule, à la libération d'une grande quantité de particules infectieuses nouvellement produites. On le divise habituellement en trois phases :

- la phase précoce, caractérisée par la synthèse de nombreuses protéines qui interviennent dans la régulation de la transcription et dans la réplication de l'ADN,
- La phase intermédiaire pendant laquelle a lieu le démarrage de la réplication de l'ADN viral,
- la phase tardive, où sont synthétisées les protéines nécessaires à l'échafaudage des nouvelles particules virales.

2-3-1- La phase précoce

Elle est particulièrement étudiée car de nombreuses étapes sont communes aux cycles lytique, transformant et abortif.

Quatre zones sont habituellement décrites: les régions E1 et E3 transcrites à partir du brin "r" (r = right, sens de transcription vers la droite) et les régions E2 et E4, transcrites à partir du brin "l" (l = left, vers la gauche).

2-3-2- La phase intermédiaire

Commençant pendant cette phase de transition, la synthèse de l'ADN viral suit un mécanisme permettant le démarrage aux deux extrémités des molécules, suivie de la séparation et du déplacement du brin non répliqué (Sussenbach *et al.*, 1972) (fig. 4).

2-3-2-1- L'initiation de la réplication

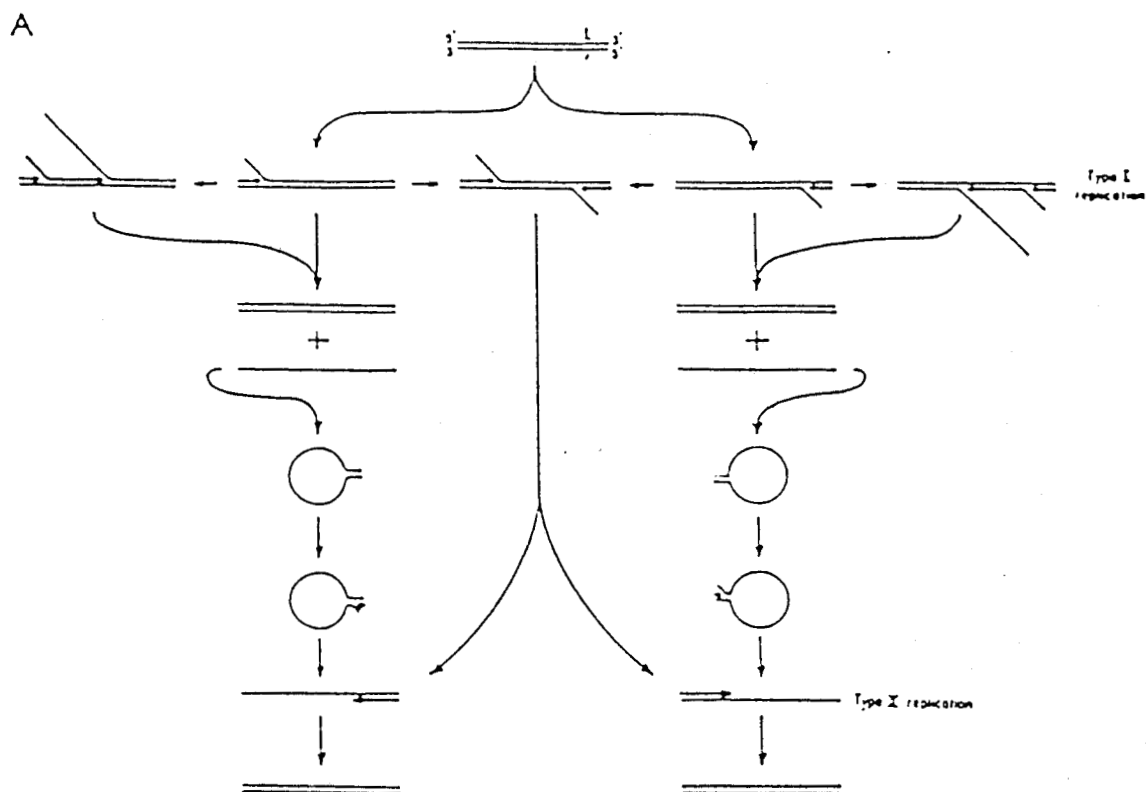
Les séquences permettant la régulation de la réplication sont localisées dans les séquences terminales inversées répétées ou ITR de l'ADN.

L'amorce est réalisée par la fixation du premier nucléotide sur la pTP formant alors le complexe d'initiation pTP-dCMP.

Cette initiation est stimulée par la protéine virale de liaison à l'ADN simple brin (DBP) et par le facteur nucléaire NFI (van der Vliet and Sussenbach, 1975; Nagata *et al.*, 1982) qui se fixe entre les nucléotides 17 et 48 de l'ITR (Guggenheimer *et al.*, 1984).

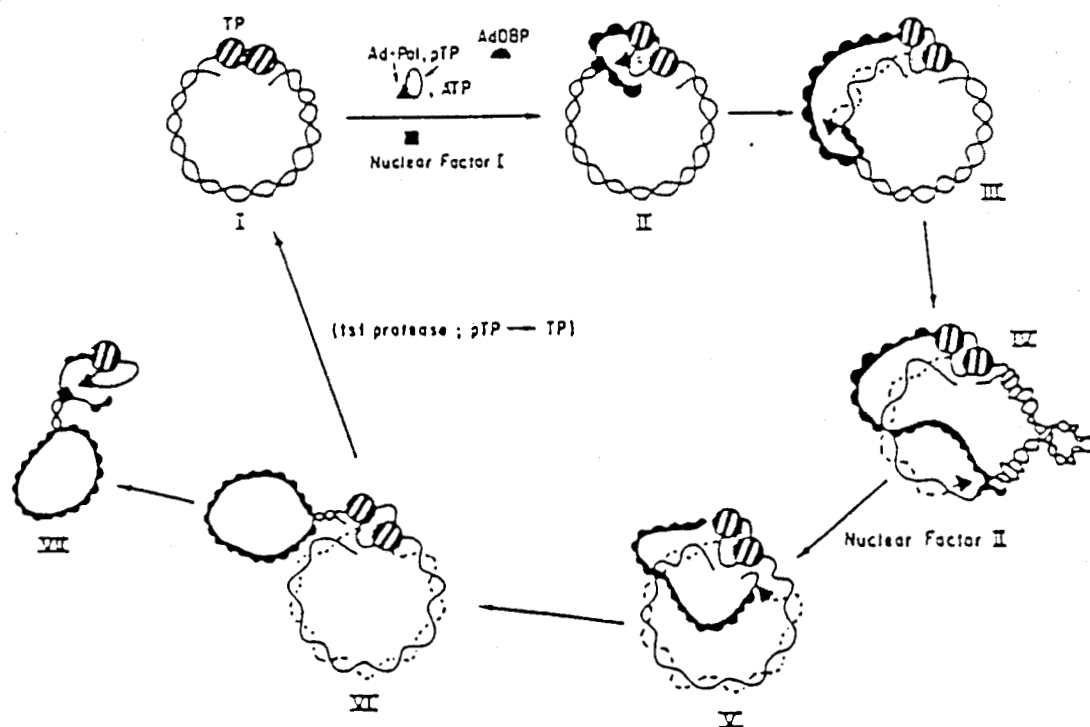
Deux autres protéines sont également impliquées pendant cette étape; l'ADN polymérase viro-codée (Lichy *et al.*, 1982; Stillman *et al.*, 1982) et le

Fig. 4 :



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 réplication.

facteur nucléaire NFIII (Pruijn *et al.*, 1987) qui se lie entre les nucléotides 39 et 50 (O'Neill and Kelly, 1988; Pruijn *et al.*, 1988).

2-3-2-2- L'élongation

Cette étape nécessite un autre facteur cellulaire, NFII et la DBP (Nagata *et al.*, 1983). Le brin parental déplacé peut alors se circulariser grâce aux ITR et à son tour servir d'intermédiaire de synthèse du brin complémentaire.

2-3-3- La phase tardive

L'expression des gènes tardifs débute pendant la réplication de l'ADN viral. La phase tardive correspond à la synthèse d'ARNm à partir du promoteur majeur tardif ou MLP localisé à 16,8 unités génomes (u.g.) sur le brin r. Les ARNm codent pour 8 polypeptides distincts.

Le précurseur ARN majeur fait 28S de constante de sédimentation et conduit à la formation par modifications post-transcriptionnelles, de 5 familles d'ARNm (L1 à L5). A leur extrémité 5', ces messagers possèdent tous une séquence non codante d'environ 200 nt: la séquence tripartite. On dénombre 15 sites accepteurs d'épissage et trois "leaders" (Chow *et al.*, 1977). Il est à noter que celui de la fibre possède trois "leaders" supplémentaires (x : 73,3 -76,9 u.g.; y: 78,6 - 79,1 u.g. et z: 84,1 - 85,1 u.g.).

2-3-4- L'assemblage

Celui-ci est réalisé par les protéines de structure de la capsid mais nécessite parfois la présence d'autres protéines intervenant dans la stabilisation et dans l'échafaudage de la capsid virale.

Le noyau, lieu d'assemblage, renferme environ 10^5 particules matures à la fin du cycle lytique. L'utilisation de mutants thermosensibles a été à l'origine de la mise en évidence des différentes étapes de l'assemblage (fig. 5).

Après lyse de la cellule hôte, les particules virales se répartissent dans le milieu, elles peuvent alors réinfecter de nouvelles cellules et reproduire le cycle lytique.

II - PRESENTATION DE LA PHASE PRECOCE

Seule la phase précoce sera développée ici. En effet elle permet, après la pénétration virale, la synthèse des nombreuses protéines précoces dont bon nombre ont un rôle important dans la régulation de la transcription.

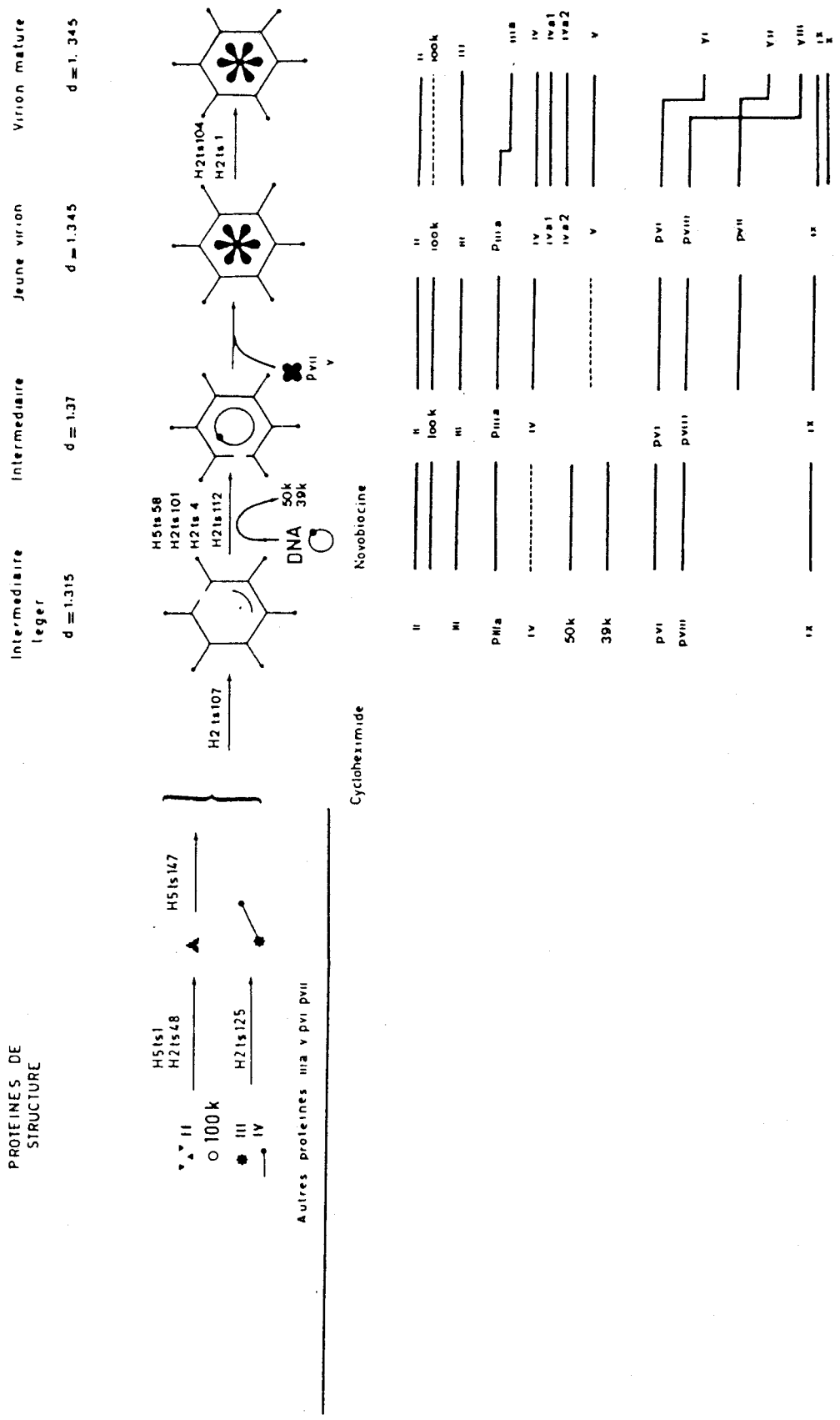


Fig. 5: Schéma d'assemblage de l'adénovirus (D'Halluin, 1980).

1- La région E1

Située dans les 11,2% gauche du génome, cette région intervient dans l'activation des autres régions précoces, dans la régulation de l'expression de gènes hétérologues et dans le processus de transformation cellulaire.

Cette région contient trois unités de transcription

- E1A, localisée entre 1,4 et 4,5 u.g.,
- E1B, entre 4,8 et 11,2 u.g.,
- l'unité de transcription du polypeptide IX, localisée entre 9,9 et 11,2 u.g., recouverte par la région E1B (fig.6a).

1-1- la région E1A

Les premières protéines virales synthétisées après l'infection sont celles de la région E1A (Nevins *et al.*, 1979)

La fonction la plus étudiée est leur activation de la transcription des autres régions précoces (Berk *et al.*, 1979; Jones and Shenk, 1979; Nevins, 1981),

Ces protéines peuvent également stimuler la transcription de gènes cellulaires, tels les gènes codant pour les protéines de choc thermique (hsp) comme la protéine hsp 70 (Allan *et al.*, 1984) ou celui codant pour les et globulines (Gaynor *et al.*, 1984),

Cependant, elles inhibent la transcription des gènes des virus SV40 et polyome ou des chaînes lourdes des immunoglobulines (Borelli *et al.*, 1984; Hen *et al.*, 1985; Velcich and Ziff, 1985).

1-1-1- les messagers de E1A

Cinq messagers sont issus de cette région par épissage alternatif. Leurs constantes de sédimentation sont 9S, 10S, 11S, 12S et 13S (Chow *et al.*, 1979; Gingeras *et al.*, 1982; Stephens and Harlow, 1987; Ulfendahl *et al.*, 1987). L'épissage s'effectue avec un accepteur commun et trois sites donneurs pour les messagers 9S, 12S et 13S. Les ARNm 10S et 11S possèdent un site donneur et un site accepteur supplémentaires et sont ainsi formés par un double épissage différentiel à partir des ARNm 12S et 13S respectivement (fig.6a; fig. 9).

Les ARNm sont accumulés au cours du cycle viral selon une cinétique différente. Pendant la phase précoce, les ARNm 12S et 13S sont plus abondants, alors que l'ARNm 9S n'est présent qu'en faible quantité. La situation s'inverse en phase tardive (Chow *et al.*, 1979).

1-1-2- les polypeptides de E1A

Les polypeptides traduits à partir des ARNm 12S et 13S possèdent les mêmes extrémités N et C terminales mais le produit de l'ARNm 13S renferme

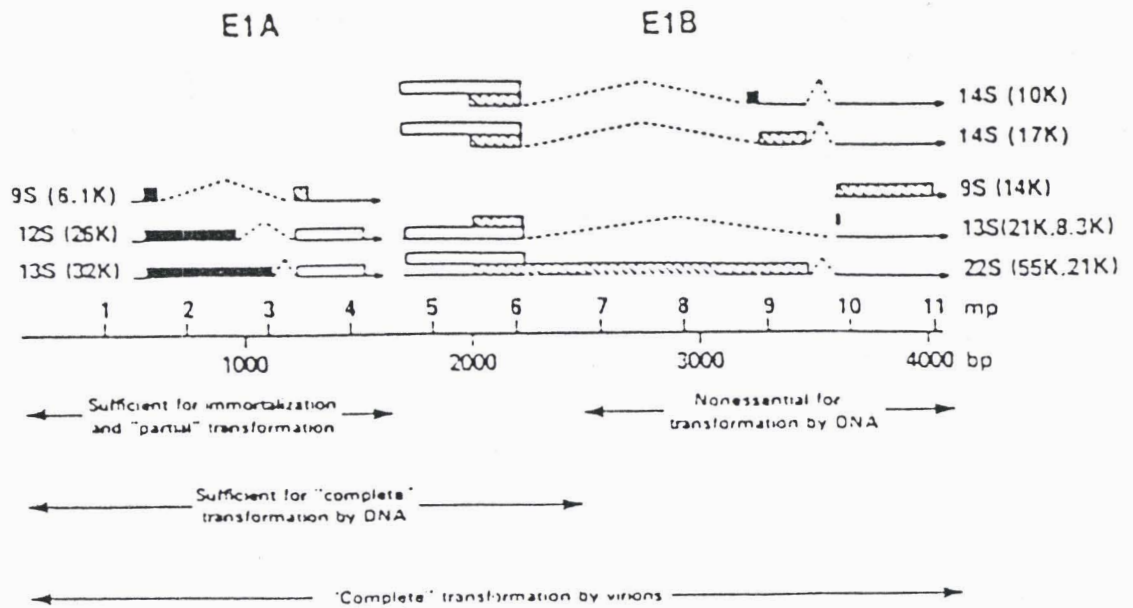


Fig. 6A: Représentation graphique de la région E1 de l'Ad2 (Branton et al., 1985)

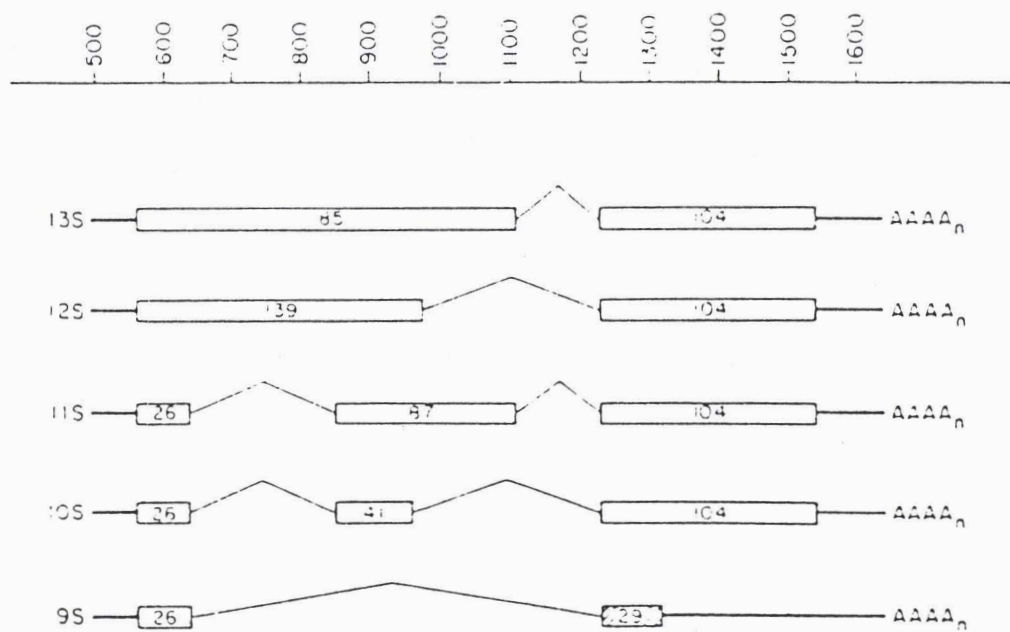


Fig. 6B: Représentation graphique des ARNm et des protéines de la région E1A de l'Ad2 (d'après Stephens and Harlow, 1987).

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

46 acides aminés (AA) supplémentaires (243 AA et 289 AA respectivement pour les ARNm 12S et 13S de l'Ad2 et de l'Ad5).

Les deux protéines majeures sont des phosphoprotéines retrouvées dans le noyau des cellules infectées ou transfectées (Shiroki *et al.*, 1980; Feldman and Nevins, 1983) et sont les homologues fonctionnels des oncogènes *c-myc* et *c-myb* (Ralston and Bishop, 1983).

Le polypeptide codé par l'ARNm 9S renferme 55AA. La différence de phase de lecture conduit à l'obtention de 29 AA spécifiques du côté C-terminal, alors que les 26 AA N-terminaux sont communs aux produits des ARNm 12S et 13S. Aucune fonction ne lui a été attribuée (Moran *et al.*, 1986). Les polypeptides des ARNm 10S et 11S possèdent 171 AA et 217 AA respectivement. Ils diffèrent des polypeptides 289 et 243 AA par l'absence de 72 AA, mais dans le même cadre de lecture (fig. 6b).

1-1-3- le rôle des protéines majeures

Ces protéines stimulent la transcription des promoteurs précoces de E1A, E1B, E2A, E3 et E4 (fig. 7). Aucune liaison à l'ADN au niveau de sites spécifiques n'a pu être démontrée (Fergusson *et al.*, 1985) même si le produit de l'ARNm 13S peut se lier à l'ADN par son domaine C terminal (Chatterjee *et al.*, 1988) ce qui suggère que les protéines E1A stimulent la transcription plus indirectement par l'intermédiaire de facteurs cellulaires.

Les résultats sont controversés quant à l'attribution du pouvoir transactivateur:

- aux produits des ARNm 13S et 12S (Carlock and Jones, 1981; Ferguson *et al.*, 1985),
- ou au produit de l'ARNm 13S seul (Ricciardi *et al.*, 1981; Svensson and Akusjarvi, 1984).

Les études de mutations dans les domaines conservés 1, 2 et 3 du premier et du second exon du gène de l'Ad5 (domaines décrits par Kimelman *et al.* en 1985) ont montré que les domaines 1 et 2 ne sont pas indispensables à la transactivation. Par contre, le domaine 3, spécifique de l'ARNm 13S et les trois résidus communs aux ARNm 12S et 13S du deuxième exon le sont (Schneider *et al.*, 1987) (fig. 8).

Les produits de E1A inhibent la transcription du promoteur précoce de SV40 (Borelli *et al.*, 1984) en agissant sur l'enhancer de 72 pb répétées en amont du promoteur, et inhibent la transcription du promoteur du virus du polyome et de son propre promoteur. Lillie *et al.* (1987) ont montré que les domaines 1 et 2 sont responsables de cette transrépression.

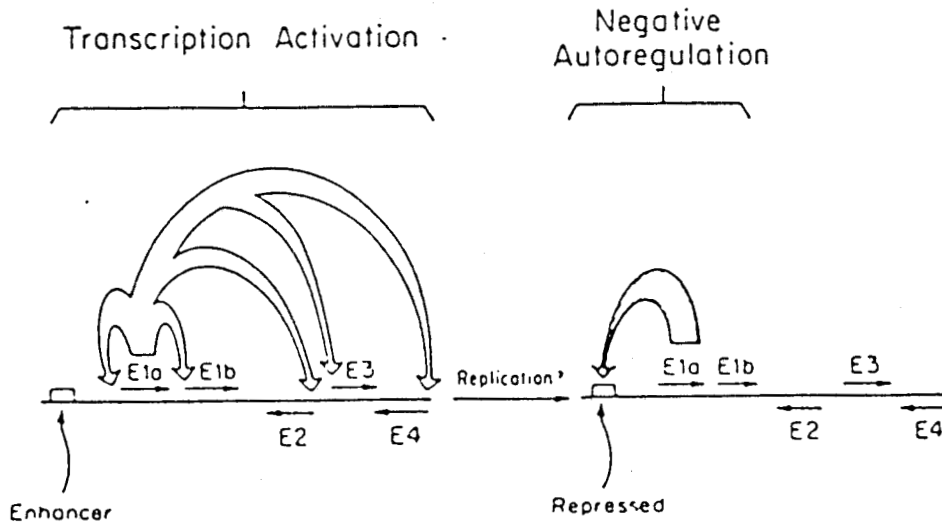


Fig. 7: Modèle proposé de régulation positive et négative des protéines de la région E1A de l'Ad2 (Smith et al., 1985).

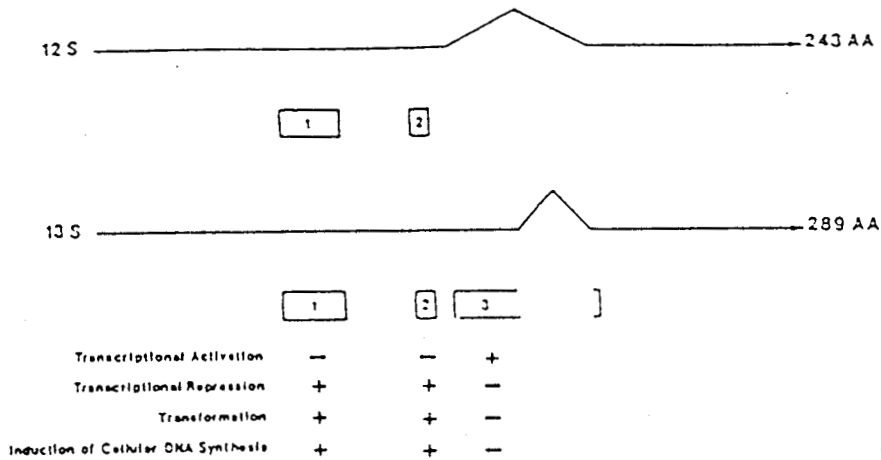


Fig. 8: Représentation des trois domaines conservés des protéines majeures de la région E1A (Kimelman et al., 1985) et des principales fonctions qui leur sont attribuées.

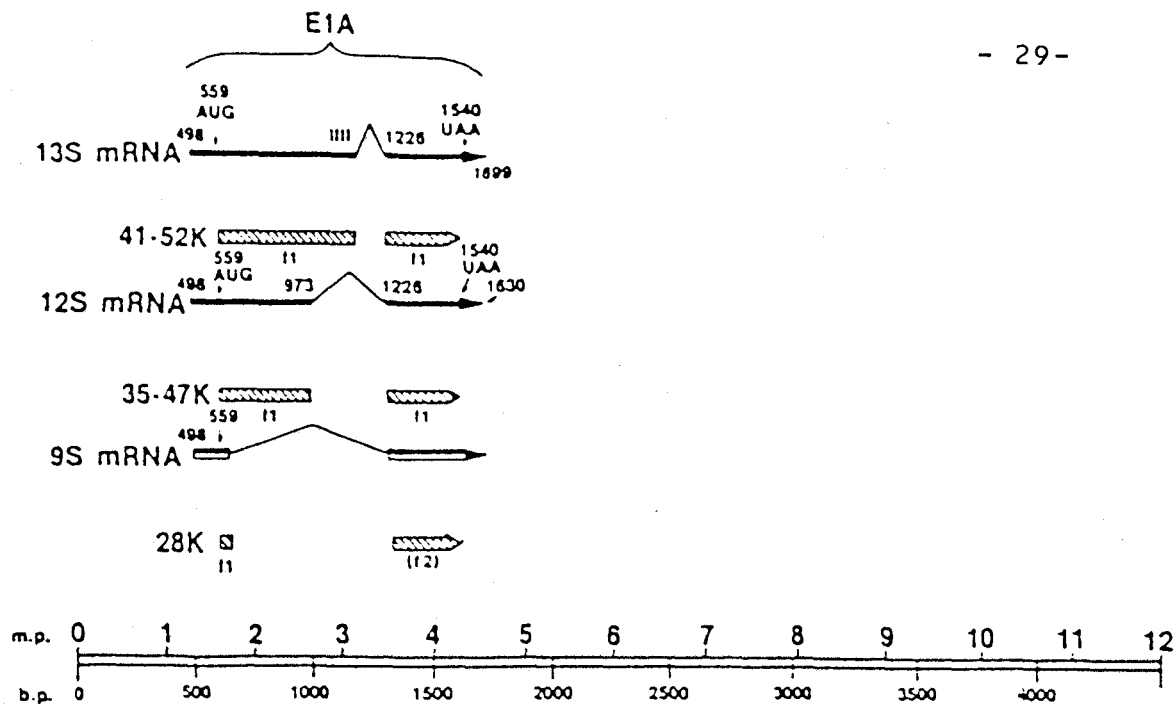


Fig. 9: Représentation graphique des ARNm et des protéines de la région E1A de l'Ad2 (Green et al., 1983 ; Stephens and Harlow, 1987).

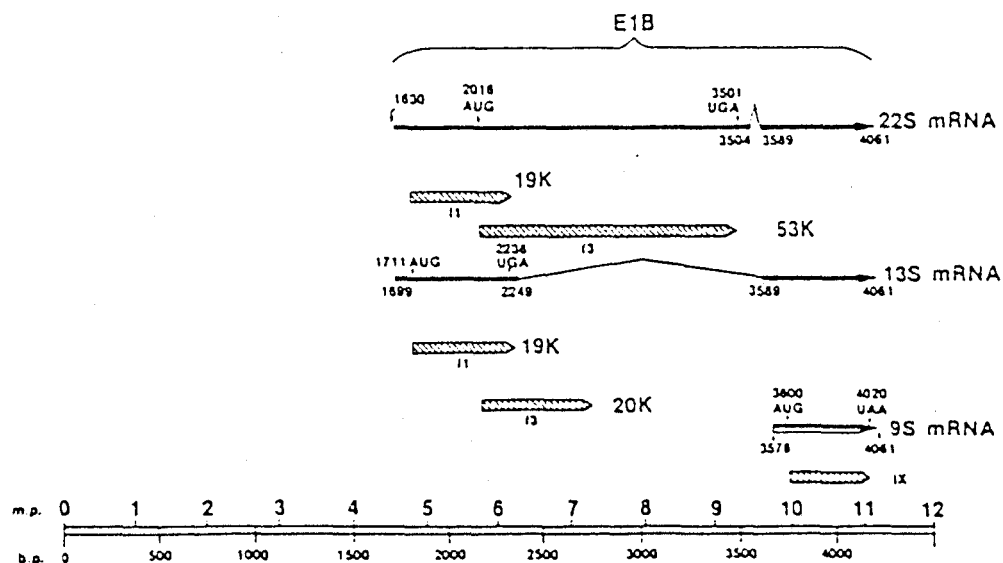


Fig. 10: Représentation graphique des ARNm et des protéines codées par la région E1B de l'Ad2 (Pettersson et al., 1983).

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

Whyte *et al.* (1988) démontrèrent l'association physique et fonctionnelle de E1A avec la protéine de 105 kDa, produit de l'anti-oncogène du rétinoblastome. En 1989 ces mêmes auteurs ont montré que cette protéine de 105 kDa nécessitait seulement la liaison aux résidus 121 à 127, homologue à une petite région de l'antigène T de SV40. Ce point confirmait l'importance de l'association entre la protéine du rétinoblastome et E1A dans le processus de transformation par cet oncogène viral (Whyte *et al.*, 1989).

1-2- la région E1B

Localisée entre 4,8 et 11,2 u.g., la région E1B code pour trois ARNm de 22S, 13S et 9S. Les ARNm 22S et 13S ont les mêmes extrémités 5' et 3' terminales et sont obtenus par épissage (fig.6a). L'ARNm 9S est codé à partir de son propre promoteur et donne naissance à une protéine structurale: le polypeptide IX (Alestrom *et al.*, 1980; Baker and Ziff, 1980) (fig. 10).

1-2-1- les messagers de E1B

L'ARNm 22S est traduit selon deux cadres de lecture différents et deux sites d'initiation AUG lui permettent le codage de deux protéines de 55kDa et de 19kDa.

Pendant la phase précoce du cycle viral, c'est l'ARNm 22S qui est principalement transcrit alors qu'en phase tardive le taux de l'ARNm 13S est plus important. Ceci peut être expliqué, en partie, par une plus grande stabilité de l'ARNm 13S par rapport à l'ARNm 22S (Wilson and Darnell, 1981) (fig. 10).

1-2-2- les polypeptides de E1B

Le premier produit de l'ARNm 22S est une phosphoprotéine de 55 kDa (496 AA). Elle est impliquée dans la maturation des ARNm tardifs, la baisse de synthèse protéique de la cellule hôte et la réplication efficace de l'ADN, (Babiss and Ginsberg, 1984) (fig. 10).

Des interactions ont également été décrites entre cette protéine et l'antigène "moyen T" du virus du polyome, ainsi qu'avec la protéine pp60 du gène *src* (Malette *et al.*, 1983). On la retrouve associée à une protéine cellulaire, la p53, durant la transformation cellulaire et avec une protéine de 25 kDa de E4 durant le cycle lytique.

Il est à noter que la p53, tout comme la protéine de 105 kDa du rétinoblastome serait un anti-oncogène cellulaire (Hinds *et al.*, 1989).

Le second produit de l'ARNm 22S est une protéine de 19 kDa (175 AA), de même que le produit de l'ARNm 13S, essentielle au cycle lytique car elle maintient l'intégrité de l'ADN viral et cellulaire (D'Halluin *et al.*, 1985). Cette protéine est indispensable au maintien de la transformation cellulaire (Stillman 1986).

2- la région E2

Transcrite à partir du brin I du génome viral, elle se situe entre 75,4 et 11,3 u.g. et contient les deux zones codantes E2A et E2B (fig. 11).

1-1- E2A

Deux promoteurs principaux sont utilisés au cours du cycle lytique: le premier situé à 75,4 u.g. (Ad2 E2AE), actif en phase précoce, le second à 72,2 u.g. (Ad2 E2AL), actif en phase tardive (Chow *et al.*, 1979).

Il y a également production d'ARNm à partir de promoteurs mineurs à 86,2 et 86,7 u.g., ainsi que des ARNm dont les séquences promotrices sont celles de la zone E4 (Baker *et al.*, 1979; Galibert *et al.*, 1979; Baker and Ziff, 1981).

La région E2A code pour une protéine multifonctionnelle qui possède une grande affinité pour l'ADN simple brin (DBP: DNA Binding Protein) (van der Vliet and Levine, 1973). Elle a une masse moléculaire apparente de 72 kDa et réelle de 59 kDa (Kruijer *et al.*, 1982).

De nombreuses fonctions lui sont attribuées:

- Elle intervient dans la réplication de l'ADN viral au niveau de l'initiation et de l'élongation de la chaîne désoxyribonucléique (van der Vliet and Sussenbach, 1975; van der Vliet *et al.*, 1977),

- Elle régule négativement la transcription de la région E4, en bloquant le démarrage de la transcription *in vivo* comme *in vitro* (Nevins and Winkler, 1980; Handa *et al.*, 1983),

- Elle est autorégulée, intervient dans la régulation de l'expression des gènes précoces viraux (Carter and Blanton, 1978a, 1978b, Blanton and Carter, 1979) et limite la durée de vie des ARNm de E1A et E1B, sans affecter les ARNm cellulaires (Babich and Nevins, 1981),

- Elle joue également un rôle dans l'assemblage des particules virales (Nicolas *et al.*, 1983).

Rice et Klessig (1984) ont montré que les deux domaines N et C terminaux de la protéine pouvaient agir indépendamment. Le domaine Ct (41-47 kDa) intervient dans la réplication de l'ADN viral car il est responsable de l'affinité pour l'ADN simple brin. Il est également responsable de la régulation de l'expression des gènes précoces et intervient dans la transformation quand il est modifié (Rice *et al.*, 1987). Ces données ont été confirmées ou avancées à partir de l'étude de mutants thermosensibles (ts) dans ce domaine, tel le H5 ts 125 (Horwitz, 1978) ou le H5 ts 107 (Kruijer *et al.*, 1983).

Le domaine Nt (26 kDa) n'a aucune affinité pour l'ADN simple brin. Sa phosphorylation conduit à l'hétérogénéité de la molécule en électro-focalisation (Klein *et al.*, 1979). Ce domaine est responsable de l'attachement de la protéine à l'enveloppe nucléaire (Klessig *et al.*, 1986).

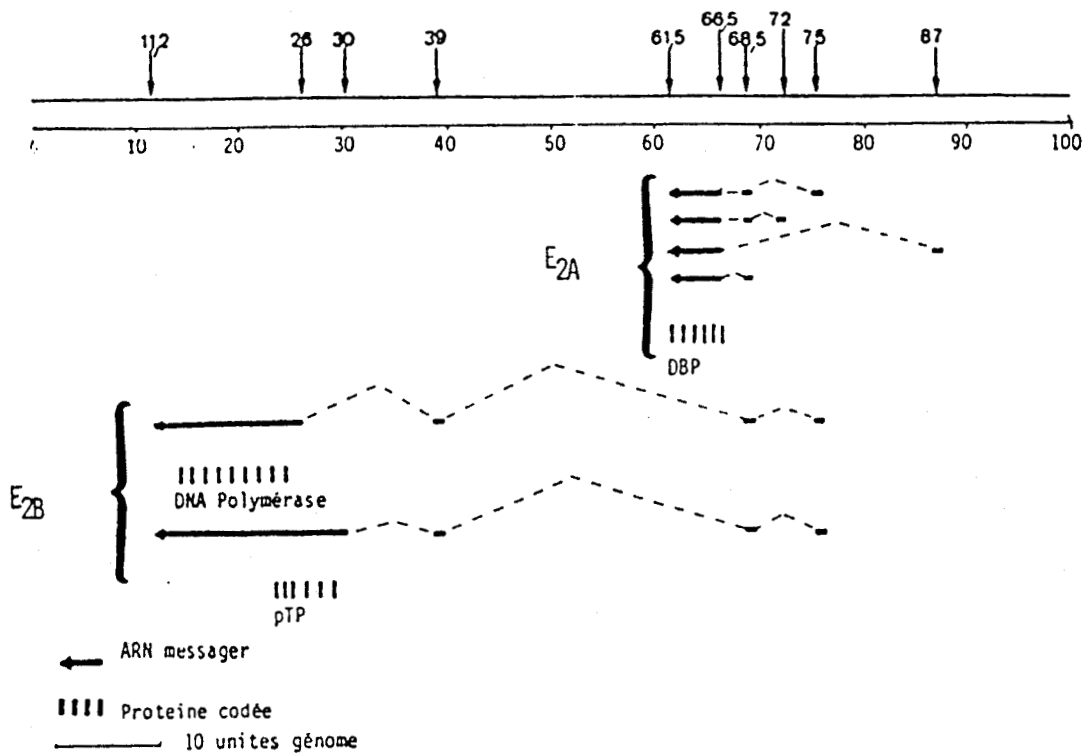


Fig. 11: Schématisation des ARNm et des protéines des régions E2A et E2B de l'Ad2.

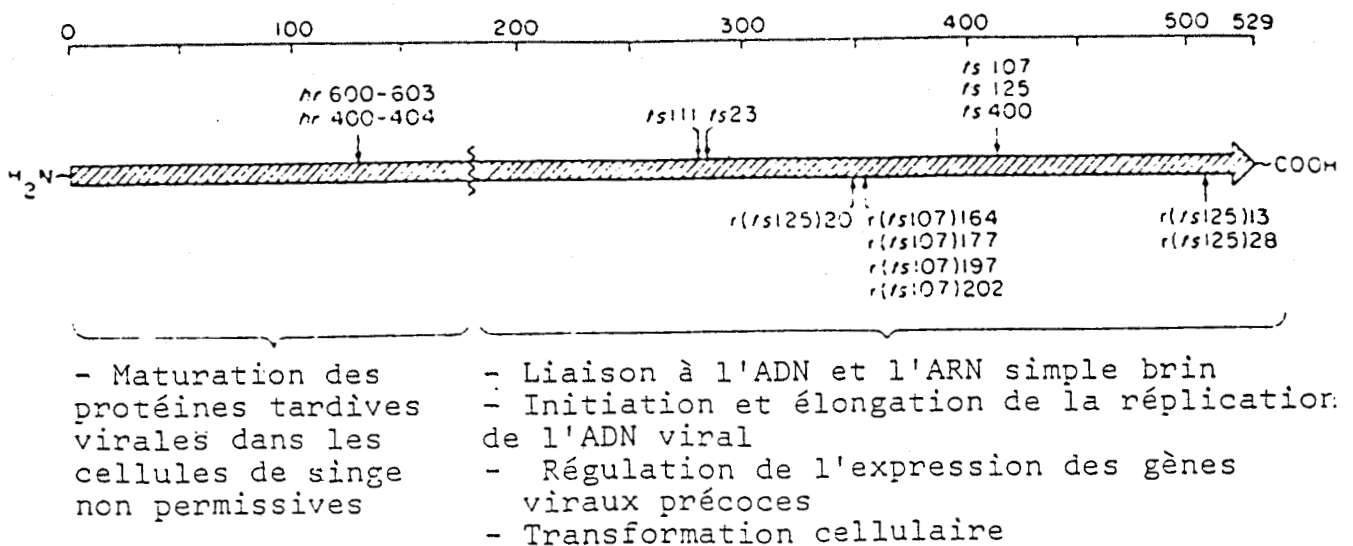


Fig. 12: Fonctions principales attribuées aux deux domaines N et C terminaux de la DBP.

Le mutant dans cette région (Ad2 hr 400: où hr= hôte dépendant; Klessig, 1977) a la capacité de pousser sur des cellules de singes, normalement non permissives au virus de type sauvage (Anderson *et al.*, 1981). En effet, il achève la maturation de ses ARNm tardifs et plus particulièrement celui de la fibre (Klessig and Anderson, 1975 ; Klessig and Chow, 1980) (fig. 12).

Récemment, l'implication de la DBP dans la régulation de l'expression des gènes par interaction avec les ARNm a été étudiée (Cleghon and Klessig, 1986; Lazarides *et al.*, 1988).

Enfin, de nombreuses études indiquent sa localisation nucléaire, associée à la chromatine condensée et diffuse, et sa localisation membranaire, associée à la lamina (Voelkerding and Klessig, 1986; Deppert *et al.*, 1988).

1-2- E2B

La région E2B code pour trois ARNm différents. Ils possèdent en commun un ensemble d'exons, situés à 76 u.g., 68,5 u.g. et 39 u.g. associés à la partie principale des ARNm localisés à 30 u.g., 26 u.g. et 23 u.g. respectivement et se terminent à 11,2 u.g.

Le plus grand des ARNm code pour le précurseur de la protéine terminale (pTP-87 kDa) qui, par clivage, donne la protéine terminale de 55 kDa (Smart and Stillman, 1982). Le plus petit des ARNm code pour l'ADN polymérase virale de 140 kDa (Nagata *et al.*, 1982).

Aucune protéine n'a été jusqu'à présent identifiée pour la phase ouverte de lecture située entre 25,1 et 23,3 u.g.

3- La région E3

Transcrite à partir du brin r, elle est située dans une zone contrôlée par le promoteur majeur tardif (Berk and Sharp, 1978).

Les ARNm sont produits à partir de deux précurseurs majeurs. Ils possèdent en commun le site de coiffe (76,8 u.g.) mais diffèrent en 3' par leurs sites de terminaison; le premier, le plus utilisé, est localisé à 85,9 u.g., le second est situé à 82,9 u.g. (Baker and Ziff, 1981). Au moins 9 ARNm sont produits par épissage et par utilisation de séquences "leaders" de la fibre (Chow and Broker, 1978)(fig.13).

Sur les huit phases ouvertes de lecture (ORF) susceptibles de générer des protéines de plus d'une centaine d'acides aminés (Herisse *et al.*, 1980), seules deux protéines de 19 et 11,6 kDa (Persson *et al.*, 1980) sont détectées.

La protéine 19 kDa est une glycoprotéine obtenue par glycosylation d'un précurseur de 14,5 kDa (Ishibashi and Maizel, 1974). Si elle ne semble pas avoir de rôle connu dans le cycle lytique, on ne la retrouve pas moins associée aux chaînes lourdes des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-1) (Kampe *et al.*, 1983). La formation du complexe 19 kDa - Ag du MHC-I abaisserait l'expression de ces antigènes à la surface cellulaire et

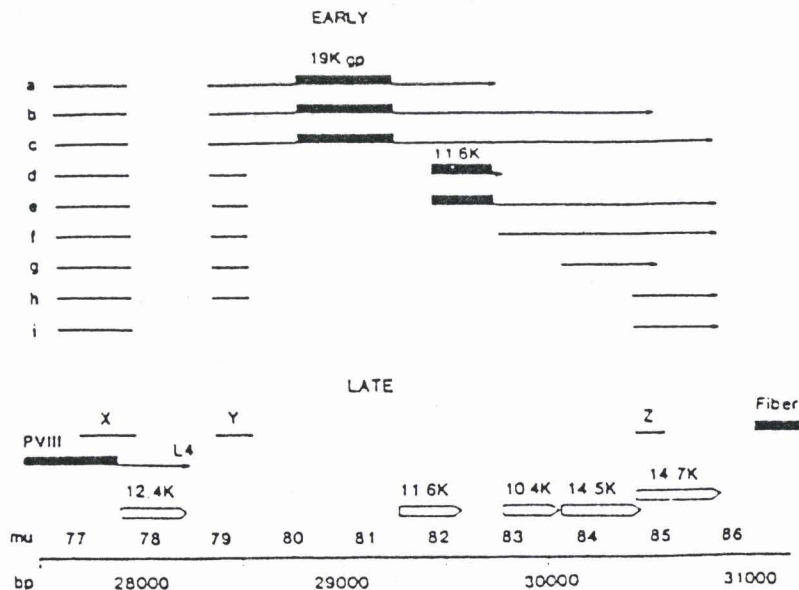


Fig. 13: Représentation graphique des transcripts de la région E3 de l'Ad2 (Aküsjarvi et al, 1986).

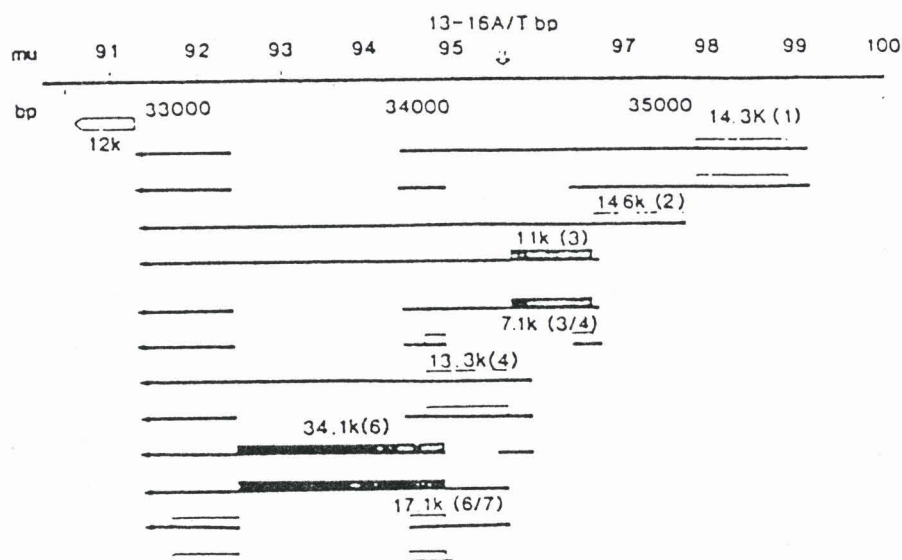


Fig. 14: Représentation graphique des transcripts de la région E4 de l'Ad2 (Aküsjarvi et al, 1986).

Les traits fins représentent les ARNm;
les rectangles hachurés figurent les phases ouvertes de lecture;
les flèches blanches correspondent aux protéines.

empêcherait la reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T (Severinsson and Peterson, 1985).

4- La région E4

Située à l'extrémité droite du génome viral (Berk and Sharp, 1978; Chow *et al.*, 1979), la région E4 est d'organisation et de régulation complexes. Le promoteur, localisé à 99,1 u.g., initie la transcription de façon hétérogène. Neuf à quatorze ARNm sont transcrits (Berk and Sharp, 1978; Chow *et al.*, 1979) et maturés par un mécanisme d'épissage à partir d'un précurseur nucléaire unique (fig.14).

Les fonctions de ces protéines sont mal connues. Environ 16 polypeptides sont traduits *in vitro*. Weinberg et Ketner (1986) ont montré que la région E4 intervenait dans la réplication et dans l'expression des gènes tardifs. En accord avec ces travaux, Halbert *et al.* (1985), en étudiant quelques mutants de délétion (H5dl 341, dl 355 et dl 366) ont déterminé que pour certaines protéines, un rôle était possible dans la régulation du niveau d'expression des protéines au cours de la phase tardive du cycle viral.

III - REGULATION DES GENES PRECOCES DE L'ADENOVIRUS

L'analyse de la régulation de l'expression des gènes eucaryotes est surtout étudiée actuellement au niveau transcriptionnel. L'adénovirus apparaît être alors un excellent modèle pour l'étude de la régulation génique car six unités transcriptionnelles majeures (parties codantes sous contrôle de leur promoteur propre) sont opérationnelles durant l'infection. Il s'agit des cinq régions précoces E1A, E1B, E2, E3 et E4 exprimées à partir de leur propre promoteur et de l'ensemble des régions tardives sous contrôle du MLP. La complexité de la régulation des régions précoces et tardives demande une parfaite coordination moléculaire que nous allons nous attacher à décrire.

Lors du cycle lytique, l'expression de tous les gènes précoces dépend de l'activité des produits de la région E1A pré-précoce (Berk *et al.*, 1979). Le contrôle de la transcription par E1A de toutes ces régions (E1A, E1B, E2, E3 et E4) s'effectue au niveau des promoteurs (Nevins, 1981).

Pour plus de facilité de compréhension, le terme "promoteur" qui sera utilisé tout au long de cet exposé correspond à toute la région nucléotidique couvrant le site de coiffe, la séquence TATA et toutes les séquences spécifiques en amont ou en aval du site de coiffe, cibles des facteurs de transcription.

Nous allons donc décrire l'organisation des divers promoteurs induits par E1A afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la stimulation de la transcription.

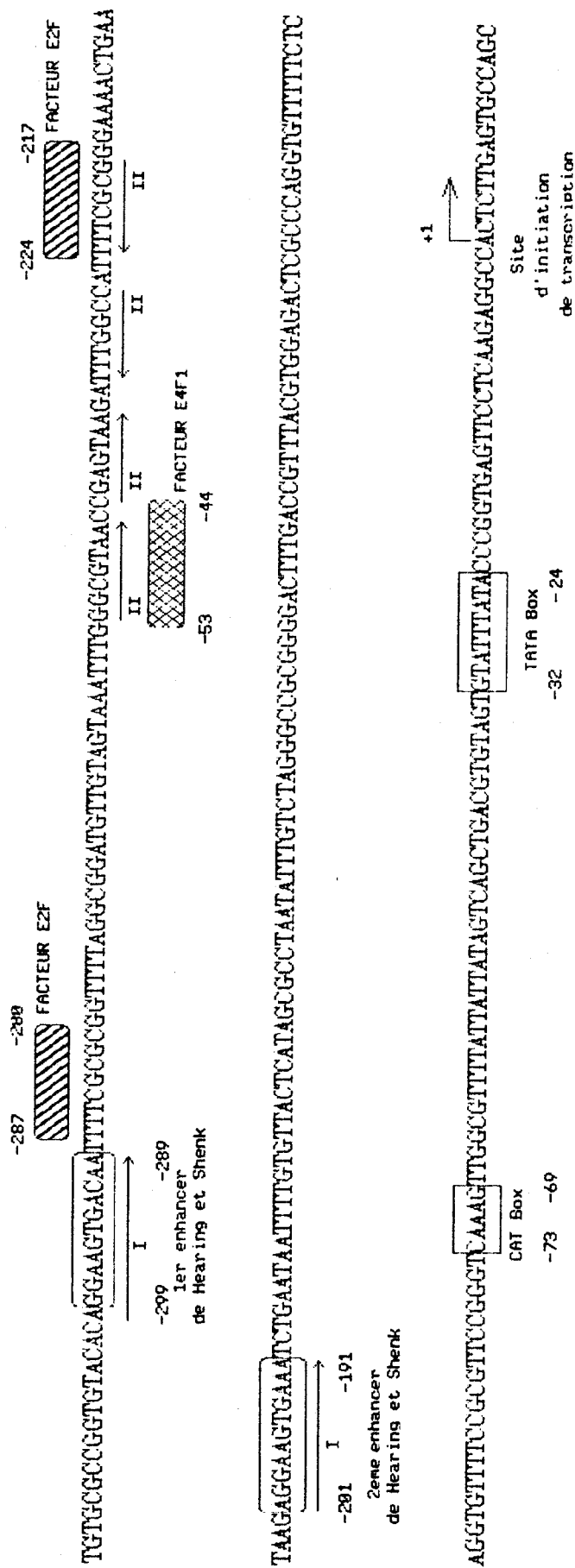


Fig. 15: Organisation nucléotidique du promoteur de la région E1A de 1'Ad2.

A - LE PROMOTEUR DE LA REGION E1A

Situé dans les 500 premiers nucléotides à l'extrémité gauche du génome, le promoteur renferme, outre la séquence d'empaquetage de l'ADN dans le virion, des séquences activatrices de la transcription (ou enhancers), des séquences "TATA box" et "CAAT box" et une séquence de 47 nucléotides hautement conservée entre tous les adénovirus humains (fig.15).

L'expression des produits du gène E1A est immédiate après l'infection. La présence de multiples éléments "enhancers" transcriptionnels dans le promoteur de E1A est à l'origine de ce phénomène (Hearing and Shenk, 1983; Hen *et al.*, 1983; Benoist and Chambon, 1981; Gruss *et al.*, 1981). Ces séquences peuvent stimuler la transcription indépendamment de leur distance ou orientation par rapport à la région codante (Moreau *et al.*, 1981). Elles peuvent également stimuler des gènes hétérologues (Banerji *et al.*, 1981).

Le motif "TATA box" quant à lui est un site de positionnement important pour le démarrage de la transcription (Grosscheld and Birnstiel, 1980). Un facteur de transcription essentiel à l'ARN polymérase II de la cellule hôte s'y fixe: il s'agit du facteur TFIID (Parker and Topol, 1984).

Les facteurs de transcription se définissent comme des protéines d'origine cellulaire le plus souvent, induites par des protéines virales ou d'autres agents (tels des facteurs hormonaux, des seconds messagers hormonaux, ou des signaux de prolifération cellulaire). Ces facteurs se lient spécifiquement à des séquences nucléotidiques précises en amont ou en aval des séquences TATA du promoteur et activent la transcription.

Le site majeur d'initiation est situé à 498 nt chez l'Ad2 et est précédé du motif TATAA à -30 nt par rapport au site de coiffe (+1) (Van Ormondt *et al.*, 1980).

De nombreuses protéines cellulaires reconnaissent le motif CCAAT important pour la transcription. Dans le promoteur E1A, ce site de séquence CAAAG, est localisé entre 60 et 80 bp en amont du site d'initiation (Benoist *et al.*, 1980; Mc Knight and Tjian, 1986).

1- Les enhancers de l'Ad2 et de l'Ad5

Le promoteur de E1A répond à la régulation positive par ses propres produits (Lewis *et al.*, 1980; Osborne *et al.*, 1984; Hearing and Shenk, 1985) et la présence d'un ou de plusieurs des éléments "enhancers" rend le promoteur sensible à l'autorégulation négative décrite par Smith *et al.* (1985) dans les cellules *cos* et Larsen *et al.* (1986, 1987).

L'analyse fine du promoteur de la région E1A par Hearing et Shenk (1983) conduit à la mise en évidence de deux séquences hautement conservées entre elles, entre -299 et -289 nt (5' GGGAAGTGACA 3') et entre -201 et -191 nt (5' AGGAAGTGAAA 3'). Elles possèdent une forte homologie avec les

régions promotrices d'autres virus à ADN et en particulier avec la séquence enhancer du virus du polyome (Hearing and Shenk, 1983).

En 1986, ces auteurs ont décrit deux domaines fonctionnels distincts dans la séquence "enhancer" de E1A de l'Ad5: le domaine I spécifique de l'activation de la transcription de E1A, lieu du premier élément "enhancer" et le domaine II qui module la transcription de toutes les autres unités précoces (voir fig. 15).

Sassone-Corsi *et al.*, (1983) ont également défini une séquence "enhancer like", mais située entre -498 et -318 nt par rapport au site de coiffe, capable de stimuler le MLP de l'Ad2 ainsi que d'autres promoteurs hétérologues.

L'analyse plus fine de cette région (Hen *et al.*, 1983) montra l'existence d'une séquence entre -342 et -333: 5' GGATGTGTAA 3', homologue de la séquence enhancer de SV40. Capable de stimuler des gènes hétérologues, elle possède cependant la particularité d'avoir un effet activateur dépendant de son orientation 5'--- 3'.

2- Les facteurs cellulaires impliqués

Décrit par Kovesdi *et al.* (1986, 1987), un facteur nucléaire E2F stimule la transcription de la région E2A, en se liant spécifiquement à la séquence TTTCGCGC. Ce facteur n'est présent sous sa forme active que dans les cellules infectées et est donc induit par E1A.

Absent des promoteurs E1B, E3, E4 et MLP, ainsi que des promoteurs de la hsp 70 et de la globuline, ce site est retrouvé en deux exemplaires entre les deux éléments I et II décrits par Hearing et Shenk (1986) du promoteur E1A: TTTCGCGC entre -287 et -280 nt; TTTCGCGG entre -224 et -217 nt.

Barett *et al.* (1987) montrèrent qu'une protéine nucléaire se liait entre -344 et -336 nt de la région E1A de l'Ad2. Le site de fixation déterminé par résistance à la DNase I est 5' GATGTGGTA 3'. Cet élément est en fait le noyau de l'élément enhancer décrit par Hen *et al.* (1983). Retrouvée dans les promoteurs de E2A, E3 et E4 de l'Ad2, cette protéine nucléaire pourrait être le lien entre ces divers promoteurs. Nous en reparlerons dans un prochain chapitre.

Lee et Green (1987) ont également identifié un autre facteur (E4F1) qui reconnaît la séquence ACGTAAC entre -44 et -53 nt par rapport au site d'initiation. On retrouve cette séquence dans l'élément II de E1A de l'Ad5.

B - LE PROMOTEUR DE LA REGION E1B

Bos *et al.* (1983) ont montré que le promoteur de E1B était bien la cible de la régulation positive des produits de E1A. L'étude des 135 nucléotides en amont du site de coiffe révéla que seule une courte région très proche du gène est suffisante pour le contrôle de l'expression. L'étude d'homologie, quant à elle,

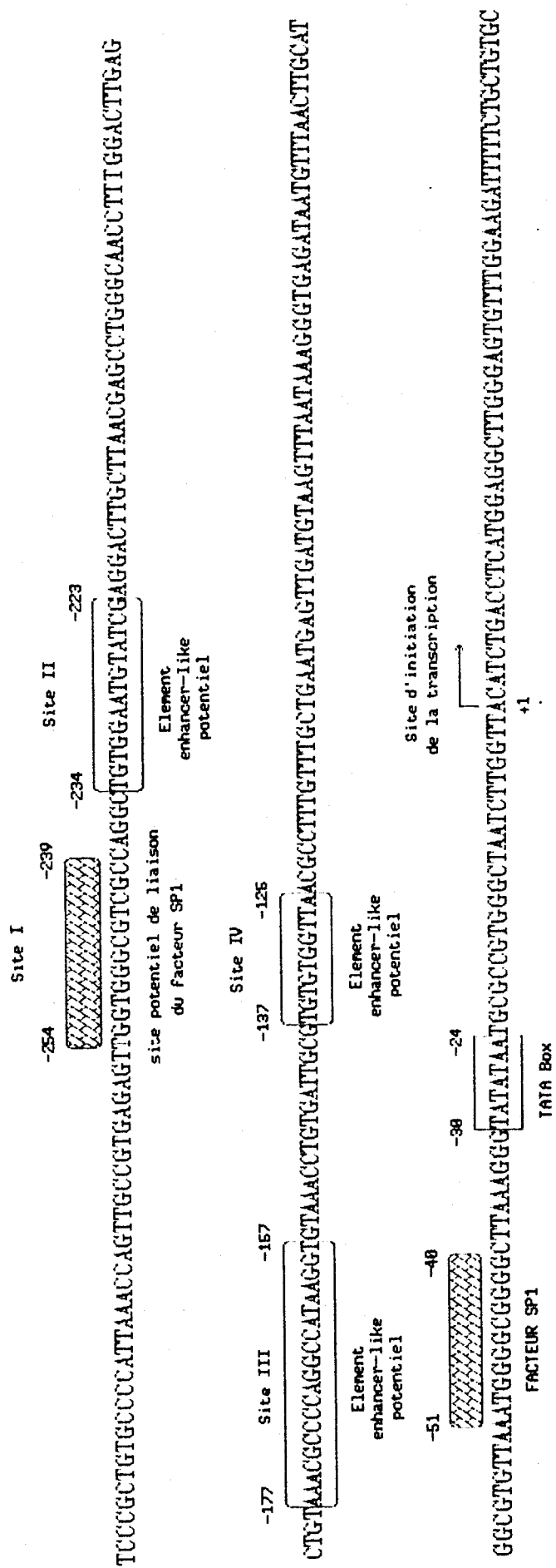


Fig. 16: Organisation du promoteur de la région E1B de l'Ad2.

mit en lumière l'existence d'une séquence de 5 nucléotides GGG Py G retrouvée dans d'autres séquences promotrices (E2, E3, E4 et MLP) d'Ad2/5, 7 et 12 (Tooze *et al.*, 1980).

Les séquences promotrices principales de E1B ont été positionnées par Wu *et al.* (1987) dans les 68 paires de bases séparant les unités de transcription E1A et E1B (fig.16).

Pour l'activité basale du promoteur, Wu *et al.* (1987) ont décrit l'importance de la séquence GGGGCGGGGC entre les nucléotides -48 et -39 qui, délétée, fait chuter le taux de production d'ARNm d'un facteur 6. Cette séquence correspond à la séquence consensus parfaite reconnue par le facteur de transcription Sp1 (Dyanan *et al.*, 1983; Kadonaga *et al.*, 1983). La liaison du facteur fut confirmée par expérience d'empreinte à la DNase I (Galas *et al.*, 1978). Les promoteurs délétés de ce site Sp1 sont toujours activés par E1A, ce qui suggère que ce facteur n'est probablement pas impliqué dans la régulation induite par cette région pré-précoce, au contraire de l'effet produit par la délétion de la séquence "TATA box" (-35/-26). De ce fait, pour le promoteur de E1B, l'élément TATA, cible du facteur de transcription TFIID, joue un rôle crucial dans l'initiation de la transcription *in vivo* et dans l'inductibilité par E1A.

Les produits de la région E1A pourraient dans ces conditions augmenter l'activité du facteur TFIID lui-même, ou celle des facteurs de transcription qui interagissent avec le facteur TFIID pour stimuler la transcription.

Associée à cette première région de contrôle, Parks *et al.* (1988) en ont identifié une seconde plus distale entre les nucléotides -250 et -120. Cette région distale n'affecte pas l'expression de la région E1B après infection des cellules HeLa. Cependant, elle renferme quatre domaines, dont 3 doués d'activité enhancer. Les trois premiers sont localisés dans la région codante des protéines de 243 AA et 289 AA de E1A (fig. 16):

- le site I, le plus distal, serait un site de fixation de Sp1,
- le site II conservé chez les Ad12, 7 et 4 contient le "core" commun à de nombreux enhancers: GTGG A/T A/T A/T G (Hearing and Shenk, 1983),
- le site III renferme la séquence similaire à celle intervenant dans le contrôle transcriptionnel de E3 d'Ad5, de E1B d'Ad4 et des enhancers de SV40 et de polyome (Sussenbach, 1984; Veldman *et al.*, 1985; Tokunaga *et al.*, 1986; Zenke *et al.*, 1986),
- le site IV renferme aussi une séquence similaire à un enhancer intervenant dans les régions de contrôle de E1B d'Ad4 et d'Ad12 (Sussenbach, 1984; Tokunaga *et al.*, 1986).

En conclusion, si on admet que la région proximale est essentielle et suffisante pour définir la région de contrôle transcriptionnel de E1B, les résultats de Parks *et al.* (1988) suggèrent qu'on peut l'étendre à la séquence distale qui ne

serait sollicitée en fait que dans des compartiments cellulaires moins riches que ceux des cellules KB ou HeLa par exemple.

C - LES PROMOTEURS DES REGIONS E2A ET E2B

La DBP est produite pendant toute la durée du cycle lytique à partir de deux promoteurs distincts. Le premier, utilisé en phase précoce du cycle lytique, est situé à 74 u.g. environ, et est inductible par E1A, ce qui ne semble pas être le cas du second, situé à 72 u.g., qui est utilisé en phase tardive du cycle lytique (Bhat *et al.*, 1987; Dery *et al.*, 1987).

1- Le promoteur précoce

1-1- Les sites de démarrage de la transcription

Les ARNm majeurs précoces sont transcrits à partir d'un site d'initiation majeur (Kitchingman *et al.*, 1977; Berk and Sharp, 1978), le site E2AE1. vingt six nucléotides en amont, un autre site d'initiation mineure a été identifié (E2AE2). Les deux sites sont utilisés *in vitro* comme *in vivo* (Mathis *et al.*, 1981) mais l'utilisation du site E2AE1 est prépondérante lors de l'inductibilité par E1A (Zajchowski *et al.*, 1985).

Les deux motifs situés 30 nucléotides en amont des sites d'initiation sont nommés "TATA-like" car leur séquence diffère de la séquence consensus TATA normalement rencontrées: TTAAGA pour T1 associée à E2AE1 et TTAAATTT pour T2 associée à E2AE2 (fig.17).

1-2- Détermination des séquences essentielles

Zajchowski *et al.* (1985) ont disséqué le promoteur précoce par la technique de "linker scanning" et ont montré que la région entre -97 et +1 nt, décrite par Elkaim *et al.* (1983), était indispensable à la transcription.

En utilisant l'expression transitoire de ces mutants en cellules HeLa, ils ont découvert que deux régions de contrôle de transcription se chevauchaient à partir des deux sites E2AE1 et E2AE2.

Deux éléments indépendants localisés autour des positions -30 et -59 nt contrôlent l'efficacité de transcription à partir des deux sites d'initiation. La séquence G C/T A/G G C/T TTTC positionnée entre -70 et -62 nt serait indispensable pour l'activité de E2AE1 et de E2AE2. On la retrouve également dans les promoteurs de E3 et de E4 (Weeks and Jones, 1983). La séquence entre -70 et -90 nt serait aussi importante pour le fonctionnement efficace des deux zones de contrôle.

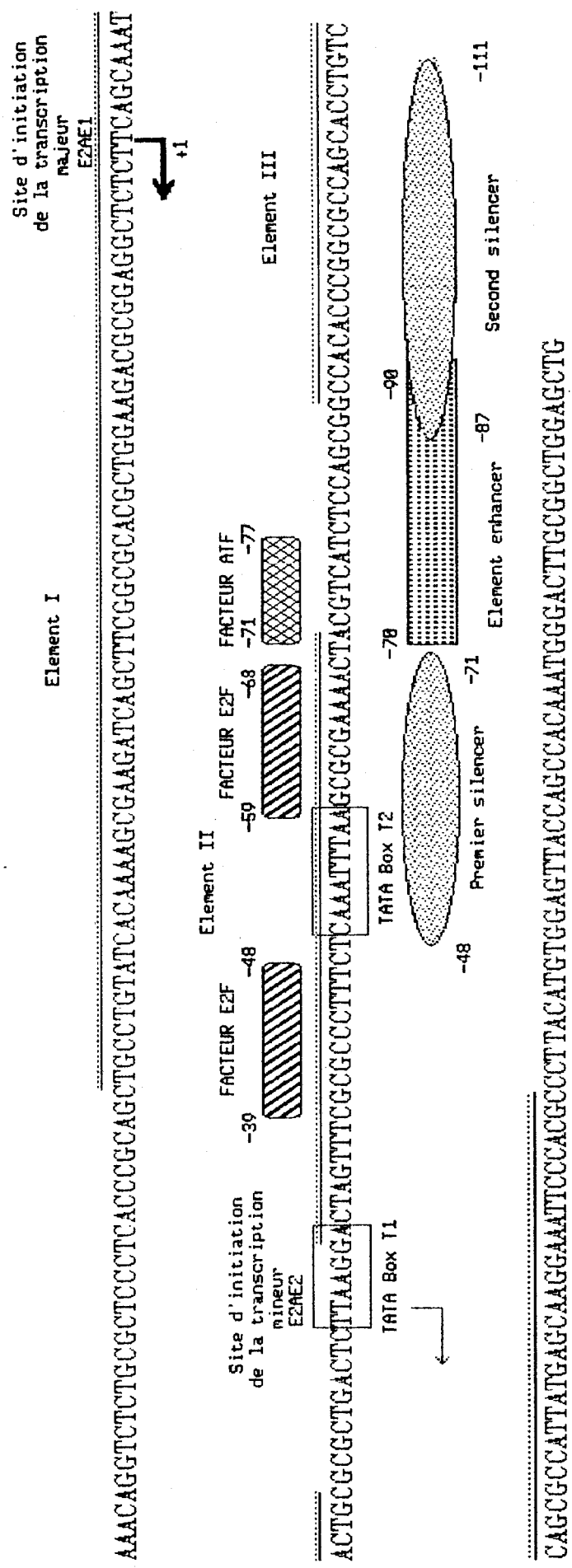


Fig. 17: Organisation nucléotidique du promoteur précoce de la région E2A de l'Ad2.

Cependant, si la stimulation par E1A ne semble impliquer aucune séquence unique spécifique à partir de E2AE1, la stimulation à partir de E2AE2 nécessite la séquence TATA-like T2. L'existence des deux zones de contrôle chevauchées pourrait être alors expliquée par la coexistence dans une même région des zones de régulations responsables de l'expression des deux régions E2A et E2B, le site à -26 appartenant alors à une unité différente de celle codant la DBP: celle de E2B codant pour la pTP et l'ADN polymérase virale (Zajchowski *et al.*, 1985)

1-3- Les séquences cibles de E1A

1-3-1- l'existence d'un enhancer inductible par les produits de E1A

Aucune séquence unique ne peut être impliquée dans l'induction par E1A, ce qui a été confirmé par Kingston *et al.* (1984). Cependant, ces résultats ne vont pas à l'encontre de l'intervention de plusieurs domaines.

En utilisant des mutants de délétion, Imperiale et Nevins (1984) ciblerent une région essentielle à l'activation par E1A entre les positions 21 et 79 nt en amont de E2AE1. Cette séquence, déplacée de sa position initiale (jusqu'à 4000 nucléotides) ou inversée, conserve sa fonction. Ces propriétés sont fortement similaires à celles définissant un enhancer (Khoury *et al.*, 1983). Cependant, son activité est directement dépendante de E1A car le promoteur est constitutionnellement faible. D'où la nomenclature d' "enhancer-like" puisque l'enhancer vrai fonctionne en absence de tout mécanisme d'induction.

Des études complémentaires (Imperiale *et al.*, 1985) suggèrent que le domaine entre -21 et -79 nt renferme plusieurs séquences impliquées à la fois dans l'expression induite et non induite par E1A. Le site le plus distal (-80/-60) interviendrait dans l'expression de base du promoteur, le second, le plus proche du site E2AE1 (-70/-30), serait impliqué dans l'induction par E1A.

L'existence de l'enhancer fut confirmée par Murthy *et al.* (1985) dans la séquence -66 à -82 nt. Deux zones ont alors pu être déduites de ce domaine:

a) la séquence A/C GGAAGTGA A/C retrouvée chez E1A et E4 et identifiée par Hearing et Shenk (1983),

b) la séquence GTAGTT, homologue à celle décrite par Weeks et Jones (1983).

En 1986, Jalinot et Kedingner positionnèrent cet enhancer entre -70 et -90 nt, car ils montrèrent que le fragment -86 à -71 nt peut être inversé et toujours activer un gène hétérologue (globuline). La séquence serait donc GGAAGTGAC. Cependant, l'expression n'est "constitutive" que si cet élément est isolé de son contexte nucléotidique. En effet, les séquences entre -111 et -87 nt du côté 5' et entre -71 et -48 nt du côté 3' interviendraient dans l'inhibition de l'effet enhancer en l'absence de E1A.

E1A agirait alors soit en mettant en jeu des molécules "represseurs" qui neutraliseraient les deux sites de régulation négative, soit en activant la fixation d'un ou de plusieurs facteurs positifs interférant avec les deux séquences inhibitrices de la transcription ("silencers").

Un autre point concernant l'organisation des régions coordonnées par E1A a été élucidé par Zajchowski *et al.* (1987). Trois éléments interviendraient dans la transactivation de la région E2A: l'élément I (-13/+62), l'élément II (-71/-29) et l'élément III (-146/-86). Il est nécessaire que ces éléments soient combinés deux à deux pour être transactivés (I + II ou II + III). L'élément II serait de ce fait d'une importance capitale pour la transactivation de la région E2A(fig. 17).

1-3-2- Les facteurs cellulaires impliqués

Kovesdi *et al.* (1986) détectèrent l'existence d'un facteur à partir d'extraits de cellules infectées par l'adénovirus de sérotype 5 qui interagissait avec le promoteur de E2. Cette région coïncidait avec celle impliquée dans l'activité promotrice induite ou non par E1A, entre -33 et -74 nt. D'autre part, l'activité de liaison à l'ADN de ce facteur était dépendante de E1A.

L'étude plus précise qu'ils réalisèrent en 1987 (Yee *et al.*) leur permit de localiser deux sites de fixation entre -33 et -49 nt et entre -53 et -71 nt pour ce facteur appelé E2F.

La liaison de E2F peut se produire à chaque site indépendamment l'un de l'autre mais la liaison est d'affinité maximale quand les deux sites sont présents. Ces deux sites sont 5' TTTCGCGC 3' pour le plus distal et 5' GCGCGAAA 3' pour le plus proximal par rapport à E2AE1 et ainsi dans une orientation inversée l'un par rapport à l'autre.

Puisque E2F n'est détecté qu'en présence de E1A, ce facteur pourrait servir d'intermédiaire à l'activation, tout au moins dans les deux promoteurs de E1A et de E2A (Kovesdi *et al.*, 1987). Jones et Tibbetts (1989) suggèrent qu'il serait d'ailleurs responsable de l'autorégulation de la région E1A..

Simultanément, SivaRaman *et al.* (1986) découvrirent un facteur cellulaire spécifique d'une séquence de contrôle transcriptionnel en amont de E2AE1. Ce facteur se lie à une séquence de 17 nt: 5' TGGAGATGACG TAGTTT 3' localisée entre -66 et -82 nt en amont du site de coiffe. Cependant ce facteur diffère de celui défini par Kovesdi *et al.* (1987) à la fois par le site de fixation à l'ADN (quoique proche d'E2F) et par le fait de son existence dans les cellules infectées ou non par l'adénovirus (Kovesdi *et al.*, 1986).

Les travaux de SivaRaman *et al.* (1987) et de Yee *et al.* (1987) montrèrent la coexistence des deux facteurs E2F et E2AEF (ou EPF).

- E2AEF serait indispensable à l'activité basale du promoteur mais ne serait vraisemblablement pas impliqué dans la régulation par E1A directement. E2AEF serait également un facteur plus général car son site de liaison est retrouvé dans de nombreux promoteurs viraux précoces (Lee *et al.*, 1987). Il

serait équivalent au site de fixation du facteur E4F1 retrouvé dans le promoteur de E4 (Lee and Green, 1987) et au site de liaison du facteur E3F2 (Hurst and Jones, 1987). Le consensus spécifique serait A/T CGTCA positionné entre -71 et -76 nt. La nomenclature acceptée pour ces facteurs EPF, E2AEF, E4F1 et E3F2 est ATF (Activating Transcription Factor). ATF jouerait donc un rôle significatif dans la transcription dirigée par E1A dans les promoteurs de l'adénovirus, à l'exclusion de E1B.

- Le facteur E2F serait quant à lui directement mis en jeu par E1A. Ce fait est d'ailleurs confirmé par la découverte d'une activité "E1A -like" dans les cellules de tératocarcinome F9 (Hen *et al.*, 1986; La Thangue and Rigby, 1987), dont la cible est le facteur E2F (Reichel *et al.*, 1987).

In vivo, le facteur ATF ne se fixe pas de manière stable au promoteur (SivaRaman *et al.*, 1987). Toutefois, l'interaction avec E2F permettrait l'édification d'un complexe de transcription stable (Yee *et al.*, 1987). Il est en outre possible qu'*in vivo* d'autres facteurs soient nécessaires à la formation du complexe de transcription. Ainsi peut intervenir le facteur TFIID ou celui qui pourrait se lier à la séquence "CAAT like" située entre les deux sites de liaison à E2F.

Les travaux de Garcia *et al.* (1987) montrent clairement la nécessité de la combinaison ATF-TFIID pour stabiliser la liaison du facteur de transcription à son site "TATA like".

Récemment, Reichel *et al.* (1988) ont montré que la cinétique d'induction d'E2F coïncidait avec la transcription du promoteur E2 stimulé par E1A. Le produit du messenger 13S est responsable de l'activation de E2F sans impliquer la synthèse de nouvelles protéines. Une confirmation de ce phénomène a été donnée par Babiss (1989).

Les études d'empreintes sur ADN réalisées par Boeuf *et al.* (1987) et par Devaux *et al.* (1987) indiquent que les profils sont les mêmes pour le promoteur, qu'il soit induit ou non par E1A. En fait, la proximité des sites de liaison à E2F et ATF pourrait permettre une reconnaissance interprotéines. E1A permettrait alors une meilleure affinité des protéines entre elles, plutôt qu'une augmentation des taux des facteurs cellulaires impliqués.

Récemment, les travaux de Loeken et Brady (1989) ont montré que les séquences renfermant le site de fixation du facteur ATF (-70 à -90 nt) est bien l'élément "enhancer" induit par E1A. En utilisant des mutants d'insertion pour modifier la double hélice, ils suggèrent également que l'arrangement spatial entre les deux sites E2F est important. Ce dernier point a également été avancé par Pei et Berk (1989).

La purification des deux facteurs a été réalisée par Jalinot *et al.* (1988) pour ATF et par Yee *et al.* (1989) pour E2F.

ATF serait un polypeptide monomérique de 40-43 kDa. L'homologie entre son site de fixation et l'élément de réponse à l'AMPc fera l'objet d'un prochain chapitre.

E2F serait, quant à lui, un polypeptide de 54 kDa. Contrairement aux autres facteurs purifiés tels que Sp1 (Briggs *et al.*, 1986), Ap1 (Lee *et al.*, 1987a) ou Ap2 (Mitchell and Tjian, 1987), E2F est un facteur faiblement abondant (1000 copies/cellule par rapport au taux de 50 000 à 100 000 copies/cellule pour les autres facteurs) ce qui confirme son rôle de composant limitant et essentiel des unités de transcription E1A et E2A. La modification activant cette protéine est une phosphorylation faite par une serine kinase cellulaire (Bagchi *et al.*, 1989).

Récemment, les travaux de Hiebert *et al.* (1989, communication personnelle) ont permis d'attribuer à E2F un rôle important dans le contrôle de la transcription durant la prolifération cellulaire comme l'indiquent les nombreux sites de reconnaissance à E2F retrouvés dans le promoteur des oncogènes *c-myc*, *N-myc*, *c-myb* et dans le promoteur des gènes codant pour le récepteur à l'EGF.

Enfin, notons l'implication de la région E4 dans la régulation de l'expression du promoteur E2A. En effet, les travaux de Marten *et al.* (1989, communication personnelle) et de Neill et Nevins (1989, communication personnelle) ont démontré l'intervention d'une protéine virale de la phase ouverte de lecture 6/7 de la région E4 dans l'activation de E2F. Cependant, les résultats de Marten *et al.* suggèrent que E1A pourrait activer le promoteur E2A précoce en l'absence de forme E2F activée. De plus, E4 n'interviendrait qu'en l'absence de E1A pour activer le promoteur en modifiant E2F pour stimuler la transcription.

Neill et Nevins (1989), au contraire, indiquent que E1A et E4 agiraient de manière synergique pour une transcription maximale du promoteur par l'intermédiaire du site de fixation au facteur E2F. Ainsi, l'action coopérative des deux régions E1 et E4 suggère plutôt dans ce cas l'existence de plusieurs étapes dans l'activation de E2F.

2- Le promoteur tardif

Aux temps intermédiaire et tardif après l'infection, la région est transcrite à partir d'un second promoteur (E2AL: Chow *et al.*, 1979; Baker and Ziff, 1981). Si la stimulation de la transcription par E1A à partir du promoteur précoce est admise, il semble que l'activation du promoteur tardif n'en dépende pas, quoique les données ne soient pas toujours claires (Guilfoyle *et al.*, 1985; Leff and Chambon, 1986).

L'analyse mutationnelle faite par Bhat *et al.* (1987) montre que la transcription de ce promoteur est induite au moins en partie par le facteur Sp1 (fig. 18). Les profils de transcription des mutants indiquent qu'aucun des produits de E1A n'interagit avec le promoteur tardif pour moduler la transcription. En outre, les éléments de régulation sont fortement différents de ceux identifiés pour le promoteur précoce.



Fig. 18: Organisation nucléotidique du promoteur tardif de la région E2A de l'Ad2.

Goding *et al.* (1987) ont décrit l'interaction de multiples facteurs de transcription avec le promoteur tardif. Outre Sp1, un de ces facteurs reconnaît les motifs CCAAT présents aux coordonnées -72, -135 et -229 sur le brin non codant. Les analyses de mutations montrent que ce facteur CRF est différent du facteur CBP (Graves *et al.*, 1986; Johnson *et al.*, 1987) et CTF/NFI (Jones *et al.*, 1987). Un autre facteur se fixe à la séquence située à -110 nt et serait homologue à celui qui se fixe à l'enhancer de *c-fos* (situé à proximité de l'élément de réponse au sérum SRE (Lee *et al.*, 1987a; Piette and Yaniv, 1987). Malgré l'homologie de leur site de liaison, ce facteur appelé USFII et le facteur AP1 seraient différents. D'autre part, ce site est également retrouvé dans les promoteurs E4 et E2AE où il est nécessaire à une transcription efficace. Enfin, un facteur supplémentaire qui reconnaît le consensus G₆NT a également été détecté.

Malgré la présence du site de reconnaissance du facteur USFII, cible potentielle de régulation par E1A, le promoteur est faible durant la phase précoce du cycle lytique et plus fort en phase tardive. De ce fait, Goding *et al.* (1987) suggèrent que l'existence d'un seul facteur serait insuffisante pour conférer l'inductibilité par E1A, d'autant plus que cet élément est présent en plusieurs exemplaires dans E4 et associé à des éléments supplémentaires chez E2.

Huang et Roeder (1988) ont étudié l'influence de la topologie de l'ADN sur l'expression du promoteur. En effet les éléments de contrôle de régulation transcriptionnelle agissant en *cis* ou en *trans* induisent des tensions et conformations particulières de l'ADN qui sont sans doute à l'origine de leur pouvoir activateur ou represseur. L'utilisation de matrices circulaires ou linéaires leur ont permis de confirmer l'importance des régions déjà décrites pour la plus grande efficacité de la transcription.

Devant la difficulté de travailler avec un promoteur faible, Huang *et al.* (1988) ont modifié la séquence TACAAA située à -30 nt en séquence TATAAA. L'augmentation de la transcription qui en résulte a confirmé la corrélation entre une efficacité maximale de transcription et une meilleure affinité avec le facteur TFIID. Pour le promoteur de type sauvage, la séquence TACAAA doit donc retarder l'édification du complexe de transcription stable nécessaire à l'initiation.

La mise en jeu de facteurs cellulaires différents a d'ailleurs été avancée par Kitani-Yasuda *et al.* (1988). Ces auteurs rejettent l'hypothèse selon laquelle la réplication serait l'événement déclencheur de l'activation du promoteur tardif.

D - LE PROMOTEUR DE LA REGION E3

Les extrémités 5' des transcripts de la région E3 sont hétérogènes. L'initiation se produit à 2 purines (séparées par une seule pyrimidine) localisées à 25 et 27 nt en aval de la séquence TATAA à 76 u.g. (Baker and Ziff, 1981).

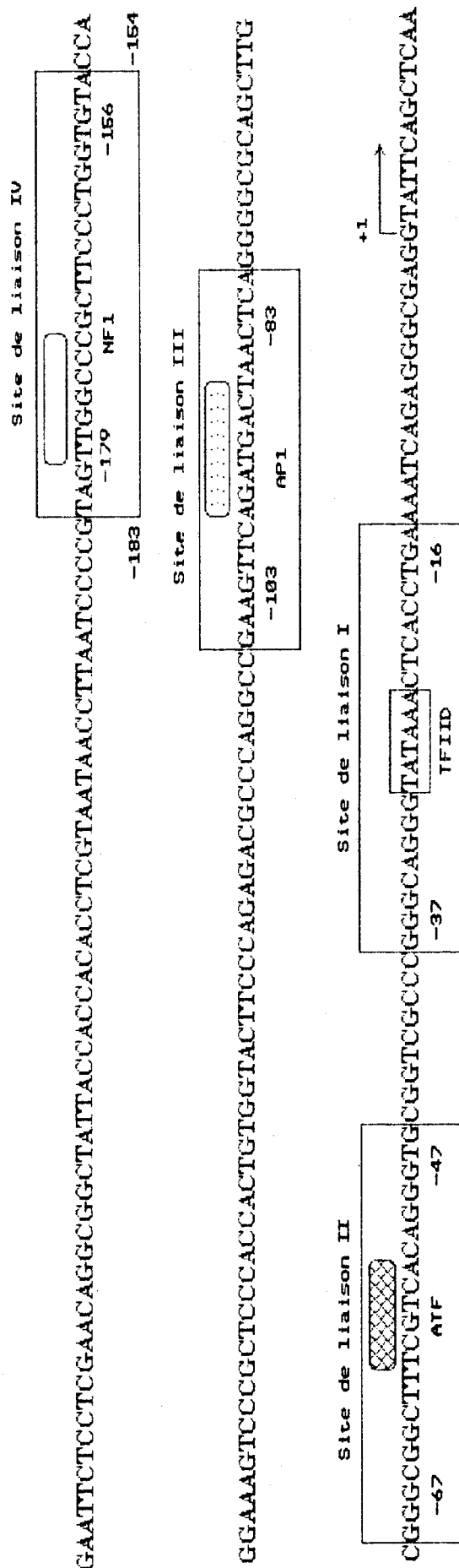


Fig. 19: Organisation nucléotidique du promoteur de la région E3 de l'Ad2.

Lee *et al.* (1982) ont suggéré que la région incluant la TATA box et s'étendant au delà du site de coiffe était essentielle à la transcription; les séquences en amont moduleraient alors les niveaux de transcription. Leff *et al.* (1985) montrèrent qu'une séquence centrée à -55/-57 et un élément localisé entre -111 et -233 nt étaient importants pour une meilleure efficacité transcriptionnelle.

Weeks et Jones (1985) recherchèrent les séquences nécessaires à l'activation par E1A. Ils localisèrent la région entre -82 et -105 nt et montrèrent son homologie avec le site entre -79 et -59 dans le promoteur de E1A (Imperiale *et al.*, 1984), le site entre -82 et -66 dans le promoteur de E2A (Murthy *et al.*, 1985) et le site entre -158 et -179 dans le promoteur de E4 (Gilardi and Perricaudet, 1984).

Cette séquence, de motif consensus AGATGACTA est également retrouvée entre -118 et -112 nt en amont du site de coiffe dans le promoteur E4. Ces deux domaines peuvent fonctionner indépendamment l'un de l'autre mais tous les deux sont utiles à une meilleure transcription (fig.19).

L'identification des facteurs cellulaires impliqués dans la régulation basale ou induite par E1A fut réalisée par Garcia *et al.* (1987) et par Hurst et Jones (1987). Quatre régions sont décrites:

- le site I (-16/-37) est le site de liaison du facteur TFIID,
- le site II (-47/-67), celui des facteurs ATF et CREB,
- le site III (-83/-103), celui du facteur AP1,
- le site IV (-183/-154) pourrait recevoir le facteur NF1.

Les études de mutagénèse révèlent que les deux sites II et III sont nécessaires à la transcription basale et induite, en plus de la séquence TATA.

Zajchowski *et al.* (1988) ont montré que les deux unités de transcription E2A et E3 voisines, quoique sur deux brins complémentaires d'ADN, renfermaient des éléments de régulation communs. La séquence "enhancer" du promoteur précoce de E2A, lieu du site de fixation d'ATF, serait alors préférentiellement mise en jeu. La meilleure transcription de la région E2, au travers de cet élément "enhancer", serait en fait due aux séquences situées plus en aval, de -29 à +37 nt, dans le promoteur E2A, dont les zones de contrôle assurent une liaison plus efficace du facteur ATF, au détriment du promoteur de E3 en présence de E1A (Zajchowski *et al.*, 1987).

E - LE PROMOTEUR DE LA REGION E4

Le promoteur, localisé à 99,1 u.g., initie la transcription de façon hétérogène, à l'intérieur d'une région de 7 nucléotides (Baker and Ziff, 1981; Hashimoto *et al.*, 1981).

La comparaison des régions E2 et E4 a permis à Gilardi et Perricaudet (1984) de détecter une séquence conservée, localisée entre la zone -80/-67 du promoteur E2A précoce et les deux séquences -154/-132 et -179/-155 du

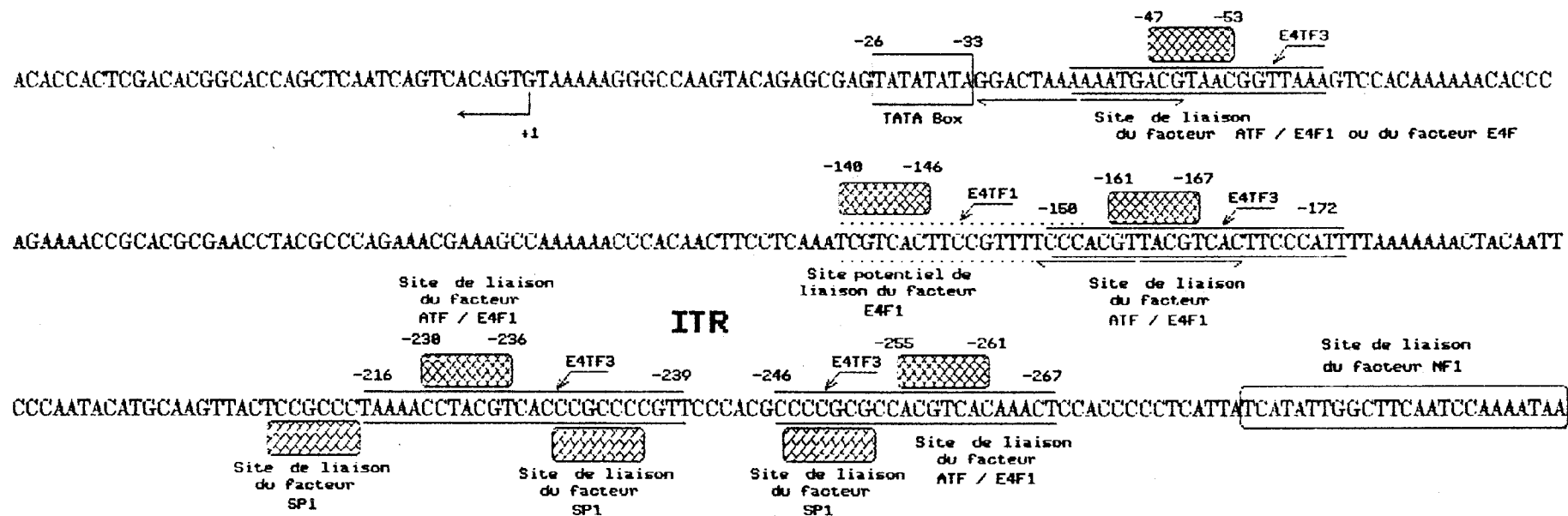


Fig. 20: Organisation nucléotidique du promoteur de la région E4 de l'Ad2.

promoteur E4. Le domaine couvre en outre la séquence GGGAAGTGAC, consensus de l'enhancer de E1A (Hearing and Shenk, 1985). Les deux copies de cet élément suggèrent que cette région peut fonctionner comme un enhancer E1A-dépendant. Gilardi et Perricaudet (1984) ont en outre montré que le produit de l'ARNm 13S était responsable de la transactivation du promoteur.

Des études plus précises (Gilardi and Perricaudet, 1986) révélèrent l'importance des régions entre -239/-218 nt et entre -179/-158 nt par rapport au site de coiffe. Le promoteur E4 est ainsi original par rapport aux autres promoteurs précoces de par l'étendue des régions de contrôle de transcription (couvrant 180 pb, alors que le promoteur de E2 peut être réduit à 79 pb et rester fonctionnel).

Hanaka *et al.* (1987) décrivent, quant à eux, les quatre domaines nécessaires à la transcription de E4:

- a) domaine I : La TATA box 26 nt en amont du site de coiffe,
- b) domaine II: entre -32 et -177 nt renfermant deux séquences répétées inversées de 17 pb centrées autour de -40 et -162 nt. La délétion de l'une ou de l'autre, ou encore une insertion entre ces deux séquences génère la synthèse d'extra-transcripts qui démarrent en amont du site d'initiation naturel,
- c) domaine III: entre -198 et -250 nt renfermant trois séquences riches en G+C: à -212, -233 et -251. Ces séquences sont les motifs consensus du site de fixation de Sp1 (Dyran and Tjian, 1983; Mc Grogan *et al.*, 1985). Des études d'ADN retardé en gel d'acrylamide confirment la liaison de facteurs cellulaires à ces séquences,

d) domaine IV: entre -207 et -307 nt. Le site de liaison de NFI y est détecté. Bien qu'il intervienne normalement dans la réplication de l'ADN viral, ce facteur de réplication peut être impliqué dans la régulation transcriptionnelle (Siebenlist *et al.*, 1984).

Lee et Green (1987) identifièrent un facteur cellulaire, E4F1, qui se liait spécifiquement à l'enhancer inducible par E1A de séquence ACGT A/C AC retrouvé dans E1A, E2 et E3 de l'Ad2 (fig. 20).

Par ailleurs, Raychaudhuri *et al.* (1987) recherchèrent l'existence d'une protéine, qui comme E2F pour le promoteur E2A (Yee *et al.*, 1987) pourrait être directement induite par E1A et impliquée dans le contrôle du promoteur E4. En effet, E1A agit en modifiant le facteur de transcription E4F1 qui stimule alors l'activité du promoteur. Ces auteurs identifièrent un facteur cellulaire (E4F) qui répond parfaitement à ces paramètres. Son taux d'expression, induit par E1A, augmente en effet de 10 fois. D'autre part E4F ne serait spécifique que du promoteur E4 et son site de fixation est exactement celui décrit par Lee et Green (1987). Les études de compétition qu'ils réalisèrent, ont montré que E4F serait crucial, comme facteur limitant, pour le contrôle transcriptionnel. La concentration faible de cette protéine expliquerait qu'elle n'ait pas été décelée par Lee and Green (1987). Cependant, un modèle intégrant ces deux facteurs reste encore à établir.

Watanabe *et al.* (1988) mirent en évidence l'existence de trois facteurs E4TF1, E4TF2 et E4TF3 impliqués dans la transcription du promoteur E4 (fig. 20):

1) E4TF1 stimule le promoteur E4 en se liant au site -134 à -149 nt. La séquence GGAAGTG est homologue aux régions enhancers de E1A,

2) E4TF3 se lie à 4 sites localisés à -40, -155, -225 et -260 nt par rapport au site de coiffe. La séquence commune est 5' PuTGACGT 3'. Le site de liaison à E4F1 (Lee and Green, 1987) est le même que pour E4TF3, excepté pour la région autour de -143 nt, site de liaison potentiel de E4F1 (voir fig. 20) qui n'est pas recouverte par E4TF3,

3) E4TF2 ne se lie pas au promoteur, mais a été détecté dans les extraits nucléaires associé à E4TF1 et E4TF3 et est indispensable à la transcription.

F - CONCLUSIONS

La transcription des promoteurs viraux précoces (E1A, E1B, E2, E3 et E4) de l'Ad2 est stimulée par la protéine de 289 acides aminés de E1A. Cette protéine n'active pas la transcription en se liant à des séquences d'ADN spécifiques. Au contraire, cette transactivation nécessite l'intervention de facteurs de transcription de la cellule hôte.

Pour chacune des unités de contrôle, une combinaison spécifique de facteurs cellulaires régulés par E1A peut être mise en jeu, sauf pour le promoteur de E1B. En effet, les études ont montré que E1A agit sur ce promoteur directement par l'intermédiaire de la séquence "TATA", bien que cette unité de contrôle renferme un site de liaison au facteur cellulaire SP1.

Dans le cas où il n'existe pas de séquence "TATA" vraie, comme pour le promoteur E2A précoce, ou dans le cas où la délétion de cette séquence n'influe pas sur l'inductibilité de E1A, comme pour les promoteurs de E3 et de E4, une autre régulation intervient.

Ainsi, un facteur nucléaire nommé E2F interagit avec des éléments de séquence importants pour les promoteurs de E2A et de E1A. D'autres résultats impliquent les sites de liaison des facteurs ATF/CREB dans le contrôle de la régulation par E1A. Ces sites sont retrouvés dans les promoteurs de E2A, de E3, de E4 et dans la région "enhancer" de E1A de l'Ad2.

On peut enfin alors résumer la régulation des cinq unités de contrôle précoces de l'adénovirus en faisant intervenir principalement les facteurs ATF et E2F.

Le tableau II donne un résumé des principaux facteurs cellulaires et de leurs sites de liaison évoqués dans cet exposé. On y trouvera également les références bibliographiques qui leur sont associées.

TABLEAU II: Les principaux facteurs cellulaires impliqués dans la régulation des régions précoces de l'Ad2.

FACTEURS CELLULAIRES	SEROTYPES	ORIGINES	SEQUENCES	REFERENCES
E2AEF	Ad2	promoteur E2AE (- 82/- 66)	ACGTCA	<i>SivaRaman et al, 1986</i>
EPF		promoteur E2AE (- 82/- 66)	ACGTCA	<i>Yee et al, 1987</i>
E4F1		promoteur E4 (- 45/- 50)	ACGTCA	<i>Lee et Green, 1987</i>
		(-161/-167)	ACGTAA	
		(-230/-236)	ACGTAG	
		(-255/-261)	ACGTCA	
E3F2		promoteur E3 (- 60/- 54)	TCGTCA	<i>Hurst et Jones, 1987</i>
<u>ATF</u>	Consensus		A/TCGTCA	
E2F	Ad5	promoteur E1A (-287/-288)	TTTCGCGC	<i>Hearing et Shenk, 1986</i>
		(-224/-217)	TTTCGCGG	
		promoteur E2AE (- 39/- 48)	TTTCGCGC	<i>Yee et al, 1987</i>
		(- 59/- 68)	AAAGCGCG	
<u>E2F</u>	Consensus		TTTCGCGG/C	
SP1	Ad2	promoteur E1B (-254/-239)	GGGCGT	<i>Wu et al, 1987</i>
		(- 51/- 40)	GGGCGG	
		promoteur E2AL (- 41/- 50)	ACGCCC	<i>Bhat et al, 1987</i>
		(-236/-241)	CCCGCC	
		promoteur E4 (-209/-215)	CCGCCC	<i>Hanaka et al, 1987</i>
		(-230/-236)	CCGCCC	
		(-245/-250)	CCCGCC	
<u>SP1</u>	Consensus		GGGCGG	
CRF	Ad2	promoteur E2AL (- 72/- 76)	CCAAT	<i>Goding et al, 1987</i>
		(-134/-138)	CCAAT	
		(-229/-234)	CCAAT	
USFII	Ad2	promoteur E2AL (-186/-112)	TGCGTCA	<i>Goding et al, 1987</i>
NF1	Ad2	promoteur E3 (-179/-156)	TTGGCCCGCTT	<i>Garcia et al, 1987</i>
		promoteur E4 (-282/-306)	TTGGCTTCAAT	<i>Hanaka et al, 1987</i>
AP1	Ad2	promoteur E3 (-103/- 83)	AGATGACT	<i>Garcia et al, 1987</i>

IV - ETUDE DU MECANISME DE LA TRANSCRIPTION: CAS DU PROMOTEUR MAJEUR TARDIF (MLP)

Situé à 16,8 u.g. ce promoteur gouverne la synthèse de la majorité des protéines tardives. En 1984, Miyamoto *et al.* montrèrent que l'élément entre -97 et -34 nt défini par Hen *et al.* (1982) comme essentiel à la transcription, était le site de fixation d'un facteur cellulaire. Cette liaison fut confirmée par Carthew *et al.* (1985). Ce facteur, appelé MLTF, se fixe à un domaine localisé entre -50 et -66 nt en amont du site d'initiation (séquence 5' TAGGTGTAGGCCACG 3') (fig. 21).

Sa purification fut réalisée par Moncollin *et al.* (1986) et Chodosh *et al.* (1986) identifièrent ce facteur MLTF à une protéine de 46 kDa. Cependant, le mécanisme par lequel MLTF active la transcription du promoteur tardif est complexe et une meilleure compréhension de la machinerie transcriptionnelle mise en jeu est nécessaire.

1- L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION

L'ARN polymérase II des eucaryotes, purifiée, au contraire de celle d'*Escherichia coli* (*E.coli*), ne peut commencer la transcription sans facteurs cellulaires spécifiques supplémentaires (Weil *et al.*, 1979).

Des méthodes chromatographiques permirent l'isolement de cinq fractions cellulaires nécessaires à la reconstitution *in vitro*, de la transcription à partir du MLP (Matsui *et al.*, 1980; Samuels *et al.*, 1982; Dignam *et al.*, 1983): il s'agit des TFIIA, TFIIB, TFIIC, TFIID et TFIIE. Le composant actif de TFIIC est une poly (ADP-ribose) polymérase (Slattery *et al.*, 1983) nécessaire *in vitro* pour supprimer l'initiation au hasard, mais non indispensable *in vivo*.

Hawley et Roeder (1985) séparèrent l'initiation de la transcription de l'élongation et subdivisèrent le premier cycle d'initiation en trois événements par le critère de leur sensibilité au sarcosinate de sodium (Gariglio *et al.*, 1974) (fig. 22a). La comparaison au modèle de Fire *et al.* (1984) (fig. 22b) leur permirent alors de suggérer que TFIIA et TFIID interviendraient dans la formation du complexe de préinitiation ("template commitment") et TFIIE et/ou TFIIB plus l'ARN polymérase II à l'étape d'activation de la transcription.

La vérification de telles hypothèses nécessitait la purification et l'analyse des facteurs impliqués. Reinberg *et al.* (1987) réalisèrent celle-ci en utilisant un MLP réduit aux seules séquences indispensables à la transcription: -56/+33: ils montrèrent alors que la meilleure efficacité de transcription nécessitait la présence de TFIIA et TFIID, puis, après l'intervention de l'ARN polymérase II (ARN pol II), TFIIB et TFIIE seraient absolument nécessaires à la transcription à partir du MLP comme à partir d'autres promoteurs cellulaires (globine de lapin, globine de souris, histone humaine H4) et viraux (E1A, E3, E4 et protéine IX d'Ad2).

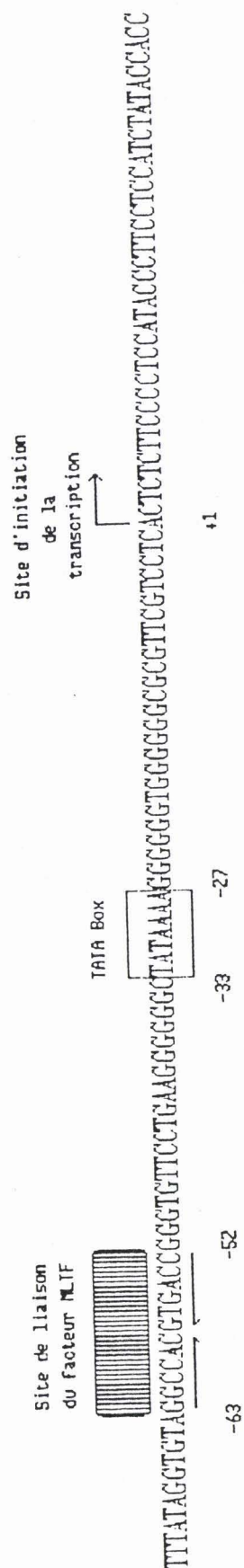


Fig. 21: Organisation nucléotidique du promoteur majeur tardif (MLP).

TFIIA, partiellement purifié des cellules HeLa, aurait une masse moléculaire apparente de 82 kDa.

TFIID serait le facteur de liaison à la TATA box. Son poids moléculaire apparent serait de 120 à 140 kDa chez HeLa et de 23 à 27 kDa chez la levure. En outre, sa capacité à se lier aux "TATA box vraies" ou aux "TATA box like" (comme nous le verrons plus loin) suggère que d'autres facteurs (ou l'ARN pol II elle-même) pourraient intervenir pour aider sa liaison à l'ADN ou qu'il existe plusieurs classes de ce facteur.

TFIIB serait une protéine de 28 kDa pouvant former un complexe avec TFIIE.

TFIIE, enfin, aurait une masse moléculaire de 60 kDa, cosédimenterait avec l'ARN pol II et serait une ATPase ADN dépendante (Sawadogo and Roeder, 1984).

Des travaux similaires plus fins furent réalisés par Zheng *et al.* (1987) pour les facteurs de transcription qu'ils appelèrent BTF1, BTF2, BTF3 et STF. La synthèse réalisée par Saltzman et Weinmann (1989) permet d'avancer une similitude de fonction entre BTF1 et TFIID, BTF2 et TFIIE, BTF3 et TFIIB, STF et TFIIA (voir tableau III).

Sopta *et al.* (1985) ont isolé des protéines interagissant avec l'ARN pol II: les RAPs (RNA polymerase Associated Proteins) (Burton *et al.*, 1986) de 30, 38 et 72 kDa (fig. 22c). Reinberg et Roeder (1987a) suggèrent leur homologie à TFIIB et TFIIE.

Les études cinétiques confirment l'intervention précoce de TFIIA et TFIID, mais TFIIA précédant TFIID. L'hypothèse formulée est que TFIIA se lierait à l'ADN en induisant et/ou stabilisant une structure secondaire nécessaire à la reconnaissance du motif TATA par le facteur TFIID (Reinberg *et al.*, 1987).

Ces données sont en parfait accord avec celles décrites par Fire *et al.* (1984) décrivant la formation du complexe "ADN-AB" et "ADN-CD" équivalents aux facteurs TFIIA et TFIID. Les facteurs de la fraction "CB" seraient équivalents à IIB et IIE et interviendraient à l'étape finale plus rapide (voir fig. 22b).

Le modèle proposé pour l'initiation de la transcription est décrit dans la figure 23a.

Si on étend la matrice de -56/+33 à -400/+546, il faut un facteur supplémentaire, le TFIIX, différent du MLTF car les séquences impliquées sont en aval du site de coiffe. L'implication de facteurs reconnaissant des séquences en aval du site de coiffe a d'ailleurs été avancée par de nombreux auteurs pour le promoteur des régions E2 (Zajchowski *et al.*, 1985; 1987), E1B (Wu *et al.*, 1987) et E3 (Leff *et al.*, 1985). Pour le promoteur E4, des plasmides renfermant le promoteur réduit à -13/+68 sont toujours stimulés par E1A (Leza and Hearing, 1989).

Facteurs	Facteurs supposés similaires	Etape de Transcription	masses moléculaires, kDa			Propriétés
			GF	CGG	SDS-PAGE	
TFIIA		Initiation	82			Se lie aux temps précoces de la formation du complexe de préinitiation
	AB STF		25,6 - 35		19,6 ; 19,1 ; 12,8 43	même propriété même propriété; contient de l'actine
TFIIB		Initiation		28	28	Se lie aux temps tardifs de la formation du complexe de préinitiation; forme un complexe avec TFIIE (contenant TFIIIF)
	CB1 BTF3			27		Se lie aux temps tardifs de la formation du complexe de préinitiation Interagit avec l'ARN polymérase II
					35	Se lie aux temps tardifs de la formation du complexe de préinitiation
TFIID		Initiation	120-140			Se lie à la région contenant la séquence TATA aux temps précoces de la formation du complexe de préinitiation
TFIIE	DB BTFI		60			Se lie aux temps tardifs de la formation du complexe de préinitiation Interagit avec l'ARN polymérase II
TFIIIF	CBII BTFII	Initiation/Elongation	90	70-80	30/82	Se lie aux temps tardifs de la formation du complexe de préinitiation; se lie à l'ARN polymérase II; stimule l'élongation
	RAP 30 and RAP 74				30/74	mêmes propriétés
			250		31/67	Se lie aux temps tardifs de la formation du complexe de préinitiation
	BTFIII			27		Se lie à l'ARN polymérase II
SII		Elongation	38			Implication dans la levée des sites de pause de transcription; Se lie à l'ARN polymérase II
	RAP 38		38			

GF: Gel Filtration

CGG: Centrifugation en gradient de glycérol

SDS-PAGE: Electrophorèse en gel acrylamide avec Sodium Dodécyl Sulfate

TABLEAU III: Résumé des facteurs généraux de transcription connus (d'après Saltzmann and Weinmann, 1989).

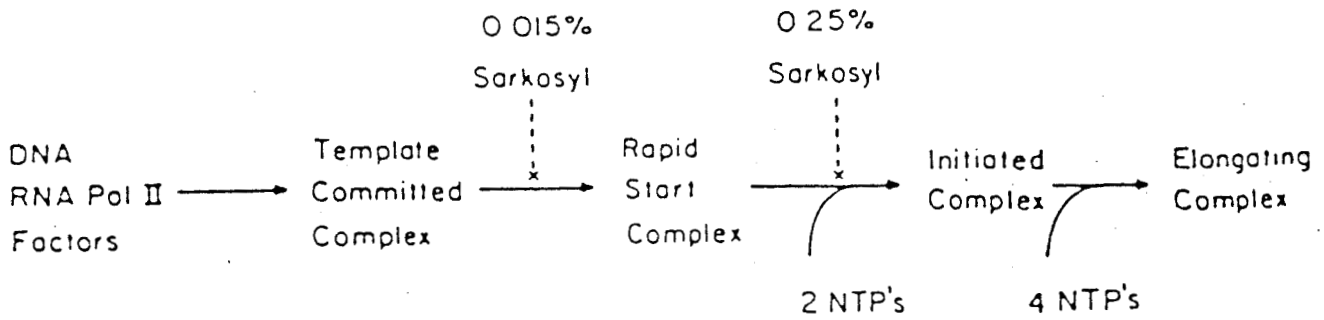


Fig. 22 a: Modèle de Hawley and Roeder (1985).

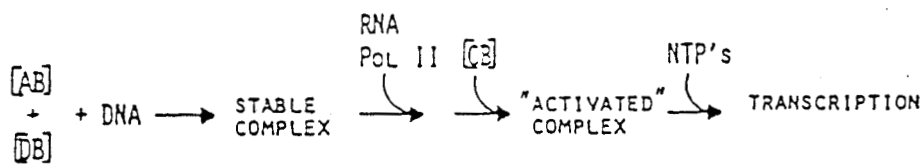


Fig. 22 b: Modèle de Fire et al (1984).

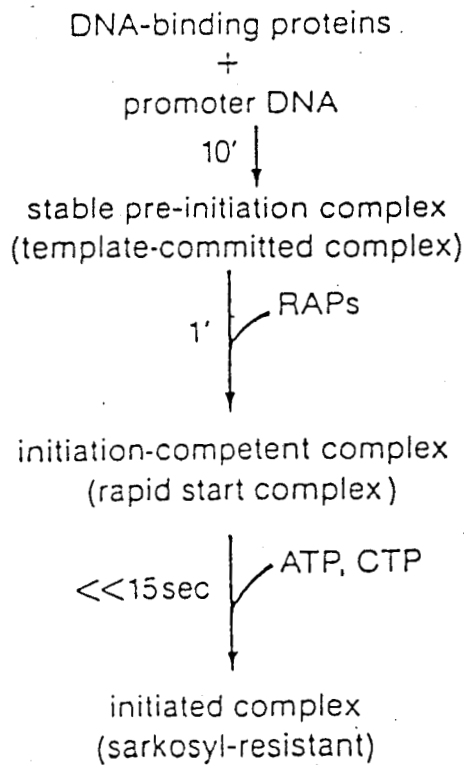


Fig. 22 c: Modèle de Burton et al (1986)

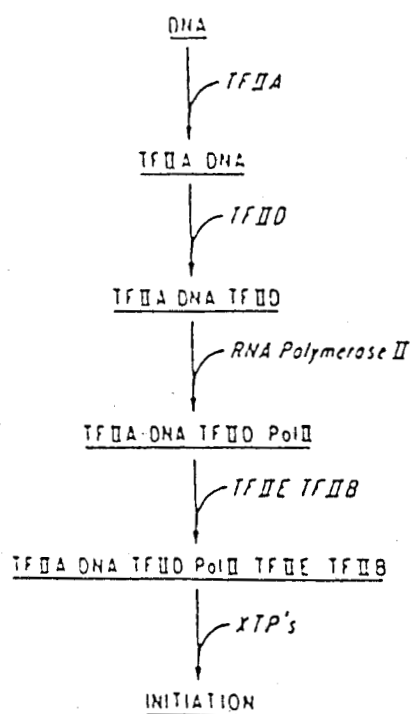


Fig. 23 a: Modèle de Reinberg et al (1987)

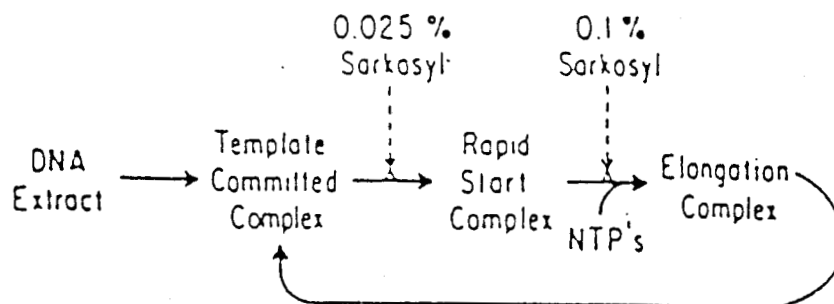


Fig. 23 b: Modèle de Hawley and Roeder (1987) avec l'intervention du complexe d'élongation.

2 - L'ELONGATION DE LA TRANSCRIPTION

Reinberg et Roeder (1987b) ont purifié un facteur des cellules HeLa, capable de stimuler la transcription non spécifique de matrices d'ADN, par l'ARN polymérase II (fig. 23b). Ils prouvèrent que ce facteur IIS n'intervenait pas dans l'initiation de la transcription. Et, comme le facteur SII décrit par Horikoski *et al.* (1984) ce facteur TFIIS stimulerait l'ARN polymérase II dans des réactions de transcription "au hasard", c'est à dire, sans initier la réaction à un site précis. Ce facteur est donc bien responsable de la stimulation du taux d'élongation par la RNA polymérase II.

Récemment, Flores, Maldonado et Reinberg (résultats cités par Saltzman and Weinmann, 1989) ont décrit un cinquième facteur d'initiation de la transcription TFIIF qui, tout comme TFIIS, peut stimuler l'ARN polymérase II purifiée. Dans leur schéma récapitulatif du mécanisme de la transcription (fig. 24), Saltzman et Weinmann (1989) font intervenir ce facteur TFIIF au niveau de la fin de la réaction d'initiation. Il stimulerait la levée de l'état de "pause de transcription" décrit par Rappoport *et al.* (1987) et Reinberg *et al.* (1987) qui met en jeu TFIIS.

Ce facteur TFIIF, purifié des cellules HeLa, serait composé de deux protéines de 30 à 82 kDa. La protéine qui intervient dans l'élongation ou TFIIF 82 kDa serait une phosphoprotéine retrouvée associée à la grande sous unité de l'ARN pol II.

Le tableau III résume les connaissances actuelles concernant les facteurs de transcription dits "généraux".

3 - INTERVENTION DES FACTEURS EN AMONT

Sawadogo et Roeder (1985) ont montré que l'addition du facteur MLTF à un système *in vitro* contenant le MLP, la RNA polymérase II et les fractions IIA, IIB, IID et IIE stimulait la transcription de 10 à 20 fois. Ils suggérèrent que la combinaison MLTF-TFIID était responsable de ce phénomène. Cette hypothèse fut vérifiée par la délétion du fragment -61/-50 nt.

Dans ces conditions, le facteur MLTF, comme le facteur Sp1, ferait partie intégrante d'une classe de produits de gènes cellulaires utilisés comme facteurs de transcription en amont des systèmes de régulation de base (ou "core" promoteur) pour stimuler l'efficacité de transcription.

L'analyse par empreinte sur ADN confirme bien la liaison TFIID-MLTP. Cette liaison apparaît alors comme la première étape conduisant à l'initiation transcriptionnelle.

Horikoshi *et al.* (1988) réalisèrent une étude similaire pour étudier les relations TFIID-ATF, dans le cadre de la transcription à partir du promoteur E4. Ils prouvèrent ainsi que la liaison coopérative entre ATF et TFIID facilitait la liaison du reste de la machinerie transcriptionnelle impliquant les facteurs IIB, IIE et la RNA Polymérase II.

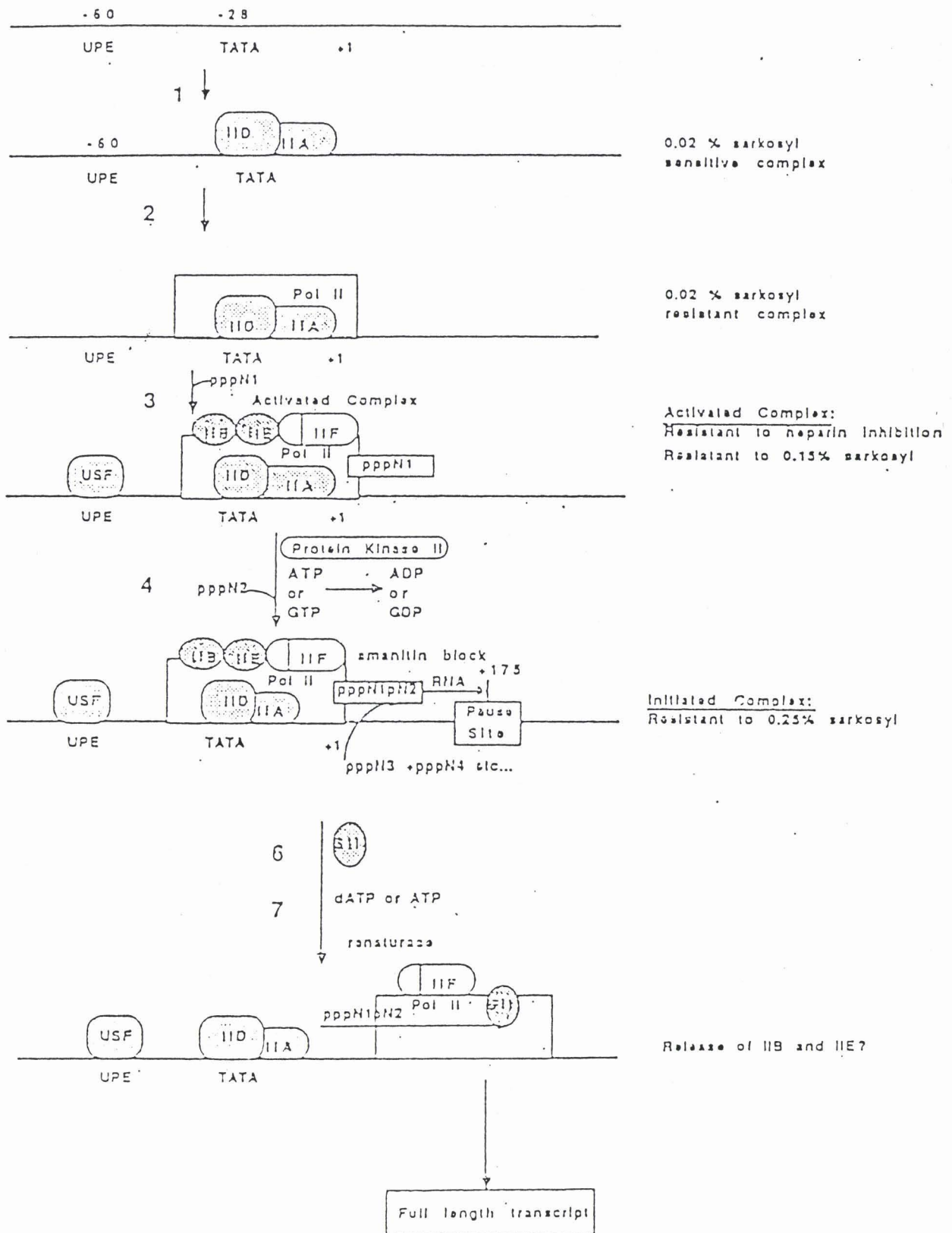


Fig. 24 : Diagramme schématique de l'initiation de la transcription à partir du MLP de l'Ad2 (d'après Saltzman and Weinmann, 1989).

TFIID et ATF se lient indépendamment l'un de l'autre à leurs sites spécifiques respectifs. Mais si TFIID n'a pas d'effet sur la fixation d'ATF, celui-ci modifie qualitativement le profil de fixation de TFIID. Les études d'empreinte de l'ADN indiquent en effet une protection au delà de +35 nt dans ce dernier cas (fig. 25a).

Ces résultats divergent un peu de ceux obtenus avec les interactions TFIID-MLP car il n'y a pas de modification du profil de fixation du motif TATA. Cependant, ces auteurs constatent une bonne corrélation entre le profil de liaison de TFIID en aval du site de coiffe et les activités transcriptionnelles *in vitro* du promoteur de E4 ou du promoteur majeur tardif (Horikoshi *et al.*, 1988).

En conclusion, le mécanisme d'activation par ATF impliquerait une modification qualitative de la liaison du facteur TFIID à la séquence TATA et faciliterait l' "entrée" de l'ARN Polymérase II et des facteurs TFIIB et TFIIE. Ensuite, la liaison à ATF ne serait plus nécessaire après le premier cycle d'initiation (Hai *et al.*, 1988).

Les études d'interaction entre l'activateur de levure GAL4 et TFIID (Hokikoshi *et al.*, 1988) permettent de généraliser ce mécanisme.

TFIID est le seul facteur de transcription, par rapport aux facteurs IIA, IIB, IIC, IIE, qui se lie spécifiquement à l'ADN. La purification de cette protéine fut réalisée par Nakajima *et al.* (1988). Ces auteurs testèrent la fonction de la fraction la plus purifiée sur plusieurs promoteurs contenant le motif TATA des gènes viraux E3 et E4 et des gènes cellulaires de globine, des histones H4 et H2D et de la hsp 70. Dans tous les cas, TFIID est impliqué dans l'activation des promoteurs avec une efficacité variant avec l'environnement nucléotidique, plus qu'avec la séquence consensus TATA elle-même. Pour les promoteurs ne possédant pas de séquences TATA canoniques (tel celui de E2A ou celui du IVa₂ voisin du MLP), la présence de TFIID est toujours essentielle à la meilleure efficacité de transcription (fig. 25b).

Carcamo *et al.* (1989) étudièrent le rôle du facteur MLTF dans la transcription du promoteur majeur tardif et du promoteur du IVa₂ (protéine intervenant dans l'assemblage de la particule virale) sur le brin complémentaire. Il est à noter que les sites de coiffe de ces deux promoteurs sont éloignés de 210 nt.

Les systèmes *in vitro* montrèrent que le MLTF stabilisait le complexe de transcription. De plus, comme ATF, le MLTF permettait à la matrice de subir plusieurs cycles de transcription. En outre, le promoteur du IVa₂ avait également besoin du MLTF, TFIID et des autres facteurs de transcription associés, pour une meilleure efficacité de transcription. La symétrie dièdre du site de liaison à MLTF permettrait cette bi-fonctionnalité.

La présence du MLTF dans les cellules non infectées suggère que ce facteur est également impliqué dans la transcription des gènes cellulaires. Chodosh *et al.* (1987) démontrèrent que le MLTF stimulait spécifiquement la

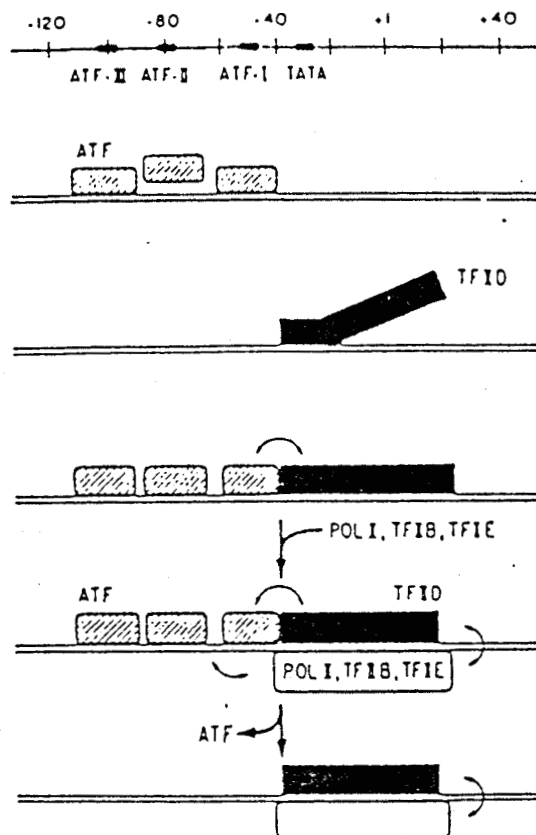


Fig. 25a: Modèle proposé de l'activation du promoteur E4; étude de la combinaison ATF- TFIID (d'après Horikoshi et al, 1988).

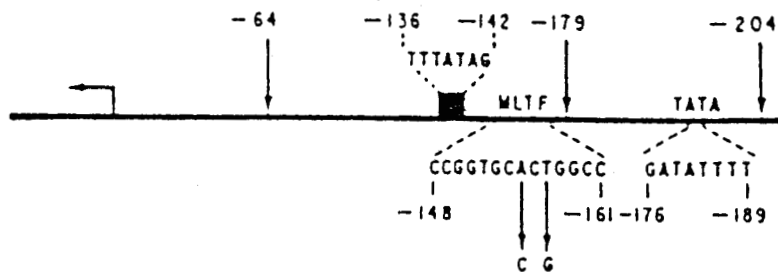


Fig. 25b: Cadre nucléotidique de la compétition IVa2/MLP (d'après Carcamo et al, 1989).

transcription du gène de fibrinogène par la reconnaissance de son site spécifique.

Il en est de même pour le facteur de transcription ATF qui intervient comme élément clef dans la régulation de la transcription des gènes précoces de l'adénovirus.

Dans le chapitre suivant, nous nous intéresserons donc à ce facteur comme protéine homologue à celle se liant à l'élément de réponse à l'AMPc (ou protéine CREB) de séquence consensus identique à celle du facteur ATF.

V - HOMOLOGIE DES SITES DE LIAISON DES FACTEURS CELLULAIRES ATF ET CREB

Lors d'études des séquences essentielles à la transcription du promoteur E3, Garcia *et al.* (1987) montrèrent que la séquence TGACG, site de reconnaissance de ATF est également le site de reconnaissance d'une protéine de 43 kDa (CREB) que renferment de nombreux promoteurs inductibles par l'AMPc (tel que celui du gène de la somatostatine) (Comb *et al.*, 1986; Montminy *et al.*, 1986, Montminy and Bilizikgian, 1987). En outre, ils suggérèrent que la protéine CREB pourrait servir de cible pour de nombreuses protéines trans-activatrices telles E1A ou la protéine du gène x de HTLV II (Chen *et al.*, 1985).

La présence du site spécifique A/T CGTCA dans le promoteur *c-fos* et dans les promoteurs inductibles par l'AMPc (Silver *et al.*, 1987) confirme le rôle significatif de la liaison du facteur CREB à cette séquence dans l'activation transcriptionnelle de ces promoteurs (pour revue: Roesler *et al.*, 1988).

Les propriétés de stimulation de gènes hétérologues, indépendamment de la position ou de l'orientation, font de ce site consensus un enhancer inductible.

Yamamoto *et al.* (1988) ont montré que l'activité transcriptionnelle du facteur cellulaire et sa capacité à se lier à l'élément de réponse à l'AMPc (CRE), dépend de sa phosphorylation, qui est un mécanisme commun à l'activation de nombreux facteurs cellulaires.

Le promoteur E4 est privilégié pour l'étude de l'interdépendance possible ATF/CREB car il renferme quatre sites de fixation à ces facteurs. Leza et Hearing (1989) montrèrent que les sites ATF du promoteur E4, indépendamment les uns des autres, conféraient l'inductibilité par l'AMPc au promoteur E4. Les autres promoteurs E1A, E2 et E3 sont également inductibles, mais dans les cellules infectées.

Cependant, la sensibilité à l'AMPc et l'inductibilité par E1A sont deux mécanismes propres (Leza and Hearing, 1989) ce qui indique que les deux voies d'activation par E1A et par le second messager hormonal agissent par des modes distincts. En effet, aucun processus cumulatif par E1A + AMPc ne fut détecté

dans les expressions transitoires réalisées sur les lignées cellulaires HepG2 infectées.

L'hypothèse d'une fonction pour E1A comme activateur de la protéine kinase A par exemple, ou même comme activateur du facteur CREB, en l'absence d'AMPc est donc à rejeter. Ce qui d'ailleurs a été confirmé par Babu et Loeken (1989, communication personnelle). D'autre part, Hurst *et al.* (1989, communication personnelle) ont démontré que ces deux protéines étaient structuralement et immunologiquement distinctes.

Pei et Berk (1989) réalisèrent des expériences de dissection des différents éléments susceptibles de répondre à l'inductibilité par E1A. Le fait le plus remarquable est la diversité des modes de réponse. Cependant, il est à noter qu'un élément de fixation à CREB (ou à ATF) réagit à E1A autant qu'un promoteur renfermant la séquence TATA plus les deux sites de reconnaissance à E2F, par exemple.

E1A, et plus particulièrement la protéine contenant 289 AA, peut alors stimuler la transcription des protéines précoces d'adénovirus ou des protéines cellulaires, à partir des divers éléments de réponse, de deux manières possibles

1) E1A pourrait activer plusieurs facteurs de transcription par phosphorylation. Cette voie a été suggérée pour le facteur TFIIC dans le cas de la transcription régulée par l'ARN polymérase III (Hoeffler *et al.*, 1988). Dans ce cas, les complexes de pré-initiation sont alors établis par combinaison entre TFIIA et TFIIC. Reconnus par TFIIB et l'ARN polymérase III, ils conduisent alors à la transcription des gènes des VA-RNAs et de l'ARN 5S (Lassar *et al.*, 1983).

2) E1A pourrait augmenter l'activité spécifique d'un seul facteur de transcription de l'hôte cellulaire qui interagirait ensuite avec différents facteurs se liant spécifiquement à l'ADN.

RESULTATS

I- LA TRANSDOMINANCE INTERSEROTYPIQUE

De nombreuses observations ont révélé l'existence d'interférences d'expression lors de co-infection virale. Ainsi, il a été mis en évidence que la répression d'un virus par un autre portait principalement sur l'inhibition des éléments de contrôle transcriptionnel indispensables à l'expression de ce virus. Borrelli *et al.* (1984) ont montré que la région E1A de l'adénovirus de type 2 inhibe le promoteur précoce de l'Ag T de SV40 en agissant sur les "enhancers" de 72 pb répétées inversées.

Il a été montré l'existence de phénomènes d'interférence négative entre les divers sérotypes d'adénovirus. Mak (1969) a observé l'inhibition de la réplication de l'Ad2 en cellules KB par l'Ad12. Rowe et Graham (1981) l'ont confirmée pour l'Ad5 en cellules HeLa.

Delsert et D'Halluin (1984) ont analysé la réplication dans les cellules humaines (HeLa, KB, HEK-293) et simiennes (Vero, CV-1, LLC-MK2) des virus SV40 et des adénovirus humains appartenant à chaque sous groupe. Ils ont montré que l'Ad3 inhibe la réplication de l'Ad2 en cellules HeLa et KB ainsi qu'en cellules simiennes.

Delsert (1985), en déterminant le taux d'expression des régions E1A et E2A au cours de la co-infection Ad2/Ad3 en a conclu que le phénomène de transdominance est associé aux protéines de la phase précoce du cycle viral.

Leite (1988), par des études cinétiques en expression transitoire, a montré que la transdominance peut être due à un mécanisme de compétition entre les deux produits des messagers 12S et 13S de la région E1A des deux sérotypes. Les résultats obtenus mettent en lumière les résultats suivants:

1) Les produits précoces majeurs de la région E1A de l'Ad3 (plasmides ou virus) sont capables de stimuler les promoteurs précoces E2A et E3 de l'Ad5 quand ils sont ensembles mais inhibent le promoteur E3 quand ils sont exprimés séparément,

2) Les produits de la région E1A de l'Ad2 stimulent plus fortement les promoteurs E2A et E3 de l'Ad5 (surtout la protéine de 289 AA), lorsqu'ils sont exprimés ensemble plutôt que séparément. Le (ou les) mécanisme(s) de ce phénomène n'a (ont) pu être expliqué(s).

L'hypothèse formulée serait que les produits de la région E1A de l'Ad3 entreraient en compétition avec les produits de transcription E1A de l'Ad2 pour les facteurs cellulaires de régulation négative et/ou positive et, par conséquent, empêcheraient une régulation positive de la transcription. Le rôle des promoteurs de la région E1A de l'Ad2 et de l'Ad3 a été précisé par Leite (1988).

Les séquences cibles mises en jeu pourraient être:

1- soit les "enhancers" A et B décrit par Hen *et al.* (1983). Chez l'Ad2, les "enhancers" A et B présentent une plus forte homologie avec la séquence consensus que chez l'Ad3,

2- soit la présence des deux sites de reconnaissance du facteur E2F chez l'Ad2, alors qu'il n'y en a qu'un chez l'Ad3, compris entre les deux "enhancers" B.

Cependant, l'hypothèse retenue serait que les produits de la région E1A de l'Ad3 en compétition avec ceux de l'Ad2, empêchent d'une certaine manière la formation du complexe de transcription et en conséquence, la fixation de facteurs de régulation sur une séquence spécifique, probablement le motif "TATAA" ou les "enhancers". Les motifs TATA de E1A de l'Ad2 (TATTTATA) et de l'Ad3 (TATTTAAA) ne renferment qu'une différence de nucléotide (T---A). La question reste à savoir si cette modification pourrait être, à elle seule, à l'origine de la formation d'un complexe d'initiation plus stable chez l'Ad3 (Leite *et al.*, 1988).

Le travail que nous allons présenter concerne un aspect intéressant des phénomènes observés. Les produits de la région E1A de l'Ad2 stimulent les promoteurs de E2A et de E3 des Ad2, Ad3 et Ad12. D'autre part, les produits de E1A de l'Ad3 stimulent également la région E2A de l'Ad2 comme celle de l'Ad3.

Cependant, comme il a été avancé par Delsert (1984), si les régions E1A de l'Ad3 et de l'Ad2 stimulent de manière cumulative le promoteur E2A de l'Ad3, l'activité du promoteur E2A de l'Ad2 chute quand E1A de l'Ad2 et E1A de l'Ad3 sont co-exprimés, par rapport au taux mesuré pour l'activation simple du promoteur E2A de l'Ad2 par E1A de l'Ad2.

Pour approfondir l'analyse de la transdominance, nous avons décidé d'étudier la régulation de la transcription des deux promoteurs E2A des deux sérotypes. En effet, l'hypothèse de départ est la suivante: les produits de E1A agissent sur les promoteurs précoces viraux qu'ils contrôlent par l'intermédiaire de facteurs cellulaires. De ce fait, l'inhibition rencontrée pour l'activité du promoteur E2A de l'Ad2 quand les deux régions E1A de l'Ad2 et de l'Ad3 sont présentes, proviendrait de la préférence des facteurs cellulaires impliqués pour des séquences cibles du promoteur E2A de l'Ad3 au détriment de celles de l'Ad2.

Cette hypothèse suggère une différence d'organisation nucléotidique de ces deux promoteurs. Nous étudierons donc:

- 1) la localisation et la détermination de la séquence nucléotidique du promoteur E2A de l'Ad3,

- 2) la comparaison à celle de l'Ad2 pour les séquences essentielles à la transcription,

- 3) les compétitions entre les promoteurs E2A des deux sérotypes par:

- a) des études d' "expression transitoire",

- b) des études d'interaction ADN-protéines,

qui permettrons alors d'approcher les facteurs cellulaires qui participent à ce processus.

II - DETERMINATION DE LA SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE DU PROMOTEUR PRECOCE E2A DE L'Ad3 (P3E2AE).

1- Etablissement de la carte de restriction de la région couvrant le P3E2AE

Les travaux de Chow *et al.* (1979) ont permis la localisation du promoteur précoce E2A de l'Ad2 (P2E2AE) à 75,4 u.g.

D'autre part, Signäs *et al.* (1986) ont déterminé la séquence du fragment d'ADN de la région E3 du site Xho I (76,5 u.g.) à Bal I (89,2 u.g.) de l'Ad3. Ces données nous permettent de rechercher la séquence du promoteur en amont de la position 76,5 u.g., car la comparaison de séquence avec l'Ad2 semble révéler que tout comme le promoteur précoce E2A de l'Ad2, le P3E2AE doit être situé en amont de ce site de restriction (Signäs *et al.*, 1986).

La construction des vecteurs plasmidiques ou phagiques de séquençage nécessite avant tout la connaissance de la carte de restriction fine de la région étudiée. Comme nous ignorions la position exacte du P3E2AE, nous avons décidé de dresser la carte de restriction entre les sites Sal I (68 u.g.) et Bcl I (83,3 u.g.)

Le principe de la méthode utilisée est présenté dans l'Appendice Technique et la carte de restriction obtenue est présentée dans la fig. 26.

Cette étude nous a conduit à découvrir l'existence de deux sites de restriction Xho I à l'emplacement du seul site Xho I décrit jusqu'à présent à 76,5 u.g. (fig. 27). Nos résultats indiquent que ces deux sites sont localisés à 1 u.g. l'un de l'autre, à 75,9 et 76,9 u.g., respectivement.

Notre stratégie de clonage a donc été la suivante:

1) cloner le fragment de restriction de l'Ad3 "Sal I (68 u.g.) - Xho I (75,9 u.g.)" dans le site Sal I d'un vecteur plasmidique de séquençage, le "Bluescribe M13+" de "vector cloning system",

2) insérer le fragment "Xho I (75,9 u.g.) - Xho I (76,9 u.g.)" dans les deux systèmes de séquençage plasmidique ("Bluescribe" M13+ ou pUC 13) et phagique (M13 mp 18).

Le choix du système de clonage plasmidique repose sur trois points:

1) Le séquençage sera fait selon la méthode des terminaisons de chaînes de Sanger *et al.* (1977) et l'utilisation du plasmide nous permet d'avoir recours aux deux sites d'amorce afin de déterminer le plus aisément possible la position du promoteur précoce d'E2A de l'Ad3 (voir l'Appendice Technique),

2) Le vecteur plasmidique peut recevoir des inserts de taille supérieure ou égale à 2000 pb et rester stable. Il est en outre, de maniement plus facile que le vecteur simple brin,

3) La stratégie de clonage utilise la méthode de cinétique à l'exonucléase III. Cette technique présente l'avantage, à partir du même vecteur

Ad3

- 72 -

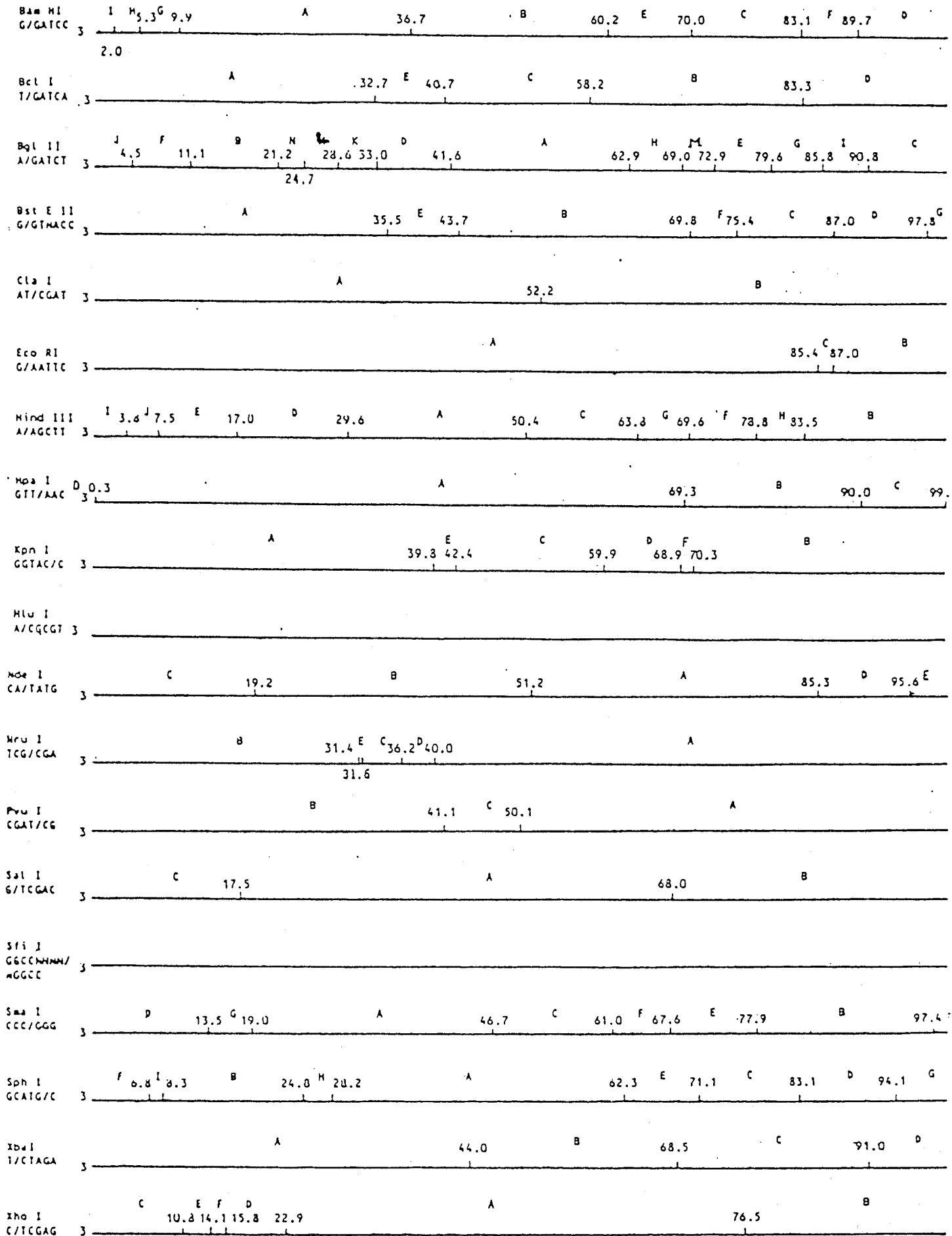


Fig. 27: Compilation des cartes de restriction connues pour l'Ad3
(d'après Niel, 1989).

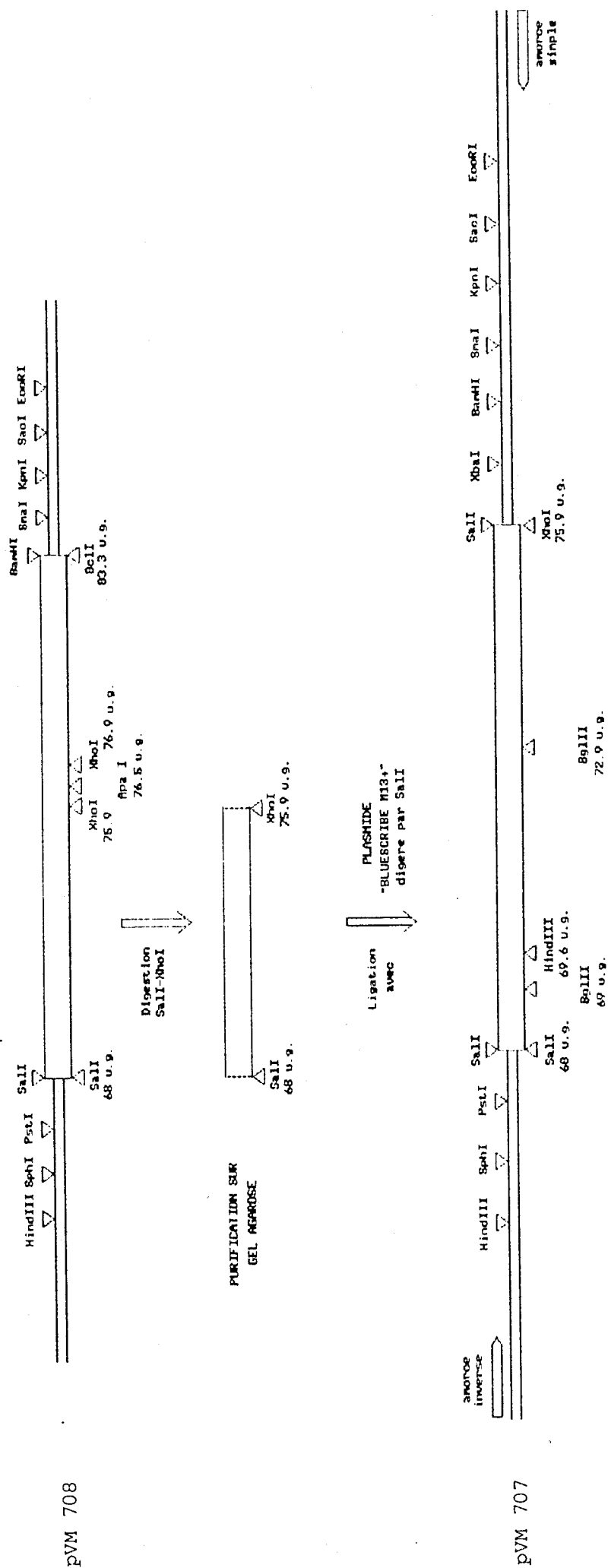


Fig. 28: Stratégie de clonage pour l'obtention du pVIM 707.

de clonage initial, d'obtenir une série de plasmides dont les inserts de tailles réduites couvrent toute la région à séquencer.

1.1. Séquençage du pVM 707

La première étape de ce travail nous a conduit à insérer le fragment de restriction "Sal I (68 u.g.) - Xho I (75,9 u.g.)" dans le vecteur plasmidique de séquençage.

La carte de restriction du plasmide obtenu à partir du pVM 708 est présenté dans la figure 28. Ce plasmide initial renfermait toute la région de l'Ad3 entre les sites Sal I (68 u.g.) et Bcl I (83,3 u.g.).

La méthode de dénaturation choisie est celle de Zagurski *et al.* (1985) et présentée dans l'Appendice Technique.

Les séquences obtenues couvrent les 169 premières pb du pVM707, à partir de l'extrémité Xho I (75,9 u.g.)

La comparaison effectuée avec la séquence correspondante de l'ADN de l'Ad2 a été réalisée en utilisant les résultats compilés obtenus à partir des logiciels de traitement de données sur APPLE (logiciel "sequences analysis" de A. LARSON) et sur IBM (logiciel PC GENE de A. BAIROCH).

Les résultats révèlent la conservation presque parfaite du site donneur d'épissage de la DBP et par la même, que le promoteur est situé plus en aval de ce site, si on compare les deux séquences homologues de l'Ad2 et de l'Ad3 (fig. 29).

Il nous était donc désormais possible de localiser le promoteur E2AE de l'Ad3 entre les deux sites Xho I (75,9 u.g. et 76,9 u.g.), avec le site de restriction Apa I (à 76,5 u.g) comme point de repère pour nos constructions futures.

1.2. Constructions des vecteurs phagiques (mp18-01; mp18-02) et plasmidique (pVM360).

Une unité génome correspond à environ 360 pb. Il nous était donc possible de cloner ce fragment à la fois en système plasmidique et surtout phagique, puisque désormais ni la stabilité, ni la cinétique par exonucléase III n'entrent en ligne de compte.

Les étapes de clonages sont résumées dans les figures 30 et 31.

Les 145 nt du côté 5' et les 178 nt du côté 3' ont été séquencés à partir du pVM 360. Le complément de la séquence fut obtenu avec le séquençage des mp18-01 et mp18-02 qui nous a permis en outre, de confirmer l'enchaînement nucléotidique décrit par la méthode "double brin" (fig. 32).

Ad3 3' GCCCACCTACCCTT.C.TCGTCCT.TC.AGTCTCTCGACTC.CT.TGCT.AGAA.G
 ** *** **
 Ad2 3' GCAGACCGCGGGTTGCTTGGGCATAGCTGGGCGCTCGAATCTTTATCCTAAAAAGG

Ad3 3' TT.....GATACGTAAAGT.CGTCTCACCCC..TTCTCGTCCCTTGAGTT..
 * ****
 Ad2 3' GTGAGACATACGATA..TAAAGTTGTTTCGTCCCCGGTTCT.TGTTCTCGACTTTT

*Site de splice
 naturel*

Ad3 3' C.TTTTTTGCT.AGAGACGCGAGCGAGTGGTCTTCAACAAACATTGTGTTCTCGCT
 *
 Ad2 3' CATTTTTTGTCCAGAGACGCGAGGGAGTGGGCGTCGACGGACATAGTGTTCGCT

XhoI

Ad3 3' TCTGGTTGAAGTCGTCGCGTGAGCTC
 *** ** *** * * * * *

Ad2 3' TCTAGTCGAAG.C..CGCGTG...

76.5 u.g

Fig. 29 : Comparaison Ad3/Ad2: entre la séquence des 179 premiers nt du brin 1 en aval du site Xho I (75.9 u.g.) du pVM 360 et la région correspondante de l'Ad2. Comme on peut le voir, le site donneur d'épissage de la DBP est conservé pour les deux sérotypes.

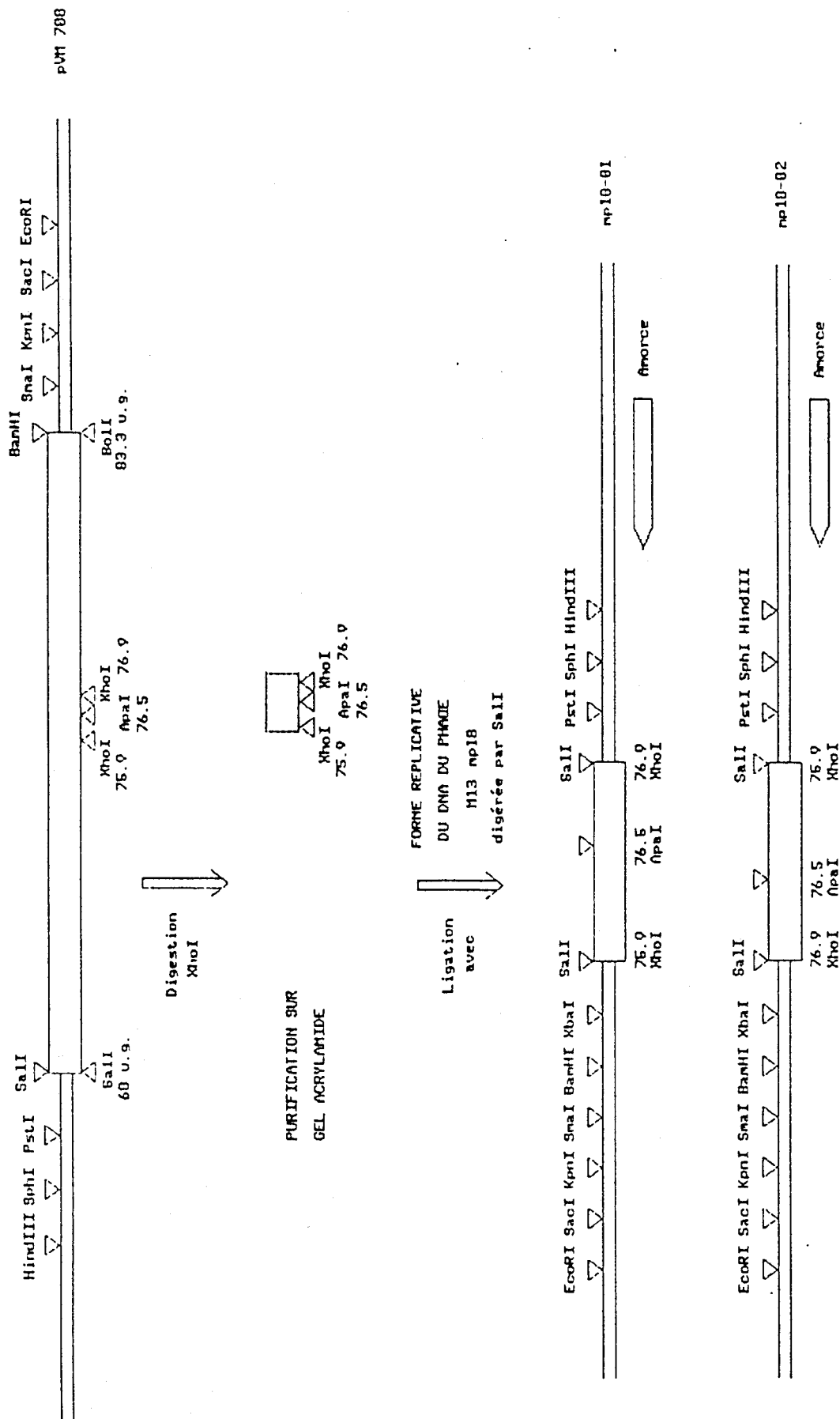


Fig. 31: Stratégie de clonage pour l'obtention des deux vecteurs phagiques de séquençage M13 mp18-01 et mp18-02.

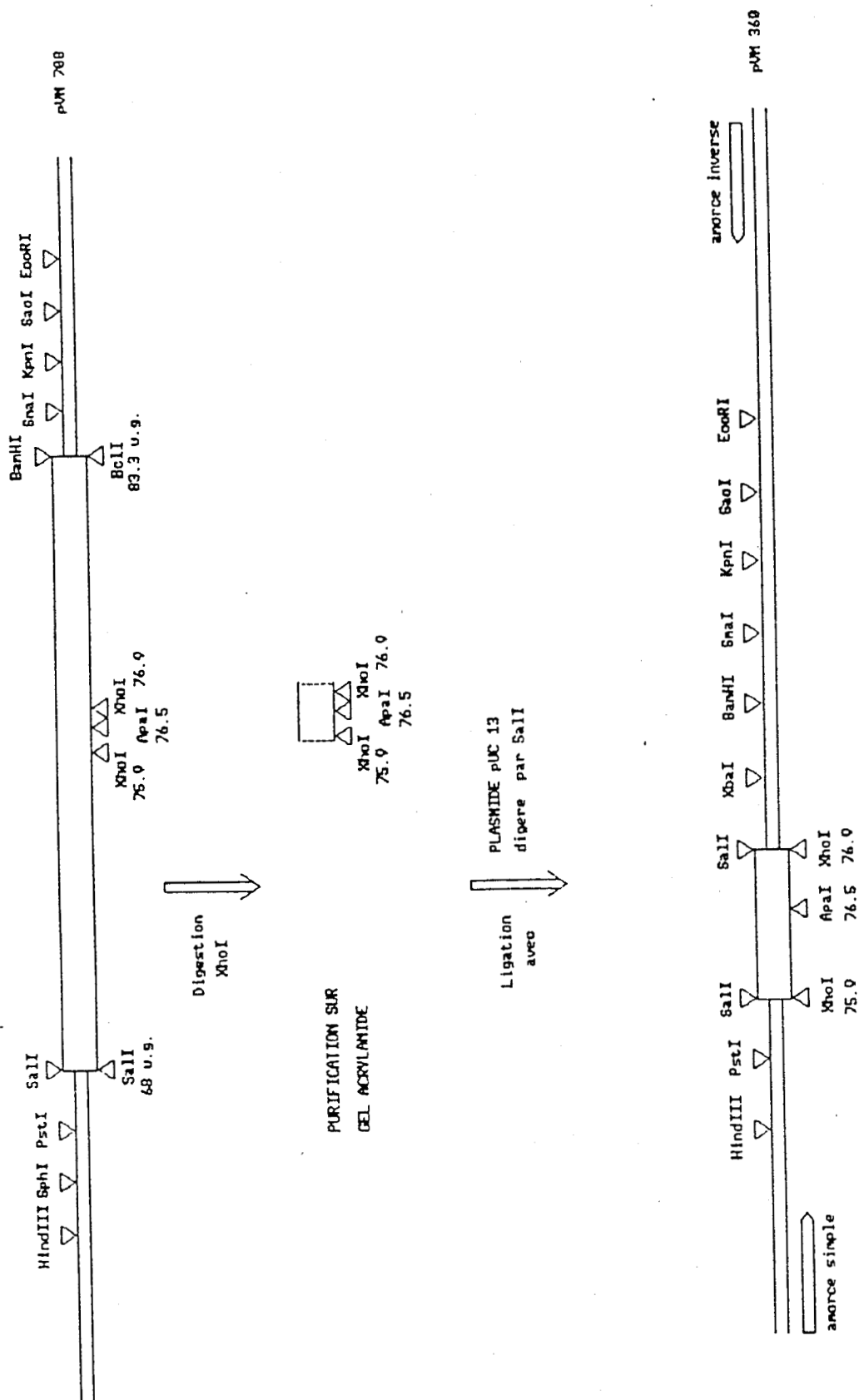


Fig. 30 : Stratégie de clonage pour l'obtention du vecteur plasmidique de séquençage pM 360.

	10	20	30	40	50	60
1	TCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCGCTGACTCTTAAAGAGTAGCCCTTGCCC					
	AGCTCCTGCGGCTCCGAGAGAAGTTGTTTCATGACGCGCGACTGAGAATTTCTCATCGGGAACGGG					
66	GCGCTCATTTTGAAAACGGCGGAATCACGTCACCCCTGGCACCTGTCCTTTGCCCTTGTCATGAG					
	CGCGAGTAAACTTTTGCCGCCTTAGTGCAGTGGGAACCGTGGACAGGAAACGGGAACAGTACTC					
131	TAAAGAGATTCCCACGCCTTACATGTGGAGCTATCAGCCCCAATAGGTTGGCAGCAGGCGCTTCCA					
	ATTTCTCTAAGGGTGCGGAATGTACACCTCGATAGTCGGGTATCCAACCGTCGTCGCGGAAGGT					
196	GGACTACTACACCGCTAGTATTGCTTAGCGCCGGGCCCTCAATGATATCACGGGTTAATGATATC					
	CCTGATGATGTGGCGATCATAACGAATCGCGGCCCCGGGAGTTACTATAGTGCCCAATTACTATAG					
261	GAGCTTATCGAAACCAGTTCTCCTAGAACAGTCAGCTCTCACCACCAACACCCCGTCAACACCTT					
	CTCGAATAGCTTTGGTCAAGAGGATCTTGTCAGTCGAGAGTGGTGGTTGTGGGGCAGTTGTGGAA					
326	AATCCCCGAAATTGGCCCCGCCACGCTGTACCAGGAAAATCCCGCTCCCACCACGTACTACTC					
	TTAGGGGCTTTAACC GGCGGTGCGACATGGTCCTTTTAGGGCGAGGGTGGTGCATGATGAG					

Fig. 32: Séquence nucléotidique du fragment de restriction
Xho I (75,9 u.g.) - Xho I (76,9 u.g.) de l'Ad3.

2- Comparaison des séquences nucléotidiques des deux promoteurs.

Il a été dit précédemment que le promoteur E2A de l'Ad2 est caractérisé par quatre "domaines" de régulations:

- 1) existence de deux sites de démarrage de la transcription: E2AE1 et E2AE2 avec leur "TATA box-like" respectives, T1 et T2,
- 2) existence des deux sites de reconnaissance au facteur cellulaire E2F et un site de liaison au facteur ATF,
- 3) existence des éléments "enhancer" et "silencers",
- 4) existence des éléments I, II et III essentiels à l'inductibilité par la région E1A.

On peut noter ainsi que le promoteur E2A de l'Ad3 diffère du promoteur E2A de l'Ad2 sur de nombreux points (fig. 33 à 36).

- 1) Absence de la "TATA box -like" T2,
- 2) Absence de séquences "silencer" et conservation partielle de l'élément enhancer couvrant le site de liaison du facteur ATF,
- 3) Absence des sites de liaison à E2F, bien qu'il semble qu'un des deux sites soit conservé mais en orientation inverse par rapport à celui le plus distal du site de coiffe de l'Ad2,
- 4) Absence de conservation des éléments II et III précédemment décrits.

Ces résultats nous permettent donc d'approfondir nos études de caractérisation du promoteur E2A de l'Ad3.

III- DETERMINATION DU SITE D'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION DU P3E2AE.

La comparaison de séquence des deux promoteurs nous montre que seul le site majeur d'initiation de la transcription E2AE1 de l'Ad2 est retrouvé conservé chez l'Ad3 avec sa séquence "TATA box like" T1. Si E2AE2 est conservé, la séquence située à -30 nt en amont n'a aucune homologie avec la "TATA box like" T2 de l'Ad2.

Afin de savoir quel site d'initiation est réellement utilisé, nous avons choisi la méthode de protection contre l'action des RNases A et T1. Le principe de cette technique repose sur l'extraction des ARN totaux à partir de cellules infectées par l'Ad3 au stade précoce du cycle lytique (10 h p.i.), afin d'extraire les ARN viraux précoces, et l'hybridation est réalisée avec une sonde ARN contenant la région qui couvre le site d'initiation de la transcription d'E2AE de l'Ad3.

La sonde est obtenue de la manière suivante: on insère le fragment "Sma I (77,9 u.g.) - Pst I (75,4 u.g.)" de l'Ad3 (contenant le promoteur complet de l'Ad3) dans les sites Sma I - Pst I du vecteur SP6.

Ce vecteur plasmidique renferme le promoteur SP6 qui permet la synthèse d'ARNm grâce à l'ARN polymérase du bactériophage SP6. Le plasmide

première séquence: Ad 2
deuxième séquence: Ad 3

```

1      10      20      30      40      50      60
TGAAGACGCGGAGGCTCTCTTCAGCAAATACTGCGCGCTGACTCTTAAGGACTAGTTTTCGCGCC
I II IIIII IIIIIIIIIIIII III IIIIIIIIIIIIIIIIIIIII II III II
TCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCGCTGACTCTTAAAGAGTAGCCCTTGCCC
1      10      20      30      40      50      60

70      80      90      100      110      120      130
CTTTCTCAAATTTAAGCGCGAAACTACGTCATCTCCAGCGGCCACACCCGGCGCCAGCACCTGT
I II II II IIIII IIIIIIIII IIIIIIIII IIIIIIIII
GCGCTCATTTTGAAAACGGCGGAATCACGTCACCCTTG.....GCACCTGT
70      80      90      100      110

140      150      160      170      180      190
C GTCAGCGCCATTATGAGCAAGGAAATTCCCACGCCCTACATGTGGAGTTACCAGCCACAAATG
I I I I IIIII II II IIIIIIIIIII IIIIIIIIIII II IIIII I I I
CCTTTGCCCTTGTCTATGAGTAAAGAGATTCCCACGCCTTACATGTGGAGCTATCAGCCCAATAGG
120      130      140      150      160      170

200      210      220      230      240      250      260
GGACTTGCGGCTGGAGCTGCCCAA..GACTACTCAACCCGAATAAACTACATGAGCGCGGGACCC
III I II II IIIII III I I I III II IIIII
T.....TGGCAGCAGGCGCTTCCAGGACTACTACACCGCTAGTATTGC..TTAGCGCCGGGCCC
180      190      200      210      220      230

270      280      290      300      310      320
CACATGATATCCCGGGTCAACGGAATCCGCGCCACCGAAACCGAATTCTCCTCGAACAGGCGGC
IIIIIIII IIIII II I III IIIII IIIII IIIII I II
TCAATGATATCACGGGTTAATGATATCGAGCTTAT.CGAAACCAG.TTCTCCTAGAACAGTCAGC
240      250      260      270      280      290

330      340      350      360      370      380      390
TAT.TACCACC.ACACCTCGT.AATAACCTTAATCCCCGTAGTTGGCCCGCTGCCCTGGTGTACC
I I IIIII IIIII III II I IIIIIIIIIII I IIIIIIIII I III
TCTC.ACCACCAACACCCCGTCAACA.CCTTAATCCCCGAAATTGGCCCGCCACGCTG...TACC
300      310      320      330      340      350      359

400      410      420
AGGAAAGTCCCGCTCCCACCACTGTGGTACTTC
IIIIII IIIIIIIIIIIIIII IIII I
AGGAAAATCCCGCTCCCACCACTGAC.TACT.C
370      380      390

```

Fig. 33 : Comparaison entre les deux séquences nucléotidiques de l'Ad2 et de l'Ad3 renfermant le promoteur E2A précoce.

PREMIERE SEQUENCE #02

DEUXIEME SEQUENCE #03

AAACAGGTCTTTGGGCTTCTTCAACCGCAGCTGGCTGTATCACAAGGAAGATCAGCTTC-G-GCCACGCTGGAGAGCGGAGGCTCTTTCAACAAT
|||||
AAACGA-TCTGTGGGCTCGCTCACCAAGTGTGTTTAAACACAGAGCGAAGACCAACTTCAGCAGCGCAC-TGGAGACCGCGAGGCTTCTTTCAACAAGT

↓
41

ELEMENT SILENCER I	ELEMENT ENHANCER LIKE	ELEMENT SILENCER II
ACTGGCGGCTGACTCTTAAGGACTAGTTTCGGGCCCTTCTCAATTAAAGCGGGAATACTAGTCAATCTCCAGCGGCGCACACCGGCGCAGCCTGTC ACTGGCGGCTGACTCTTAAGGACTAGCCCTTGCCCGGCTCATTTTGAACCGCGGAATCAGTCACCTTG- 		GCACCTGTC

↓
-26

-GTCAGCGGCTTATGAGCAAGGAATTCACCGGCTACATGTGGAGTTACAGCCACAATGGGACTTGGGCTGGAGCTG
|
CTTGGCCCTTGTCATGAGTAAGAGATTCCACGGCCTTACATGTGGAGCTATAGCCCAATAGT-TGGCAGCAGGCGGC

Fig. 35: Comparaison de l'organisation nucléotidique des promoteurs E2A précoces des deux sérotypes au niveau des éléments de régulation agissant en cis.

PREMIERE SEQUENCE AD2

DEUXIEME SEQUENCE AD3

ELEMENT I

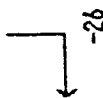
AAACAGGTCTCTGGGCTCCCTCACCAGCTGCTGTATCACAAAAGGAAGATCAGCTTCG - GCGCACGCTGGAAGACGCGGAGGCTCTCTTCAGCAAT
|||||
AAACGA - TCTCTGCGGCTCGCTCACCAAGTTGTTTAAACACAAAGAGGGAAGACCAACTTCAGCAGGCAU - TUGAGGACGCGGAGGCTCTCTTCACACAGT



ELEMENT III

ELEMENT II

ACTCGCGCTGACTCTTAAGGACTAGTTTCGGGCCCCCTTCTCAATTTAAGCGGAAACTACGTCTATCTCCAGGGCCACACCGGGCCAGCACCTGTC
|||||
ACTCGCGCTGACTCTTAAAGTAGCCCTTGCCCGGCTCATTTTGAAACGGCGGAATCAGTCACTCTTG - GCACCTGTC



-GTCAGCGCCATTATGAGCAAGGAATTCCACGGCCCTACATGTGGAGTTACCAGCCACAAATGGGACTTGGGCTGGAGCTG
|||||
CTTTGCCCTTGTCATGAGTAAAGAGATTCCACGGCCCTACATGTGGAGCTATCAGCCCAATAGT - TGGCAGCAGGGGGC

Fig. 36 : Comparaison de l'organisation nucléotidique des promoteurs E2A précoces des deux
sérotypes au niveau des régions de contrôle dépendantes de la stimulation par E1A
pour l'Ad2 (Zajchowski et al, 1987)

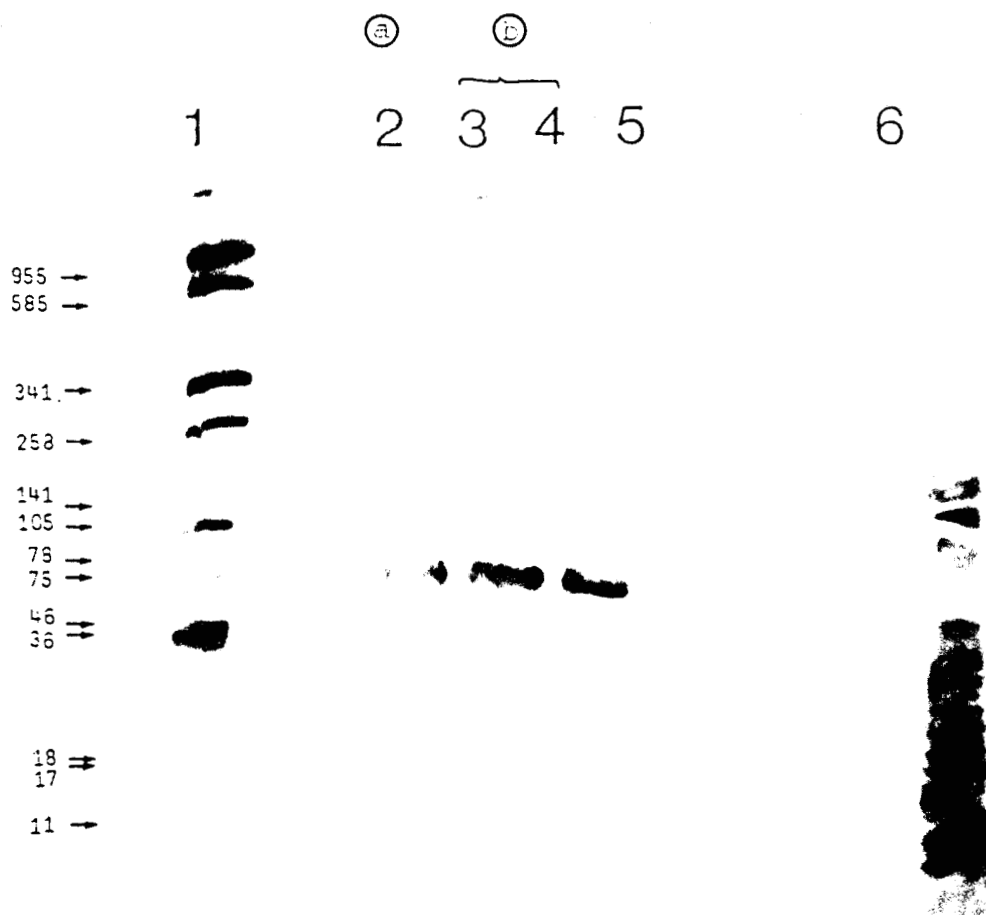


Fig. 37: Détermination du site de démarrage de la transcription du promoteur E2A par la technique de protection aux RNases A et T1. Le profil de protection est obtenu par migration sur gel de polyacrylamide 8% dénaturant (Urée 7M) (voir Appendice Technique).

1- Témoin de taille pUC 13 digéré par l'enzyme de restriction Sau 3A I et marqué en 3' OH avec le dCTP $\alpha^{32}P$ par l'ADN polymérase I fragment de Klenow.

L'hybridation est réalisée avec la sonde ARN, et les ARN totaux extraits:

2- Des cellules HeLa infectées par l'Ad3 en phase précoce du cycle lytique,

3- Des cellules IC4 transfectées par le pVM 708,

4- Des cellules HeLa cotransfectées par le pVM 708 et le pVM 254,

5- Des cellules HeLa "mock".

6- Sonde ARN radioactive libre.

est linéarisé par l'endonucléase de restriction Apa I et l'ARN est synthétisé (voir Appendice Technique).

La polymérase SP6 synthétise le brin r du fragment Pst I (75,4 u.g.)- Apa I (76,5 u.g.). La sonde atteint une taille optimale de 400 nt et couvre alors le site potentiel de démarrage de la transcription de E2A de l'Ad3 ainsi que le site donneur d'épissage naturel de la DBP.

L'hybridation est réalisée avec les ARN totaux cellulaires, dont les ARNm de la DBP synthétisés à partir du brin l de l'ADN. Le traitement à la RNase A et à la RNase T1 permet l'élimination de toutes les interactions ARN-ARN* non spécifiques et la taille de l'hybride est déterminée après migration sur gel de polyacrylamide par comparaison à un témoin de taille approprié.

Les ARNm viraux précoces matures de la DBP couvrent la région du site d'initiation de la transcription au site donneur d'épissage et reprennent au site accepteur d'épissage situé plus en avant dans la séquence. D'après nos constructions, nous nous attendions à obtenir:

- soit un fragment de 70 pb si seul le site E2AE1 de l'Ad2 est bien retrouvé chez l'Ad3,
- soit deux fragments de 70 pb et 96 pb, si les deux sites de démarrage sont toujours utilisés.

L'autoradiographie obtenue indique une ou deux bandes radioactives aux environ des 75 pb par comparaison au témoin de taille (plasmide pUC 13 digéré par Sau 3A I et dont les fragments de restriction sont marqués en 3' grâce à l'ADN polymérase fragment de Klenow), ce qui confirme notre hypothèse de départ et positionne ainsi le site de démarrage au même site E2AE1 que l'Ad2.

Cependant, on peut noter qu'il existe une certaine hétérogénéité dans l'initiation de la transcription, car deux fragments protégés, différents de quelques nucléotides, sont obtenus (fig 37a.). Peut-être ce phénomène est-il lié à l'absence de "TATA box" vraie en amont du site d'initiation ou, est-il le reflet de l'organisation particulière du promoteur. Il en sera discuté plus loin.

D'autres essais ont été réalisés avec les ARN totaux de cellules HeLa ou IC4 transfectées avec un plasmide renfermant le P3E2AE (pVM 708). Les profils de protection sont les mêmes que ceux obtenus avec les ARN extraits de cellules infectées. Ces expériences nous permettent ainsi de nous assurer de la validité des vecteurs plasmidiques utilisés (fig. 37b).

IV- ETUDE DU TAUX D'EXPRESSION DU PROMOTEUR E2A DE L'Ad3

Notre approche dans la compréhension du phénomène de la transdominance intersérotypique, est de savoir s'il existerait une préférence dans l'activation du promoteur E2A de l'Ad3 par les produits des gènes E1A des deux sérotypes.

La stratégie que nous avons développée repose sur trois points:

1) Détermination de l'inductibilité du promoteur E2A de l'Ad3 aux produits de E1A des deux sérotypes et comparaison avec le taux de stimulation de l'expression du promoteur E2A de l'Ad5,

2) Mise en évidence de la transdominance avec les plasmides isolés,

3) Test de compétition entre les deux promoteurs vis à vis de l'inductibilité par les produits de la région E1A de l'Ad2.

Le système de mesure utilisé ici repose sur l'expression transitoire des promoteurs dans trois souches cellulaires établies en lignées continues (HeLa, HEK-293 et IC4).

L'activité des promoteurs est déterminée par dosage du taux d'expression de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT), dont le gène *cat* est placé en aval des promoteurs E2A des deux sérotypes.

L'ensemble des vecteurs plasmidiques utilisés est présenté dans la figure 38.

Les cellules sont donc soumises à une transfection ou une co-transfection, précédée le cas échéant d'une infection par l'Ad3 ou l'Ad5. Quarante heures post-transfection, l'activité CAT est mesurée (Voir Appendice Technique). Le pourcentage d'acétylation ou activité acétyl transférase est déterminé de la manière suivante:

$$X = \text{fraction acétylée (cpm)} / (\text{fraction non acétylée} + \text{fraction acétylée (cpm)})$$

1- Mesure de l'activité des promoteurs E2AE des deux sérotypes.

Les vecteurs plasmidiques ont été construits en suivant la même stratégie de clonage afin d'éviter toute interférence possible liée aux vecteurs de base. Le principe du clonage pour les deux promoteurs repose sur la mise en ligation de trois fragments de restriction:

- le premier, entre les sites Eco RI et Hind III renferme le promoteur E2AE de l'Ad3 (fragment Xho I (75,9 u.g.) - Xho I (76,9 u.g.)) ou le promoteur de l'Ad2 (fragment Sau 3A I (75,3 u.g.) - Eco RI (76,1 u.g.)),

- le second, entre les sites Hind III et Bam HI renferme le gène CAT.

- enfin le troisième, entre les sites Bam HI et Eco RI renferme l'origine de réplication du plasmide et le gène marqueur de résistance à l'Ampicilline nécessaire à l'amplification bactérienne. Les plasmides obtenus sont le pVM 361 pour le vecteur exprimant le P3E2AE-CAT, et le pVM 599 pour celui exprimant le P2E2AE-CAT (fig. 39).

1.1. Mesure de l'activité du PE2AE de l'Ad3

Il fallait tester tout d'abord les activités de base et induite du promoteur E2A précoce de l'Ad3. Pour cela, nous avons co-transfecté le pVM 361 dans les

NOMENCLATURE DES VECTEURS PLASMIDIQUES	NATURE DE L'INSERT Fragments de restriction	EXPRIMENT	SEQUENCE POISON
ADENOVIRUS DE SEROTYPE 2			
pVM 214	<u>Eco</u> RI - <u>Hind</u> III 0 nt 6231 nt	E1A + 19K E1B	OUI
pVM 249	<u>Eco</u> RI - <u>Hind</u> III 0 nt 6231 nt	E1A + 19K E1B	NON
pVM 254	<u>Eco</u> RI - <u>Hind</u> III 0 nt 6231 nt délétion du frag- ment 1771 nt à 5638 nt	E1A	NON
pVM 255	Mutation au nt 975 du pVM 249 : perte du site d'épissage de l'ARNm 12S	produit de l'ARNm 13S de E1A + 19K E1B	NON
pVM 256	Délétion de 9 nt entre 1109 nt et 1119 nt du pVM 249 : perte du site d'épissage de l'ARNm 13S	produit de l'ARNm 12S de E1A	
ADENOVIRUS DE SEROTYPE 3			
pVM 312	<u>Hpa</u> I - <u>Bgl</u> II 93 nt 1568 nt	E1A	OUI
pVM 325	Délétion dans le site d'épissage de l'ARNm 13s	produit de l'ARNm 12S de E1A	OUI
pVM 335	Constuction d'un ADNc à partir de l'ARNm 13S de E1A de l'Ad3.	produit de l'ARNm 13S de E1A	OUI

Fig. 38: Présentation des vecteurs plasmidiques utilisés lors des différentes transfections.



Fig. 39: Schématisation des vecteurs plasmidiques exprimant le gène cat sous contrôle des promoteurs E2A précoces des deux sérotypes.

cellules HeLa avec ou sans les plasmides exprimant la région E1A de chacun des deux sérotypes. Des expériences similaires de référence ont été réalisées avec le pVM 599 (Tableau IV).

Dix µg de chacun des vecteurs plasmidiques ont été utilisés, comme dans chacune des expériences de transfection qui sont présentées dans ce mémoire.

On peut noter que le pouvoir transactivateur de la région E1A de l'Ad3 est moindre que celui de la région E1A de l'Ad2. Ensuite que le pouvoir transactivateur est bien le fait du produit de l'ARNm 13S comme il a été décrit par Reichel *et al.* (1988) et Babiss (1989) pour l'activation du promoteur E2A de l'Ad2 par E1A de l'Ad2.

Il est de plus montré dans ce Tableau que l'activité est optimale pour un vecteur plasmidique qui, non seulement exprime la protéine de 19kDa de E1B en plus de la région E1A de l'Ad2, mais surtout qui est dépourvu d'une séquence dite "poison" (voir § VI).

1.2. Comparaison avec le pouvoir transactivateur de E1A sur le promoteur E2A des deux sérotypes.

Nous avons co-transfecté en cellules HeLa le plasmide renfermant le gène *cat* sous contrôle du promoteur E2AE de chacun des sérotypes avec le ou les plasmides exprimant les produits de la région E1A de l'Ad2 et de l'Ad3.

Les résultats des co-transfections en cellules HeLa sont présentés dans le Tableau V et sont la moyenne d'au moins 3 essais.

Comme dans l'expérience précédente, l'activité de base des deux promoteurs E2A est faible (0,37% pour P3E2A-CAT; 0,60% pour P2E2A-CAT) quoique l'activité CAT du P2E2AE-CAT soit deux fois plus forte que le P3E2AE-CAT. Certains essais ont même montré un taux 3 à 4 fois plus fort pour l'activité de base du P2E2AE vis à vis du P3E2AE.

Le produit de l'ARNm 13S de E1A de l'Ad2 stimule 7 fois l'activité du P3E2AE-CAT et les deux produits de E1A le stimule 20 fois, tandis que leurs équivalents chez l'Ad3 (les produits de la région E1A complète, et le produit de l'ARNm 13S) ne stimulent le P3E2AE-CAT que 2,5 et 2 fois, respectivement.

D'autre part, le produit de l'ARNm 13S de E1A de l'Ad3 stimule le P2E2AE-CAT 1,5 fois et les deux produits de la région E1A 2 fois, alors que ces mêmes régions de l'Ad2 le stimulent 4,5 et 14 fois, respectivement.

Enfin, les produits des ARNm 12S de E1A des deux sérotypes n'ont pas d'effet marquant sur l'activité des promoteurs E2A de l'Ad2 ou de l'Ad3.

On peut déduire de ces résultats que si les activités finales des promoteurs induits par E1A sont similaires, le pouvoir transactivateur de E1A des deux sérotypes semble différent. En effet, la région E1A de l'Ad2 stimule plus efficacement le promoteur E2A de l'Ad3 que le promoteur E2A de l'Ad2. Cependant, cette meilleure efficacité de stimulation est sans doute plus le reflet de la différence d'organisation des promoteurs E2AE des deux sérotypes.

TABLEAU IV: Mesure de l'activité de base et induite des promoteurs E2A précoces des deux sérotypes, en cellules HeLa.

Type de vecteurs cotransfectés	régions exprimées		activités "CAT"	
	régions	sérotypes	pVM 361	pVM 599
pKH 47	aucune	aucun	0,30 % ^a (1) ^b	0,57 % (1)
pVM 312	E1A avec SP	Ad3	0,87 % (3)	0,80 % (1,4)
pVM 254	E1A de sans SP	Ad2	7,00 % (23)	7,00 % (12)
pVM 214	E1A et 19kDa E1B avec SP	Ad2	4,00 % (13)	8,50 % (15)
pVM 249	E1A et 19kDa E1B sans SP	Ad2	7,20 % (24)	10,50 % (18)

a: activité CAT, déterminée comme décrit dans l'appendice technique, exprimée en % de conversion en formes acétylées

b: facteur de stimulation déterminé par le rapport des taux d'acétylation en absence ou en présence de la région E1A des deux sérotypes pour chacun des deux promoteurs E2A précoces

SP: Séquence Poison

TABLEAU V: Mesure de l'activité de base et induite des promoteurs E2A précoces des deux sérotypes, par les produits des régions E1A, en cellules HeLa.

Type de vecteurs cotransfectés	régions exprimées		activités "CAT"	
	régions	sérotypes	pvm 361	pvm 599
pKH 47	aucune	aucun	0,37 % ^a (1) ^b	0,60 % (1)
pvm 325	produit ARNm 12S E1A	Ad3	0,32 % (1)	0,34 % (0,5)
pvm 335	produit ARNm 13S E1A	Ad3	0,91 % (2,5)	0,84 % (1,5)
pvm 312	E1A	Ad3	0,81 % (2)	1,25 % (2)
pvm 256	produit ARNm 12S E1A	Ad2	0,40 % (1)	0,57 % (1)
pvm 255	produit ARNm 13S E1A	Ad2	2,60 % (7)	2,70 % (4,5)
pvm 254	E1A	Ad2	7,40 % (20)	8,20 % (14)

a: activité CAT, déterminée comme décrit dans l'Appendice Technique, exprimée en % de conversion en formes acétylées
b: facteur de stimulation déterminé par le rapport des taux d'acétylation en absence ou en présence de la région E1A des deux sérotypes pour chacun des deux promoteurs E2A précoces

2. Mise en évidence de la transdominance intersérotypique.

Pour cette expérience, nous avons réitéré les premiers essais de Delsert (1985), mais avec les deux vecteurs plasmidiques exprimant les promoteurs E2AE en notre possession.

Les premiers résultats sont obtenus par co-transfections séparées des plasmides renfermant les deux promoteurs E2A précoces avec le vecteur exprimant la région E1A du sérotype qui assure leur régulation normale. Les seconds résultats sont le produit de l'infection préalable des cellules HeLa (1 h précédant la co-transfection; à environ 10 pfu / cellule) par l'autre sérotype, dominant ou dominé suivant le cas.

Les résultats des essais d'infection et de co-transfections en cellules HeLa sont présentés dans le Tableau VI.

Dans la première partie, nous avons testé le P3E2AE-CAT (pVM 361) en présence de E1A de l'Ad3, dans les cellules HeLa infectées ou non par l'Ad2.

Le promoteur E2A de l'Ad3 a une activité CAT de base de 0,6%, qui passe à 1,3% en présence du plasmide exprimant la région E1A de l'Ad3 et qui est encore augmentée (jusqu'à 3,9%) quand les cellules sont infectées par l'Ad2.

On peut supposer que les deux régions E1A des deux sérotypes, la première apportée par le plasmide, la seconde par le virus, puissent dans ce cas agir de manière additive.

Dans la seconde partie de l'expérience, en testant le P2E2AE-CAT dans les mêmes conditions, on peut noter que si l'activité de base de P2E2AE-CAT (0,9%) est stimulée par la région E1A de l'Ad2 (valeur de 9%), elle chute à 2,5% lorsqu'il y a infection par l'Ad3.

Nous avons vu dans les chapitres précédents que les deux régions E1A des deux sérotypes stimulent, lorsqu'elles sont introduites séparément, l'expression des deux promoteurs.

Les résultats que nous présentons ici démontrent que le P3E2AE-CAT est stimulé de manière cumulative par la région E1A des deux sérotypes. Cependant, dans le cas du P2E2AE-CAT, non seulement, il n'y a pas addition des effets stimulateurs des deux régions E1A mais au contraire inhibition de l'activité du P2E2AE-CAT.

L'hypothèse que nous formulons pour expliquer ce phénomène est la suivante:

Nous avons vu que la région E1A stimulait l'expression du promoteur par l'intermédiaire de facteurs cellulaires (voir partie Généralités). Dans ces conditions, on peut supposer qu'une interférence quant à la liaison des facteurs impliqués vis à vis de la régulation des deux promoteurs soit possible. Le ciblage de ce ou ces facteurs cellulaires se ferait ainsi préférentiellement sur le promoteur E2A de l'Ad3.

Les résultats obtenus quant à la différence d'organisation nucléotidique des deux promoteurs peuvent renforcer cette hypothèse.

Afin de la vérifier, nous nous sommes proposés de réaliser une étude de compétition entre ces deux promoteurs, d'abord en utilisant les vecteurs plasmidiques en expression transitoire, puis en utilisant la technique d'ADN retardé en gel d'acrylamide.

3. Compétition entre les deux promoteurs E2A des deux sérotypes.

Notre hypothèse repose sur l'affinité préférentielle des facteurs cellulaires induits par E1A pour le promoteur E2AE de l'Ad3.

La première partie des essais avait montré que E1A stimulait plus efficacement le promoteur E2AE de l'Ad3. L'approche que nous proposons ici consiste à voir si des facteurs cellulaires sont mis en jeu dans ce phénomène.

Pour cela, nous avons co-transfecté, en présence de la région E1A de l'un ou de l'autre sérotype, un vecteur plasmidique contenant le gène *cat* en aval du premier des deux promoteurs E2AE avec un autre vecteur ne renfermant que le second promoteur. Dans ces conditions, la chute de l'activité CAT serait le reflet du ciblage préférentiel du vecteur compétiteur (donc du promoteur mis en compétition) au détriment de celui contenant le gène *cat* (donc le promoteur testé).

3.1. Compétition en présence de la région E1A de l'Ad2.

L'expérience préliminaire de l'étude de la transdominance avait été faite avec le plasmide contenant le gène *cat* sous contrôle du P2E2AE en présence de la région E1A des deux sérotypes, mais également en présence du P3E2AE apporté avec l'Ad3 (Tableau VI).

La première expérience a été réalisée en cellules HeLa, par co-transfection de trois plasmides, apportant chacun séparément la région E1A de l'Ad2, l'un des deux promoteurs E2A associé au gène *cat* et l'autre promoteur E2A comme compétiteur (Tableaux VIIa et VIIb).

Pour l'activité du promoteur E2AE de l'Ad2, on peut voir que la co-transfection avec le promoteur E2AE de l'Ad3 fait chuter l'expression du gène *cat* d'un facteur 1,5, ce qui est en accord avec l'hypothèse de départ.

Cependant, un effet compétiteur est observé également dans le cas de l'activité du P3E2AE-CAT co-transfecté avec le P2E2AE.

Cependant ces résultats peuvent être sujets à caution car nous avons pu constater la difficulté à standardiser une telle expérience de transfection à trois composants. Nous avons donc décidé de contourner cette difficulté en utilisant les cellules établies en lignées continues:

- HEK-293, qui expriment constitutivement les régions E1 de l'Ad5,
- IC4, qui expriment la région E1A de l'Ad2 de manière inductible. Dans ce cas, la région E1A de l'Ad2 est intégrée dans le génome cellulaire, couplée au

TABLEAU VI: Mise en évidence de la transdominance intersérotypique

Type de vecteurs	régions exprimées	Infection par	activités "CAT"
cotransfectés	régions	sérotypes	pVM 361 pVM 599
PKH 47	aucune	aucun	0,60 % ^a (1) ^b 0,90 % (1)
pVM 254	E1A	Ad2	13,00 % (22) 9,00 % (10)
pVM 312	E1A	Ad3	1,30 % (2) 1,25 % (1,5)
pVM 312	E1A	Ad5	3,90 % (6,5) ND
		Ad5	2,50 % (4) ND
pVM 254	E1A	Ad2	ND 2,50 % (2,7)
		Ad3	ND 2,00 % (2,2)

a: activité CAT, déterminée comme décrit dans l'Appendice Technique, exprimée en % de conversion en formes acétylées
b: facteur de stimulation déterminé par le rapport des taux d'acétylation en absence ou en présence de la région E1A des deux sérotypes pour chacun des deux promoteurs E2A précoces

A: Compétition équimolaire entre le P3E2AE-CAT et le P2E2AE. Les transfections sont réalisées ici en cellules HeLa avec le pVM 361.

Type de vecteurs cotransfectés	exprimant	de sérotype	Activités "CAT"
pKH 47			0,15 % ^a
pKH 47			
pKH 47			2,20 %
pVM 254	E1A	Ad2	
pVM 598	PE2AE	Ad2	1,20 % (1,8) ^b
pVM 254	E1A	Ad2	
pKH 47			0,27 %
pVM 312	E1A	Ad3	
pVM 598	PE2AE	Ad2	0,25 % (1)
pVM 312	E1A	Ad3	

B: Compétition équimolaire entre le P2E2AE-CAT et le P3E2AE. Les transfections sont réalisées ici en cellules HeLa avec le pVM 598.

Type de vecteurs cotransfectés	exprimant	de sérotype	Activités "CAT"
pKH 47			0,69 % ^a
pKH 47			
pKH 47			6,10 %
pVM 254	E1A	Ad2	
pVM 360	PE2AE	Ad3	4,00 % (1,5) ^b
pVM 254	E1A	Ad2	
pKH 47			1,25 %
pVM 312	E1A	Ad3	
pVM 360	PE2AE	Ad3	0,70 % (1,8)
pVM 312	E1A	Ad3	

a: activité CAT, déterminée comme décrit dans l'appendice technique, exprimée en % de conversions en formes acétylées.
b: facteur d'inhibition déterminé par le rapport des taux d'acétylation en absence et en présence du compétiteur.

TABLEAUX VIII

A: Compétition équimolaire entre le P3E2AE-CAT et le P2E2AE. Les transfections sont réalisées ici en cellules IC4 et en cellules HEK-293 avec le pVM 361.

Type de vecteurs cotransfectés	exprimant	de sérotype	en cellules IC4	Activités "CAT" en cellules HEK-293
PKH 47			0,88 % (1)	2,15 % (1)
PVM 598	PE2AE	Ad2	0,39 % (2,3)	0,85 % (2,5)

B: Compétition équimolaire entre le P2E2AE-CAT et le P3E2AE. Les transfections sont réalisées ici en cellules IC4 et en cellules HEK-293 avec le pVM 599.

Type de vecteurs cotransfectés	exprimant	de sérotype	en cellules IC4	Activités "CAT" en cellules HEK-293
PKH 47			2,00 % (1)	5,00 % (1)
PVM 360	PE2AE	Ad3	1,60 % (1,2)	4,05 % (1,2)

a: activité "CAT", déterminée comme indiqué dans l'appendice exprimée en % de conversion en formes acétylées.
b: facteur d'inhibition déterminé par le rapport des taux d'acétylation en absence et en présence du compétiteur.

"LTR" du virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV) qui possède la particularité d'être stimulé par des stéroïdes comme la dexaméthasone.

Dans ces deux derniers cas, comme il est figuré dans les Tableaux VIIIa et VIIIb, le taux d'inhibition atteint un facteur moyen de 1,5 pour la compétition P2E2AE-CAT par rapport au P3E2AE et de 2,5 pour la compétition P3E2AE-CAT par rapport au P2E2AE.

De ce fait, on peut en déduire que malgré les observations faites avec les co-transfections en présence des virus "complets" non seulement la compétition est réciproque au niveau vecteur plasmidique, mais encore elle est plus en accord avec une meilleure inductibilité du P2E2AE par les produits E1A de l'Ad2.

3.2. Compétition en présence de la région E1A de l'Ad3.

Le principe des co-transfections est le même que celui utilisé en présence de E1A de l'Ad2. Cependant, cette expérience n'a pu être réalisée qu'en cellules HeLa, ce qui explique la faiblesse des valeurs des activités CAT mesurées. En effet, nous ne disposons pas de souches cellulaires exprimant constitutivement ou de manière inductible la région E1A de l'Ad3.

Les premières co-transfections du P3E2AE-CAT en présence du P2E2AE indiquent que l'activité stimulante de E1A de l'Ad3 est bien ciblée sur le promoteur E2AE de l'Ad3, car la présence du P2E2AE comme compétiteur n'a pas d'effet marquant sur l'activité du P3E2AE-CAT.

En outre, dans les autres co-transfections avec le P2E2AE-CAT, si on a vérifié le pouvoir stimulateur de la région E1A de l'Ad3 sur le P2E2AE, on montre que l'addition du plasmide compétiteur qui est ici le P2E2AE, fait chuter l'activité CAT environ de moitié, ce qui montre bien la répartition des effets activateurs indépendamment sur l'un, comme sur l'autre, promoteur dans ce cas précis. Cette expérience a été réalisée pour bien montrer la distribution de l'effet stimulateur par effet *trans*, c'est à dire en mettant en jeu des facteurs cellulaires.

En conclusion de ces études, on peut avancer l'idée selon laquelle la région E1A de l'Ad3 stimule de manière préférentielle le P3E2AE. Cette observation est en accord avec notre hypothèse de départ ce qui cependant, n'est pas confirmé par les expériences réalisées avec la région E1A de l'Ad2. Dans ces conditions, seule la meilleure efficacité de stimulation du promoteur E2AE de l'Ad3 par rapport au promoteur E2AE de l'Ad5 par E1A de l'Ad2, peut être mise en jeu pour rendre compte de la différence d'expression des deux sérotypes.

Cependant, ces premiers résultats ont été obtenus en utilisant des concentrations molaires équivalentes de vecteurs plasmidiques; il serait peut être plus judicieux d'affiner cette étude de compétition en réalisant une approche plus graduelle. Cette stratégie repose ainsi sur deux essais de

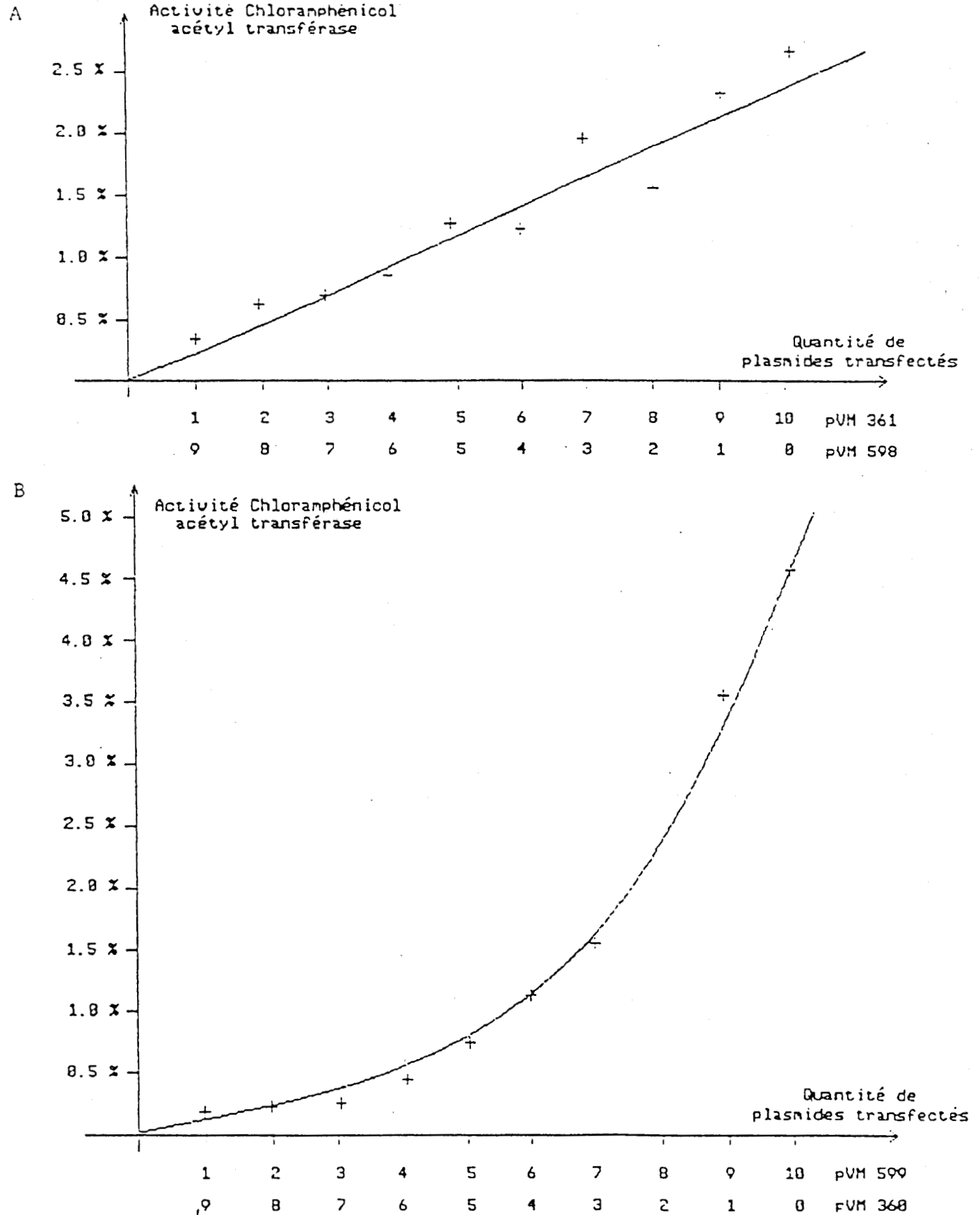
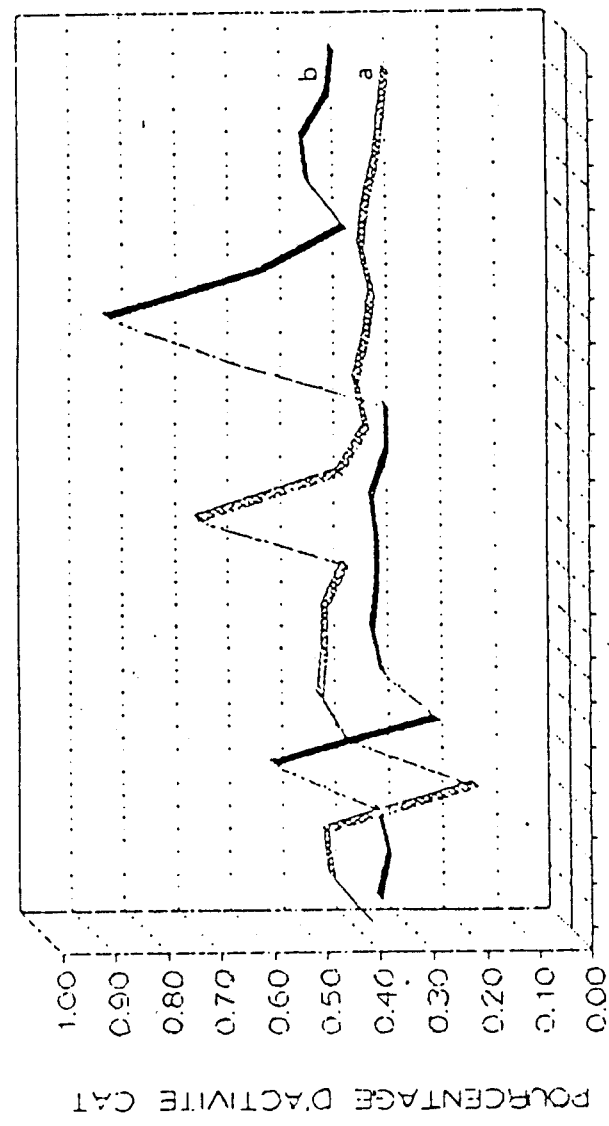


Fig. 40 : Compétition entre les deux promoteurs E2A précoces des deux sérotypes par "double variable".



MESURE DE L'EFFET SEUIL



pvm 361 + pvm 598

pvm 599 + pvm 360

a										b									
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
pvm 599										pvm 361									
pvm 360										pvm 598									
pkh 47										pkh 47									

Fig.41: Mise en évidence de l'existence d'un seuil de compétition entre les deux promoteurs E2A précoces des deux sérotypes.

compétition entre le P2E2AE-CAT/P3E2AE d'une part et les P3E2AE-CAT/P2E2AE:

1) en utilisant des rapports croissants du premier promoteur et décroissants de l'autre,

2) en utilisant des quantités fixes de l'un et variables de l'autre pour envisager l'existence d'un seuil de compétition entre ces deux promoteurs.

4. Compétition par double variable.

Les transfections sont effectuées en cellules IC4 et entre 10 et 1 ug de PE2AE-CAT du premier sérotype sont opposés 1 à 10 ug de PE2AE du second (fig. 40).

Comme on peut le voir dans ces conditions expérimentales la préférence est nettement attribuée au P3E2AE qui, en effet, n'est pas affecté par la présence du compétiteur. L'expression du gène *cat* suit alors une loi de proportionnalité presque parfaite (fig. 40a).

Au contraire, la courbe de compétition P2E2AE-CAT/P3E2AE est plus le reflet du ciblage préférentiel des facteurs cellulaires sur le promoteur E2AE de l'Ad3 (fig. 40b).

Ces compétitions, réalisées en présence de E1A de l'Ad2 semblent en désaccord avec les résultats de compétitions équimolaires. Cependant, cette compétition par double variable est sans doute la représentation plus réelle de la régulation différente des deux promoteurs, comme il en sera discuté plus loin.

5. Mesure de l'effet seuil.

Afin de tester l'hypothèse de l'existence d'un effet seuil de compétition, nous avons réalisé des essais de compétition en prenant la valeur fixe d'un promoteur E2AE d'un sérotype associé au gène *cat* (10 ug) et fait varier le promoteur E2AE de l'autre sérotype. Les valeurs CAT sont assez faibles mais s'expliquent par le fait que la transfection en cellules HEK-293 a nécessité l'utilisation d'un troisième vecteur, le pKH 47 comme plasmide neutre, afin de standardiser les quantités de matériels plasmidiques transfectés.

Les courbes obtenues peuvent être divisées en deux domaines (fig. 41):

La seconde partie de la courbe (10 à 20 ug de compétiteur P3E2AE ou 14 à 20 ug de compétiteur P2E2AE); domaine B, est plus en accord avec l'effet seuil que nous nous attendions à obtenir. Dans ce cas, la préférence de E1A de l'Ad2 est bien attribuée au P3E2AE, car il faut environ 1,5 fois plus de compétiteur P2E2AE que de P3E2AE pour faire chuter l'activité CAT. Au delà, la valeur de cette activité CAT reste minimale sans doute par excès de compétiteur.

Les premières parties des deux courbes, parce que surprenantes dans leurs évolutions, méritent qu'on s'y intéresse. Au contraire d'une activité CAT maximale attendue par défaut de compétiteur, ces deux courbes accusent un

minima, avec des éléments de symétrie (pour 3 ug de compétiteur) d'une courbe à l'autre. La mise en jeu de facteurs de régulation négatifs, en plus des facteurs de régulation positifs classiques serait à envisager. Il en sera discuté également plus loin.

Toutes les hypothèses formulées jusqu'à présent font intervenir des facteurs cellulaires. La vérification de leur implication peut être faite grâce à la technique de l'ADN retardé en gel de polyacrylamide, qui non seulement mettra en évidence les complexes ADN-protéines mis en jeu mais qui nous permettra également de rendre compte des compétitions inter-promoteurs.

V- MISE EN EVIDENCE DE L'IMPLICATION DE FACTEURS NUCLEAIRES DANS LA COMPETITION INTER-PROMOTEURS.

1. Profil de retardement en gel d'acrylamide de chacun des deux promoteurs.

Le principe de la méthode utilisée repose sur la différence de migration électrophorétique en gel d'acrylamide des fragments d'ADN purifiés ou complexés à des protéines spécifiques. Chaque bande retardée (par rapport à la sonde "libre") sera donc l'illustration de leurs combinaisons à une ou plusieurs protéines.

Nous avons donc incubé des fragments d'ADN renfermant soit le promoteur E2A précoce de l'Ad3 (fragment Apa I (76,5 u.g.) - Xho I (76,9 u.g.)) soit le promoteur E2A précoce de l'Ad2 (fragment Sau 3A I (75,3 u.g.) - Eco RI (76,1 u.g.)) avec des extraits nucléaires.

Les cellules choisies sont les suivantes:

- les cellules KB3 non infectées (témoin "mock"),
- les cellules KB3 infectées par l'Ad2 ou par l'Ad3 et où les protéines nucléaires sont extraites 10 h p.i. (temps précoce du cycle lytique),
- les cellules HEK-293.

Les expériences réalisées sont les suivantes:

Nous avons incubé environ 1 ng de sonde correspondant à chaque promoteur avec 10 ug de protéines d'extraits nucléaires de cellules infectées par l'Ad3 ou par l'Ad2 (voir Appendice Technique).

Nous nous sommes assurés que la combinaison ADN-protéines nucléaires était bien spécifique par l'utilisation du poly (dI-dC)-poly (dI-dC) comme compétiteur dans un rapport 1 ng de sonde / 1000 à 2000 ng de polydimère.

Les figures 42a et 43a montrent pour le promoteur E2A précoce de l'Ad2 un profil de deux bandes retardées que soit exprimée ou non la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3. Quant au promoteur E2A de l'Ad3, trois bandes retardées sont obtenues.

Profils d'ADN retardé en gels de polyacrylamide.

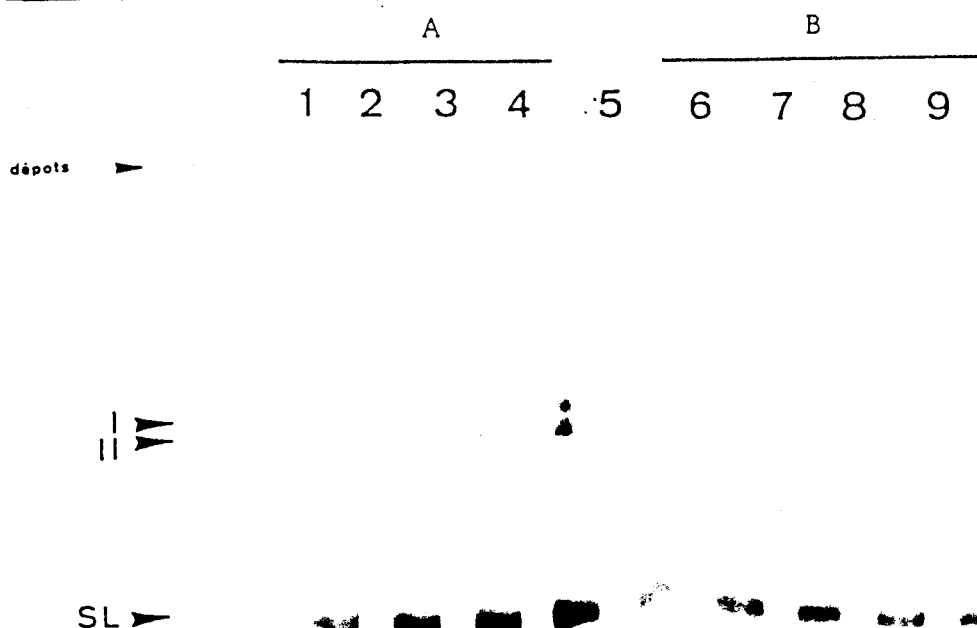


Fig. 42: A: à 10000 cpm de sonde P2E2AE (1ng environ) sont ajoutés 10 µg d'extraits nucléaires totaux (voir Appendice Technique) issus des:

- 1- Cellules KB3 "mock",
- 2- Cellules KB3 infectées par l'Ad3 au stade précoce du cycle lytique,
- 3- Cellules KB3 infectées par l'Ad2 au stade précoce du cycle lytique,
- 4- Cellules HEK-293 "mock".
- 5- Sonde P2E2AE libre.

B: Les milieux d'incubation sont les mêmes que pour les essais A de 1 à 4, mais en présence du promoteur E2AE de l'Ad3 comme compétiteur.

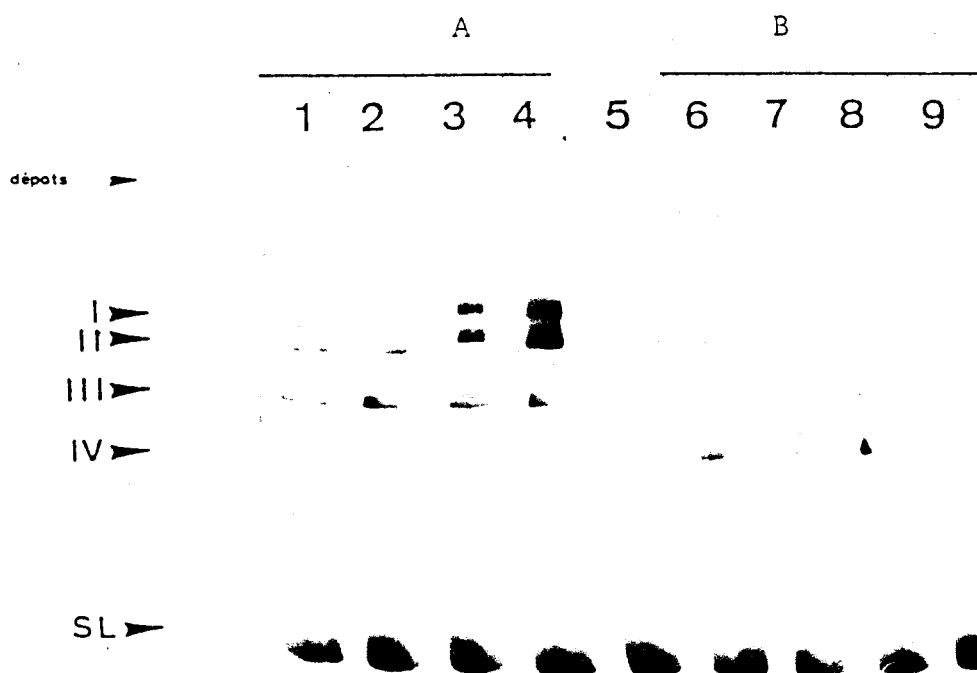


Fig. 43: A: même protocole expérimental que ci-dessus, mais avec la sonde P3E2AE.

B: Compétition avec le P2E2AE. Comme ci-dessus, le rapport sonde radioactive et promoteur compétiteur est de 100 (1 ng de P3E2AE marquée en 3'OH incubées avec 100 ng de P2E2AE compétiteur en présence des 10 µg d'extraits protéiques nucléaires totaux).

2. Compétition inter-sérotypique.

Afin de vérifier si ces interactions spécifiques ADN/protéines peuvent être mises en jeu lors des compétitions inter-promoteurs, nous avons ajouté au milieu d'incubation contenant toujours 10 ug de protéines, le fragment de restriction contenant le promoteur E2AE compétiteur du promoteur testé (avec un rapport de 1 ng de promoteur testé pour 100 ng de promoteur compétiteur).

Ainsi, dans le cas où est ajoutée au P2E2AE le fragment non radio-actif contenant le P3E2AE, les deux bandes retardées caractéristiques de son profil disparaissent quelque soit le système cellulaire testé. On peut en déduire une capture des facteurs de régulation du premier promoteur par le second.

Quant au promoteur E2A de l'Ad3, son profil de retard sur gel est plus complexe que celui du P2E2AE. Trois bandes sont obtenues sans compétiteur, mais si celles-ci disparaissent en présence du P2E2AE, une bande retardée de masse moléculaire moins élevée est obtenue. On peut suggérer que dans le cas du P3E2AE, un facteur cellulaire différent de ceux se liant au P2E2AE intervient dans la liaison au promoteur E2AE de l'Ad3 (fig. 42b et 43b). Il en sera discuté plus loin.

En conclusion de cette étude, l'observation de la disparition de certaines des bandes retardées dans les différents systèmes cellulaires testés confortent notre hypothèse de l'implication des facteurs nucléaires dans le processus de régulation des deux promoteurs.

VI- MISE EN EVIDENCE D'UNE SEQUENCE "POISON" DANS LES VECTEURS PLASMIDIQUES DERIVES DU pBR 322.

La délétion du fragment de restriction Sal I- Nde I du pBR 322 (fig. 44) fut réalisée par J.P.G. Leite afin d'éliminer le site Bal I du vecteur plasmidique et permettre la réalisation de modifications dans le site Bal I de la région E1A de l'Ad2. On s'aperçut alors que l'activité du gène *cat* de ce nouveau vecteur plasmidique était 23 fois plus forte que celle du plasmide sans délétion.

La localisation précise des séquences impliquées a été faite en utilisant des plasmides délétés de petites régions définies par les sites Nde I-Sal I Tth 111 I-Pvu II et Nde I - Tth 111 I et exprimant le gène *cat* sous contrôle du promoteur E1A de l'Ad2 (fig. 45 et 46). Les résultats présentés dans le Tableau IX éliminent ainsi le rôle du site "nick" localisé à 2254 pb sur le pBR 322 et permettent de localiser la séquence inhibitrice entre les sites Pvu II et Tth 111 I.

Entre les sites Pvu II et Tth 111 I, deux structures peuvent être mises en jeu:

- 1) Le promoteur P5 localisé aux environs du nt 2150 (Stuber and Bujard, 1981)

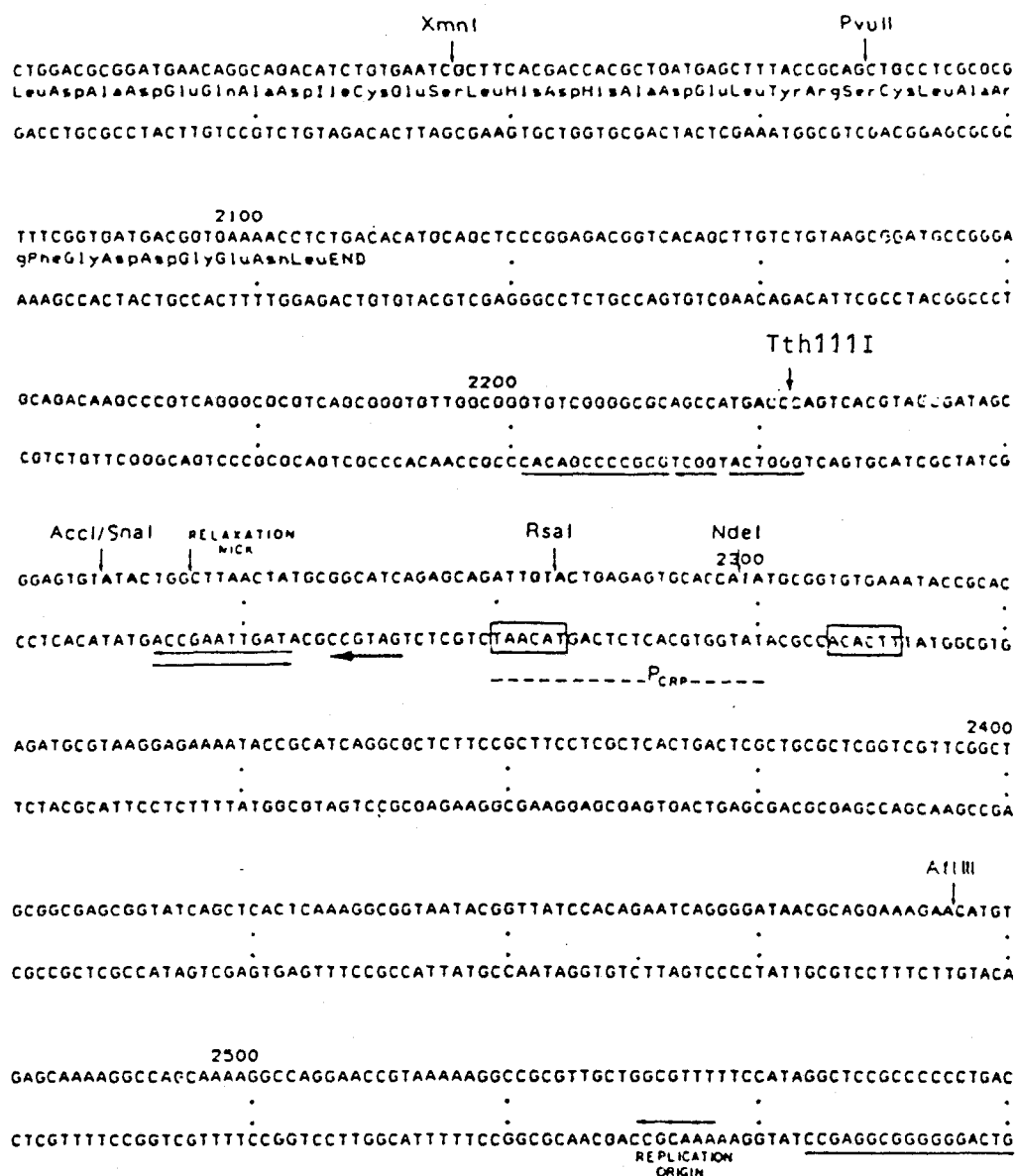


Fig.44: Séquence nucléotidique de la région du pBR 322 couvrant la séquence "poison".

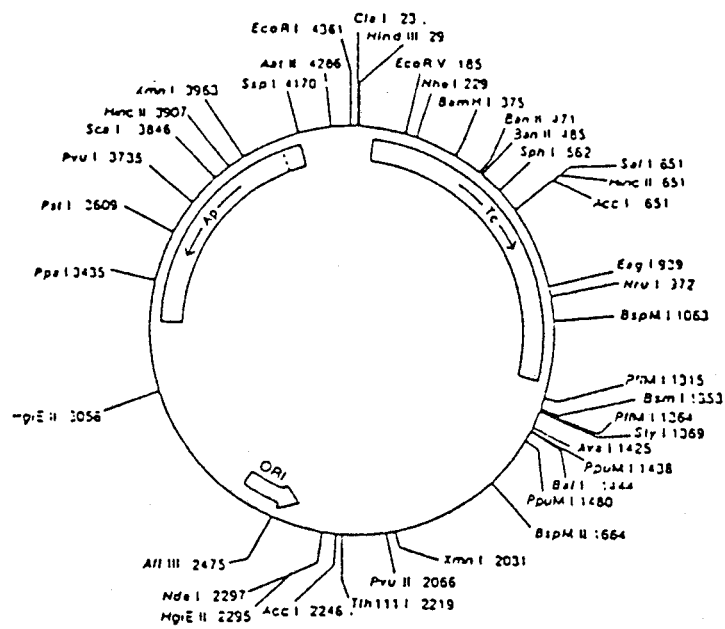


Fig 45: Carte de restriction du pBR 322.

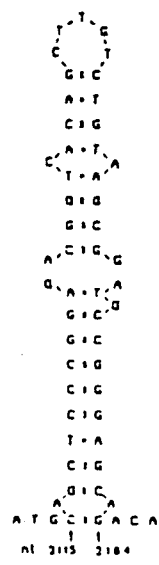


Fig. 46 : Structure en "épinglé à cheveux" potentielle dans la région entre les nt 2115 et 2154.

2) Un élément agissant en cis, le "bom", (Young and Poolis, 1978).

La séparation de ces deux éléments de séquence fut réalisée en introduisant un "linker" Xba I au site de restriction Fok I séparant ces deux domaines.

Les activités CAT mesurées après délétions ont montré que ces deux domaines étaient impliqués dans l'inhibition de la transcription (fig. 47).

Ces résultats obtenus en transcription furent également confirmés lors d'études de transformation cellulaire (Leite *et al.*, 1989).

D'autre part, cette séquence "poison" agit en cis (Leite *et al.*, 1989), et n'est pas spécifique d'un promoteur, comme le montrent les résultats obtenus avec les promoteurs E2A précoces et tardifs.

Nous avons réalisé en effet, des constructions similaires avec les promoteurs E2A de l'Ad2 et avons confirmé la fonction inhibitrice de cette séquence.

Dans le cas du promoteur précoce, nous avons testé l'influence de vecteurs plasmidiques exprimant la région E1A de l'Ad2 où chacun de ses produits séparément délétés ou non de la séquence "poison".

Dix ug de plasmides contenant le P2E2AE-CAT (fig. 39) ont été transfectés avec 10 ug de chacun des plasmides exprimant E1A ou un de ses produits (Tableau X). Comme le montrent les résultats, l'activité stimulatrice de la région E1A complète ou du produit de l'ARNm 13S est de 1,5 et de 2,5 fois plus élevée, respectivement, lorsque la séquence "poison" est délétée. En outre, on peut noter l'effet légèrement stimulateur du produit de l'ARNm 12S.

L'étude similaire que nous avons menée sur le promoteur E2A précoce de l'Ad3 vis à vis de la région E1A de l'Ad2 confirme ces premiers résultats (Tableau X).

Quant au promoteur E2A tardif (PE2AL), les résultats sont encore plus étonnants. Nous avons introduit le plasmide délété de sa séquence "poison" et contenant le gène *cat* sous contrôle du P2E2AL dans des cellules HeLa avec les plasmides exprimant E1A de l'Ad2 (les quantités de plasmides sont toujours de 10 ug)(fig. 48 et 49).

Dans le cas de l'utilisation de vecteurs plasmidiques contenant la séquence inhibitrice, on retrouve les résultats avancés par Bhat *et al.* (1986) indiquant que les produits des ARNm 12S et 13S de E1A de l'Ad2 n'ont pas d'effet marquant sur l'expression du P2E2AL. En effet, les valeurs d'activité CAT restent comprises entre 0,9 et 1,2% lorsqu'il y a induction alors que l'activité CAT de base du promoteur est de 1% (Tableau XI).

Cependant, l'utilisation des vecteurs plasmidiques sans séquence "poison" rend le P2E2AL inductible à la région E1A et à chacun de ces produits. Dans ce cas, les valeurs d'activité CAT passent en effet de 1,2% pour l'activité de base du promoteur à 1,5 et 2,7% pour l'activité induite. Même le vecteur plasmidique exprimant le produit de l'ARNm 12S stimule le promoteur E2AL.

NOMENCLATURE DES VECTEURS PLASMIDIQUES	NATURE DE L'INSERT Fragments de restriction	EXPRIMENT	SEQUENCE POISON
pVM 214	<u>Eco</u> RI - <u>Hind</u> III 0 nt 6231 nt	E1A + 19K E1B	OUI
pEK 975	Mutation au nt 975: perte du site d'épissage de l'ARNm 12S	produit de l'ARNm 13S de E1A + 19K E1B	OUI
d1 1500	Délétion de 9 nt entre 1109 nt et 1119 nt perte du site d'épissage de l'ARNm 13S	produit de l'ARNm 12S de E1A + 19K E1B	OUI

Fig. 48 : Présentation des vecteurs plasmidiques utilisés dans les expériences de mise en évidence de l'influence de la séquence poison.

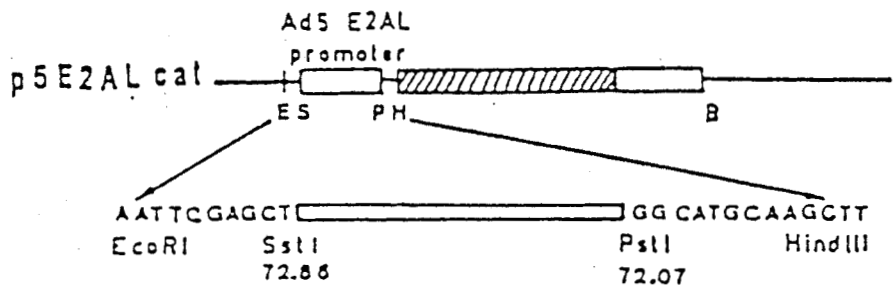


Fig. 49 : Schématisation du vecteur plasmidique exprimant le promoteur E2A tardif utilisé lors des expériences.

p5E2AL-CAT		
PRESENCE DE LA SEQUENCE POISON	OUI	NON
ACTIVITE DE BASE	1.0 %	1.2 %
PLASMIDES COTRANSFECTES		
pVM 214	1.2 %	2.7 %
d1 1500	0.9 %	1.5 %
pEK 975	1.1 %	1.9 %

TABLEAU XI : Résultats des activités CAT des plasmides exprimant le P5E2AL en présence ou en absence de la séquence poison, cotransfectés avec des plasmides exprimant la région E1A de l'Ad2 ou chacun de ses produits.

Plasmid ^a	Deletion	relative CAT activity
p2Elacat	—	1.0 ^b
p2ElacatΔA	nt 650-2245	14.0
p2ElacatΔSN	nt 650-2300	8.6
p2ElacatΔPN	nt 2065-2300	12.5
p2ElacatΔTN	nt 2223-2300	1.2
p2ElacatΔPT	nt 2065-2223	14.8
pVM061	XbaI (nt 2163)	3.1
pVM062	nt 2065-2163	4.2
pVM063	nt 2163-2223	4.3

Tableau IX: p2Elacat: plasmide contenant le gène *càt* sous le contrôle du promoteur E1A de l'Ad2. Les activités CAT présentées dans ce tableau correspondent aux délétions réalisées dans la séquence "poison" en utilisant les sites de restriction AccI; NdeI; Tth111I et PvuII. (d'après Leite *et al*, 1989)

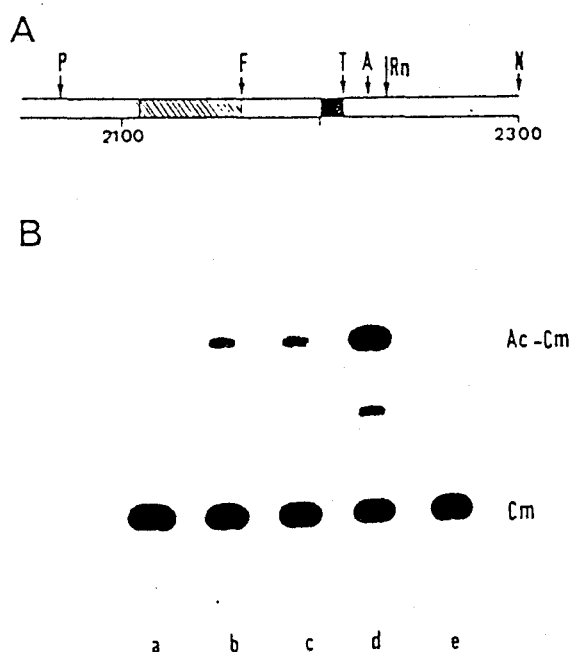


Fig. 47: Localisation de l'élément agissant en *cis*.

A: Diagramme des principaux éléments pouvant être impliqués dans la séquence "poison". Le rectangle hachuré correspond au promoteur P5, le rectangle noir au site "bon". A: AccI, F: FokI, N: NdeI, P: PvuII, Rn: Relaxation nick, T: Tth111I.

B: Activité CAT déterminée par transfection des cellules HeLa avec le p2Elacat (a), pVM 062 (b), pVM 063 (c), p2Elacat PT (d) (e) est le contrôle cellules "mock". (d'après Leite *et al*, 1989)

TABEAU X: Mesure de l'influence de la séquence "poison" sur l'expression du promoteur E2A précoce de l'AD2 et de l'Ad3.

Type de vecteurs cotransfectés	régions exprimées		activités "CAT"	
	régions	sérotypes	pvm 361	pvm 599
PKH 47	aucune	aucun	0,35 % ^a (1)	0,90 % (1)
pvm 214	E1A avec SP	Ad2	4,00 % (12) ^b	8,20 % (9)
pvm 249	E1A sans SP	Ad2	7,20 % (20)	12,00 % (13)
pEK 975	ARNm 13S avec SP	Ad2	ND	6,50 % (7)
pvm 255	ARNm 13S sans SP	Ad2	ND	15,40 % (17)
d1 1500	ARNm 12S avec SP	Ad2	ND	1,40 % (1,5)
pvm 256	ARNm 12S sans SP	Ad2	ND	2,45 % (2,7)

a: activité CAT, déterminée comme décrit dans l'Appendice Technique, exprimée en % de conversion en formes acétylées
b: facteur de stimulation déterminé par le rapport des taux d'acétylation en absence ou en présence de la région E1A des deux sérotypes pour chacun des deux promoteurs E2A précoces
SP: Séquence Poison

Dans ces conditions, nous avons préféré lorsque cela était possible, les constructions plasmidiques dépourvues de cette séquence inhibitrice.

La séquence "poison" n'intervient pas dans le phénomène de la transdominance, comme il a été montré par Leite (1988), car les plasmides exprimant les promoteurs E1A de l'Ad2, qu'ils renferment ou non cette séquence inhibitrice, sont inhibés par les produits de la région E1A de l'Ad3.

VII- COMPARAISON DES SEQUENCES POLYPEPTIDIQUES DE LA PROTEINE DE STRUCTURE pVIII DES DEUX SEROTYPES.

L'analyse de la séquence du P3E2AE révèle que sur les trois phases ouvertes de lecture potentielles qui peuvent être générées dans la région du P3E2AE, une d'entre elles montre que deux protéines sont également retrouvées au niveau de cette région. On peut replacer ainsi la fin de la partie codante d'une protéine de 33 kDa et le début de la séquence codante d'une protéine structurale, la protéine pVIII (fig. 50).

Nous avons donc décidé de compléter la séquence que nous avons établie en amont du site *Xho* I (76,9 u.g.), avec celle obtenue par Signäs *et al.* (1986), en aval de ce même site, de rechercher et de comparer les deux séquences en AA des protéines pVIII des deux sérotypes.

D'une masse moléculaire de 27,4 kDa (Hérissé *et al.*, 1980), la pVIII est codée par la famille des gènes L4 sur le brin r de l'ADN viral (se terminant à 78,3 u.g.). Cette protéine est le produit d'une modification post-transcriptionnelle d'un ARN précurseur nucléaire de 28S, codée à partir du MLP. Le site ATG d'initiation de la traduction est situé dans la séquence du PE2AE, sur le brin r.

La comparaison de séquence établie par le logiciel PC GENE (fig 51.) indique que la pVIII de l'Ad3 commence au même ATG que la pVIII de l'Ad2 mais diffère sur quelques points. Les parties N et C terminales de la protéine sont conservées pour les deux sérotypes mais la région centrale diverge et correspond d'ailleurs à la région de contrôle du promoteur E2AE. La protéine pVIII est en outre plus courte de 5 AA que son homologue de l'Ad2.

Nous avons recherché les sites d'épissage des ARN codants pour les protéines pVIII des deux sérotypes mais aucune séquence consensus de ces sites n'a pu être déterminée par analyse informatique.

Everitt *et al.* (1975) ont montré que la protéine pVIII est le précurseur d'un polypeptide de masse moléculaire apparente 17,5 kDa chez l'Ad2 (la protéine VIII) qui est associée dans le virion aux hexons des zones apicales et possède un rôle de stabilisation de la capside.

Le clivage est assuré par une protéase de spécificité de coupure M/LXGX G ou M/LXGG X, où X est un acide aminé quelconque (Webster *et al.*, 1989; communication personnelle). Cependant, sa localisation précise n'a pu

10	20	30	40	50	60
CGGGTGGATGGGAAGAGCAGGAAGTCAGAGAGCTGAGGAACGATCTTCAACTATGCATTTTCAGCAGAGT					
G	G	W	E	E	Q
E	V	R	E	L	R
N	D	L	Q	L	C
I	S	A	E		

70	80	90	100	110	120	130
GGGGAAGAGCAGGGAACTCAAGAAAAACGATCTCTGCGCTCGCTCACCAGAAGTTGTTTGTAACACAA						
W	G	R	A	G	N	S
R	K	N	D	L	C	A
R	S	P	E	V	V	C
N	T					

140	150	160	170	180	190	200
GAGCGAAGACCAACTTCAGCAGCGCACTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCGCTGA						
R	A	K	T	N	F	S
S	A	L	E	D	A	E
A	L	F	N	K	Y	C
A	L					

210	220	230	240	250	260	270
CTCTTAAAGAGTAGCCCTTGCCCGCGCTCATTTTGAAAACGGCGGAATCACGTCACCCTTGGCACCTGT						
T	L	K	E	-		

280	290	300	310	320	330	340
CCTTTGCCCTTGTCATGAGTAAAGAGATTCCCACGCCTTACATGTGGAGCTATCAGCCCAATAGGTTGG						
<u>M</u>	S	K	E	I	P	T
P	Y	<u>M</u>	W	S	Y	Q
P	N	R	L			

350	360	370	380	390	400	410
CAGCAGGCGCTTCCAGGACTACTACACCGCTAGTATTGCTTAGCGCCGGGCGCTCAATGATATCACGGG						
A	A	G	A	S	R	T
T	T	T	P	L	V	L
L	S	A	G	P	S	<u>M</u>
I	S	R				

420	430	440	450	460	470	480
TTAATGATATCGAGCTTATCGAAACCAGTTCTCCTAGAACAGTCAGCTCTCACCACCAACACCCCGTCA						
V	N	D	I	E	L	I
E	T	S	S	P	R	T
V	S	S	H	H	Q	H
P	V					

490	500	510	520	530	540	550
ACACCTTAATCCCCGAAATTGGCCCGCCACGCTGTACCAGGAAAATCCCGCTCCCACCACGTACTACTC						
N	T	L	I	P	E	I
G	P	P	R	C	T	R
K	I	P	L	P	P	R
T	T					

Fig. 50: Séquences polypeptidiques obtenues par traduction du brin r de la séquence nucléotidique correspondant au promoteur E2A précoce de l'Ad3.

être déterminée chez l'Ad2. La comparaison de séquence montre la conservation d'un site possible de coupure, vers le 101ème AA (séquence LAGGS chez l'Ad3 et LAGGF chez l'Ad2). Ce site est vraisemblablement utilisé car il conduit à deux protéines de masses moléculaires réelles de 11,4 et 12,6 kDa qui sont voisines des protéines de 12,1 et 12,5 kDa obtenues à partir de l'Ad2. On peut suggérer que ces produits de clivage peuvent donner naissance à la protéine de masse moléculaire apparente de 17,5 kDa par modifications post-traductionnelles.

Enfin, l'étude que nous avons menée sur la protéine de 33 kDa dont nous connaissons les 72 AA pour la partie C-terminale, révèle une homologie de l'ordre de 40% avec son homologue de l'Ad2 (fig. 51). Cependant on peut noter l'homologie presque parfaite pour les 18 derniers acides aminés. Peu de choses sont connues sur le rôle de cette protéine, mais il pourrait être intéressant de les comparer.

```

PVIIIAD3 - MSKEIPTPYMWSYQPNRLAAG--ASRTTTPLVLLSAGPSMISRVNDIELI -48
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
PVIIIAD2 - MSKEIPTPYMWSYQPQMGLAAGAAQDYSTRINYMSAGPHMISRVNGIRAH -50
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
PVIIIAD3 - ETSSPRTVSSHHQHVPVNTLIPEIGPPRCTRKIPLPPRTT---RDAQAEVQ -95
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
PVIIIAD2 - RNRIILLEQAAITTTPRNNILNPRSWPAALVYQESPAPTTVVLPRDAQAEVQ -100
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
PVIIIAD3 - MTNAGVQLAGGSALCRHRPQQSIKRLVIRGRGIGLQLNDES VSSSLGLRPDG -145
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
PVIIIAD2 - MTNSGAQLAGGFRHRVRSPGQGITHLKIRGRGIGLQLNDES VSSSLGLRPDG -150
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
PVIIIAD3 - VFQIAGCRGSSFTPRQAVLTLESSSSQPRSGGIGTLQFVEEFTPSVYFNP -195
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
PVIIIAD2 - TFQIGGAGRSSFTPRQAILTLQTSSEPRSGGIGTLQFIEEFVPSVYFNP -200
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
PVIIIAD3 - FSGSPGQYPDEFIPNFD AISESV DGYD -222
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
PVIIIAD2 - FSGPPGHYPDQFIPNFD AVKDSADGYD -227
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

Fig. 51: Alignement des deux séquences peptidiques des protéines pVIII des deux sérotypes de l'adénovirus (Ad2 et Ad3).

```

P33ADEN3 - GGWEEQEVREL RNDLQLCISA EWGRAGNSRKNDLCARSPEVVCNTRAKTN -50
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P33ADEN2 - VSTRELNRIFPTLYAIFQQSRGQEQLKIKNRSLSLTRSCLYHKSEDQ -50
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P33ADEN3 - FSSALEDAEALFNKYCALT LKE -72
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P33ADEN2 - LRRTLEDAEALFSKYCALT LKD -72
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

Fig. 52: Comparaison de l'enchaînement polypeptidique des deux régions C-terminales des p33 des deux sérotypes.

DISCUSSION

La découverte du phénomène de la transdominance intersérotypique repose sur l'observation d'une inhibition par l'adénovirus de sérotype 3 de la réplication des adénovirus des autres sérotypes, que ces co-infections soient effectuées en cellules non permissives (Vero, CV-1) ou permissives (HeLa, KB, HEK-293)(Delsert et D'Halluin, 1984).

Dans le cas de la co-infection Ad2-Ad3, Delsert (1985) avait montré que le taux de transcription des régions E1A et E2A de l'Ad2 était nettement réduit. En infectant les HEK-293 par l'Ad2, puis par l'Ad3, il a montré que la base du penton et la fibre de l'Ad2 étaient toujours synthétisées. Il en a ainsi conclu que ce phénomène était associé aux protéines de la phase précoce du cycle viral.

Le rôle des produits de la région E1A de l'Ad2 et de l'Ad3, dans le phénomène de transdominance, et celui du rôle individuel des produits E1A de l'Ad3 par rapport à ceux de l'Ad2 ont été déterminés (Leite, 1988).

Ainsi, il fut nettement démontré que les produits de la région E1A de l'Ad3 régulaient négativement le promoteur E1A de l'Ad2. Par contre, le produit de l'ARNm 13S de l'Ad2 régule positivement le promoteur E1A de l'Ad2 et de l'Ad3.

Des études complémentaires lui ont permis de mettre en évidence que si les produits des ARNm 12S et 13S de l'Ad3 exprimés séparément ou ensemble, inhibent les promoteurs E1A de l'Ad2 et même E3 de ce même sérotype, ils stimulent séparément le promoteur E2A de l'Ad5. En amont des promoteurs E1A et E3, il existe une séquence "TATA box" qui est absente pour le promoteur E2A. Cette séquence est sans doute une des cibles de la régulation négative directe ou indirecte de ces produits.

Pour approfondir l'étude de la transdominance, et plus particulièrement le mécanisme mettant en jeu le promoteur E2A dans ce processus, nous avons décidé d'étudier les séquences et les facteurs cellulaires qui pourraient participer à ce phénomène.

Les expériences préliminaires réalisées par Leite *et al.* (1986) avaient montré que la région E1A de l'Ad2/5 et plus particulièrement le produit de l'ARNm 13S activait les promoteurs E2A et E3 de l'Ad5, en présence de la région E1A de l'Ad3. Cependant, le produit de l'ARNm 13S de l'Ad3 inhibe la transcription de la région E1A de l'Ad2 et plus encore le promoteur E3. Des résultats similaires sont obtenus avec le produit de l'ARNm 12S mais avec des valeurs d'inhibition plus faibles qu'avec le produit de l'ARNm 13S.

I- DIFFERENCES DE REGULATION DE L'EXPRESSION DES DEUX PROMOTEURS E2A DE L'Ad2 ET DE L'Ad3.

1- Comparaison de l'organisation nucléotidique des promoteurs E2A précoces des deux sérotypes.

1.1- Détermination de la séquence du P3E2AE.

Si la séquence complète du génome de l'Ad2 est connue, très peu de séquences ont été établies pour les autres sérotypes (en dehors de la région E1A). Pour isoler et tester le promoteur E2A de l'Ad3, nous avons entrepris d'en déterminer la séquence nucléotidique, par la méthode des terminaisons de chaînes de Sanger *et al.* (1977).

Tout d'abord, si l'on compare l'organisation nucléotidique des deux promoteurs E2A précoces des deux sérotypes, on s'aperçoit que seule la région centrale, clef de voute de la régulation par E1A (mais également dans l'activité de base du promoteur) est fortement modifiée (fig. 33 à 36).

Pour l'Ad2, la régulation du promoteur nécessite la combinaison de nombreux éléments de séquence qui sont le lieu de liaison de nombreux facteurs cellulaires: La faible activité de base du promoteur E2AE de l'Ad2 est la résultante de l'inhibition de la séquence "enhancer like" présente entre -70 et -90 nt par les deux séquences inhibitrices situées au voisinage de cette séquence activatrice (Jalinot and Kedinger, 1986). En outre, la faible stabilité de liaison du facteur ATF qui se lie à l'élément "enhancer", empêche une bonne efficacité de transcription. En effet, l'édification par les facteurs de transcription généraux du complexe de pré-initiation de la transcription nécessite la liaison ATF-TFIID préalable (Garcia *et al.*, 1987), stabilisée par un facteur cellulaire (E2F) qui n'est actif que lors de l'infection virale.

En présence de E1A, l'activité du P2E2AE est optimale, à la fois par levée de l'inhibition des séquences "silencers", et par l'intervention du facteur E2F qui, activé, stimule la formation du complexe de transcription stable E2F-ATF-TFIID (SivaRaman *et al.*, 1986; Yee *et al.*, 1987).

Pour l'Ad3, toute cette région de contrôle est altérée. Un seul élément est bien à sa place, le "noyau" de la séquence "enhancer" inductible par E1A, cible du facteur cellulaire ATF.

Les séquences "silencer" sont au nombre de deux chez le P2E2AE:

- la première, située en amont de l'élément "enhancer" (-72/-48 nt) n'est pas retrouvée dans le P3E2AE. Il n'y a en effet aucune homologie de séquence entre les deux régions (fig. 35),
- la seconde, située en aval de ce même élément "enhancer" (-111/-97 nt) est également absente chez le P3E2AE. En fait, les 18 nt contenant ce "silencer" sont éliminés de la séquence correspondante chez l'Ad2 (fig. 33). Il n'y a donc pas d'équivalence de séquence pour ces éléments inhibiteurs chez l'Ad3.

Le premier élément "silencer" est paradoxalement le lieu du site de fixation du deuxième facteur activateur de la transcription E2F (-59/-68 nt). Le premier site de fixation de ce même facteur de consensus TTTCGCGC

(-39/-48 nt) n'est pas retrouvé dans la séquence du promoteur E2A de l'Ad3 où elle est remplacée par la séquence CCCTTGCCC. Rien encore dans la littérature ne nous permet de croire que cette séquence puisse être la cible du facteur E2F.

Le second site de liaison au facteur E2F, GCGCGAAAA (-59/-58 nt) n'est pas retrouvé chez l'Ad3 bien que la séquence AAAACGGCGG qui s'y trouve puisse être utilisée, car elle est, à un nucléotide près, la même séquence mais en orientation inverse.

Enfin, un fait remarquable demeure. Les sites d'initiation de la transcription, décrits dans le cas du promoteur E2A de l'Ad2 ne sont pas retrouvés tous les deux chez l'Ad3 (fig. 35).

Si le promoteur E2A de l'Ad3 conserve le site d'initiation E2AE1 et sa "TATA box-like" associée exactement aux positions de ceux de l'Ad2, le site de démarrage E2AE2 ne semble pas être conservé chez l'Ad3.

La question que nous nous sommes posée, est de savoir si ce second site d'initiation mineur est encore utilisé, car la conservation de E2AE2 pourrait être seulement la conséquence de la proximité chez l'Ad2 de T1 et de E2AE2.

1.2- Localisation du site d'initiation de la transcription du P3E2AE.

Nous avons recherché l'origine de la transcription des ARNm issus du P3E2AE. De nombreuses techniques sont possibles, mais nous avons choisi la méthode de protection contre l'action des RNases A et T1, au regard de l'organisation nucléotidique du promoteur. En effet, près du site d'initiation de la transcription unique potentiel, on trouve le site donneur d'épissage de la DBP, qui est positionné dans la même région de celui de la DBP de l'Ad2.

La sonde ARN utilisée couvre tout le promoteur E2AE de l'Ad3 et la séquence en amont du site donneur d'épissage (soit environ 400 pb). Dans ces conditions, l'hybridation de cette sonde spécifique avec les ARNm issus du promoteur précoce E2A de l'Ad3, donnera un fragment protégé de 70 pb si le site d'initiation de la transcription défini par la séquence de l'Ad3 est bien le site E2AE1 décrit pour l'Ad2. Un second fragment de 96 pb est attendu si le site E2AE2 est également utilisé chez l'Ad3, quoiqu' aucune homologie de séquence ne soit décelable.

L'hybridation avec les ARN totaux extraits des cellules KB3 infectées par l'Ad3 au stade précoce, ou des cellules HeLa ou HEK-293 transfectées avec le pVM 708, contenant l'insert Sal I (68 u.g.)- Bcl I (83,3 u.g.), conduit à la protection de deux fragments de taille approximative de 75 pb sur gel de polyacrylamide (fig. 37).

Ce résultat confirme que le site E2AE1 est bien le seul site d'initiation de la transcription utilisé chez l'Ad3, que ce soit *in vivo* (dans le cas de l'infection par l'Ad3) ou *in vitro* (par transfection avec le pVM 708) en phase précoce du cycle lytique.

Dans ce dernier cas, l'expérience nous permet d'avancer une hypothèse quant à la localisation du site accepteur d'épissage de la DBP de l'Ad3. En effet, pour qu'il soit possible de visualiser une bande protégée de 75 pb environ sur gel de polyacrylamide dans l'essai avec les ARN des cellules transfectées, il faut que l'épissage des ARNm ait lieu normalement. C'est à dire, que si le site donneur d'épissage est bien pris en compte, il faut qu'il existe également un site accepteur d'épissage. Chez l'Ad2, l'un des sites accepteurs d'épissage de la DBP est situé à 68,8 u.g. On peut suggérer qu'il soit conservé chez l'Ad3.

Un autre point concernant l'hétérogénéité de la bande protégée est également à considérer. Cette observation est sans doute la résultante de l'organisation particulière du promoteur E2A de l'Ad3. Deux hypothèses peuvent être formulées:

- La première fait intervenir l'absence de "TATA box" vraie en amont du site d'initiation de la transcription. Etant donnée la difficulté possible de fixation préalable du facteur TFIID, on peut supposer l'instabilité de ce complexe d'initiation. Celle ci peut alors induire un manque de précision quant au positionnement du site de démarrage de la transcription,

- La seconde hypothèse est directement liée à la première. Il a été montré que la stabilité du complexe de préinitiation dépendait de l'intervention de facteurs de transcription spécifiques en amont de la "TATA box" (Hai *et al.*, 1988; Horikoshi *et al.*, 1988). Chez l'Ad2, il s'agit du facteur ATF et des deux facteurs E2F (Garcia *et al.*, 1987). Chez l'Ad3, seul le site ATF est conservé et il n'existe qu'un seul site potentiel de liaison au facteur E2F. On peut donc suggérer que ce faible agencement des facteurs cellulaires soit à l'origine de l'hétérogénéité de démarrage de la transcription.

Cette hétérogénéité d'initiation de la transcription a été décrite pour les régions E3 et E4 de l'Ad2 (Baker and Ziff, 1981), mais dans ce cas si le consensus de la "TATA box" ne peut être mis en cause, l'organisation de chacun de ces deux promoteurs peut sans doute être impliquée.

Un autre aspect de l'organisation particulière du P3E2AE peut être mise en jeu pour expliquer les résultats que nous avons obtenus en mesurant l'activité relative des deux promoteurs E2A des deux sérotypes.

2- Comparaison de la régulation de base des deux promoteurs E2AE.

2.1- Mesure de l'activité CAT relative des deux promoteurs E2A de l'Ad3 et de l'Ad2.

Afin de montrer plus aisément l'activité de ces deux promoteurs, nous les avons clonés en amont du gène de la *cat* et replacés dans le contexte cellulaire en faisant intervenir ou non les produits de la région E1A des deux sérotypes. Le choix de ce système de clonage en expression transitoire repose en fait sur la facilité de mesure, sa reproductibilité et surtout sa sensibilité.

Les nombreux essais que nous avons faits montrent et vérifient la faiblesse de l'activité de base de chacun des promoteurs.

Cependant, il est paradoxal de constater que le promoteur E2A de l'Ad3 est plus faible (2 à 4 fois) que le promoteur E2A de l'Ad2 alors que les séquences "silencers" homologues à celle de l'Ad2 sont absentes et que l'élément de fixation du facteur ATF responsable de l'activité de base du promoteur, est à sa place et actif, peut-on le suggérer (Tableaux IV et V).

L'hypothèse que l'on peut formuler pour expliquer cette observation, est que la liaison du facteur ATF est facilitée par la liaison du facteur E2F, l'interaction ATF-E2F facilitant ainsi l'entrée du complexe stable d'initiation de transcription.

Les profils d'empreinte à la DNase I ont montré chez l'Ad2 que les facteurs E2F et ATF se liaient à l'ADN, même en l'absence de l'activité stimulante de E1A (Devaux *et al.*, 1987). En présence de cette région, on suppose qu'il y aurait augmentation de l'affinité interprotéines et par conséquent stimulation de l'établissement du complexe de transcription (avec entrée des facteurs TFIID, IIA; puis TFIIB, TFIIE et l'ARN polymérase II)(fig. 24).

Or, dans le cas du promoteur E2A de l'Ad3, il n'y a plus qu'un site potentiel de liaison à E2F. On peut très bien admettre que ce soit insuffisant pour permettre une transcription efficace tout au moins en l'absence de E1A.

2.2- Profil de retardement en gel de polyacrylamide.

La méthode d'ADN retardé en gel de polyacrylamide repose sur la combinaison spécifique entre les protéines cellulaires de régulation et leurs séquences cibles. Elle conduit à l'obtention d'un profil de bandes retardées dans leur migration en gel de polyacrylamide, caractéristique des complexes ADN-protéines formées lors d'incubations préalables.

Nos sondes renferment les promoteurs E2AE des deux sérotypes dans leur intégralité, c'est à dire en fait les mêmes fragments de restriction utilisés pour le clonage des vecteurs plasmidiques testés dans le système CAT. Ce choix de longs fragments d'ADN (320 pb pour l'Ad2, 220 pb pour l'Ad3) repose sur notre volonté de rester dans le même système de référence.

Cependant, les résultats de comparaison de l'organisation nucléotidique des deux promoteurs montrent clairement que seule la région centrale de contrôle de régulation des deux promoteurs E2A change (fig. 34 à 36).

On peut donc admettre en première approximation que les facteurs cellulaires se lient préférentiellement à cette région particulière du promoteur. Les travaux de SivaRaman *et al* (1986) sont en accord avec cette hypothèse. En effet, leurs profils de retardement montrent clairement qu'aucune liaison avec les facteurs nucléaires n'est notable dans les régions situées de part et d'autre des 80 pb couvrant la zone clef de régulation du promoteur E2A de l'Ad2 (entre -17 et -98 nt).

Les extraits nucléaires utilisés pour comparer les deux activités de base du promoteur sont issus des cellules KB3 "mock", c'est à dire sans intervention de la région E1A de chacun des deux sérotypes.

Pour l'Ad2, le profil de retardement indique la formation de deux complexes ADN-protéines. Ceci est sans doute l'illustration de la combinaison des deux facteurs E2F et ATF et leurs séquences cibles respectives (fig. 42a). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Devaux *et al* (1987) qui avaient montré la fixation du facteur ATF mais également des facteurs E2F dans des cellules où la région E1A ne s'exprimait pas. Nos conditions d'incubation se prêtent sans doute bien à la détection de ces liaisons.

Pour l'Ad3, le profil de retardement est plus complexe et est composé de trois bandes retardées. L'organisation nucléotidique du promoteur révèle que seul le facteur ATF et peut être un seul facteur E2F peuvent se lier au P3E2AE (fig. 43a). Le profil de retardement laisse penser que d'autres facteurs pourraient être mis en jeu, facteurs qui seraient spécifiques du promoteur E2A de l'Ad3. Toute la région allant de la séquence "TATA box-like" au seul site E2F pourrait très bien être le siège d'une interaction d'un facteur supplémentaire avec l'ADN. En effet, si on peut concevoir un édifice moléculaire comprenant le complexe (E2F)₂ - ATF en interaction avec le facteur TFIID pour induire la formation du complexe de préinitiation de la transcription (en termes de conformation moléculaire), un mécanisme similaire ramené à la seule combinaison E2F - ATF pourrait être insuffisant.

L'analyse informatique des sites potentiels que nous avons réalisés indique que la majorité des facteurs cellulaires connus (Ap1, Ap2, NFKB...) ne se lie pas à cette région, à l'exception peut être des facteurs CTF/NF1 ou Sp1 dont on retrouve plusieurs sites potentiels de liaison (fig. 53).

3- Comparaison de la régulation des deux promoteurs E2A induite par la région E1 des deux sérotypes

3-1 Mesure de l'activité CAT relative à la région E1 des deux sérotypes.

3.1.1 Influence des deux produits de la région E1A des deux sérotypes ou du seul produit de l'ARNm 13S.

En accord avec les travaux de Leite (1988), l'activité stimulatrice de la région E1A de l'Ad3 est moindre que celle de E1A de l'Ad2. La différence d'organisation nucléotidique entre les deux promoteurs des deux régions E1A est sans doute à l'origine de ce phénomène (Leite *et al.*, 1988).

Ensuite, le promoteur E2A de l'Ad3 est plus efficacement stimulé par la région E1A de l'Ad2, dont le facteur de stimulation est de 20 fois vis à vis du

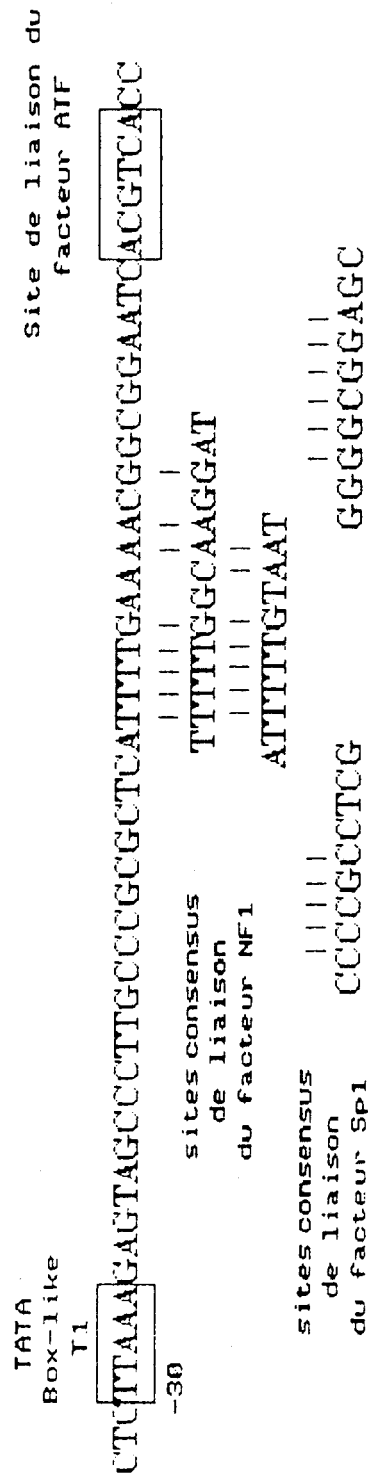


Fig. 53: Détermination des sites potentiels de liaison situés entre la "TATA box-like" T1 et le site de liaison du facteur ATF du P3E2AE. Ces résultats ont été obtenus par analyse informatique.

P3E2AE-CAT et de 14 fois vis à vis du P2E2AE-CAT pour E1A de l'Ad2 (Tableau V).

Ce facteur de stimulation est de 4,5 et 7 fois respectivement dans le cas du produit de l'ARNm 13S de l'Ad2 (Tableau V).

Ces résultats semblent donc en accord avec les hypothèses formulées à partir de l'organisation des deux promoteurs. En effet, en présence de E1A, l' "enhancer" inductible pourrait être plus facilement mis en jeu chez l'Ad3, en regard de l'absence des éléments "silencers". Ces éléments, ou plutôt leur absence, permettrait ainsi de contrebalancer la présence d'un seul site potentiel de liaison au facteur E2F. En effet, Pei et Berk (1989), Loeken et Brady (1989) ont montré que l'inductibilité par E1A était optimale lorsque non seulement les deux sites E2F étaient présents avec ATF, mais aussi lorsque ces deux sites E2F étaient placés à bonne distance l'un par rapport à l'autre.

3.1.2. Influence du produit de l'ARNm 12S.

Les études que nous avons menées quant à l'activité des produits des ARNm 12S des deux sérotypes semblent montrer qu'ils n'ont que peu ou pas d'effet sur l'activité des promoteurs E2A des deux sérotypes (Tableau V).

Les travaux de Carlock et Jones (1981), Leff *et al* (1987) et Ferguson *et al* (1985) ont montré que la stimulation des promoteurs E2A et E3 de l'Ad2 est réalisée efficacement par les produits des ARNm 13S et 12S. Cependant, Ricciardi *et al* (1981), Montell *et al* (1984) et Svensson et Akusjarvi (1984) indiquent une activation de ces mêmes gènes précoces par la seul produit de l'ARNm 13S. Nos résultats vont plus en ce sens.

3.1.3. Influence de la protéine de 19 kDa de la région E1B de l'Ad2.

Lors des premiers essais d'induction par E1A, les premiers plasmides utilisés exprimaient, en plus de la région E1A de l'Ad2, un des produits de E1B de l'Ad2, la protéine de 19kDa.

Les résultats nous ont montré que le plasmide exprimant la région E1A complète et la protéine de 19 kDa de la région E1B de l'Ad2, avait un pouvoir transactivateur, sur les deux promoteurs E2A des deux sérotypes, plus important que le plasmide qui ne renferme que la région E1A de l'Ad2 (Tableau IV). Des études plus précises, avec des vecteurs plasmidiques n'exprimant que la région E1B ou que la protéine de 19 kDa de E1B (résultats non présentés), ont révélé que dans ce cas, l'effet activateur de la 19 kDa sur le promoteur de E1A était un effet *cis* activateur, c'est à dire que des régions du promoteur de E1B peuvent activer l'expression de la région E1A. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par V. Leclère (1989) qui montrent que le site de fixation du facteur Sp1 serait vraisemblablement impliqué dans ce processus.

Cependant, comme la région E1B n'intervient pas directement dans le phénomène de la transdominance intersérotypique, nous avons décidé d'utiliser exclusivement le vecteur exprimant la seule région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3 dans nos expériences.

3.2- Profil de retardement en gel de polyacrylamide.

On obtient pour l'Ad2, un profil identique à celui obtenu sans activation par la région E1A, que soient utilisées les cellules KB3 infectées par l'Ad2 ou par l'Ad3, ou les cellules exprimant constitutivement la région E1 de l'Ad5 (HEK-293). Là encore, l'intervention des facteurs E2F et ATF peut être mise en jeu. Bagchi *et al* (1989) ont suggéré que l'activation de E2F par E1A était un mécanisme post-traductionnel. De ce fait, l'implication d'une meilleure interaction protéines-protéines est envisageable pour expliquer la stimulation de la transcription. Ce processus induit une meilleure édification et stabilité du complexe de l'initiation de la transcription (fig. 42a).

Pour l'Ad3, cette hypothèse est sans doute encore valable puisqu'on retrouve exactement le même profil de retardement en gel de polyacrylamide en présence ou en absence de l'expression de la région E1A de l'Ad2/5 ou de l'Ad3 (fig. 43a).

4- Compétition entre les deux promoteurs E2A précoces des deux sérotypes.

4.1- En système CAT.

L'utilisation du système CAT présente l'avantage de tester la préférence accordée à l'un des deux promoteurs pour l'activité stimulatrice des produits de la région E1A des deux sérotypes.

Nous avons vérifié, tout d'abord, avec nos constructions plasmidiques, les termes de la transdominance intersérotypique.

En présence de l'Ad3, l'activité du promoteur E2A de l'Ad2 chute lorsque E1A de l'Ad2 est également exprimé. Cependant, le promoteur E2A de l'Ad3 est stimulé lorsque les deux régions E1A des deux sérotypes sont présentes, l'une apportée par le virus, l'autre par le plasmide (Tableau VI).

Afin d'analyser l'activité relative des deux promoteurs, nous avons décidé de les tester en système CAT. La première expérience consistait à placer un des promoteurs E2A contrôlant le gène CAT en présence d'une quantité équimolaire de son homologue sérotypique. S'il y avait compétition dans un sens préférentiel à l'autre nous nous attendions à voir chuter le taux de l'activité CAT uniquement dans un cas de figure. Nous avons constaté que cette chute d'activité CAT pouvait être observée dans les deux cas et semblait même privilégier, dans les conditions expérimentales choisies, le promoteur E2A de l'Ad2 par rapport à

celui de l'Ad3. Ce résultat fut confirmé en système HeLa par transfections de trois vecteurs plasmidiques et en système IC4 ou HEK-293 où l'expression de la région E1A de l'Ad2/5 est respectivement induite ou constitutive. Ce fait a lui seul pouvait remettre en question toute notre hypothèse de départ, en ce sens que la transdominance pouvait ne pas correspondre à une préférence du promoteur du sérotype 3 vis à vis du 2 pour le ciblage des facteurs cellulaires dépendants de E1A, en présence de E1A de l'Ad2

Cependant, au regard de notre connaissance de la séquence nucléotidique et des conditions expérimentales utilisées, nous pouvions émettre une certaine réserve quant à l'interprétation de ce résultat.

En effet, ce système équimolaire permet d'établir la mise en jeu directe des facteurs cellulaires indispensables à l'expression des promoteurs. On peut suggérer que ces facteurs cellulaires sont E2F et ATF. Or, vis à vis de ces deux facteurs, il est logique de concevoir une préférence pour le promoteur E2A de l'Ad2 vis à vis de l'Ad3 car ce dernier, s'il possède le site de fixation à ATF, ne semble posséder qu'un site potentiel de liaison à E2F (fig. 34).

Le système de compétition utilisé dans ces conditions vérifie l'organisation nucléotidique des deux promoteurs mais peut-être n'est-il pas assez adapté à l'étude de la transdominance.

Il serait donc plus judicieux d'utiliser des concentrations variables des compétiteurs par rapport au promoteur de départ. C'est ce que nous avons réalisé dans les expériences de "double variable" et d'effet seuil.

Dans le premier cas, nous utilisons des quantités variables de nos deux promoteurs, croissantes pour le promoteur testé, décroissantes pour le promoteur compétiteur, et nous avons obtenu une préférence nette pour le promoteur E2A de l'Ad3 (fig. 40).

Dans le cas P2E2AE-CAT/P3E2AE, la courbe d'activité CAT reflète bien une capture des facteurs cellulaires, levée lorsque la quantité relative de P2E2AE-CAT est plus forte que celle du P3E2AE. De l'autre côté, dans le cas P3E2AE-CAT/P2E2AE, quelque soit la quantité de compétiteur, l'activité CAT reste proportionnelle à la quantité de plasmides P2E2AE-CAT transfectée (fig. 40).

Dans ces conditions, l'expression de E1A semble bien activer préférentiellement le promoteur E2AE de l'Ad3 et confirmer notre hypothèse de travail.

Dans la seconde expérience, nous voulions déterminer l'existence d'un effet seuil de compétition. Pour cela, nous avons maintenu constant le taux du promoteur CAT et fait varier le taux du compétiteur.

Les courbes obtenues semblent mettre en lumière une plus grande complexité du processus qu'il n'y paraissait au premier abord.

La seconde partie des courbes obtenues est bien l'illustration de la préférence du P3E2AE vis à vis du P2E2AE en présence de E1A de l'Ad2 (fig. 41).

Cependant même en présence de faible quantité de plasmide compétiteur, l'activité des deux promoteurs testés est loin d'être optimale, comme il aurait été logique de le supposer.

En fait, il est fort probable que ces courbes soient l'illustration de l'existence de facteurs de régulation négatives. L'existence de ces protéines de régulation négative a été suggérée par Jalinot et Kedinger (1986).

Cette première approche par mesure de l'activité CAT nous montre que la capture des facteurs de régulation positive peut rendre compte de la chute de l'activité CAT du promoteur testé, ceux-ci retrouvant alors une activité proche de l'activité de base du promoteur. En regard de l'évolution des courbes de l'effet "seuil", nous suggérons que cette capture de facteur de régulation se ferait en trois étapes:

- la première, par capture d'une première catégorie de facteur de régulation, peut être le facteur E2F (les résultats ont été obtenus en cellules HEK-293),

- la seconde, par capture du ou des facteurs de régulation négative, ce qui se traduit par un pic d'activité CAT, sans doute lié à l'effet "enhancer-like" présent dans les deux promoteurs,

- la troisième, par excès de compétiteur, produit la capture du facteur ATF qui régule l'expression de l'élément "enhancer-like" et ramène l'activité CAT à l'activité de base du promoteur.

Cette hypothèse se heurte au problème majeur de l'absence des séquences "silencers" homologues à celles de l'Ad2 chez l'Ad3. Cependant, la mise en jeu de ces protéines inhibitrices pourrait expliquer l'évolution symétrique de la courbe observée pour les 3 ug de compétiteur (fig. 41). L'hypothèse que l'on peut formuler est que ces séquences inhibitrices existeraient toujours. Sans doute pas en aval de l'élément "enhancer", car cette séquence est presque identique à celle retrouvée chez l'Ad2. Au contraire, dans la région entre la séquence "TATA box-like" et le site potentiel de liaison du facteur E2F, il se peut qu'il existe une telle séquence "silencer", même si celle-ci n'est pas homologue à celles définies chez l'Ad2. Les expériences d'empreintes à la DNase I pourraient nous apporter un élément de réponse si plusieurs séquences sont protégées dans cette région de 30 pb environ.

4.2- En utilisant la technique de gel retard.

Dans ces expériences, nous avons introduit dans les milieux d'incubation, en même temps que le promoteur E2A testé, le promoteur E2A du sérotype compétiteur.

Pour l'Ad2, l'introduction du P3E2AE en excès, fait disparaître le profil des deux bandes retardées, ce qui suggère que les deux facteurs de régulation E2F et ATF sont captés par le promoteur compétiteur (fig. 42b).

Pour l'Ad3, si les trois bandes caractéristiques du profil normal disparaissent, on voit qu'une bande retardée de masse moléculaire plus faible apparaît (fig. 43b).

Cette observation confirme donc notre hypothèse quant à l'existence d'au moins un facteur supplémentaire et spécifique du promoteur E2AE de l'Ad3. En effet, l'interprétation possible de ce résultat serait que les trois bandes retardées soient la combinaison des facteurs ATF, E2F et de ce ou ces facteurs supplémentaires. La présence du promoteur compétiteur destabiliserait alors les complexes ADN-protéines formés, d'où la disparition des trois bandes retardées, et seul (s) ce ou ces facteurs supplémentaires resteraient fixés sur le promoteur.

Au regard de ces résultats et de notre connaissance de l'unité de transcription E2, il pourrait être également intéressant de connaître les implications de cette nouvelle organisation nucléotidique sur l'expression des trois protéines intervenant dans la réplication de l'ADN viral: la DBP, mais également la pTP et l'ADN polymérase. En effet, la transdominance met en jeu l'inhibition de la réplication de l'ADN viral du sérotype dominé.

La DBP, codée par la région E2A de l'Ad3, que l'on suppose privilégiée pour la stimulation de la transcription par les deux régions E1A du sérotype 3 (dominant) et 2 (dominé), n'a pas de spécificité connue de reconnaissance vis à vis de l'ADN. Cependant, les travaux de Mc Donough et Rekosh (1982), quoique ne faisant pas intervenir les implications de la transdominance intersérotypique, nous permettent d'avancer l'hypothèse selon laquelle la stimulation préférentielle de la DBP de l'Ad3 par rapport à celle de l'Ad2 peut conduire à une réplication préférentielle de l'Ad3 par rapport à l'Ad2. En effet, ces auteurs ont montré que l'Ad3, et plus particulièrement la DBP de l'Ad3, ne pourrait compléter la déficience fonctionnelle de la DBP de l'Ad5 apportée par le mutant H5ts125, lors de co-infection à température restrictive. Ces auteurs avaient montré en outre, que l'incapacité de complémentation par la DBP hétérologue était due au fait que les deux protéines ne pouvaient pas se substituer l'une à l'autre directement au niveau de la réplication de l'ADN et non pas au niveau d'un événement précoce du cycle cellulaire. Ces travaux ont été confirmés par Li *et al* (1984). Ainsi, même si la DBP ne possède pas de site précis de fixation à l'ADN simple brin, une certaine spécificité de fonction, liée aux différents facteurs ou enzymes intervenant dans la réplication, doit être mise en jeu, que ces facteurs soient d'origine cellulaire ou virale.

L'unité de transcription E2 génère également deux protéines nécessaires à la réplication: la pTP et l'ADN polymérase. Si ces deux protéines mettent également en jeu des spécificités pour la réplication du sérotype auquel ils sont associés et comme la régulation de leur expression est sans doute directement sous contrôle du site E2AE1 et de T1 de l'Ad3, on peut supposer que l'on tiendrait là une hypothèse supplémentaire plausible pour rendre compte de la transdominance.

Des travaux en ce sens ont été effectués par van Bergen *et al* (1983) qui recherchaient l'influence de la pTP d'un sérotype donné sur la réplication de l'ADN viral d'un autre sérotype. Leurs résultats montrent qu'*in vitro*, la pTP de sérotype 2 ou 5 peut permettre plusieurs cycles de réplication de l'ADN viral d'un sérotype différent du sous groupe C. Cependant, on peut très bien concevoir qu'*in vivo*, une spécificité plus grande vis à vis de son propre sous groupe puisse permettre à la pTP d'un sérotype donné, de lui donner l'avantage lors de co-infection, et ainsi permettre une réplication plus efficace du sérotype correspondant au détriment de l'autre.

II- MISE EN EVIDENCE DE LA SEQUENCE POISON.

L'utilisation de vecteurs plasmidiques dérivés du pBR 322 et délétés du fragment de restriction "Nde I (2297 nt) - Sal I (651 nt)" nous avait montré l'existence d'un élément de régulation négative dans cette région (Leite *et al.*, 1989).

Lusky et Botchan (1981) avait déjà montré la présence d'une telle séquence et son implication dans l'inhibition de la réplication de l'ADN du virus SV40, mais ces auteurs la plaçaient dans un fragment de 1370 pb (entre les nt 1120 et 2490) du pBR 322.

Il nous a semblé important de préciser la séquence responsable de ce phénomène dans le but de l'éliminer des constructions plasmidiques. En effet, le pBR 322 est largement utilisé comme outil de clonage en Biologie Moléculaire. De ce fait, l'utilisation de vecteurs plasmidiques sans cette séquence inhibitrice est recommandée pour ce type d'études.

Au cours du déroulement de nos recherches, Peterson *et al* (1987), ont montré que la séquence située entre le site Pvu II (2066 nt) et l'origine de réplication du pBR 322 (2536 nt) était sans nul doute impliquée dans la régulation négative de la transcription.

A l'intérieur de cette séquence, quatre domaines pouvaient intervenir dans ce mécanisme:

- le site de relaxation "nick" situé au nt 2254 sur le pBR 322 (Balbas *et al.*, 1981),
- l'extrémité 3' du gène répresseur de l'amorce: "rop" (Cesareni *et al* , 1982),
- le promoteur P5 localisé vers 2150 nt (Stuber and Bujard, 1981),
- et un élément pouvant agir en *cis*, le site "bom" (Young and Poolis, 1978).

La délétion entre les sites Nde I et Tth 111 I (nt 2223-2300) nous a donné un vecteur plasmidique dont l'activité CAT était similaire au contrôle. De plus, le gène "rop" n'est pas transcrit dans les cellules eucaryotes, et le pKH 47 n'exprime qu'une protéine tronquée et présente toujours la séquence inhibitrice.

Ces deux domaines ne sont donc pas impliqués dans la régulation négative de la transcription.

Dans ces conditions, la séquence "poison" est située entre les sites Pvu II et Tth111 I. Il fallait déterminer lequel des deux domaines restants étaient responsables de cette inhibition. Des vecteurs plasmidiques renfermant l'un, l'autre ou les deux domaines ont été construits en utilisant le site Xba I mis à la place du site Fok I situé à 2163 nt. Les résultats d'activité CAT montrent que les deux domaines sont impliqués dans ce mécanisme (Tableau IX).

Des études complémentaires montrent que cet élément inhibiteur affecte également l'expression d'un gène intégré (le gène de résistance à la néomycine) et l'efficacité de la transformation cellulaire (Leite *et al.*, 1989).

Nous avons également insisté sur le fait que cette séquence n'est pas spécifique du promoteur E1A de l'Ad2. Des travaux de construction ont été également réalisés avec le promoteur E2AE de l'Ad2 et indiquent, en présence de la région E1A de l'Ad2, une activité CAT plus élevée pour les plasmides délétés de la séquence "poison" (Tableau X).

Dans le cas de promoteur E2A tardif, les résultats sont remarquables. Guilfoyle *et al* (1985) avaient indiqué que la région E1A, et plus particulièrement le produit de l'ARNm 12S, inhibait le promoteur E2A tardif, tandis que Bhat *et al* (1987) montraient au contraire que E1A n'avait aucun effet sur l'expression de ce même promoteur.

Les résultats d'activité CAT sont conformes avec une non inductibilité du promoteur E2A tardif en présence de E1A ou d'aucun de ses produits de transcription. En effet, les valeurs de l'activité CAT en présence des produits de E1A sont approximativement les mêmes que celles obtenues pour l'activité de base du promoteur lorsque le plasmide possède encore sa séquence inhibitrice.

Par contre, la délétion de la séquence "poison" rend le promoteur inducible par E1A. Le rôle majeur de cette transactivation est joué par le produit de l'ARNm 13S. En outre, contrairement aux résultats de Guilfoyle *et al* (1985), le produit de l'ARNm 12S semble activer le promoteur E2A tardif, dans nos conditions expérimentales. Ceci nous rapproche des résultats obtenus par Leff et Chambon (1986) qui attribuaient au produit de l'ARNm 12S de la région E1A, un rôle activateur de la transcription.

En conclusion, on peut remarquer que cette séquence "poison", par son comportement, est homologue aux séquences dites "silencers" de transcription décrites par Brand *et al* (1985). Elle est en effet capable de diminuer l'expression de gènes à la fois en expression transitoire et pendant la transformation cellulaire.

III - LA PROTEINE pVIII DES DEUX SEROTYPES.

La faible taille relative de son génome oblige l'adénovirus à utiliser les deux brins de l'ADN pour la synthèse des protéines de régulation ou de structure.

L'analyse de l'organisation nucléotidique de notre promoteur illustre ce phénomène, car si sur le brin l on retrouve toutes les régions promotrices précoces associées à la DBP, le brin r complémentaire est codant, et est le lieu de la terminaison d'une protéine de 33 kDa et le début de la synthèse de la protéine pVIII intervenant comme protéine de structure de la capsid virale.

Il nous a semblé intéressant, en parallèle de nos études de régulations géniques, de reconstituer la protéine pVIII de l'Ad3 et de la comparer à celle de l'Ad2. Pour la protéine p33 en effet, seule la partie C-terminale nous était accessible.

La détermination de la séquence polypeptidique de la protéine a été rendue possible par fusion de la séquence que nous avons établie avec celle déterminée par Signäs *et al* (1986). Nous avons pu alors montrer que les deux protéines étaient similaires, tout au moins pour leurs régions N et C-terminales.

Le site de clivage qui génère la protéine mature VIII qui intervient dans la stabilisation de la capsid est inconnu chez l'Ad2. Le seul point établi est que la spécificité de coupure de cette protéase d'origine virale est M/LXGX G ou M/LXGG X.

La comparaison de séquence nous indique la conservation d'un site potentiel vers le 100ème résidu. Il est possible qu'il soit utilisé ici, si les protéines résultantes de ce clivage sont bien modifiées de manière post-traductionnelle, ce qui permettrait d'atteindre la masse moléculaire de 17,5 kDa apparente attendue pour la protéine VIII de l'Ad2.

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

Les études que nous avons menées ont permis de proposer un modèle concernant la nature des mécanismes impliqués dans le phénomène de dominance entre les sérotypes de l'adénovirus.

Les éléments que nous avons en notre possession portaient sur l'observation de l'inhibition de la région de contrôle E1A de l'adénovirus dominé (Ad2) par celle de l'adénovirus dominant (Ad3). Cependant, on avait pu noter que cette inhibition n'empêchait pas la stimulation cumulative par les régions E1A des deux sérotypes de la région E2A de l'Ad3. Cette unité de transcription génomique présente la particularité d'être responsable de la synthèse des protéines impliquées dans la réplication des adénovirus. Comme le phénomène de la transdominance est révélé par le blocage de la réplication de l'adénovirus du sérotype dominé, il était important d'étudier le mécanisme de cette inhibition.

Nous avons pu montrer que cette sélectivité de ciblage du promoteur E2A de l'Ad3 au détriment de celui de l'Ad2 était expliqué en partie par l'organisation nucléotidique particulière de ce promoteur E2AE de l'Ad3.

L'expression du promoteur dépend de la bonne coordination des différents éléments de régulation que sont la "TATA box" et toutes les séquences en amont ou en aval, cibles de facteurs de transcription spécifiques. Chez l'Ad2, ce sont les facteurs nucléaires E2F et ATF. On retrouve également un élément de séquence "enhancer", contrôlé chez l'Ad2 par deux séquences "silencers", d'où l'inductibilité du promoteur par la région E1A.

Chez l'Ad3, cette organisation est modifiée et semble être simplifiée au premier abord. Il ne reste plus qu'une seule séquence "TATA box-like" et le site de liaison du facteur ATF. De plus, l'élément de séquence "enhancer" est tronqué et les deux séquences "silencers" homologues à celles de l'Ad2 sont absentes. Ceci explique sans doute, la faible activité de base relative du P3E2AE-CAT. Cependant, en présence de la région E1A de l'Ad2 ou de l'Ad3, l'efficacité de stimulation est meilleure pour le P3E2AE-CAT au détriment du P2E2AE-CAT, et les compétitions inter-promoteurs montrent une préférence nette pour ce même promoteur.

L'absence de séquences "silencers" homologues à celles de l'Ad2 peut sans doute expliquer la meilleure efficacité de stimulation par les deux régions E1A, et les résultats obtenus en "gel retard" nous permettent d'avancer quelques précisions.

D'abord, que des captures de facteurs cellulaires sont impliqués dans ces processus. Des facteurs cellulaires communs au deux promoteurs, mais également des facteurs différents et spécifiques, ici, du P3E2AE. En effet, si certains résultats de compétition en expression transitoire nous ont montré l'implication de facteurs communs (compétition équimolaire), d'autres résultats ont permis la mise en évidence de facteurs supplémentaires, et même de séquences inhibitrices ou cibles de facteurs cellulaires de régulation négative chez le P3E2AE (mesure de l'effet seuil).

Toutes ces données nous permettent de comprendre comment il est possible de cibler préférentiellement une unité de transcription intervenant dans la régulation de l'expression des gènes clefs nécessaires à la réplication d'un virus au détriment d'un autre.

Pour permettre une transcription préférentielle des gènes codés par la région E2A de l'adénovirus de sérotype 3, il fallait que le promoteur E2AE soit plus sensible que celui de l'Ad2 à la régulation par la région E1A des deux sérotypes. Nos premiers résultats sont en accord avec cette hypothèse, mais il serait sans doute intéressant de les préciser sur quelques points. Par exemple, rechercher quels seraient les éléments de régulation spécifiques du P3E2AE qui sont révélés par nos expérience de gel retard. La détermination de l'empreinte à la DNase I des interactions ADN-protéines pourrait y répondre et même nous offrir, non seulement la possibilité de cibler de plus courtes régions de l'ADN viral, mais également d'envisager toutes les études de compétition avec des facteurs de transcription purifiés ou avec des oligonucléotides renfermant des séquences cibles particulières.

Enfin, la possibilité qui nous est offerte de travailler avec deux promoteurs équivalents du point de vue fonctionnel, mais divergents sur leur organisation nucléotidique respective, nous donne également l'opportunité de mieux déterminer l'importance de tel ou tel élément de régulation de la transcription. En effet, nous avons vu qu'il était essentiel pour une transcription efficace que le complexe de préinitiation, impliquant l'intervention des facteurs TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE et l'ARN polymérase II, soit bien stabilisé.

On s'accorde à affirmer l'importance des facteurs de transcription spécifiques de chaque promoteur dans ce processus de stabilité du complexe de préinitiation. Il serait donc très intéressant d'étudier les conséquences des organisations différentes des éléments de contrôle des deux promoteurs et de comparer l'efficacité de tel ou tel agencement moléculaire. Une bonne connaissance de ces éléments de contrôle pour le promoteur E2A de l'Ad3 devrait beaucoup nous y aider.

Dans la grande majorité des cas, jusqu'à présent, les sérotypes 2 ou 5 des adénovirus sont les seuls utilisés comme sondes pour modéliser les interactions cellules-virus ou pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de la régulation de l'expression des gènes eucaryotes. Notre travail offre donc l'intérêt d'enrichir ces modèles en mettant en évidence une plus grande diversité et complexité des régions de contrôle du génôme d'un sérotype à l'autre qu'il n'était prévisible.

L'étude du seul promoteur précoce E2A de l'Ad3 par rapport à celui de l'Ad2 indique déjà une différence majeure dans l'organisation nucléotidique des séquences indispensables à la transcription. On peut donc s'attendre à approcher

plus finement les mécanismes responsables des régulations coordonnées des gènes par l'étude des divers sérotypes de l'Adénovirus.

APPENDICE TECHNIQUE

I - TRANSFORMATION BACTERIENNE

1 - TRANSFORMATION D'E.Coli, SOUCHE HB101

HB101 est un hybride d'E.coli K 12, E.coli B utilisé pour la préparation des plasmides (amplification et purification). Son génotype est Pro, Leu, Thi, Lac y, ksd 20, end A, rec A, rps L 20, ora-14, Gal K 2, Xyl-5, mtl-1, sup E 44.

Les bactéries sont cultivées à 37°C sous agitation en milieu LB (extrait de levure DIFCO: 5g/l, peptone DIFCO: 10g/l, NaCl: 5g/l). Quand la D.O.₅₈₀ 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 0,1M. Le culot bactérien est repris dans CaCl₂ 0,1M et laissé 20 mn à +4°C, puis centrifugé une dernière fois (d'après Cohen *et al.*, 1972).

On s'attend à ce que 30 ml de culture bactérienne fournissent 0,7 ml de bactéries "compétentes" aliquotées par 0,1 ml. Chacun des aliquotes 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) pendant 5 mn. 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 (15g/l -DIFCO) renfermant l'antibiotique comme marqueur de résistance (Ampicilline à 50ug/ml). Les boîtes sont incubées 18 h. à 37°C et les clones résistants sont isolés.

2 - TRANSFORMATION D'E. Coli SOUCHE JM107 (phage M13)

Cette souche est un hybride E.coli K12, E.coli B de génotype A96, Thi, hsd R17, sup E44, rel A1, D(lac-pro AB), F', (tra D36, pro A⁺, pro B⁺, lac i^q, lac 2 DM15).

Le protocole de transformation est identique à celui précédemment décrit, jusqu'aux chocs thermiques. 40 µl d'une solution de Bluogal (20mg/ml-BRL) et 24 µl d'IPTG (24 mg/ml-BRL) sont ajoutés à chacun des 2 tubes contenant 3,5 ml de LB gélosé(7 g/l) à 56°C.

10 µl de bactéries compétentes sont alors ajoutées dans le premier tube et 90 µl dans l'autre. A chaque tube sont ensuite additionnés 100 à 200 µl de JM107 en phase exponentielle de croissance (D.O.₅₈₀ = 0,3). Le contenu des tubes est mélangé et coulé uniformément sur une boîte de pétri contenant du milieu LB gélosé. Après solidification du milieu, les boîtes sont incubées 18 h à 37°C.

3 - SELECTION DES CLONES

3-1- Méthode des "tailles"

Les bactéries sont lavées dans 500 µl de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH8) et centrifugées 10 mn à 6000 rpm, à +4°C. Le culot est suspendu dans 60 µl d'une solution TBE-saccharose 25% (Tris-HCl 89 mM, EDTA 2,5 mM, acide orthoborique H₃BO₃ 89 mM pH 8,3) contenant du lysozyme 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 % contenant du Bromure d'Ethidium (BrEt) à 8 µg/ml. A chaque échantillon sont additionnés 20 µl d'une solution de SDS à 1 %, Bleu de bromophénol (BBO) à 0,005 %, saccharose à 50 %. L'électrophorèse est effectuée à 90 V pendant 4 h (Echardt, 1979).

3-2- Méthode de dénaturation par la chaleur

Le culot de bactéries est resuspendu dans 700 µl de tampon STET (Saccharose 8 %, Triton X100 à 5 %, EDTA 50 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8), puis traité par 40 µl d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml, 40 sec à 100°C. Après centrifugation à 10.000 rpm, 15 mn, l'ADN en solution dans le surnageant est précipité par 1 volume 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.

II - 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'Ampicilline et incubé à 37°C sous agitation pendant 18 h. Les bactéries sont centrifugées 10 min à 4000 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 10mg/ml dans le tampon Tris-HCl 50mM pH8, puis, après 10 min, 1 ml d'EDTA 0,2M pH8. Au bout de 10 mn, la lyse est complétée par addition de 4,5ml d'une solution de Tris-HCl 50mM pH8, EDTA 20mM, Triton X100 0,1%. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 35 000 rpm pendant 30 mn à +4°C dans un rotor SW41 Beckman. 8,6 ml de surnageant sont mélangés avec 8,6 g de CsCl et 86 µl de BrEt (Bromure d'Ethidium) à 5 mg/ml. La centrifugation 20 h à 16°C à 55 000 rpm en TFT65 Kontron permet d'obtenir la bande d'ADN plasmidique visualisée par le BrEt.

La bande d'ADN ponctionnée à travers le tube est extraite 2 à 3 fois par l'isopropanol (v:v) pour éliminer le BrEt. Les plasmides sont alors dialysés contre Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH8. La mesure de la D.O. à 260 nm

permet une évaluation de la concentration en ADN ($D.O_{260} = 0,21 \rightarrow 10 \mu\text{g/ml}$ d'ADN).

III - CULTURE CELLULAIRE

1 - LIGNEES CONTINUES

Les cellules HeLa, IC4, HEK-293 sont cultivées dans des flacons (FALCON de 175 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, irradié.

Les cellules sont décollées au versène ou versène-trypsine (EDTA 3mM, NaCl 137mM, Na₂HPO₄·2H₂O 16 mM, KCl 2,7 mM-trypsine 1mg/ml) et réparties dans des boîtes de Pétri (FALCON de 60 mm de diamètre) à raison de 5×10^6 cellules par boîte, dans un volume de 5 ml du milieu initial.

2 - CELLULES EN SUSPENSION

Les cellules KB3 et HEK-293 sont maintenues en suspension dans des flacons "spinners" avec du milieu MEM modifié par Joklik (F13-Flow) et contenant 5% de sérum de cheval décomplémenté pour les KB3 et 5% de sérum de veau nouveau-né et irradié pour les HEK-293.

IV - TRANSFECTION DES PLASMIDES DANS LES CELLULES HeLa, IC4 et HEK293

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 mélangé avec 250 μl d'HBS x 2 (NaCl 0,28M, Hepes 50mM et 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. Les cellules sont laissées 40 h à 37°C dans l'étuve à CO₂ avec changement du milieu après 5 h pour les HEK-293, ou après 16 h pour les IC4 et les HeLa.

V - DOSAGE DE L'ACTIVITE CHLORAMPHENICOL ACETYL TRANSFERASE

Quarante heures après transfection, les cellules sont décollées au versène (HeLa et HEK-293) ou au versène trypsine (IC4), lavées dans du sérum physiologique et centrifugées 10 mn à 2000 rpm. Le culot est resuspendu dans 100 μl de Tris HCl 0,25M pH 7,7 et les cellules sont lysées par traitement aux

ultrasons. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 10 mn à 12000 rpm en centrifugeuse "Eppendorf".

Environ 20 µl de surnageant (dont la concentration relative est estimée par D.O. à 280 nm) sont incubés une heure à 37°C avec 70 µl de Tris-HCl 0,25M pH7,8; 20 µl d'acétyl coenzyme A 4mM, 0,5 µl de ¹⁴C-dichloroacétyl 1,2 chloramphénicol à 0,05 mCi/0,5 ml (NEN) et 35 µl d'H₂O. La réaction est arrêtée par addition de 0,8 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange homogénéisé est centrifugé 5 mn à 12000 rpm en centrifugeuse "Eppendorf". La phase organique prélevée est séchée sous vide.

Le culot est resuspendu dans 15 µl d'acétate d'éthyle et chromatographié sur couche mince de gel de silice (20 x 20 cm- polygramm). La concentration du dépôt est réalisée par migration dans l'acétone 3 mn et la séparation des formes acétylées des formes non acétylées du substrat initial est réalisée par migration pendant 45 mn en tampon chloroforme/méthanol (95/5).

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

VI - OBTENTION DES PARTICULES VIRALES

Les adénovirus de sérotype 2 et 3 sont obtenus après multiplication dans des cellules KB3 en suspension. Les cellules ($4,5 \times 10^5$ par ml) sont centrifugées à 2000 rpm pendant 10 mn à 30°C. Le culot est repris dans du milieu F13 sans sérum. Les cellules sont infectées à raison de 10 à 20 particules virales par cellule. Après 1 h d'adsorption virale à 37°C sous agitation, la suspension cellulaire est diluée 20 fois dans du milieu F13 contenant 2% de sérum de veau.

Après 40 h à 37°C (durée du cycle viral), les cellules infectées sont centrifugées à 2000 rpm 10 mn à +4°C. Le culot est repris dans une solution de Tris hypotonique (Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM pH 8,1). Après 3 congélations et décongélations (-70°C/+37°C), on additionne 1 volume de fréon 113 et la suspension est homogénéisée 3 mn à l'Ultra-Turrax. Les débris cellulaires sont éliminés après centrifugation 25 mn à 2000 rpm à +4°C. La phase aqueuse est reprise, déposée sur un coussin de CsCl de densité 1,43 et centrifugée 1 h à 20 000 rpm à +4°C en rotor SW27 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 16 h à 35 000 rpm à +4°C en TST60 Kontron. Les particules sont récoltées dans du glycérol (v/v) et titrées avec un immunsérum anti-adénovirus selon la technique du nombre de foyers fluorescents (Thiel et Smith, 1967).

VII - OBTENTION D'ADN VIRAL

Les virus sont dialysés contre du Tris hypotonique 2 h pour éliminer le glycérol. La solution subit ensuite un traitement à la protéinase K (100 µg/ml) et au sarcosinate de sodium 0,5 % 2 à 3 h à 37°C. Après obtention d'une solution limpide et visqueuse, on équilibre en CsCl (2,545 g/2 ml de solution). On centrifuge 41 h à 44 000 rpm en TST60 Kontron à 16°C. La récupération de l'ADN se fait par ponction à travers le tube de polyallomère. Après dialyse, l'ADN est repris en solution Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH8,1.

VIII - HYBRIDATION

1 - TRANSFERT D'ADN SUR MEMBRANE (SOUTHERN BLOT)

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

La membrane subit ensuite une préhybridation de 4h à 42°C dans la solution d'hybridation: SSC 5X, Tampon Denhardt 5X (Ficoll 400 à 0,1%; Polyvinylpyrrolidone, PVP, 0,1% et sérum albumine bovine 0,1%) tampon phosphate monosodique et dibasique 0,02 M pH 6,7, ADN "carrier" 100 µg/ml, formamide 50 %. L'hybridation se fait dans cette même solution à laquelle est ajoutée une sonde préalablement dénaturée thermiquement et marquée au (α -³²P)dCTP (3000 Ci/mMol) par la technique d'amorce aléatoire. Après 20 h à 42°C, la membrane est lavée en SSC 2 X, 0,1 % SDS, lavée 2 fois 30 mn avec SSC 6X, SDS 0,1% à 65°C et une fois 15 mn avec SSC 2X, SDS 0,1% à 65°C. La membrane est mise en impression et le film révélé après 48 à 72 h. .

2 - PREPARATION DE LA SONDE PAR "RANDOM PRIMER"

Le fragment de restriction est marqué sans extraction de l'agarose à bas point de fusion grâce aux propriétés de l'enzyme ADN polymérase I fragment de Klenow. Le fragment d'ADN est prélevé avec la fenêtre d'agarose et transféré en Eppendorf de 1,5 ml. De l'eau est ajoutée dans un rapport de 3 ml/g de gel et le tube est placé à 100°C pendant 7 mn pour faire fondre le gel et dénaturer l'ADN.

Le mélange ADN/agarose contenant 25 ng d'ADN est ajouté à la réaction décrite dans le protocole "Random Primed DNA labeling kit" de Boehringer (Cat N° 1004760).

IX - PROTECTION CONTRE L'ACTION DE LA RNASE

Les plasmides sont transfectés dans les cellules HeLa, HEK-293 et IC4 et les ARN extraits 40 h après transfection par la méthode au chlorure de guanidium décrite par Glisin *et al.*, (1977) revue par Chirgwin *et al.* (1979).

Les sondes de haute activité spécifique sont préparées par clonage de la séquence en aval du promoteur du bactériophage SP6. Le plasmide est clivé par un enzyme de restriction et l'ADN plasmidique est transcrit par l'ARN polymérase SP6 en présence d'UTP α ^{32}P , d'UTP non radioactif, et des trois autres ribonucléotides. 5.10^5 cpm de sonde ARN (ARN*) sont hybridés aux ARN totaux dans un tampon Formamide 80%, PIPES 10 mM pH6.4, NaCl 0.4 mM et EDTA 1 mM.

Les hybrides ARN*-ARNm sont placés dans le tampon Tris-HCl 10 mM pH7,6, EDTA 5 mM et NaCl 500 mM, contenant 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ribonucléase A et 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ribonucléase T1. Après incubation 1h à 30°C, 20 μl de SDS à 10 % et 5 μl de protéinase K à 10 mg/ml sont ajoutés.

Une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) est alors effectuée, puis une précipitation à l'éthanol. Après centrifugation à 12 000 rpm 15 mn, le culot est repris dans 20 μl d'eau, 20 μl de BBO/XC/formamide/EDTA (0.1%/0.1%/80%/1 mM) et les échantillons sont analysés sur gel d'acrylamide à 8%, en milieu dénaturant (Urée 7 M).

X - SEQUENCAGE DE L'ADN PAR LA METHODE DE SANGER

A) PRINCIPE

Les 2'-3' didéoxynucléosides triphosphates (ddNTP) inhibent l'activité de l'ADN polymérase I quand ils sont incorporés dans la chaîne déoxyribonucléique néo-synthétisée à la place des dNTP. En effet, la chaîne ne peut s'allonger dès l'incorporation du ddNTP correspondant, car ce nucléotide triphosphate ne possède pas de fonction hydroxyle en 3'. Dans ces conditions, la synthèse peut se terminer chaque fois qu'un dN devrait être ajouté.

Si on incube une matrice ADN simple brin, une amorce oligonucléotidique en présence de l'ADN polymérase I et d'un mélange de ddATP et de dATP avec les trois autres dXTP, par exemple (dont l'un, le dCTP, est marqué au ^{32}P), des fragments ayant tous des extrémités 5' communes, mais des extrémités 3' variables et terminées par des résidus ddA seront obtenus.

Quand ces molécules de tailles différentes sont déposées sur gel d'acrylamide dénaturant la répartition des bandes repérées après autoradiographie montre la distribution des dA dans le brin synthétisé.

L'utilisation de ce même principe en changeant de ddNTP au cours d'incubations séparées, et la migration en gel de polyacrylamide en parallèle, permet de lire directement la séquence complémentaire de celle de la molécule matrice, en commençant la lecture par le bas du gel.

Le plus délicat est l'obtention de matrices simple-brin à partir de l'ADN double brin. Trois méthodes ont été utilisées et sont décrites dans les paragraphes suivants.

B) SEQUENCAGE A PARTIR DE MATRICES SIMPLE BRIN

1) Méthode "classique"

Cette méthode est choisie pour obtenir la séquence des 150 premiers nucléotides de l'insert

a) Solutions stocks et tampons

- TBE 10 X pour les gels: Tris-HCl (162 g), Acide borique (27,2 g), EDTA (9,5 g), H₂O q.s.p. 1 l.
- Solution mère d'acrylamide: acrylamide (38 g), bis-acrylamide (2 g), H₂O q.s.p. 100 ml.
- Persulfate d'ammonium à 10 %.
- TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine).
- Tampon d'hybridation 10 X pour la réaction de terminaison des chaines: Tris 100 mM, MgCl₂ 100 mM pH 7,8.
- Tampon de mélange des dNTPs: Tris 50 mM pH 8, EDTA 1 mM.
- Solutions de ddNTPS
 - Solutions stocks: 10 mM
 - Solutions de travail: ddATP 0,1 mM
 - : ddCTP 0,09 mM
 - : ddGTP 0,5 mM
 - : ddTTP 0,9 mM
- Solutions de dNTPs
 - Solutions stocks: 20 mM
 - Solution de travail 0,5 mM
- Mélange dNTPs:

	dTTP	dATP	dGTP	dCTP
0,5 mM dATP	1 µl	20 µl	20 µl	20 µl
0,5 mM dATP	20 µl	1 µl	20 µl	20 µl
0,5 mM dGTP	20 µl	20 µl	1 µl	20 µl
Tampon TE 1X	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

- Solutions de travail dNTPs + ddNTP1: mélange à volume égal de ddNTPs et des mélanges dNTPs décrits précédemment

- Colorants: 100 ml de formamide désionisée (par passage sur amberlite MB) contenant 0,03 g de BB Φ et 0,03 g de xylène cyanol FF(XCFF).
- α ^{32}P dCTP: activité spécifique 3000 Ci/mMole.
- Gel d'acrylamide: urée 7 M, acrylamide 8%. 10 ml de solution mère d'acrylamide, 21 g d'urée, 5 ml de TBE 10 X, 250 μl de persulfate 10% et 50 μl de TEMED.

b) Obtention des matrices simples brins

La première étape nécessite l'obtention de plages de lyse par transfection sur JM107 des formes répliquatives du phage M13mp18 ou mp19 contenant l'insert à séquencer (voir transfection sur JM107). 300 μl de bactéries JM107 en phase exponentielle sont placées dans 30 ml de milieu LB (dilution 1/100). Une plage de lyse est placée dans 2 ml de cette solution et on incube à 37°C sous agitation 6 h.

La solution est centrifugée 10 mn à 4500 rpm en rotor A6-14 de Kontron. Le surnageant transféré dans un microtube eppendorf est additionné de 300 μl de PEG 25 %/ NaCl 5 M, laissé 15 mn à température ambiante et enfin centrifugé 5 mn à 1000 rpm. Après élimination du PEG, l'ADN est repris dans 100 μl de Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 7,5. Une extraction au phénol saturé est alors effectuée. L'ADN simple brin est alors précipité par 2,5 volumes d'éthanol (EtOH) contenant de l'acétate de sodium 0,16 M (Aco- Na^+).

c) Hybridation

L'ADN est repris dans 50 μl d' H_2O . A 7 μl , sont ajoutés 1 μl d'amorce (0,5 pmole/ μl), 2 μl de tampon d'hybridation et 1 μl d' H_2O . Le mélange est placé dans un bain-marie à +70°C et la température est ramenée à 30°C après 6 h.

d) Séquençage

2 μl de la solution d'hybridation sont répartis dans chaque tube A, G, C, T contenant le mélange ddNTP et dNTP. 1 U de ADN polymérase type I fragment de Klenow "sequencing grade" (Boehringer) et 0,5 μl de solution de α ^{32}P dCTP sont ajoutés. La réaction est laissée à 37°C, 10 mn, et 1 μl de solution de chasse est ajouté (les 4 dNTP à 0,25 mM chaque).

Après 10 mn, 5 μl de solution de colorants sont ajoutés. Après ébullition 3 mn, 2 μl d'échantillons sont déposés par puits dans le gel d'acrylamide à 8 %.

Après migration 1 nuit à 250 V, les gels sont plongés dans l'acide acétique à 10 % afin d'éliminer l'urée. Les gels sont rincés, séchés sous vide et mis en impression.

2) Méthode longue

Elle est choisie pour obtenir la séquence au delà de 50 à 100 pb par rapport à l'amorce.

a) Solutions stocks et tampons

- Tampon de séquençage (5X): Tris-HCl 200 mM pH 7,5 , MgCl₂ 50 mM, NaCl 250 mM.

- Tampon d'extension de la matrice: dATP 7,5 uM, dGTP 7,5 uM, dTTP 7,5 uM , à diluer au 1/5 avant l'emploi.

- Tampon de terminaison de chaines.

	A	C	G	T
ddATP	300 μ M			
ddGTP			150 μ M	
ddCTP		100 μ M		
ddTTP				500 μ M
dATP	25 μ M	250 μ M	250 μ M	250 μ M
dGTP	250 μ M	250 μ M	25 μ M	250 μ M
dCTP	250 μ M	25 μ M	250 μ M	250 μ M
dTTP	250 μ M	250 μ M	250 μ M	25 μ M

- Formamide-colorants: formamide 95 %, Na₂EDTA 20 mM, 0,05 % (w/v) de BB Φ , 0,05 % (w/v) de XCFF.

- Les autres solutions sont les mêmes que pour la méthode classique.

b) Obtention de matrices simples brins et hybridation

La méthode utilisée ici est la même que celle décrite dans la méthode classique, précédemment décrite.

c) Séquençage

10 μ l de solution d'hybridation sont ajoutés à 2 μ l de tampon d'extension de la matrice 5X, 0,5 μ l d' α ³²P dCTP, 1 μ l de DTT 0,1 M, 2U de l'ADN polymérase de type I fragment de Klenow et q.s.p. 16 μ l en H₂O. L'ensemble est incubé 5 mn à température de la pièce.

3,5 μ l de la solution précédente sont transférés dans chacun des tubes A, G, C, T renfermant les mélanges de terminaison de chaines.

Après incubation 5 mn à 37°C, la réaction est arrêtée par 4 µl de mélange "formamide-colorants". Après avoir chauffé 3 mn à 80°C, 2 µl sont déposés par puits dans le gel de séquence.

C) SEQUENCAGE A PARTIR DE MATRICES DOUBLE BRINS

Cette méthode est utilisée pour résoudre le problème rencontré par les structures secondaires de la matrice et nécessite la transcriptase inverse.

1) Solutions stocks et tampons

- Tampon TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM
- Tampon d'hybridation 5X: Tris-HCl 0,3 M pH 8,3, NaCl 0,375 M, MgCl₂ 37,5 mM et DTT 2,5 mM
- Les solutions mères de nucléotides sont ajustées à pH 7,8:
ddNTP 5 mM, dNTP 10 mM
- Solutions de ddNTP et dNTP: ddNTP 200 µM, dATP 100 µM, dCTP 2 mM, dGTP 2 mM, dTTP 2 mM

	A	G	C	T
ddATP	126 µM			
ddCTP			1,26 µM	
ddGTP		12,6 µM		
ddTTP				12,6 µM
dATP	60 µM	250 µM	250 µM	250 µM
dCTP	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM
dTTP	250 µM	250 µM	60 µM	250 µM
dGTP	250 µM	250 µM	250 µM	60 µM

- la solution de classe renferme les quatre dNTP à 0,25 mM chaque.
- la solution d'arrêt est de la formamide désionisée contenant EDTA 10 mM pH 8, XC FF 0,3%, BBΦ 0,3%.

2) Préparation de l'ADN plasmidique

1,5 µg d'ADN sont placés dans 8 µl d'H₂O, 2 µl de NaOH 2M et la réaction est laissée 5 mn à température ambiante.

7 µl d'amorce (2 uMol/ul), 3 µl de CH₃COO·Na⁺ 3 M pH 4,5 et 75 µl d'EtOH 100 % sont ajoutés. L'ADN est laissé 20 mn dans la carboglace + EtOH

Après centrifugation 15 mn à +4°C à 12000 rpm en centrifugeuse "Eppendorf", le culot est rincé avec 200 µl d'EtOH 70 %; une seconde

centrifugation 5 mn à température ambiante est effectuée et le culot est séché sous vide. L'ADN est repris dans 11 µl d'H₂O.

3) Séquençage

Les mélanges ddNTP/dNTP sont aliquotés dans les quatre tubes A, G, C, T, et un pré-mélange est préparé contenant par essai: 4 µl de tampon transcriptase reverse 5 X, 4 µl de γ -³²PdCTP, 0,4 µl DTT 50 mM, 1,6 µl d'H₂O et 20 U de transcriptase inverse.

Les 11 µl d'ADN sont placés dans 9 µl de pré mélange et les 4 µl du mélange obtenu sont ajoutés dans chaque tube A, G, C, T

Après 10 mn à 43°C, 1,5 µl de solution de chasse sont ajoutés. Après 8 mn à 43°C, 4 µl de tampon d'arrêt sont ajoutés.

Après 3 mn à 100°C et choc thermique dans la glace, 2 µl d'échantillons sont déposés par puits dans le gel de séquence.

XI - PREPARATION D'EXTRAITS NUCLEAIRES

La méthode utilisée et celle adaptée de Dynam *et al.* (1983) et revue par Lee *et al.* (1988)

- A partir d'un flacon de culture en suspension ou en monocouche (175 cm²) d'HEK 293, les cellules sont lavées en sérum physiologique et rassemblées par centrifugation 20 mn à 1200 rpm. Elles sont suspendues dans le tampon HEPES 10 mM pH 7,9, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, DTT 0,5 mM (Dynam *et al.*, 1983) et laissées dans la glace 15 mn

- La lyse des cellules est effectuée par passage dans une seringue de 1 ml (aiguille 25 GX 5/8") en évitant les bulles d'air. Cinq passages sont suffisants pour lyser 80 % des cellules (vérification par microscope photonique).

- Centrifugation 20 sec en microtube eppendorf à 12000 rpm afin de séparer les noyaux du surnageant péri-nucléaire.

- Les noyaux sont resuspendus 30 mn à +4°C sous agitation dans 2/3 du volume cellulaire en tampon HEPES 20 mM pH 7,9, glycérol 25% (v/v), NaCl 0,42 M, MgCl₂ 0,03 M, EDTA 0,2 mM, phenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) 0,2 mM, DTT 0,5 mM (Digman *et al.*, 1983).

- Les débris nucléaires sont rassemblés par centrifugation 5 mn à 12 000 rpm et le surnageant est dialysé contre le tampon HEPES 20 mM pH 7,9, glycérol 20% (v/v), KCl 0,1M, EDTA 0,2mM, PMSF 0,5mM pendant 2 h (conservation à -70°C ou en N₂ liquide).

- Lee *et al.* suggèrent qu'approximativement 10 boîtes de pétri (100 mm de diamètre) de cellules à 80° % de confluence conduisent à l'obtention de 5 à 8 mg/ml de protéines d'extraits nucléaires. (Détermination par la méthode de Bradford, 1976).

XII - ADN RETARDE EN GEL D'ACRYLAMIDE

Deux méthodes ont été utilisées pour cette technique.

La première, est décrite par SivaRaman *et al.* (1985).

De 5000 à 10000 cpm de fragments de restriction rendus radioactifs par double marquage au α - ^{32}P dATP et au α - ^{32}P dCTP aux extrémités 3' (approximativement 0,5 à 2 ng) sont placés dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 60 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, Glycérol 5 % (v/v) contenant 10 à 15 μg de protéines issues d'extraits nucléaires totaux. Le volume final réactionnel est de 25 μl et l'incubation est réalisée 30 mn à 30°.

La seconde méthode est tirée de Carthew *et al.* (1985).

A 10000 cpm de sonde, sont ajoutés 2 à 4 μg de poly (dI-dC) - poly (dI-dC), 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final de sérumbulbine bovine, 1 μl de glycérol 100% et 10 μg d'extraits protéiques. Le volume final est de 15 μl . Ce milieu d'incubation est laissé 20 min à 30°C.

Dans ces deux méthodes, les conditions de migration électrophorétiques sont les suivantes:

1) Préparation du gel

Dans une éprouvette de 50 ml sont placés 270 μl de Tris-HCl 1M pH 7,9; 80 μl d'EDTA 0,5 M pH 7,8; 5,33 ml d'acrylamide 30%; 1 ml de bis-acrylamide 2%; 1 ml de glycérol; q.s.p. 40 ml en H_2O .

Après filtration au travers d'un filtre de 0,2 μm , le gel est polymérisé par addition de 34 μl de Temed et 300 μl de persulfate d'ammonium à 10%.

2) Tampon de migration

La pré-électrophorèse (2 h à 150 V) et la migration (3 h à 250 V) sont réalisées dans un tampon TAE 1X (Tris-HCl 6,7 mM pH 7,5, Aco- Na^+ 3,3 mM et EDTA 1 mM)

Les gels sont séchés sous vide et mis en autoradiographie.

XIII - OBTENTION DE CARTES DE RESTRICTION

1 - Enzymes de restriction

Les enzymes BglII, HindIII, XhoI, ApaI, SmaI, PstI et EcoRI sont fournis par la société Boehringer et sont utilisés à raison d'une unité d'endonucléase par μg d'ADN plasmidique.

2 - Electrophorèse en gel d'agarose

Le gel, contenant 0,8% à 1,5% d'agarose et du BrEt à 0,5 mg/ml, est placé dans un tampon TBE (Tris-HCl 89 mM, acide orthoborique 89 mM, EDTA 2 mM pH8). Après 4h de migration à 80V, le gel est placé sous lumière ultraviolette afin de visualiser les bandes d'ADN (longueur d'onde à 312 nm) et photographié par un appareil de type polaroid (film 667 "professionnel").

3 - Electrophorèse en gel d'acrylamide

Le gel de résolution est un gel à 8%, polymérisé dans un tampon TBE pH8, dont le rapport acrylamide/bis-acrylamide est 29/1.

4 - Construction de la carte de restriction

La stratégie utilisée ici est la suivante:

1µg d'ADN d'adénovirus était digéré par:

a) un enzyme de restriction X dont la carte de restriction était connue

b) un enzyme Y dont on voulait déterminer l'emplacement des sites de restriction

c) les enzymes X et Y simultanément.

Les enzymes X ont été choisis parmi les suivants: BglII, SmaI, HindIII, et EcoRI. Après électrophorèse en gel d'agarose, les fragments de restriction sont comparés avec des fragments de référence. La vérification et le prélèvement des fragments utilisés lors des étapes de clonage ont été réalisés sur gel d'acrylamide.

BIBLIOGRAPHIE

ADRIAN, T., WIGAND, R., and HIERHOLZER, J.C. 1985. Immunological and biochemical characterization of human adenovirus from subgenus B. II. DNA restriction analysis. *Arch. Virol.*, 84, 79-89

AKUSJARVI, G., PETTERSSON, U., and ROBERTS, R.J. 1986. Structure and function of the adenovirus-2 genome. *Adenovirus DNA. The viral genome and its expression*, 53-97, ed. par W. Doerfler, Martinus Hijhall publishing

ALESTROM, P., AKUSJARVI, G., PERRICAUDET, M., MATTHEWS, M.B., KLESSIG, D.F., and PETTERSSON, U. 1980. The gene for polypeptide IX of adenovirus type 2 and its unspliced messenger RNA. *Cell*, 19, 671-681

ALLAN, M., ZHU, J., MONTAGUE, P., and PAUL, J. 1984. Differential response of multiple Σ - globin cap sites to cis- and trans- acting controls. *Cell*, 38, 399-407

ANDERSON, C.W. 1981. Spontaneous mutants of the adenovirus simian virus 40 hybrid. Ad2+ND3 that grow efficiently in monkey cells. *Virology*, 111, 263-269

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, 371-379

BABISS, L.E., and GINSBERG, H.S. 1984. Adenovirus type 5 early region 1B gene product is required for efficient shut off of host protein synthesis. *J. Virol.*, 50, 202-219

BABISS, L.E. 1989. The cellular transcription factor E2F requires viral E1A and E4 gene products for increased DNA-binding activity and fuctions to stimulate adenovirus E2A gene expression. *J. Virol.*, 63, 2709-2717

BABU, S.R., LOEKEN, M.R. 1989. Activation of promoters containing ATF/CREB binding sites are differentially regulated by c-AMP, E1A, and SV40 small t in different CV-1 cells. *The Imp. Cancer Res. Fund Tumor Virus Meeting on SV40, Polyoma and Adenovirus. Cambridge (England)*

BAGCHI, P., RAYCHAUDHURI, P. and NEVINS, J.R. 1989. Phosphorylation-dependent activation of the adenovirus inducible E2F transcription factor in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86, 43582-43586

BAKER, C.C., HERISSE, J.E., COURTOIS, G., GALIBERT, F., and ZIFF, E. 1979. Messenger RNA for the Ad2 DNA Binding Protein: DNA sequences encoding the first leader and heterogeneity at the mRNA 5' end. *Cell*, 18, 569-580

BAKER, C.C., and ZIFF, E.B. 1980. Biogenesis, structure and sites encoding the 5' termini of adenovirus 2 mRNAs. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 44, 415-428

BAKER, C.C., and ZIFF, E.B. 1981. Promoters and heterogeneous 5' termini of the messenger RNAs of adenovirus serotype 2. *J. Mol. Biol.*, 149, 189-221

BALBAS, P., SOBERON, X., MERINO, E., ZURITA, M., LOMELI, H., VALLE, F., FLORES, N., and BOLIVAR, F. 1986. Plasmid vector pBR 322 and its special purpose derivatives - a review. *Gene*, 50, 3-40

BANERJI, J., RUSCONI, S., and SCHAFFNER, W. 1981. Expression of a α -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, 27, 299-308

BARETT, P., CLARK, L., and HAY, R.T. 1987. A cellular protein binds to a conserved sequence in the adenovirus type 2 enhancer. *Nucl. Acid. Res.*, 15, 2719-2735

BENOIST, C., O'HARE, K., BREATHNACH, R., and CHAMBON, P. 1980. The ovalbumine gene: sequence of putative control regions. *Nucl. Acid. Res.*, 8, 127-142

BENOIST, C., and CHAMBON, P. 1981. In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature*, 290, 304-310

BERK, A.J., and SHARP, P.A. 1978. Structure of adenovirus 2 early mRNAs. *Cell*, 14, 695-711

BERK, A.J., LEE, F., HARRISSON, T., WILLIAMS, J., and SHARP, P.A. 1979. Pre-early adenovirus 5 gene products regulate transcription and processing of early viral messenger RNAs. *Cell*, 17, 923-934

BERNARDS, R., and van der EB, A.J. 1984. Adenovirus: transformation and oncogenicity. *Biochem. Biophys. Acta.*, 783, 187-204

BHAT, G., SIVARAMAN, L., MURTHY, S., DOMER, P., and THIMMAPAYA, B. 1987. In vivo identification of multiple promoter domains of adenovirus E2A late promoter. *EMBO J.*, 6, 2045-2052

BLANTON, R.A., and CARTER, T.H. 1979. Autoregulation of adenovirus type 5 early gene expression. III. Transcription studies in isolated nuclei. *J. Virol.*, 29, 458-465

BOEUF, H., ZAJCHOWSKI, D.A., TAMURA, T., HAUSS, C., and KEDINGER, C. 1987. Specific cellular proteins bind to critical promoter sequences of the adenovirus early E2A promoter. *Nucl. Acid. Res.*, 15, 509-529

BORRELLI, E., HEN, R., and CHAMBON, P. 1984. Adenovirus 2 E1A products repress enhancer-induced stimulation of transcription. *Nature*, 312, 608-612

BOS, J.L., and TEN WOLDE-KRAAMWINKEL, H.C. 1983. The E1B promoter of Ad12 in mouse L tk- cells is activated by adenovirus region E1A. *EMBO J.*, 2, 73-76.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254

BRAND, A.H., BREEDEN, L., ABRAHAM, J., STERNGLANZ, R., and NASMYTH, K. Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell*, 41, 41-48

BRANTON, P.E., BAYLEY, S.T., and GRAHAM, F.L. 1985. Transformation by human adenovirus. *Biochem. Biophys. Acta*, 780, 67-94

BRIGGS, M.R., KADONAGA, J.T., BELL, S.P., and TJIAN, R. 1986. Purification and biochemical characterizations of the promoter-specific transcription factor Sp1. *Science*, 234, 47-52

BROKER, T.R., KELLER, C., and ROBERTS, R.J. 1984. Human adenoviruses serotypes 2, 4, 8, 40 and 41 and adenovirus-simian virus 40 hybrids. Genetics maps. p 99, ed. par S.J. O' BRIEN, Cold Spring Harbor Laboratory.

BURTON, Z.F., ORTOLAN, L.G., and GREENBLATT, J. 1986. Proteins that bind to RNA polymerase II are required for accurate initiation of transcription at the adenovirus 2 major late promoter. *EMBO J.*, 5, 2923-2930

CARCAMO, J., LOBOS, S., MERINO, A., BUCKBINDER, L., WEINMANN, R., NATARAJAN, V., and REINBERG, D. 1989. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of factors IID and MLTF in transcription from the adenovirus major late and IVa2 promoters. *J. Biol. Chem.*, 264, 77304-77314

CARLOCK, L.R., and JONES, N.C. 1981. Transformation-defective mutant of adenovirus type 5 containing a single altered E1A mRNA species. *J. Virol.*, 40, 657-664

CARTER, T.H., and BLANTON, R.A. 1978a. Possible role of the 72 kDa DNA binding protein in regulation of adenovirus type 5 early gene expression. *J. Virol.*, 25, 664-674

CARTER, T.H., and BLANTON, R.A. 1978b. Auto-regulation of adenovirus type 5 early gene expression. II. Effect of temperature-sensitive early gene mutations on virus accumulation. *J. Virol.*, 28, 450-456

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, 439-446

CESARENI, G., MUESING, M.A., and POLINSKY, B. 1982. Control of ColE1 DNA replication: the rop gene product negatively affects transcription from the replication primer promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 79, 6313-6317

CHARDONNET, Y., and DALES, S. 1970. Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intercellular release of the DNA genome. *Virology*, 40, 462-477

CHATTERJEE, P.K., BRUNER, M., FLINT, S.J., and HARTER, M.L. 1988. DNA binding properties of an 289R E1A protein. *EMBO J.*, 7, 835-841

CHEN, I.S.Y., CANN, A.J., SHAH, N.P., and GAYNOR, R.B. 1985. Functional relation between HTLV-II x and adenovirus E1A proteins in transcriptional activation. *Science*, 230, 570-573

CHIRGWIN, J.J., PRZBYLA, A.E., Mac DONALD, R.J., and RUTTER, W.J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18, 5294-5296

CHODOSH, L.A., CARTHEW, R.W., and SHARP, P.A. 1986. A single polypeptide possesses the binding and transcription activities of the adenovirus major late transcription unit. *Mol. Cell. Biol.*, 6, 4723-4733

CHODOSH, A.L., CARTHEW, R.W., MORGAN, J.G., CRABTREE, G.R., and SHARP, P.A. 1987. The adenovirus major late transcription activates the rat α -fibrinogen promoter. *Science*, 238, 684-688

CHODOSH, A.L., BALDWIN, A.S., CARTHEW, R.W., and SHARP, P.A. 1988. Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits. *Cell*, 53, 11-24

CHOW, L.T., GELINAS, R.E., BROKER, T.R., and ROBERTS, R.J. 1977. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus messenger RNA. *Cell*, 12, 1-8

CHOW, L.T., and BROKER, T.R. 1978. The spliced structures of adenovirus 2 messenger and the other late mRNAs. *Cell*, 15, 497-510

CHOW, L.T., BROKER, T.R., and LEWIS, J.B. 1979. Complex splicing patterns of the early regions of adenovirus 2. *J. Mol. Biol.*, 134, 265-303

CLEGHON, V.G., and KLESSIG, D.F. 1986. Association of the adenovirus DNA binding protein with RNA both in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 83, 8947-8951

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, 2110-2115

COMB, M., BIRNBERG, N.C., SEASHOTZ, A., HERBERT, E., and GOODMAN, H.M. 1986. A cyclic AMP and phorbol ester inducible DNA element. *Nature*, 323, 353-356

DELSERT, C., and D'HALLUIN, J.C. 1984. Genetic expression of human adenoviruses in simian cells: evidence for interserotypic inhibition of viral DNA synthesis. *Virus Res.*, 1, 365-380

DELSERT, C. 1985. Permissivité et hiérarchie de transdominance intersérotypique dans le système adenovirus humain-cellules simiennes. *Thèse, Université de Lille I*.

DEPPERT, W., WALSER, A., and KLOCKMAN, U. 1988. A subclass of the adenovirus 72K DNA binding protein specifically associating with the cytoskeletal framework of the plasma membrane. *Virology*, 165, 457-468

DERY, C.V., HERRMANN, C.H., and MATHEWS, M.B. 1987. Response of individual adenovirus promoters to the products of the E1A gene. *Oncogene*, 2, 15-23

DEVAUX, B., ALBRECHT, G., and KEDINGER, C. 1987. Identical genomic footprints of the adenovirus E2A promoter are detected before and after E1A induction. *Mol. Cell. Biol.*, 7, 4560-4563

D'HALLUIN, J.C. 1980. Génétique de l'adénovirus. *Bull. Inst. Pasteur*, 78, 347-405

D'HALLUIN, J.C., DELSERT, C., MILLEVILLE, M., and BOULANGER, P. 1985. An adenovirus cytotoxic function related to the control of a cellular pH4 endonuclease activity. *J. Gen. Virol.*, 66, 1877-1887

DIGNAM, D.J., LEBOWITZ, R.M., and ROEDER, J.R. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acid. Res.*, 11, 1475-1489

DYNAN, W.S., and TJIAN, R. 1983. The promoter-specific transcription factor SP1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*, 32, 79-87

ECHARDT, T. 1979. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*, 1, 584-588

ELKAIM, R., GODING, C., and KEDINGER, C. 1983. The adenovirus-2 E2A early gene promoter: sequences required for efficient in vitro and in vivo transcription. *Nucl. Acid. Res.*, 11, 7105-7117

EVERITT, E., LUTTER, L., and PHILIPSON, L. 1975. Structural proteins of adenovirus. XII. Location and neighbour relationship among proteins of adenovirus type 2 as revealed by enzymatic iodination, immunoprecipitation and chemical cross-linking. *Virology*, 67, 197-208

FADEN, H., GALLAGHER, M., OGRA, P., and Mc LAUGHLIN, S. 1978. Nosocomial outbreak of pharyngoconjunctival fever due to adenovirus type 4. *New York Morb. Mort. Week. Rep.*, 27, 49

FELDMAN, L.T., and NEVINS, J.R. 1983. Localization of the adenovirus E1A protein, a positive acting transcriptional factor in infected cells. *Mol. Cell. Biol.*, 3, 829-838

FERGUSON, B., KRIPPL, B., ANDRISANI, O., JONES, N., WESTPHAL, H., and ROSENBERG, M. 1985. E1A 13S and 12S mRNA products made in E. coli. Both function as nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 2653-2661

FIFE, K.H., ASHLEY, R., and COREY, L. 1985. Isolation and characterization of six new genome types of human adenovirus types 1 and 2. *J. Clin. Microbiol.*, 21, 20-23

FIRE, A., SAMUELS, M., and SHARP, P.A. 1984. Interactions between RNA polymerase II, factors and template leading to accurate transcription. *J. Biol. Chem.*, 259, 2509-2516

FLEWETT, T.H., BRYDEN, A.S., DAVIES, H., and MORRIS, C.A. 1975. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet*, 1, 4-5

FLINT, S.J., and SHARP, P.A. 1976. Adenovirus transcription. V. Quantification of viral RNA sequences in Ad2 infected and transformed cells. *J. Mol. Biol.*, 106, 749-771

FLORES, O., MALDONADO, E., BURTON, Z., GREENBLATT, J., and REINBERG, D. 1988. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. RNA polymerase II associating protein 30 is an essential component of transcription factor IIF. *J. Biol. Chem.*, 263, 10812-10816

GALAS, D.L., and SCHMITZ, A. 1978. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucl. Acid. Res.*, 5, 3157-3171

GALIBERT, F., HERISSE, J., and COURTOIS, G. 1979. Nucleotide sequences of RI-F fragment of adenovirus 2 genome. *Gene*, 6, 1-22

GARCIA, J., WU, F., and GAYNOR, R. 1987. Upstream regulatory regions required to stabilize binding to the TATA sequence in an adenovirus early promoter. *Nucl. Acid. Res.*, 15, 8367-8385

GARIGLIO, P., BUSS, J., and GREEN, M.H. 1974. Sarkosyl activation of RNA polymerase activity in mitotic mouse cells. *FEBS Lett.*, 44, 330-333

GAYNOR, R.B., HILLMAN, D., and BERK, A.K. 1984. Adenovirus early region 1A protein activates transcription of a non viral gene introduced into mammalian cells by infection or transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 81, 1193-1197

GILARDI, P., and PERRICAUDET, M. 1984. The E4 transcriptional unit of Ad2: far upstream sequences are required for its trans-activation by E1A. *Nucl. Acid. Res.*, 20, 7877-7888

GILARDI, P., and PERRICAUDET, M. 1986. The E4 promoter of adenovirus type 2 contains an E1A dependent *cis*-acting element. *Nucl. Acid. Res.*, 14, 9035-9049

GINGERAS, T.R., SCIAKY, D., GELINAS, R.E., BING-DANG, J., YEN, C., KELLY, M., BULLOCK, P., PARSONS, B., O'NEIL, K., and ROBERTS, R.J. 1982. Nucleotide sequence from the adenovirus 2 genome. *J. Biol. Chem.*, 257, 13475-13491

GLISIN, V., GKVENJAKOV, R., and BYUSS, C. 1977. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry*, 13, 2633-2637

GODING, C.R., TEMPERLEY, S.M., and FISCHER, F. 1987. Multiple transcription factors interact with the adenovirus-2 E2A late promoter: evidence for a novel CCAAT recognition factor. *Nucl. Acid. Res.*, 15, 7761-7780

GORMAN, C.M., MOFFART, L.F., and HOWARD, B.H. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl-transferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 2, 1044-1051

GRAHAM, F.L., and van der EB, A.J. 1973. A new technique for the assay infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52, 456-467

GRAVES, B.J., JOHNSON, P.F., and MCKNIGHT, S.L. 1986. Homologous recognition of a promoter domain common to the MSV LTR and the HSV tk gene. *Cell*, 44, 565-576

GREEN, M., PINA, M., KINES, R.C., WENSINK, P.C., MACHATTIE, L.A., and THOMAS C.A., Jr. 1967. Adenovirus DNA. V. Molecular weight and conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 57, 1302-1309

GREEN, M.R., TREISMAN, R., and MANIATIS, T. 1983. Transcriptional activation of cloned human β -globin genes by viral immediate-early gene products. *Gene*, 35, 137-145

GROSSCHEDL, R., and BIRNSTIEL, M.L. 1980. Identification of regulatory sequences in the prelude sequences of H2A histone gene by the study of specific deletion mutants in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 77, 1432-1436

GRUSS, P., DHAR, R., and KHOURY, G. 1981. Simian virus 40 tandem repeated sequences as an element of the early promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 78, 943-947

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, 3069-3073

GUILFOYLE, R.A., OSHEROFF, W.P., and ROSSINI, M. 1985. Two functions encoded by adenovirus early region 1A are responsive for the activation and repression of the DNA binding protein gene. *EMBO J.*, 4, 707-713

HAI, T., HORIKOSHI, M., ROEDER, R.G., and GREEN, R. 1988. Analysis of the role of transcription factor ATF in the assembly of a functional preinitiation complex. *Cell*, 54, 1043-1051

HALBERT, D.N., CUTT, J.R., and SHENK, T. 1985. Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shut off. *J. Virol.*, 56, 250-257

HANAKAWA, S., NISHIGAKI, T., SHARP, P.A., and HANDA, H. 1987. Regulation of in vitro and in vivo transcription of early region IV of adenovirus type 5 by multiple cis-acting elements. *Mol. Cell. Biol.*, 7, 2578-2587

HANDA, H., KINGSTON, R.E., and SHARP, P.A. 1983. Inhibition of adenovirus early region 4 transcription in vitro by a purified viral DNA binding protein. *Nature*, 302, 545-547

HASHIMOTO, S., PURSLEY, M.H., and GREEN, M. 1981. Nucleotide sequences and mapping of novel heterogenous 5' termini of adenovirus-2 early region 4 mRNA. *Nucl. Acid. Res.*, 9, 1675-1689

HAWLEY, D.K., ROEDER, R.G. 1985. Separation and partial characterisation of three functional steps in transcription initiation by human RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, 13, 8163-8172

HAWLEY, D.K., ROEDER, R.G. 1987. Functional Steps in transcription Initiation and reinitiation from the major late promoter in a HeLa nuclear extract. *J. Biol. Chem.*, 262, 3452-3461

HEARING, P., and SHENK, T. 1983. The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element. *Cell*, 33, 695-703

HEARING, P., and SHENK, T. 1985. Sequence-independent autoregulation of the adenovirus type 5 E1A transcription unit. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 3214-3221

HEARING, P., and SHENK, T. 1986. The adenovirus type 5 enhancer contains two functionally distinct domains: one is specific for E1A and the other modulates transcription of all early units in cis. *Cell*, 45, 229-236

HEN, R., SASSONE-CORSI, P., CORDEN, J., GAUB, M.P., and CHAMBON, P. 1982. Sequences upstream from the TATA box are required in vitro and in vivo for efficient transcription from the adenovirus serotype 2 major late promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 79, 7132-7136

HEN, R., BORELLI, P., SASSONE-CORSI, P., and CHAMBON, P. 1983. An enhancer element is located 340 base pairs upstream from the adenovirus-2 E1A cap site. *Nucl. Acid. Res.*, 11, 8747-8761

HEN, R., BORELLI, E., and CHAMBON, P. 1985. Repression of the immunoglobulin heavy enhancer by the adenovirus-2 E1A products. *Science*, 230, 1391-1394

HEN, R., BORELLI, E., FROMENTAL, C., SASSONE-CORSI, P., and CHAMBON, P. 1986. A mutated polyoma virus enhancer which is active in undifferentiated embryonal carcinoma cells is not repressed by adenovirus-2 E1A products. *Nature*, 321, 249-251

HERISSE, J., COURTOIS, G., and GALIBERT, F. 1980. Nucleotide sequence of the EcoRI D fragment of adenovirus 2 genome. *Nucl. Acid. Res.*, 8, 2173-2191

HIEBERT, S., MUDRYJ, M., and NEVINS, J.R. 1989. Role of the adenovirus induced E2F factor in cellular transcription. *The Imp. Cancer Res. Fund Tumor Virus Meeting on SV40, Polyoma and Adenovirus. Cambridge (England)*

HIERHOLZER, J.C., WIGAND, R., ANDERSON, L., ADRIAN, T., GOLD, J.W.M. 1988. Adenovirus from patients with AIDS: a plethora of erotypes and a description of five new serotypes of subgenous D (types 43-47). *J. Infect. Dis.*, 158, 804-813

HINDS, P., FINLEY, C., and LEVINE, A.J. 1989. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J. Virol*, 63, 739-746

HOEFFLER, W.K., KOVELMAN, R., and ROEDER, R. 1988. Activation of transcription factor IIIC by the adenovirus E1A protein. *Cell*, 59, 907-920

HORIKOSHI, M., SEKIMUZU, K., and NATORI, S. 1984. Analysis of the stimulatory factor of RNA polymerase II in the initiation and elongation complex. *J. Biol. Chem.*, 259, 608-611

HORIKOSHI, M., CAREY, M.F., KAKIDANI, H., and ROEDER, R.G. 1988. Mechanism of action of a yeast activator: direct effect of GAL4 derivatives on mammalian TFIID-promoter interactions. *Cell*, 54, 665-669

HORNE, R.W., BRENNER, S., WATERSON, A.P., and WILBY, P. 1959. The icosahedral form of an adenovirus. *J. Mol. Biol.*, 1, 84-86

HORWITZ, M.S. 1978. Temperature-sensitive replication of H5ts125 adenovirus DNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 75, 4291-4295

HUANG, D.H., and ROEDER, R.G. 1988. Delineation of DNA sequences that are important for in vitro transcription from the adenovirus E2A late promoter. *Mol. Cell. Biol.*, 8, 1906-1914

HUANG, D.H., HORIKOSHI, M., and ROEDER, R.G. 1988. Activation of the adenovirus E2A late promoter by a single mutation which enhances binding of transcription factor IID. *J. Biol. Chem.*, 263, 12596-12601

HUEBNER, R.J., ROWE, W.P., and LANE, W.T. 1962. Oncogenic effects in hamsters of adenovirus types 12 and 18. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 48, 2051-2058

HUEBNER, R.J. 1967. Adenovirus-directed tumor and T antigens. Pollard M. (Ed) *Perspectives in virology*, 5, 147-166

HURST, H.C., and JONES, N.C. 1987. Identification of factors that interact with the E1A-inductible adenovirus E3 promoter. *Gene Develop.*, 1, 1132-1146

HURST, H.C., BENBROOK, D., and NICHOLAS, C.J. 1989. Characterization of ATF protein: a transcription factor that can mediate E1A activation. *Cancer Res. Fund Tumor Virus Meeting on SV40, Polyoma and Adenovirus. Cambridge (England)*

IMPERIALE, M.J., and NEVINS, J.R. 1984. Adenovirus 5 E2A transcription unit: an E1A-inducible promoter with an essential element that functions independently of position and orientation. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 875-882

IMPERIALE, M.J., HART, R.P., and NEVINS, J.R. 1985. An enhancer-like element E2 promoter contains sequences essential for uninduced and E1A-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 82, 381-385

ISHIBASHI, M., and MAIZEL, J.V., Jr. 1974. The polypeptides of adenovirus. VI. Early and late glycopeptides. *Virology*, 58, 345-361

JALINOT, P., and KEDINGER, C. 1986. Negative regulatory sequences in the E1A-inductible enhancer of the adenovirus-2 early E2A promoter. *Nucl. Acid. Res.*, 6, 2651-2669

JALINOT, P., WINTZERITH, M., GAIRE, M., HAUSS, C., EGLY, J.M., and KEDINGER, C. 1988. Purification and functional characterization of a cellular transcription factor that binds to an enhancer element within the adenovirus early E2A promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 85, 2484-2488

JOHNSON, P.F., LANDSCHULZ, W.H., GRAVES, B.J., and McKNIGHT, S.L. 1987. Identification of a rat liver nuclear protein that binds to the enhancer core element of three animal viruses. *Gene and Develop.*, 1, 133-146

JONES, N., and SHENK, T. 1979. An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76, 3665-3669

JONES, K.A., KADONAGA, J.T., ROSENFELD, P.J., KELLY, J.J., and TJIAN, R. 1987. A cellular DNA binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell*, 48, 79-89

JONES, N., and TIBBETTS, C. 1989. Upstream DNA sequences determine different auto-regulatory responses of the adenovirus types 5 and 3 E1A promoters. *J. Virol.*, 63, 1833-1838

KADONAGA, J.T., JONES, K.A., and TJIAN, R. 1983. Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Spl. *Trends. Biochem. Sci.*, 11, 20-24

KAMPE, O., BELLGRAM, D., HAMMERLING, U., LIND, P., PAABO, S., SEVERINSON, L., and PETERSON, P.A. 1983. Complex formation of class I transplantation antigens and a viral glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 258, 10594-10598

KHOURY, G., and GRUSS, P. 1983. Enhancer elements. *Cell*, 33, 313-314

KIMELMAN, D., MILLER, J.S., PARTER, D., and ROBERTS, B.E. 1985. E1A regions of the human adenovirus and the highly oncogenic simian adenovirus 7 are closely related. *J. Virol.*, 53, 399-409

KINGSTON, R.E., KAUFMAN, R.J., and SHARP, P.A. 1984. Regulation of transcription of the adenovirus E2 promoter by E1A gene products: absence of sequence specificity. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1970-1977

KITANA-YASUDA, T., YASUDA, N., and HASHIMOTO, S. 1988. Activation of the adenovirus-2 E2A late promoter during inhibition of protein synthesis by cycloheximide. *Gene*, 69, 165-169

KITCHINGMAN, G., LAI, S., and WESTPHAL, H. 1977. Loop structures in hybrids of early RNA and the separated strands of adenovirus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 74, 4392-4395

KLEIN, H., MALTZMANN, W., and LEVINE, A.J. 1979. Structure-function relationship of the adenovirus DNA binding protein. *J. Biol. Chem.*, 254, 11051-11060

KLESSIG, D.F., and ANDERSON, C.W. 1975. Block to multiplication of adenovirus serotype 2 in monkey cells. *J. Virol.*, 16, 1650-1668

KLESSIG, D.F. 1977. Two adenovirus mRNAs have a common 5' terminal leader sequence encoded at least 10 kb upstream from their main coding region. *Cell*, 12, 9-21

KLESSIG, D.F., and CHOW, L.T. 1980. Incomplete splicing and deficient accumulation of the fiber messenger RNA in monkey cells infected by human adenovirus type 2. *J. Mol. Biol.*, 139, 221-242

KLESSIG, D.F., RICE, S.A., CLEGHON, V., BROUGH, D.E., WILLIAMS, J.F., and VOELKERDING, C. 1986. Studies on the adenovirus DNA-binding protein. *Cancer Cells/ DNA Tumor Viruses . Control of Genes Expression and Replication*, 485-496, ed M. Botchan, T. Grodzicker and P. A. Sharp, Cold Spring Harbor Laboratory

KOVESDI, I., REICHEL, R., and NEVINS, J.R. 1986. E1A transcription induction: enhanced binding of a factor to upstream promoter sequences. *Science*, 231, 719-722

KOVESDI, I., REICHEL, R., and NEVINS, J.R. 1987. Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84, 2180-2184

KRUIJER, W., van SCHAIK, F.M.A., and SUSSENBACH, J.S. 1982. Nucleotide sequence of the gene encoding adenovirus type 2 DNA binding protein. *Nucl. Acid. Res.*, 10, 4493-4500

KRUIJER, W., NICOLAS, J.C., van SCHAIK, F.M.A., and SUSSENBACH, J.S. 1983. Structure and function of DNA binding proteins from revertants of adenovirus type 5 mutants with a temperature sensitive DNA replication. *Virology*, 124, 425-433

LARSEN, P.L., McGRAINE, M.N., ROBINSON, C.C., and TIBBETTS, C. 1986. An E1A mutant of adenovirus type 3: Ad3hr15 has reiterated DNA sequences 5' to its E1A gene. *Virology*, 155, 148-159

LARSEN, P.L., and TIBBETTS, C. 1987. Adenovirus E1A gene auto regulation: revertants of an E1A promoter mutation encode altered E1A proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84, 8185-8189

LASSAR, A.B., MARTIN, P.L., and ROEDER, R.G. 1983. Transcription of class III genes: formation of preinitiation complexes. *Science*, 222, 740-748

LA THANGUE, N.B., and RIGBY, P.W.J. 1987. An adenovirus E1A-like transcription factor is regulated during the differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells. *Cell*, 49, 507-513

LAZARIDES, I., BABICH, A., and NEVINS, J.R. 1988. Role of the adenovirus 72kDa DNA binding protein in the rapid decay of early viral mRNA. *Virology*, 165, 438-445

LECHNER, R.L., and KELLY, T.J. 1977. The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules. *Cell*, 12, 1007-1020

LECLERE, V. 1989. Transformation par les adénovirus: Action en *cis* de la région E1B sur l'activité du promoteur de la région E1A. *Diplôme d'études approfondies Sciences de la Vie et Santé de l'Université de Lille Flandres Artois*.

LEE, C.L., ROEDER, R.G., and WILLIAM, S.M.W. 1982. DNA sequences affecting specific initiation of transcription *in vitro* from the EIII promoter of adenovirus 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 79, 41-45

LEE, K.A.W., and GREEN, M.R. 1987. A cellular transcription factor E4F-1 interacts with an E1A-inducible enhancer and mediates constitutive enhancer function *in vitro*. *EMBO J.*, 6, 1345-1353

LEE, K.A.W., MITCHELL, P., and TJIAN, R. 1987a. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell*, 49, 741-752

LEE, K.A.W., HAI, T.Y., SIVARAMAN, L., THIMMAPAYA, B., HURST, H.C., JONES, N.C., and GREEN, M.R. 1987b. A cellular proteins, activating transcription factor, activates transcription of multiple E1A-inducible adenovirus early promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84, 8355-8359

LEE, K.A.W., BINDEREIFF, A., and GREEN, M.R. 1988. A small-scale procedure for preparation of nuclear extracts that support efficient transcription and pre-mRNA splicing. *Gene Anal. Techn.*, 5, 22-31

LEFF, T., CORDEN, J., ELKAIM, R., and SASSONE-CORSI, P. 1985. Transcriptional analysis of the adenovirus-5 EIII promoter: absence of sequence specificity for stimulation by E1A gene products. *Nucl. Acid. Res.*, 13, 109-1221

LEFF, T., and CHAMBON, P. 1986. Sequence-specific activation of transcription by adenovirus E1A products is observed in HeLa cells but not in 293 cells. *Mol. Cell. Biol.*, 6, 201-208

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

LEITE, J.P.G. 1988. La région E1A des sérotypes 2,3 et 12 de l'adenovirus: transdominance et régulation de la transcription. Thèse de doctorat de l'université de Lille Flandres Artois

LEITE, J.P.G., and D'HALLUIN, J.C. 1988. Differences in the organization of adenovirus E1A promoters are not important for their full activity. *FEBS Lett.*, 235, 233-236

LEVINGER, L. 1986. Identification of DNA binding proteins from human cells. *Gene Anal. Techn.*, 3, 96-101

LEWIS, J.B., and MATTHEWS, M.B. 1980. Control of adenovirus early gene expression: a class of immediate early products. *Cell*, 21, 303-313

LEZA, M.A., and HEARING, P. 1989. Independent cyclic AMP and E1A induction of adenovirus early region 4 expression. *J. Virol.*, 63, 3057-3064

LI, P., BELETT, A.J., and PARISH, C.R. 1984. DNA-binding proteins of chick embryo lethal orphan virus: lack of complementation between early proteins of avian and human adenoviruses. *J. Gen. Virol.*, 65, 1817-1825

LICHY, J.H., FIELD, J., HORWITZ, M.S., and HORWITZ, J. 1982. Separation of the adenovirus terminal protein precursor from its associated DNA polymerase: role of both proteins in the initiation of adenovirus DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 79, 5225-5229

LILLIE, J.W., LOEWENSTEIN, P.M., GREEN, M.R., and GREEN, M. 1987. Functional domains of adenovirus type 5 E1A proteins. *Cell*, 50, 1091-1100

LOEKEN, M.R., and BRADY, J. 1989. The adenovirus E2A enhancer analysis of regulatory sequences and changes in binding activity of ATF and E2F following adenovirus infection. *J. Biol. Chem.*, 264, 6572-6579

LOMBERG-HOLM, K., and PHILPSON, L. 1969. Early events of virus-cells interactions in an adenovirus system. *J. Virol.*, 4, 323-338

LUSKY, M., and BOTCHAN, M. 1981. Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences. *Nature*, 293, 79-81

Mc DONOUGH, J., and REKOSH, D.M. 1982. Differential complementation of adenovirus type 5 temperature-sensitive early mutants by adenovirus types 3 and 12. *Virology*, 120, 383-398

Mc GROGAN, M.M., SIMONSEN, C.C., SMOUSE, D.T., FARNHAM, P.J., and SCHIMKE, R.T. 1985. Heterogeneity at the 5' termini of mouse dihydrofolate reductase mRNAs: evidence for multiple promoter regions. *J. Biol. Chem.*, 260, 2307-2314

Mc KNIGHT, S., and TJIAN, R. 1986. Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell*, 46, 795-805

MAIZEL, J.V., WHITE, D.O., and SHARFF, M.D. 1968. The polypeptides of adenovirus II. Soluble proteins, core, top components and the structure of the virion. *Virology*, 36, 126-136

MAK, S. 1969. Transcription and replication of viral deoxyribo-nucleic acid in cells co-infected with adenovirus types 2 and 12. *J. Virol.*, 4, 651-656

MALETTE, P., YEE, S.P., and BRANTON, P.E. 1983. Studies on the phosphorylation of the 58,000 daltons early region 1B protein of human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, 64, 1069-1078

MARTON, M., BAIM, S., HARDY, S., BHATTACHARYA, S., and SHENK, T. 1989. E1A transactivation of the E2 early promoter does not require the infection-specific form of the cellular factor E2F. *The Imp. Cancer Res. Fund Tumor Virus Meeting on SV40, Polyoma and Adenovirus. Cambridge (England)*

MATHIS, D.J., ELKAIM, R., KEDINGER, C., SASSONE-CORSI, P., and CHAMBON, P., 1981. Specific in vitro initiation of early transcription on the adenovirus type 2 early and late E2 transcription units. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 71, 7383-7387

MATSUI, T., SEGALL, J., WEIL, P.A., and ROEDER, R.G. 1980. Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 255, 11992-11996

MITCHELL, P.J., WANG, C., and TJIAN, R. 1987. Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell*, 50, 847-861

MIYAMOTO, N.G., MONCOLLIN, V., WINTZERITH, M., HEN, R., EGLY, J.M., CHAMBON, P. 1984. Stimulation of in vitro transcription by the upstream element of the adenovirus-2 major late promoter involves a specific factor. *Nucl. Acid. Res.*, 12, 8779-8799

MONCOLLIN, V., MIYAMOTO, N.G., ZHENG, X.M., and EGLY, J.M. 1986. Purification of a factor specific for the upstream element of the adenovirus-2 major late promoter. *EMBO J.*, 5, 2577-2584

MONTELL, C., COURTOIS, G., ENG, C., and BERK, A.J. 1984. Complete transformation by adenovirus 2 requires both E1A proteins. *Cell*, 36, 951-961

MONTMINY, M.R., SEVARINO, K.A., MANDEL, G., and GOODMAN, R.H. 1986. Identification of a cyclic element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 83, 6682-6686

MONTMINY, M.R., and BILEZIKGIAN, L.M. 1987. Binding of a nuclear protein to the cyclic AMP-response element of the somatostatin gene. *Nature*, 328, 175-178

MORAN, E., ZERLER, B., HARRISON, T.M., and MATHEWS, M.B. 1986. Identification of separate domains in the adenovirus E1A gene for immortalization activity and the activation of virus early genes. *Mol. Cell. Biol*, 6, 3470-3480

MOREAU, P., HEN, R., WASYLYK, B., EVERRETT, R., GAUB, M.P., and CHAMBON, P. 1981. The SV40 72 bp repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants. *Nucl. Acid. Res.*, 9, 6047-6067

MORGAN, C., ROSENKRANS, H.S., and MEDNIS, B. 1969. Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. X. Entry and uncoating of adenovirus. *J. Virol.*, 4, 777-796

MURTHY, S.C.S., BHAT, G.P., and THIMMAPAYA, B. 1985. Adenovirus early promoter: transcriptional control elements and induction by the viral pre-early E1A gene, which appears to be sequence independent. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 82, 2230-2234

NAGATA, K., GUGGENHEIMER, R.A., ENOMOTO, T., LICHY, J.M., and HURWITZ, J. 1982. Adenovirus DNA replication of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 79, 6438-6442

NAGATA, K., GUGGENHEIMER, R.A., and HURWITZ, J. 1983. Adenovirus DNA replication in vitro: synthesis of full length DNA with purified proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 80, 4266-4270

NAKAJIMA, N., HORIKOSHI, M., and ROEDER, R.G. 1988. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification genetic specificity, and TATA box-promoter interactions of TFIID. *Mol. Cell. Biol*, 8, 4028-4040

NEILL, S.D., and NEVINS J.R. 1989. Role of the E4 gene in the activation of adenovirus E2 transcription. *The Imp. Cancer Res. Fund Tumor Virus Meeting on SV40, Polyoma and Adenovirus. Cambridge (England)*

NERMUT, M.V. 1979. Structural elements in adenovirus cores: evidence for a "core shell" and linear structures in "relaxed" cores. *Arch. Virol.*, 62, 101-106

NEVINS, J.R., GINSBERG, H.S., BLANCHARD, J.M., WILSON, M.C., and DARNELL, J.E. 1979. Regulation of the primary expression of the early adenovirus transcription units. *J. Virol.*, 32, 727-733

NEVINS, J.R., and 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, 1893-1897

NEVINS, J.R. 1981. Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. *Cell*, 26, 213-220

NICOLAS, J.C., SARNOW, P., GIRARD, M., and LEVINE, A.J. 1983. Host-range temperature-conditional mutants in the adenovirus DNA binding protein are defective in the assembly of infectious virus. *Virology*, 126, 228-239

NIEL, C. 1989. Contribution aux études d'épidémiologie moléculaire des adénovirus humains. *Thèse de doctorat d'état de l'Université des Sciences et Techniques de Lille*.

NORRBY, E., and SKAARET, P. 1967. The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. III. Immunological identification of fiber antigen and isolated vertex capsomer antigen. *Virology*, 32, 489-502

O'NEILL, E.A., and KELLY, T.J. 1988. Purification and characterization of NFIII (origin recognition protein C), a sequence-specific DBP required for efficient initiation of adenovirus DNA replication. *J. Biol. Chem.*, 263, 931-937

OSBORNE, T.F., ARVIDSON, D.N., TYAN, E.S., DUNSWORTH-BROWNE, M., and BERK, A.J. 1984. Transcription control region within the protein-coding portion of adenovirus E1A genes. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1293-1305

PARKER, C.S., and TOPOL, J., 1984. A drosophila RNA polymerase II transcription factor contains a promoter region-specific DNA binding activity. *Cell*, 36, 357-369

PARKS, C.L., BANERJEE, S., and SPECTOR, D.J. 1988. Organization of the transcriptional control region of the E1B gene of adenovirus type 5. *J. Virol.*, 62, 54-67

PEI, R., and BERK, A.J. 1989. Multiple transcription factor binding sites mediate adenovirus E1A transactivation. *J. Virol.*, 63, 3499-3506

PERSSON, H., JANSSON, M., and PHILIPSON, L. 1980. Synthesis and genomic site for an adenovirus type 2 early glycoprotein. *J. Mol. Biol.*, 136, 375-394

PETERSON, D.O., BEIFUSS, K.K., and MORLEY, K.L. 1987. Context-dependent gene expression: cis-acting negative effects of specific procaryotic plasmid sequences on eucaryotic genes. *Mol. Cell. Biol.*, 7, 1563-1567

PETTERSSON, U., VIRTANEN, A., PERRICAUDET, M., and AKUSJARVI, G. 1983. The messenger RNAs from the transforming region of human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 109, 107-123

PETTERSSON, U., and WADELL, G. 1985. Antigenic structure of the adenoviruses. *Immunochemistry of viruses. The basis for serodiagnosis and vaccines.* 295-319, ed. par M. H. V. van Reggenmortel and A. R. Neurath, Elsevier Sciences Publishers B. V.

PIETTE, J., and YANIV, M. 1987. Two different factors bind to the alpha domain of the polyoma virus enhancer, one of which also interacts with the SV40 and c-fos enhancer. *EMBO J.*, 6, 1331-1337

PINA, M., and GREEN, M. 1965. Biochemical studies on adenovirus multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 54, 447-451

PRUIJN, G.J.M., van DRIEL, W., van MILTENBURG, R.T., and van der VLIET, P.C. 1987. Promoter and enhancer elements containing a conserved sequence motif are recognized by NFIII, a protein stimulating adenovirus DNA replication. *EMBO J.*, 6, 3771-3778

PRUIJN, G.J.M., van MILTENBURG, R.T., CLAESSENS, J.A.J., and van der VLIET, P.C. 1988. Interaction between the octamer-binding protein NFIII and the adenovirus origin of DNA replication. *J. Virol.*, 62, 3092-3102

RALSTON, R., and BISHOP, J.M. 1983. The protein products of the myc and myb oncogenes and adenovirus E1A are structurally related. *Nature*, 306, 803-806

RAPPOPORT, J., CHO, K., SALZMAN, A., PRENGER, J., COLOMB, M., WEINMANN, R. 1988. Transcription elongation factor SII interacts with a domain of the large subunit of human RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, 8, 3136-3142

RAYCHAUDHURI, P., ROONEY, R., and NEVINS, J.R. 1987. Identification of an E1A-inductible cellular factor that interacts with regulatory sequences within the adenovirus E4 promoter. *EMBO J.*, 6, 4073-4081

REICHEL, R., KOVESDI, I., and NEVINS, J.R. 1987. Developmental control of a promoter-specific factor that is also regulated by the E1A gene product. *Cell*, 48, 501-506

REICHEL, R., KOVESDI, I., and NEVINS, J.R. 1988. Activation of a preexisting cellular factor as a basis for adenovirus E1A-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 85, 387-390

REINBERG, D., HORIKOSHI, M., and ROEDER, R.G. 1987. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: Functional analysis of initiation factors IIA and IID and identification of a new factor operating at sequences downstream of the initiation site. *J. Biol. Chem.*, 262, 3322-3330

REINBERG, D., and ROEDER, R.G. 1987a. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: Purification and functional analysis of initiation factors IIB and IIE. *J. Biol. Chem.*, 262, 3310-3321

REINBERG, D., and ROEDER, R.G. 1987b. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: Transcription factor IIS stimulates elongation of RNA chains. *J. Biol. Chem.*, 262, 3331-3337

REKOSH, D.M.K., RUSSEL, W.C., and BELLET, A.J.D. 1977. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell*, 11, 283-295

RICCIARDI, R.P., JONES, R.L., CEPKO, C.L., SHARP, P.A., and ROBERTS, B.E. 1981. Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 78, 6121-6125

RICE, S.A., and KLESSIG, D.F. 1984. The function(s) provided by the adenovirus-specified, DBP required for viral late gene expression is independent of the role of the protein in viral DNA replication. *J. Virol.*, 49, 35-49

RICE, S.A., KLESSIG, D.F., and WILLIAMS, J. 1987. Multiple effects of the 72 kDa adenovirus-specified DNA binding protein on the efficiency of cellular transformation. *Virology*, 156, 366-376

ROBINSON, A.J., YOUNGHUSBAND, H.B., and BELLET, A.J.D., 1973. A circular DNA protein complex from adenoviruses. *Virology*, 56, 54-69

ROESLER, W.J., VANDENDARK, G.R., and HANSON, R.W. 1988. Cyclic AMP and induction of eukaryotic gene transcription. *J. Biol. Chem.*, 263, 9063-9066

ROWE, W.P., HUEBNER, R.J., GILMORE, L.K., PARROTT, R.H., and WARD, T.G., 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 84, 570-573

ROWE, D.T., and GRAHAM, F.L. 1981. Complementation of adenovirus type 5 host range mutants by adenovirus type 12 in co-infected HeLa and BHK21 cells. *J. Virol.*, 38, 191-197

RUSSEL, W.C., and PRECIOUS, B. 1982. Nucleic acid binding properties of adenovirus structural polypeptides. *J. Gen. Virol.*, 63, 69-79

SALZMAN, A.G., and WEINMANN, R. 1989. Promoter specificity and modulation of RNA polymerase II transcription. *The FASEB J.*, 3, 1723-1733

SAMUELS, M., FIRE, A., and SHARP, P.A. 1982. Separation and characterization of factors mediating accurate transcription by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, 257, 14419-14427

SANGER, D., NICKLEN, S., and COULSON, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 74, 5463-5467

SASSONE-CORSI, P., HEN, R., BORELLI, E., LEFF, T., and CHAMBON, P. 1983. Far upstream sequences are required for efficient transcription from the adenovirus-2 E1A transcription unit. *Nucl. Acid. Res.*, 11, 8735-8745

SAWADOGO, M., and ROEDER, R.G. 1984. Energy requirement for specific transcription initiation by the human RNA polymerase II system. *J. Biol. Chem.*, 259, 5321-5326

SAWADOGO, 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, 165-175

SCHNEIDER, J.F., FISCHER, F., GODING, C.R., and JONES, N.C. 1987. Mutational analysis of the adenovirus E1A gene: the role of transcriptional regulation in transformation. *EMBO J.*, 6, 2053-2060

SETH, P., FITZGERALD, D., WILLIANGHAN, M., and PASTAN, I. 1986. Pathway of adenovirus entry into cells. *Virus attachment and entry into cells*, 191-195, ed. par R.L. Crowell and R. Lonberg-Holm, American Society for microbiology

SEVERINSSON, L., and PETERSON, P. 1985. Abrogation of cell surface expression of human class I transplantation antigens by an adenovirus protein in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Cell. Biol.*, 101, 540-547

SHIROKI, K., SEGAWA, K., and SHIMOJO, H. 1980. Two tumor antigens and their polypeptides in adenovirus type 12-infected and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 77, 2274-2278

SIEBENLIST, U., HENNIGHAUSEN, L., BATTERY, J., and LEDER, P. 1984. Chromatin structure and protein binding in the putative regulatory region of the c-myc gene in Burkitt lymphoma. *Cell*, 37, 381-391

SIGNAS, C., AKUSJARVI, G., and PETTERSSON, U. 1986. Region E3 of human adenoviruses; differences between the oncogenic adenovirus-3 and the non-oncogenic adenovirus-2. *Gene*, 50, 173-184

SILVER, B.J., BOKAR, J.A., VIRGIN, J.B., VALLEN, E.A., MILSTED, A., and NILSON, J.H. 1987. Cyclic AMP regulation of the human glycoprotein hormone alpha-subunit gene is mediated by an 18 base-pair element. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84, 2198-2202

SIVARAMAN, L., SUBRAMANIAN, S., and THIMMAPAYA, B., 1986. Identification of a factor in HeLa cells specific for an upstream transcriptional control sequence of an E1A-inductible adenovirus promoter and its relative abundance in infected and uninfected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 83, 5914-5918

SIVARAMAN, L., and THIMMAPAYA, B., 1987. Two promoter-specific host factors interact with adjacent sequences in an E1A-inductible adenovirus promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84, 6112-6116

SLATTERY, E., DIGNAM, J.D., MATSUI, T., and ROEDER, R.G. 1983. Purification and analysis of a factor which suppresses nick-induced transcription by RNA polymerase II and its identity with poly (ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.*, 258, 5955-5969

SMART, J.E., and STILLMAN, B.W. 1982. Adenovirus terminal protein precursor: partial amino acid sequence and the site of covalent linkage to virus DNA. *J. Biol. Chem.*, 257, 13499-13505

SMITH, D.H., KEGLER, D.M., and ZIFF, E.B. 1985. Vector expression of adenovirus type 5 E1A proteins: evidence for E1A autoregulation. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 2684-2696

SOPTA, M., CARTHEW, R.W., and GREENBLATT, J. 1985. Isolation of proteins that bind to mammalian RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, 260, 10353-10360

STEPHENS, C., and HARLOW, E. 1987. Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNAs that encode 30 kDa and 35 kDa proteins. *EMBO J.*, 6, 2027-2035

STILLMAN, B.W., TAMANOI, F., and MATHEWS, M.B. 1982. Purification of an adenovirus-coded DNA polymerase that is required for initiation of DNA replication. *Cell*, 31, 613-623

STILLMAN, B.W. 1986. Functions of the adenovirus E1B tumor antigens. *Cancer Surveys*, 5, 389-404

STUBER, D., and BUJARD, H. 1981. Organization of transcriptional signals in plasmids pBR 322 and pACYC 184. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 78, 167-171

SUSSENBACH, J.J., van der VLIET, P.C., ELLENS, D.J., and JANSZ, H.S. 1972. Linear intermediates in the replication of adenovirus DNA. *Nature*, 239, 47-49

SUSSENBACH, J.J. 1984. The structure of the genome. *In The Adenoviruses*, Ginsberg, H.S., (ed.), Plenum Publishing Corp., New York, 35-113

SVENSSON, C., and AKUSJARVI, G. 1984. Adenovirus 2 early region 1A stimulates expression of both viral and cellular genes. *EMBO J.*, 3, 789-794

THIEL, J.F., and SMITH, K.O. 1967. Fluorescent focus assay of viruses on monolayers in plastic Petri dishes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 125, 892-895

TRENTIN, J.J., YOSHIRO, Y., and GRANT, T. 1962. The quest for human cancer viruses. *Science*, 137, 835-841

TOKUNAGA, O., YAEGASHI, T., LOWE, J., DOBBS, L., and PADMANABHAN, R., 1986. Sequence analysis in the E1 region of adenovirus type 4 DNA. *Virology*, 155, 418-433

TOOZE, J. 1980. *DNA Tumor Viruses. The Molecular Biology of Tumor viruses*, 2nd ed. Part 2, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

ULFENDAHL, P.J., LINDER, S., KREIVI, J.P., NORDQUIST, K., SEVENSSON, L., HULTBERG, H., and AKUSJARVI, G. 1987. A novel adenovirus-2 E1A mRNA encoding a protein with transcription activation properties. *EMBO J.*, 6, 2037-2044

van BERGEN, B.G., van der LEY, P.A., van DRIEL, W., van MANSFIELD, A.D., van der VLIET, P.C. Replication of origin containing adenovirus DNA fragments that do not carry the terminal protein. *Nucl. Acid. Res.*, 11, 1975-1989

Van der EB, A.J., van KESTEREN, L.W., and van BRUGGEN, E.F.J. 1969. Structural properties of adenovirus DNAs. *Biochem. Biophys. Acta*, 182, 532-541

Van der VLIET, P.C., and LEVINE, A.J. 1973. DNA binding proteins specific for cell infected by adenovirus. *Nature New Biol.*, 246, 170

Van der VLIET, P.C., and SUSSENBACH, J.S. 1975. An adenovirus type 5 gene function required for initiation of viral DNA replication. *Virology*, 67, 415-426

Van der VLIET, P.C., ZANDBERG, J., and JANSZ, H.S. 1977. Evidence for a function of the adenovirus DNA binding protein in initiation of DNA synthesis as well as in elongation of nascent chains. *Virology*, 80, 98-110

VAYDA, M.E., LEONE, K., and FLINT, S.J. 1983. The structure of nucleoprotein from Ad2. *Nucl. Acid. Res.*, 11, 441-460

Van ORMONDT, H., MAAT, J., and van BEVEREN, C.P. 1980. The nucleotide sequence of the transforming region E1 of adenovirus type 5 E1A DNA. *Gene*, 11, 299-309

VELCICH, A., and ZIFF, E. 1985. Adenovirus E1A proteins repress transcription from the SV40 early promoter. *Cell*, 40, 705-716

VELDMAN, G.M., LUPTON, S., and KAMEN, R. 1985. Polyoma virus enhancer contains multiple redundant sequence elements that activate both DNA replication and gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 649-658

VOELKERDING, K., and KLESSIG, D.F. 1986. Identification of two nuclear subclasses of the adenovirus type 5 encoded DNA binding protein. *J. Virol.*, 60, 353-362

WADELL, G. 1978. Classification of human adenovirus by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of structural polypeptides. *Intervirology*, 11, 47-57

WADELL, G., HAMMARSKJOLD, M.L., WINBERG, G., VERSANYL, T.M., and SUNDELL, G. 1980. Genetic variability of adenoviruses. *Ann. New York Acad. Sci.*, 354, 16-42

WATANABE, H., IMAI, T., SHARP, P.A., and HANDA, H. 1988. Identification of two transcription factors that bind to specific elements in the promoter of the adenovirus early region 4. *Mol. Cell. Biol.*, 8, 1290-1300

WEBSTER, A., RUSSEL, S., RUSSEL, W.C., and KEMP, G.D. 1989. Characterisation of the adenovirus proteinase. *The Imp. Cancer Res. Fund Tumor Virus Meeting on SV40, Polyoma and Adenovirus. Cambridge (England)*

WEEKS, D.L., and JONES, N.C. 1983. E1A control of gene expression is mediated by sequence 5' to the transcriptional starts of the early viral genes. *Mol. Cell. Biol.*, 7, 1222-1234

WEEKS, D.L., and JONES, N.C. 1985. Adenovirus E3-early promoter: sequences required for activation by E1A. *Nucl. Acid. Res.*, 13, 5389-5402

WEIL, P.A., LUSE, D.S., SEGALL, J., and ROEDER, R.G. 1979. Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell*, 18, 469-484

WEINBERG, D.H., and KETNER, G. 1986. Adenoviral early region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression. *J. Virol.*, 57, 833-838

WHITE, E., FAHA, B., and STILLMAN, B. 1986. Regulation of adenovirus gene expression in human W138 cells by an E1B-encoded tumor antigen. *Mol. Cell. Biol.*, 6, 3763-3773

WHYTE, P., BUCHKOVICH, K.J., HOROWITZ, J.M., FRIEND, S.H., RAYBUCH, M., WEINBERG, R.A., and HARLOW, E. 1988. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 334, 124-129

WHYTE, P., WILLIAMSON, N.H., and HARLOW, E. 1989. Cellular targets for transformation by the E1A proteins. *Cell*, 56, 67-75

WIGAND, A., BARTHA, A., DREIZIN, R.S., ESCHE, H., GINSBERG, H.S., GREEN, M., HIERHOLZER, J.C., KALTER, S.S., McFERRAN, J.B., PETTERSSON, U., RUSSEL, W.C., and WADELL, G. 1982. Adenovirus, second report. *Intervirology*, 18, 169-177

WIGAND, R., ADRIAN, T., and BRICOUT, F. 1987. A new human adenovirus of subgenus D: candidate adenovirus type 42. *Arch. Virol.*, 94, 283-286

WILSON, M.C., and DARNELL, J.E., Jr. 1981. Control of mRNA concentration by differential cytoplasmic half-life: adenovirus mRNAs from transcription units 1A and 1B. *J. Mol. Biol.*, 148, 231-251

WOLFSON, J., and DRESSLER, D. 1972. Adenovirus DNA contains an inverted terminal redundancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 64, 3054-3057

WU, D.S.E., ROSSER, M., SCHMIDT, C., and BERK, A. 1987. A TATA box implicated in E1A transcriptional activation of a simple adenovirus 2 promoter. *Nature*, 326, 512-515

YAMAMOTO, K.K., GONZALEZ, G.A., BIGGS III, W.H., and MONTMINY, M.R. 1988. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*, 334, 494-498

YEE, A.S., REICHEL, R., KOVESDI, I., and NEVINS, J.R. 1987. Promoter interaction of the E1A-inducible factor E2F and its potential role in the formation of a multi-component complex. *EMBO J.*, 6, 2061-2068

YEE, A., RAYCHAUDHURI, P., JAKOI, L., and NEVINS, J.R. 1989. The adenovirus-inductible factor E2F stimulates transcription after specific DNA binding. *Mol. Cell. Biol.*, 9, 578-585

YOUNG, I.G., and POULIS, M.I. 1978. Conjugal transfer of cloning vectors derived from ColE1. *Gene*, 4, 175-179

ZAJCHOWSKI, D.A., BOEUF, H., and KEDINGER, C. 1985. The adenovirus 2 early E2A transcription unit possesses two overlapping promoters with different sequence requirements for E1A-dependent stimulation. *EMBO J.*, 4, 1293-1300

ZAJCHOWSKI, D.A., BOEUF, H., and KEDINGER, C. 1987. E1A inducibility of the adenoviral E2A promoter is determined by specific combinations of sequence elements. *Gene*, 58, 243-256

ZAJCHOWSKI, D.A., JALINOT, P., and KEDINGER, C. 1988. E1A-mediated stimulation of adenovirus E1II promoter involves an enhancer element within the nearby E1IIa promoter. *J. Virol.*, 62, 1762-1767

ZAGURSKY, R.J., BAUMEISTER, K., LAMAX, N., and BERMAN, M.L. 1985. Rapid and easy sequencing of large linear double-stranded DNA and supercoiled plasmid DNA. *Gene Anal. Techn.*, 2, 89-94

ZENKE, M.T., GREENSTROM, T., MATTHEWS, H., WINTZERITH, C., SCHATZ, A., WILDEMAN, A., and CHAMBON, P. 1986. Multiple sequence motifs are involved in SV40 enhancer function. *EMBO J.*, 5, 387-397

ZHENG., X.M., MONCOLLIN, V., EGLY, J.M., and CHAMBON, P. 1987. A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B. *Cell*, 50, 361-368



Dans les lignées cellulaires humaines ou simiennes co-infectées par l'Adénovirus de type 2 (l'Ad2) et l'Ad3, un effet dominant et inhibiteur de l'Ad3 sur l'Ad2 est détecté. Cette inhibition conduit au blocage de la réplication du génôme de l'Ad2, et il a été montré qu'un événement précoce du cycle lytique était responsable de ce phénomène (Delsert et D'Halluin, 1984).

Les premières données obtenues suggèrent que cette trans-dominance est due à la repression de la région E1A de l'Ad2 par celle de l'Ad3 (Leite *et al*, 1988). Nous avons observé l'effet cumulatif du pouvoir stimulateur des deux régions E1A des sérotypes 2 et 3 sur le promoteur E2AE de l'Ad3 alors qu'il y a inhibition, dans ces mêmes conditions, du promoteur E2AE de l'Ad2.

Pour étudier la compétition entre les deux promoteurs E2A, le promoteur E2AE de l'Ad3 a été séquencé et comparé à celui de l'Ad2. Les résultats révèlent une différence d'organisation nucléotidique entre les deux promoteurs, avec la conservation de la seule "TATA box-like" T1 de l'Ad2, celle du site de liaison du facteur ATF, d'un seul site potentiel de liaison du facteur E2F, et la disparition des séquences "silencer" homologues à celles de l'Ad2.

Les études de compétition en expression transitoire, par l'utilisation de vecteurs plasmidiques contenant le gène *cat* sous contrôle de l'un ou de l'autre promoteur E2AE, révèlent une préférence nette du pouvoir trans-activateur des régions E1A des deux sérotypes pour le promoteur E2A de l'Ad3.

La mise en jeu des facteurs cellulaires spécifiques des promoteurs dans ces processus de compétition est confortée par nos expériences de "gel retardement", qui indiquent également l'intervention de facteurs nucléaires supplémentaires associés spécifiquement avec le promoteur E2AE de l'Ad3.

Enfin, l'implication de l'expression différente des produits des régions E2A et E2B des deux sérotypes dans le phénomène de la transdominance sera discutée.