

50376
1991
138

68587

50376
1991
138

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

Année: 1991

N° d'ordre: 718

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE

Diplôme Présenté pour l'Obtention du Grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE
OPTION BIOCHIMIE

par

Philippe VERWAERDE

LA REGION E1A DES ADENOVIRUS:
ROLE DE LA *SEQUENCE CONSERVEE*
ENTOURANT LE SITE D'INITIATION DE LA
TRANSCRIPTION



Présentée le 22 Mai devant la Commission d'Examen:

MM. A. VERBERT

Président

S. BALL

Rapporteur

D. BLANGY

Rapporteur

J-C. D'HALLUIN

Examineur

J-P. KERKAERT

Examineur

A mon épouse, Caroline.
A mes enfants, Sigrid et Kerel.
A mes parents, Thérèse et Roger.

Je remercie toutes les personnalités de ce jury d'avoir accepté de juger ce mémoire.

Je tiens à remercier Jean Claude D'Halluin, directeur du laboratoire de virologie moléculaire et "promoteur" de ce travail, de m'avoir permis "d'initier" un sujet intéressant et de m'avoir accordé sa confiance et une grande liberté dans mes investigations.

Ma reconnaissance va à l'ensemble de mes collègues de laboratoire pour leur coopération et la bonne ambiance qu'ils ont su faire régner dans le travail.

Je remercie plus particulièrement Chantal Vercamer, "facteur" indispensable à la bonne marche du laboratoire, de m'avoir fait partager son expérience de la recherche et Valéire Leclère et Isabelle Huvent d'avoir consacré du temps à relire ce mémoire. Ma sympathie va à mon ami Arnaud Heysen, d'une bonne humeur permanente, avec qui j'ai partagé les joies et les difficultés du travail de recherche et à José Paulo Leite dont les conseils et la sagesse m'ont été d'un grand secours.

Que les docteurs Dive, de Villeneuve d'Ascq, et Tuffrau, d'Orsay, trouvent ici l'expression de toute ma gratitude. Ils ont conseillé, orienté et fait confiance à un jeune garçon passionné par la biologie et lui ont permis de faire l'expérience précoce de la recherche.

Toute mon affection va à mon épouse Caroline qui a su supporter mes absences et retards répétés et n'hésite pas à me suivre dans une "aventure" post-doctorale aux Etats-Unis.

Je n'oublie pas mes parents qui ont encouragé mon goût pour la recherche, m'ont permis de poursuivre des études et ont toléré une chambre transformée durant de nombreuses années en un "Capharnaüm" rempli d'éprouvettes, de suspensions douteuses et de microscopes.

Le ministère de la recherche et de la santé et l'association pour la recherche contre le cancer (A.R.C.) m'ont accordé une bourse qui m'a permis de mener ce travail à bien; qu'ils en soient remerciés.

Enfin je rends hommage à tous les scientifiques, inconnus ou célèbres, qui ont contribué, par leur travail, leur génie ou leur curiosité, à faire avancer les connaissances et les techniques nous permettant ainsi de progresser sur des bases solides dans la découverte des mystères de la vie.

Ce travail a fait l'objet des publications suivantes:

"Different regulatory responses of the adenovirus types 2, 3 and 12 E1A promoters". VERWAERDE P., LEITE J.P.G. and D'HALLUIN J.C. J. VIROL. submitted for publication

"Binding of nuclear factors on E1A transcription initiation site: role in transcription regulation". VERWAERDE P. and J-C D'HALLUIN. Nucl. Acids Res. manuscript in preparation.

"Role of E1A conserved leader sequence in translation regulation". VERWAERDE P. and J-C D'HALLUIN. Mol. Cell. Biol. manuscript in preparation.

Communication orale:

"Adenovirus cis-acting elements involved in BRK cells transformation" VERWAERDE P., COUSIN C., LECLERE V., and D'HALLUIN J.C. (1989) : the Imperial cancer research fund 1989 tumour virus meeting on SV40, Polyoma & adenovirus.

Communications par affiche:

"The E1A region of adenoviruses 2, 3 and 12 : role of 5'non-coding sequences and the encoding sequences in transformation and transient expression" J.P.G. LEITE, M. MILLEVILLE, P. VERWAERDE and J.C. D'HALLUIN. (1988) . the fourth encontro nacional de virologia SAO LOURENCO (BRESIL).

"The E1A region of adenoviruses 2, 3 and 12 : role of 5'non-coding sequences and the encoding sequences in transformation and transient expression" J.P.G. LEITE, M. MILLEVILLE, P. VERWAERDE and J.C. D'HALLUIN. (1988) . The Cold Spring Harbor 1988 tumour virus meeting on SV40, Polyoma & adenovirus.

"Eléments agissant en cis dans la transformation cellulaire par les adénovirus"
VERWAERDE P., LEITE JPG., LECLERE V. et D'HALLUIN J.C. (1989).
15ème réunion du groupe développement. PARIS. Thème: multiplication, différenciation et transformation cellulaire.

"Identification of nuclear factors that bind the highly conserved E1A cap site region"
VERWAERDE P. and D'HALLUIN J-C. (1990). The Cold Spring Harbor 1990 tumor virus meeting on SV40, Polyoma and adenovirus.

LEXIQUE**Cellules:**

- HEK-293 : Lignée établie de cellules embryonnaires de rein humain 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.

Gènes:

- cat* : gène d'origine procaryote codant pour la chloramphénicol acétyl transférase.
Ha-ras : oncogène du sarcome murin de Harvey.
néo : gène procaryote de résistance à la néomycine.

Virus:

- Ad : adénovirus.
 SV40 : papovavirus du singe.
 virus du polyome: papovavirus de l'homme.

Réactifs:

- BrET : bromure d'éthidium.
 CsCl : chlorure de césium.
 HEPES : acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-éthanesulfonique.
 SDS : dodécyl sulfate de sodium.
 dCTP : déoxycytidine triphosphate.

Autres abbréviations:

- AA : acide aminé
 ADNc : ADN complémentaire.
 dl : délétion.
 E : early (précoce).
 kDa : kilodalton.
 L : late (tardif).
 MLP : major late promoter (promoteur majeur tardif).
 nt : nucléotide.
 pb : paire de bases.
 R : résidu
 S : coefficient de Svedberg
 U.V. : ultra violet

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	17
GENERALITES	20
I CLASSIFICATION DES ADENOVIRUS HUMAINS	21
II ASPECTS STRUCTURAUX	23
1) Structure de la particule virale	23
2) Structure et organisation du génome	24
III LES CYCLES VIRAUX	26
1) Le cycle infectieux	27
a) L'adsorption et la pénétration	28
b) La phase précoce	29
c) La réplication du génome viral	31
d) La phase tardive	32
2) Le cycle abortif	33
3) La transformation virale	33
IV LA REGION E1A	34
1) L'organisation de E1A	34
2) Les fonctions de E1A (revue par Berk, 1986)	36
a) La transactivation	36
b) La trans-répression	39
c) Régulation du cycle cellulaire	39
d) La transformation	39
V - LE PROMOTEUR DE LA REGION E1A	43
1) Les séquences activatrices ou enhancers de l'Ad2 et de l'Ad5	44
2) Les facteurs cellulaires impliqués	45
3) Etudes concernant la région entourant le site d'initiation de la transcription	47
VI ROLES DES SEQUENCES 5'-NON CODANTES	48

TRAVAUX PERSONNELS.....	53
I ETUDE INFORMATIQUE DES HOMOLOGIES ET DE LA STRUCTURE SECONDAIRE POTENTIELLE DE LA SEQUENCE CONSERVEE.....	54
1) Comparaison des homologues de séquences nucléotidiques existant au niveau du site d'initiation de la transcription entre différents adénovirus.....	54
2) Localisation de la <i>séquence conservée</i>	54
3) Homologies avec des séquences de régulation connues.....	56
4) Structure de la séquence conservée sous forme d'ADN.....	56
5) Calcul de la structure secondaire potentielle de la séquence 5' non-codante de l'ARNm E1A.....	57
II TRANSFORMATION DE CELLULES PRIMAIRES PAR LA REGION E1A MUTEE DANS LA SEQUENCE CONSERVEE EN COOPERATION AVEC <i>HA-RAS</i>	59
1) Clonage de la région E1A.....	59
2) Mutation par délétion de la <i>séquence conservée</i>	59
3) Transformation des cellules primaires de reins de rat.....	62
4) Etablissement de lignées de cellules transformées par les mutants et étude de l'expression de E1A.....	63
5) Analyse des taux de transcription dans les lignées en fonction des délétions.....	63
6) Mesure des taux de traduction au sein des lignées établies.....	64
III IDENTIFICATION D'INTERACTIONS ADN-PROTEINES AU NIVEAU DE LA SEQUENCE CONSERVEE.....	66
1) Sous-clonage de la <i>séquence conservée</i> isolée.....	66
2) Détection et caractérisation des interactions ADN-protéines.....	66
3) Analyse des variations de protéines affines pour la séquence	

conservée en fonction du type de cellule.	68
4) Restriction des interactions ADN-protéine sur un oligonucléotide correspondant à la <i>séquence conservée</i>	70
5) Mutagenèse de la <i>séquence conservée</i> au niveau du site d'initiation de la transcription.	70
6) Identification de la masse apparente en gel des protéines se fixant sur la séquence entourant le site d'initiation de la transcription de E1A.	71
7) Localisation des interactions ADN-protéines dans la séquence entourant le site d'initiation de la transcription par "footprinting"	73
IV TRANSCRIPTION IN VITRO DES REGIONS E1A DELETEES.	75
V COMPLEXES ARN-PROTEINES NUCLEAIRES: INFLUENCE DE LA <i>SEQUENCE CONSERVEE</i>	77
1) sous-clonage des fragments E1A dans le vecteur pSP64 permettant la synthèse d'ARN in vitro.	77
2) Pontage ARN-protéines nucléaires par irradiation U.V.	78
3) Etude de la stabilité des ARN délétés dans un extrait nucléaire en fonction de la complexation ARN-protéine.	79
VI INFLUENCE DE LA SEQUENCE CONSERVEE SUR L'EXPRESSION DU GENE <i>CAT</i> CLONE SOUS LE CONTROLE DU PROMOTEUR E1A.	80
1) Sous-clonage du gène de la Chloramphénicol acétyl-transférase sous le contrôle du promoteur E1A type sauvage ou délété dans la séquence conservée.	80
2) Dosage de l'activité CAT in vivo sous le contrôle du promoteur E1A.	81
VII INFLUENCE DE LA SEQUENCE 5'-NON CODANTE SUR LA TRADUCTION IN VITRO.	82

1) Mutagénèse dirigée: obtention d'un site <i>Hind</i> III au niveau du site d'initiation de la transcription	82
2) Traduction in vitro	82
VIII INTERACTIONS DE PROTEINES CYTOPLASMIQUES AVEC LA SEQUENCE CONSERVEE DE LA REGION 5' NON-CODANTE DE L'ARNm E1A.....	84
IX EXPRESSION DES PROTEINES E1A EXPRIMEES A PARTIR DES DIFFERENTS MUTANTS	87
1) Transactivation du promoteur E2A cloné en amont du gène <i>cat</i> :.....	87
X LOCALISATION DU SITE D'INHIBITION INTERSEROTYPIQUE.....	89
DISCUSSION	91
I HOMOLOGIES DE SEQUENCES ET ROLES POTENTIELS.....	92
II STRUCTURES POTENTIELLES.	93
III INFLUENCE DE LA <i>SEQUENCE CONSERVEE</i> SUR LA TRANSFORMATION PAR E1A	94
IV LES INTERACTIONS ADN-PROTEINES	95
V TRANSCRIPTION IN VITRO	98
VI COMPLEXES RIBONUCLEOPROTEIQUES NUCLEAIRES ET STABILITE DES ARN.....	100
VII ESTIMATION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES E1A EN FONCTION DES DELETIONS	102
VIII TRADUCTION IN VITRO DES ARN DELETES DE LA <i>SEQUENCE CONSERVEE</i>	103
IX FIXATION DE PROTEINES CYTOPLASMIQUES SUR LA SEQUENCE 5'-NON CODANTE.....	105
X LOCALISATION DU SITE D'INHIBITION INTERSEROTYPIQUE DES REGIONS E1A DES ADENOVIRUS DE TYPE 2,3 ET 12.....	107
CONCLUSION	109

I QUEL EST LE ROLE DE LA SEQUENCE CONSERVEE ?	110
II POURQUOI LA SEQUENCE CONSERVEE L'EST-ELLE ?.....	111
BIBLIOGRAPHIE	114
APPENDICE TECHNIQUE	138
I TECHNIQUES DE GENIE GENETIQUE.....	139
A) TRANSFORMATION BACTERIENNE.....	139
1 - TRANSFORMATION D'E.coli, SOUCHE HB101	139
2 - TRANSFORMATION D'E. coli SOUCHE JM109 (phage M13)	139
3 - SELECTION DES CLONES	140
a) Méthode des "tailles"	140
b) Méthode de dénaturation par la chaleur.....	140
B) PURIFICATION DE PLASMIDES.....	141
C) TECHNIQUES DE MUTAGENESE	141
1) Délétions d'ADN par l'exonucléase <i>Bal31</i>	141
2) Mutagenèse dirigée	142
3) Séquençage de l'ADN.....	142
a) Solutions stocks et tampons.....	142
b) Préparation de l'ADN plasmidique.....	143
c) Séquençage.....	143
II CULTURE CELLULAIRE	144
1) LIGNEES CONTINUES	144
a) Culture sur boites	144
b) Culture en suspension	144
2) Culture de cellules primaires.....	144
3) Techniques virologiques	145
a) Infection virale	145
b) Purification de virus.....	145

III ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES	146
1) Transfection de plasmides dans les cellules.....	146
2) Analyse des ARNm	146
a) Extraction des ARNs totaux	146
b) Transfert des ARNs sur membrane: "Northern blot"	147
c) Cartographie des ARNm: protection contre les ARNases par ARN anti-sens.....	148
d) Transcription in vitro.....	149
d-1 Préparation d'extrait transcriptionnel	149
d-2 Transcription	150
3) Analyse des protéines	151
a) Transfert de protéines sur membrane et révélation par anticorps spécifiques: Immunoblots.	151
b) Dosage de l'activité Chloramphénicol acétyl transférase (activité CAT)	151
c) Traduction in vitro	152
c-1) Synthèse de la matrice ARN coiffée	152
c-2) Traduction in vitro.....	153
IV INTERACTIONS PROTEINES-ACIDES NUCLEIQUES.	153
1) Préparation d'extraits cellulaires	153
a) Extrait nucléaire.....	153
b) Extrait cytoplasmique	154
2) Retard d'ADN en gel d'acrylamide	154
1) Préparation du gel	154
2) Tampon de migration.....	155
3) Pontage UV ADN-protéines	155
4) Détermination du site d'interaction ADN-protéine: "Footprinting"	155

5) Pontage UV ARN-protéines 156

 1) Synthèse des matrices ARNs bromées(Méthode originale) 156

 2) pontage UV 157

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Tableau I: Classification des adénovirus humains.	22
Figure 1: Représentation de la capsid virale.	23
Figure 2: Génome de l'adénovirus.....	24
Figure 3: Cartographie de la région E1A.	26
Figure 4: schématisation des trois cycles viraux.	27
Figure 5: Adsorption, pénétration et décapsidation de la particule virale dans la cellule hôte (Seth et al., 1986).	29
Figure 6: Cinétique d'expression des régions précoces de l'adénovirus.....	30
Figure 7: réplication du génome viral selon un mode semi réplicatif (Lechner et Kelly, 1977).....	31
Figure 8: Modèle de Guggenheimer et al. (1984) montrant le rôle des protéines cellulaires et virales dans la réplication.	32
Figure 9: Représentation des transcrits épissés de la région E1A.	34
Figure 10: Schématisation du doigt de zinc de la région E1A.	35
Figure 11: Transactivation des régions précoces de l'adénovirus par les protéines E1A de l'adénovirus.(Smith et al., 1985).	36
Figure 12: Auto-répression des produits de la région E1A sur leur promoteur.	37
Figure 13: Alignement des ARNm 12S et 13S avec les régions conservées des protéines E1A.	37
Figure 14: Transformation d'une cellule par les sérotypes 5 et 12 de l'adénovirus.	40
Figure 15: Liaison des protéines E1A avec les protéines cellulaires anti-oncogènes: p105-Rb, p107K et p300K (Harlow, 1988)	42
Figure 16: Liaison de antioncogènes p105-Rb et p53 en fonction des protéines oncogènes de virus à ADN.....	43
Figure 17: Schématisation du promoteur E1A.	43
Figure 18: Délétions introduites dans la <i>séquence conservée</i> par Hearing et Shenk	

(1983).....	47
Figure 19: Etendue des délétions introduites par Osborne et al.. (1982).	48
Figure 20: Initiation de la traduction selon Shatkin (1985).	50
Figure 21: Illustration de l'inhibition de la traduction par l'intermédiaire d'une interaction avec une structure secondaire de la région 5' non-codante de l'ARNm.	52
Figure 22: Illustration des recherches d'homologies entre les différents adénovirus.	55
Figure23: Alignement des séquences conservées entourant le site d'initiation de la transcription des adénovirus humains de types 2, 3, 4, 5, 7, 12, 40 et 41.	55
Figure24: Illustration de la structure secondaire potentielle calculée en fonction de la séquence symétrique entourant le site d'initiation de la transcription de la région E1A de l'adénovirus 2.	57
Figure 25: Structure secondaire potentielle de la séquence 5' non-codante des ARNm E1A calculée selon la méthode de Zucker (1981).	58
Figure26: Illustration de la stratégie de délétion:.....	60
Figure 27: Electrophorèse des produits de délétion.	61
Figure 28: Localisation des délétions au niveau de la <i>séquence conservée</i>	61
Figure 29: Taux de transformation induit après transfection de cellules primaires de reins de rats nouveau-nés par les mutants E1A délétés dans la <i>séquence</i> <i>conservée</i> en coopération avec ras.	62
Figure 30: Transcription dans les lignées de cellules transformées par les mutants E1A en coopération avec l'oncogène ras activé.....	65
Figure 31: Traduction dans les lignées de cellules transformées.	65
Fig 32: Détection des interactions ADN-protéines	67
Figure 33: Interactions ADN-protéines dans un extrait nucléaire de cellules KB3	68
Figure 34: Retard en gel de polyacrylamide de la <i>séquence conservée</i> en présence d'extrait de HeLa, KB3 ou HEK-293.	69
Figure 35: Retard en gel de polyacrylamide de l'oligonucléotide correspondant à la	

séquence palindromique incubé en présence de 10 µg d'extrait nucléaire de cellules KB3.....	71
Figure 36: Protéines affines pour la <i>séquence conservée</i>	72
Figure 37: Empreinte à la DNase I de la zone d'interaction des protéines avec la <i>séquence conservée</i>	74
Figure 38: Transcription <i>in vitro</i> des plasmides délétés de la <i>séquence conservée</i>	76
Figure 39: Clonage des séquences transcrites de l'ADNc 12S E1A délétées ou mutées dans la <i>séquence conservée</i> dans le plasmide vecteur psp64 à l'aide des sites d'enzymes de restriction Hind III et Pst I.	77
Figure40: Instabilité des ARN délétés de la <i>séquence conservée</i> dans un extrait nucléaire:	79
Figure 41: Clonage du gène cat en aval des promoteurs E1A délétés ou non de la <i>séquence conservée</i>	80
Figure 42 : Mesure de l'activité du promoteur E1A délété dans la <i>séquence conservée</i> :	81
Figure 43: Traduction <i>in vitro</i> des ARN délétés dans la <i>séquence conservée</i> dans un lysat de réticulocytes.....	83
Figure 44: Protéines cytoplasmiques se liant à la séquence 5' non-codante de l'ARNm E1A en fonction des délétions introduites dans celle ci.	86
Figure 45: Estimation de l'expression des protéines E1A à partir de plasmides délétés dans la <i>séquence conservée</i>	88
Figure46: Influence des protéines E1A des sérotypes 2, 3 et 12 sur l'activité du promoteur E1A délété de la <i>séquence conservée</i>	90
Figure 47: Fixation hypothétique des protéines de 10-12 kDa (11 kDa) et 18,5 kDa sur la séquence entourant le site d'initiation de la transcription.	97
Figure 48: Fixation possible de la protéine de 10-12 kDa (11 kDa) sur la structure secondaire potentielle calculée d'après la séquence primaire.	98
Figure49: Structure complexe de la séquence 5' non-codante transcrite à partir du	

MLP de l'adénovirus.	99
Figure 50: Interaction possible de la <i>séquence conservée</i> avec le facteur TFIID par liaison directe ou par l'intermédiaire d'un facteur protéique.....	100
Figure 51: Illustration des structures secondaires potentielles calculées d'après la séquence des ARN WT muté Hind III et dl16.	104
Figure 52: Modélisation des interactions de la 33 kDa avec la structure complexe conservée de l'ARNm E1A.	106
Figure 53: Illustration de l'inhibition de la traduction par une structure complexe de la séquence 5' non-codante de l'ARNm.....	107
Figure 54: Schématisation du complexe ADN-protéines représentant le génome de l'adénovirus lié avec les protéines du "core": pV et pVII (Wong et Hsu, 1989).	113

INTRODUCTION

Les adénovirus, dénomination familière des adenoviridae, ont été largement utilisés ces dernières années comme systèmes modèles pour l'étude de la transformation cellulaire, et plus généralement pour l'analyse des mécanismes de l'expression génétique chez les eucaryotes. C'est à l'occasion de recherches sur la structure et l'expression du génome de ces virus que furent découverts l'organisation morcelée des gènes eucaryotes et l'épissage des ARN messagers. Ces virus constituent un matériel particulièrement précieux pour l'étude des mécanismes moléculaires et leur modélisation, au niveau de la transcription et de la traduction.

Parmi ceux-ci se distingue l'adénovirus de type 2, responsable d'affections respiratoires bénignes chez l'homme. Néanmoins son principal intérêt réside dans l'étude de l'expression de ses gènes qui font l'objet d'un travail important dans le monde entier et constituent des références tant dans l'étude des phénomènes accompagnant la transcription, tels les promoteurs MLP, E2, E3 ou E1A, l'épissage des ARN, la traduction de ceux-ci en protéines, avec l'utilisation en standard des structures tripartites du MLP et des "VA RNA", et surtout et enfin la Transformation cellulaire. En un mot l'adénovirus 2 représente l'un des modèles les plus prisés d'étude de l'expression des gènes eucaryotes.

Parmi ces gènes la région d'expression précoce E1A, encore appelée l'oncogène E1A, est le point de mire de la plupart de ces études. Ce remarquable gène est responsable d'une avalanche de phénomènes plus ou moins compris. Ceux-ci vont de la régulation de l'expression de gènes tant viraux que cellulaires à la Transformation oncogénique de cellules en passant par de nombreuses inductions notamment au niveau du cycle cellulaire et de la synthèse d'ADN.

On connaît à peu près tout de cette petite région de quelques 1600 paires de bases (en comparaison aux centaines de milliers de paires de bases constituant la plupart des gènes cellulaires) sans toutefois bien appréhender la nature de ses nombreuses fonctions.

Parmi ces 1600 paires de bases, se distingue une toute petite zone, longue de 45 paires de bases et entourant le site d'initiation de la transcription de E1A, mais dont

l'étonnante caractéristique est d'être préservée de toute mutation, hautement conservée, chez tous les adénovirus humains, simiens ou même canins chez qui les homologies de génome sont parfois très faibles. Cette conservation remarquable ne va pas sans cacher quelque fonction importante. C'est pourquoi nous avons entrepris d'étudier et de découvrir quel est son rôle.

GENERALITES

I CLASSIFICATION DES ADENOVIRUS HUMAINS

L'adénovirus a été isolé pour la première fois en 1953 par ROWE *et al.*. Les adénovirus sont très répandus dans la nature. Plus de 40 sérotypes différents sont déjà répertoriés comme agents infectieux chez l'homme, plus de 20 chez les autres primates, au moins une dizaine chez les bovins et différents sérotypes infectant spécifiquement les souris et les chiens. On en connaît également chez les oiseaux, tel le Tupaïa, et chez les amphibiens. Tous ces virus sont transformants *in vitro*. Ne seront évoqués ici que les virus humains, qui font l'objet de notre étude.

Les 48 sérotypes humains sont répartis en 6 sous-groupes, A, B, C, D, E et F, définis selon des critères biochimiques, biologiques et pathologiques (Adrian *et al.*, 1985)(Tableau). Les données les plus quantitatives concernent les homologies de séquence entre les différents adénovirus. C'est ce critère qui a permis d'établir cette classification. Les homologies de séquence entre les différents génomes de virus appartenant à un même sous-groupe sont généralement supérieures à 80%. En revanche, les homologies de séquence entre les génomes de virus appartenant à des sous-groupes différents peuvent descendre en dessous de 10%. Les mêmes clivages se retrouvent entre les différents sous-groupes de virus si l'on utilise d'autres paramètres de classification (Wadell, 1978), comme les contenus en G+C (Pina and Green, 1965), les données antigéniques ou les effets pathologiques (Niel, 1989).

Cette classification permet, en particulier, de bien distinguer les adénovirus en fonction de leur pouvoir oncogène chez le hamster nouveau-né qui sert de référence (Tableau I). En effet si les adénovirus humains sont tous capables de transformer les cellules *in vitro*, seuls certains d'entre eux peuvent induire des tumeurs *in vivo*. Seuls les adénovirus appartenant aux sous-groupes A et B ont cette possibilité.

Le sous-groupe A comprend les adénovirus 12, 18 et 31 qui sont caractérisés par un potentiel oncogène élevé *in vivo*. Ils sont, en effet, capables d'induire la formation de tumeurs chez les rongeurs avec une très grande efficacité. En revanche les cellules transformées par les virus des autres sous-groupes ne sont pas tumorales.

Sous-groupe	Sérotypes	Homologies de séquences		Transformation	Tumorigenicité
		intra-groupe	inter-groupe		
A	12, 18, 31	45-70%	8-20%	+	++++
B	3, 7, 11, etc...	90-95%	9-20%	+	+
C	1, 2, 5, 6	99-100%	10-16%	+	-
D	8, 9, 10, etc...	95-99%	4-17%	+	-
E	4	"100%"	4-23%	+	-
F	40, 41	62-69%	15%	+	-

Tableau I: Classification des adénovirus humains.

Parmi les virus de ces différents sous-groupes certains ont fait l'objet d'études particulièrement approfondies. Ainsi l'adénovirus de type 12 du sous-groupe A (que l'on note Ad12) constitue le prototype de l'adénovirus oncogène *in vivo*, alors que les sérotypes 2 et 5 du sous-groupe C sont plus étudiés dans le cadre de la régulation de l'expression du génome eucaryote. L'adénovirus 3 du sous-groupe B a également fait l'objet d'études plus attentives.

II ASPECTS STRUCTURAUX

1) Structure de la particule virale

Produites en grandes quantités au cours du cycle lytique, les protéines structurales de l'adénovirus sont aisément purifiables (Maizel *et al.*, 1968, Ishibashi and Maizel, 1974, Everitt *et al.*, 1975).

La structure de la capside de l'adénovirus a ainsi été l'une des plus étudiées.

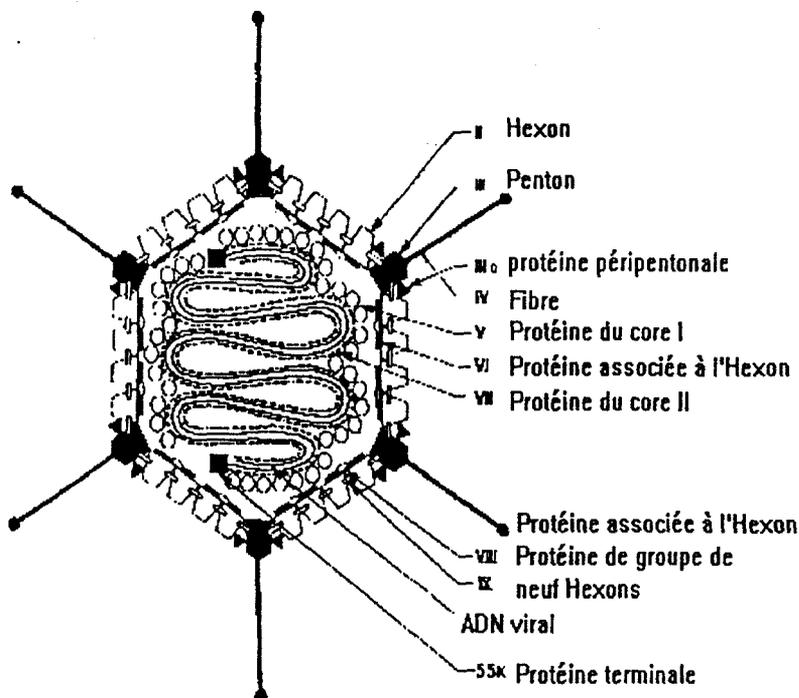


Figure 1: Représentation de la capside virale.

Les adénovirus sont des virus nus dont l'ADN est renfermé dans une capside de symétrie icosaédrique et dont la taille varie de 70 à 80 nm. La capside est composée de 252 capsomères, comprenant les pentones et les hexones (Horne *et al.*, 1959. Morgan *et al.*, 1969). Les 12 sommets de l'icosaèdre sont constitués de pentones, eux mêmes hérissés de fibres ressemblant à des antennes surmontées d'une boule. Les faces de l'icosaèdre sont constituées de 150 hexones. Toutes ces structures protéiques portent différents déterminants antigéniques.

2) Structure et organisation du génome.

Le génome des adénovirus est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire linéaire, dont la taille peut varier de 30 à 50000 pb (Sussenbach, 1984, Akusjarvi *et al.*, 1986). L'ADN viral est associé à des protéines basiques de type histone, codées par l'ADN viral et appelées pV, pVII et μ (Nermut, 1979).

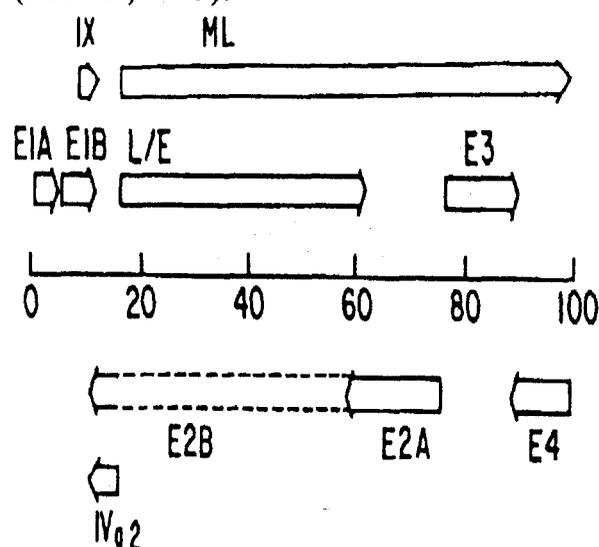


Figure 2: Génome de l'adénovirus.

La région E1A est comprise dans les 5% du génome situés à gauche.

La séquence de tout ou partie de ces génomes et surtout la région précoce E1, dont une partie fait l'objet de cette étude, est connue.

L'ADN viral comporte à ses extrémités, des séquences répétées inversées (Wolfson *et al.*, 1972), qui permettent la formation de structures circulaires monocaténares comportant une queue caractéristique et intervenant dans la réplication de l'ADN de l'adénovirus (Robinson *et al.*, 1973). Les extrémités 5' des deux brins de l'ADN sont liées de façon covalente à une protéine codée par le virus. Cette protéine est utilisée comme amorce et initie la réplication (Rekosh *et al.*, 1977).

Les régions du génome de l'adénovirus ont été caractérisées en régions précoces (E) et tardives (L) en fonction de leur expression durant le cycle viral. Schématisée sur la figure

2, la carte du génome est divisée par convention en 100 unités.

Les gènes précoces et tardifs, codés selon les deux orientations de l'ADN, sont intriqués les uns dans les autres; seule la région E1 est isolée du reste du génome.

Les gènes tardifs sont tous codés par le même brin, appelé le brin droit. Alors que les régions d'expression précoce sont réparties sur tout le génome et portées par les deux brins de l'ADN viral.

Les régions précoces sont divisées en six régions indépendantes et sont les seules transcrites durant la première partie du cycle viral.

Les régions E1 et E2 sont subdivisées en deux parties, appelées respectivement E1A, E1B et E2A, E2B; les autres régions précoces sont appelées E3 et E4; les régions tardives ont pour préfixe L (à l'exception des régions IX et IVa2) nommées de L0 à L5.

Chacune de ces régions correspond à une unité de transcription, utilisant le même promoteur, mais pouvant générer différents ARN messagers et différentes protéines par le jeu d'épissages multiples et de sites de polyadénylation variables.

L'organisation générale des génomes des adénovirus est bien conservée entre les différents sérotypes.

Il faut rappeler que le système d'expression de l'adénovirus constitue un excellent modèle d'épissage alternatif (Chow *et al.*, 1978) et son étude est à l'origine de la découverte des mécanismes d'épissage (Berk and Sharp, 1977).

La région E1A illustre bien ce mécanisme (fig 3), l'organisation et l'expression de cette région sera approfondie dans le chapitre IV.

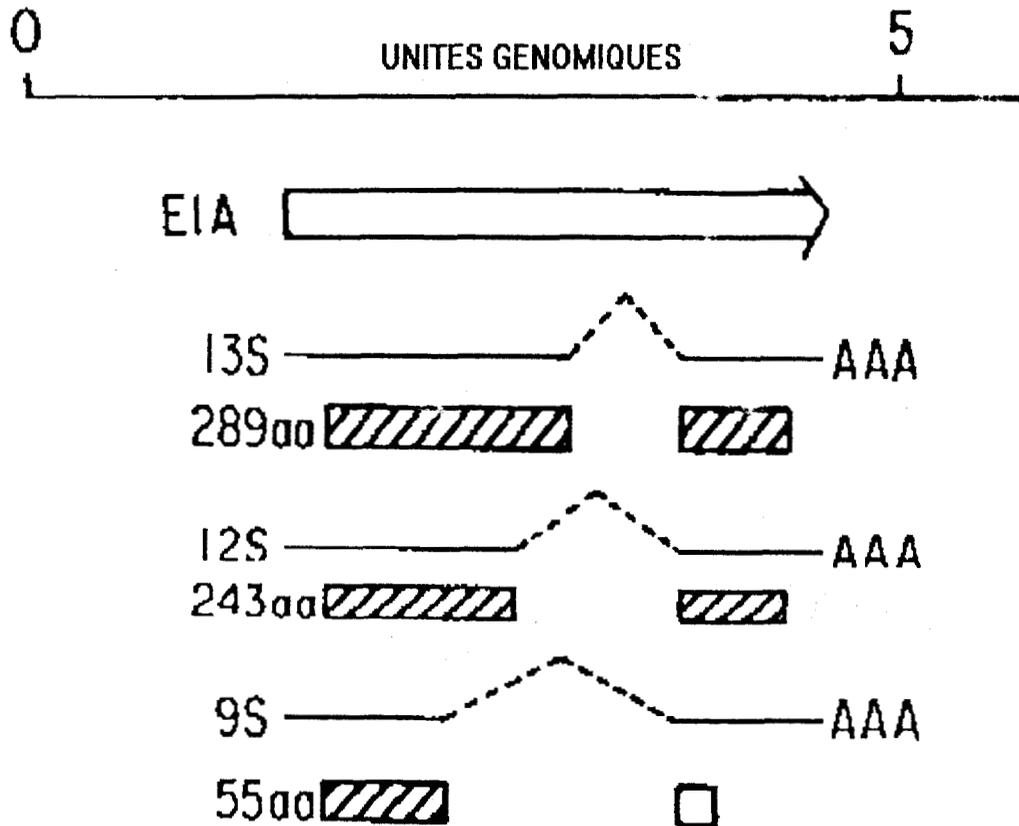


Figure 3: Cartographie de la région E1A.
Les ARNm sont les produits d'un épissage alternatif de l'ARN primaire.

III LES CYCLES VIRAUX

Les interactions du virus avec une cellule sont très diverses et ne conduisent pas toujours à une production virale efficace. Trois grands types de cycles viraux se distinguent ainsi: le cycle infectieux classique où le virus pénétrera dans une cellule et s'y multipliera, le cycle abortif où le virus pénétrera dans une cellule dans laquelle il ne pourra se répliquer et enfin la transformation virale qui conduira à une transformation oncogénique de la cellule (fig 4).

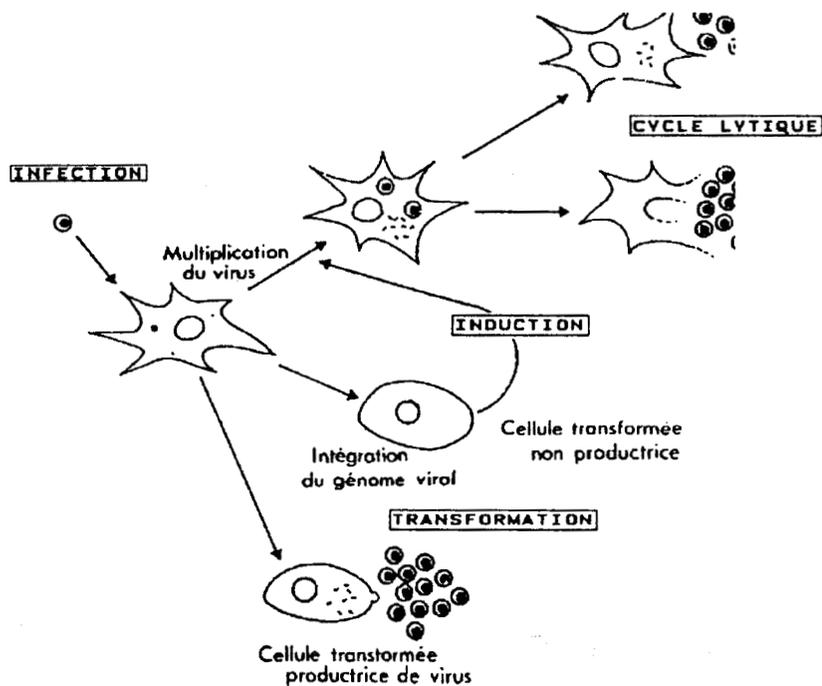


Figure 4: schématisation des trois cycles viraux.

1) Le cycle infectieux

L'étude des différentes phases du cycle infectieux des adénovirus a été réalisée dans des cellules humaines cultivées telles les cellules HeLa et KB.

L'adénovirus n'est apparemment qu'un morceau d'ADN entouré de protéines et tant qu'il ne se sera pas fixé sur un récepteur et n'aura pas pénétré dans une cellule, il semblera inerte, sans activité biologique décelable.

Néanmoins, une fois "dans la place", l'adénovirus va ébranler la machinerie cellulaire pour la mettre à son service avec un seul objectif: se multiplier.

Pour cela l'adénovirus possède un large éventail d'outils. L'adénovirus possède un génome qui code pour de nombreuses protéines, parfois homologues de protéines cellulaires, qui permettront de répliquer le génome viral et de l'encapsider dans un cocon protéique.

Le génome de l'adénovirus code ainsi pour une ADN polymérase, une protéase, des facteurs de transcription, des pseudo histones virales (pV et pVII), des pseudo récepteurs hormonaux et des protéines de structure, le tout codé par un petit chromosome de 36000 paires de bases...!

La région E1A s'exprime en grande partie au stade précoce de l'infection et s'impose comme "chef d'orchestre" de l'expression du génome viral (Berk *et al.*, 1979).

Afin de replacer l'influence de la séquence étudiée dans son contexte naturel, le cycle lytique de l'adénovirus sera retracé. Les événements qui suivent la pénétration du virus dans la cellule se déroulent en trois phases sur une période de 40 heures:

- le stade précoce, durant lequel s'expriment des gènes qui en définitive permettront la réplication efficace du génome viral.
- le stade intermédiaire qui débute avec la réplication de l'ADN viral
- le stade tardif où les protéines de la capsidie seront synthétisées et où le génome sera encapsidé.

a) L'adsorption et la pénétration

L'adsorption du virus s'effectue au niveau d'un récepteur cellulaire spécifique (Chardonnet and Dales, 1970). Puis, après invagination de la membrane plasmique et formation d'un endosome, celui-ci migrera jusqu'au noyau où la capsidie sera détruite. L'ADN viral sera alors libéré; la transcription des régions précoces, quasi immédiate, va alors s'opérer selon une cinétique précise (Seth *et al.*, 1986).

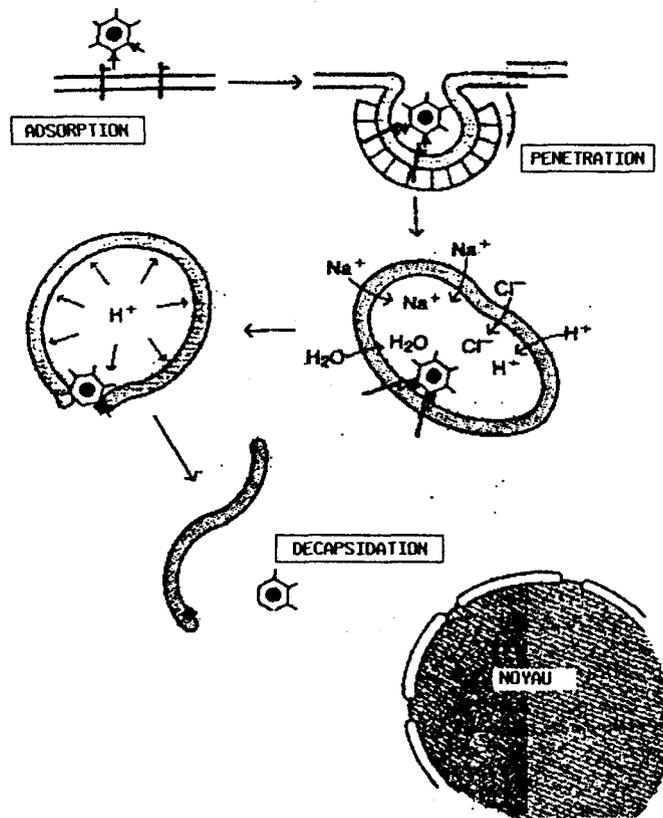


Figure 5: Adsorption, pénétration et décapsulation de la particule virale dans la cellule hôte (Seth *et al.*, 1986).

b) La phase précoce

La région E1A est la première à être transcrite dès 1, 5 à 2 heures après infection pour atteindre un maximum vers 6 heures (fig 6) (les détails de son organisation et de sa transcription seront développés dans un chapitre suivant). La protéine de 289 résidus codée par l'ARNm 13S de E1A transactive l'expression des autres régions précoces de l'adénovirus (Glenn and Ricciardi, 1985, Montell *et al.*, 1982); alors que la protéine de 243 résidus, produit de la traduction de l'ARNm 12S est nécessaire pour une synthèse optimale de l'ADN viral dans des cellules maintenues quiescentes (Spindler *et al.*, 1985).

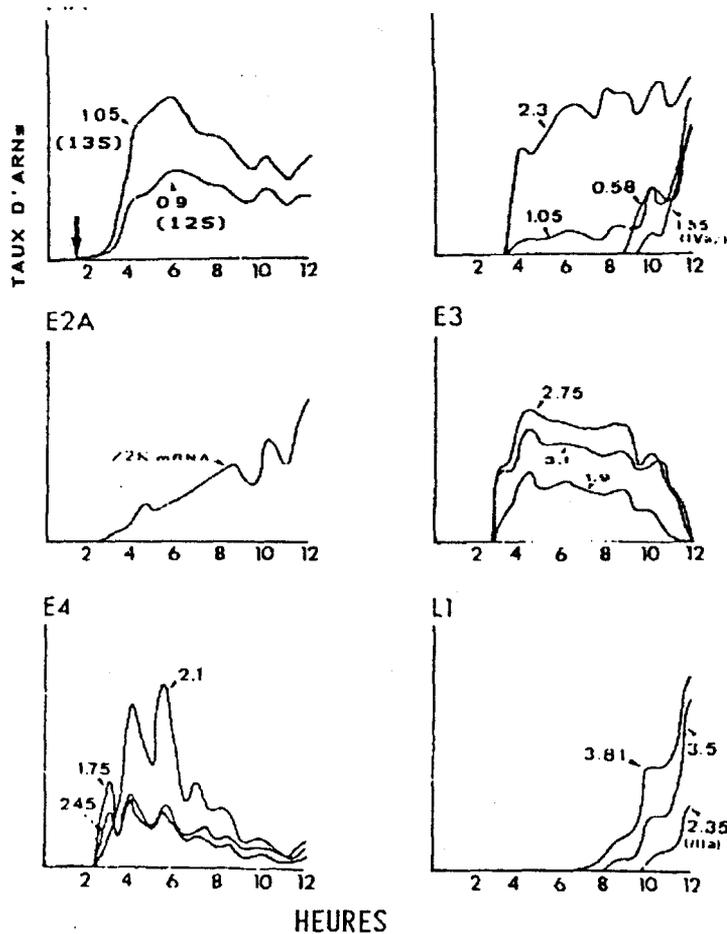


Figure 6: Cinétique d'expression des régions précoces de l'adénovirus.

La région E1A est la première à être exprimée. Son maximum d'expression se situe vers 6 heures après infection. (Glenn and Ricciardi, 1988)

La région E2A est ensuite transcrite en ARN dont les produits participent à la réplication de l'ADN viral (revue par Kelly *et al.*, 1984). La région E3 est alors exprimée; ses produits ne sont pas indispensables lors de l'infection de cellules cultivées, cependant leur rôle se situe probablement dans l'établissement d'infections persistantes (Anderson *et al.*, 1985); bientôt suivie par la région E4 qui code notamment pour une protéine mimant le rôle du récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) au profit de l'infection virale. Puis la région E1b est transcrite puis traduite en protéines de 19 kDa et 55 kDa dont les

rôles sont respectivement la réorganisation du cytosquelette cellulaire et une participation dans le transport et le contrôle de la stabilité des ARNm du noyau vers le cytoplasme. Puis plus tard dans la phase précoce la région L1 est transcrite à partir du promoteur majeur "tardif" appelé MLP. La traduction des polypeptides IVa2 et pIX et la traduction des ARN VA donne alors le signal de la phase intermédiaire du cycle viral: la réplication de l'ADN viral.

c) La réplication du génome viral

Le génome de l'adénovirus est répliqué selon un mode semi-conservatif (Lechner and Kelly, 1977)(fig7). L'initiation de la réplication s'effectue en amont de la région E1A, au niveau des séquences répétées inversées (ITR).

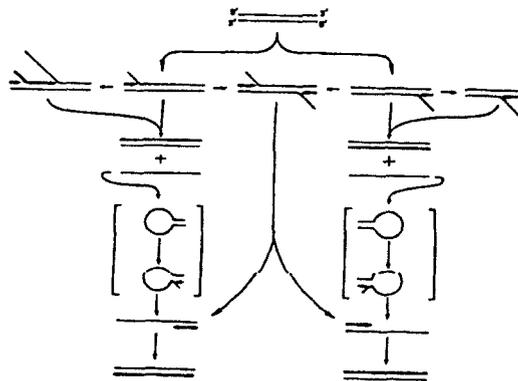


Figure 7: réplication du génome viral selon un mode semi conservatif (Lechner and Kelly, 1977)

La fixation de la pTP sur le premier nucléotide, la stabilisation de l'ADN simple brin par la DBP (DNA Binding Protein codée par E2) et l'élongation assurée par l'ADN polymérase viro-codée associée au facteur nucléaire III (NFIII) permettra la copie de plusieurs ADN viraux qui seront encapsidés ultérieurement (Nagata *et al.*, 1982, O'Neill and Kelly, 1988).

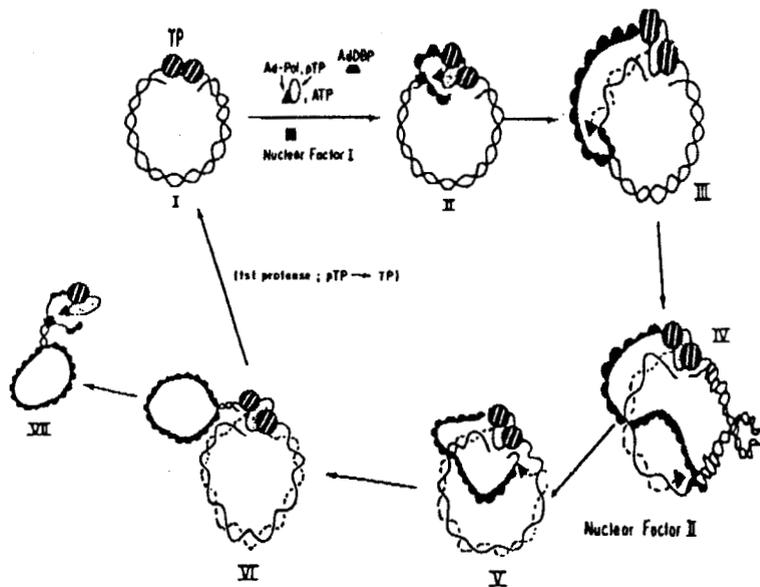


Figure 8: Modèle de Guggenheimer *et al.* (1984) montrant le rôle des protéines cellulaires et virales dans la réplication.

d) La phase tardive

Les protéines traduites lors de cette phase sont essentiellement destinées à l'assemblage et la composition de la capsid virale (fig 1). L'expression de la région E1A est inhibée (fig 12)

Un ARN 28S est transcrit à partir du MLP situé à 16, 5 unités génomes; il donne naissance après épissage différentiel à 5 familles d'ARNm correspondant aux régions L1, L2, L3, L4 et L5 (fig 2).

Les "matériaux" étant produits, le processus de l'assemblage de la capsid est alors amorcé. Après la lyse de la cellule, les quelque 105 particules matures vont alors se répartir dans le milieu, prêtes à reproduire le cycle infectieux.

2) 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'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 (revue: Delsert, 1985).

3) La transformation virale

Tous les adénovirus humains connus sont capables de transformer les fibroblastes de rongeurs cultivés et quelques sérotypes peuvent induire des tumeurs chez les rats et hamsters nouveaux-nés (Huebner *et al.*, 1962, Revues par Branton *et al.*, 1985, Graham *et al.*, 1984). Ces derniers sont classés principalement dans le sous groupe A. Ces cellules possèdent les caractéristiques phénotypiques de la transformation y compris la croissance en l'absence d'ancrage, la culture en milieu appauvri en sérum et la croissance en densité anormale. Leur morphologie leur confère un aspect plus arrondi et elles ont tendance à former des colonies denses.

Trois observations principales montrent à l'évidence que l'information virale nécessaire et suffisante à l'induction de la transformation est comprise entièrement dans les onze premiers pour cent du génome:

- D'abord, les lignées cellulaires viro-transformées contiennent et expriment toujours les gènes E1A et E1B et certaines ne contiennent que ces régions (Graham and van der Eb, 1973).

- La transfection de cellules de rongeurs *in vitro* a montré que des fragments d'ADN ne contenant que E1A et E1B sont suffisants pour conduire à la transformation (Dijkema *et*

al., 1977).

- Les virus mutants dans les régions E1A et E1B sont généralement incapables d'induire la transformation.

IV LA REGION E1A

1) L'organisation de E1A

L'unité de transcription E1A est située dans la partie gauche du génome viral et est apparemment le premier gène à être exprimé à la suite de l'infection. La transcription de E1A conduit à la synthèse de cinq ARN messagers; ceux-ci ont des extrémités 5' et 3' communes mais diffèrent dans leur épissage (fig 9). Les ARN sont nommés en fonction de leur coefficients de sédimentation: 13S, 12S, 11S, 10S et 9S (Stephens and Harlow, 1987, Ulfendahl *et al.*, 1987).

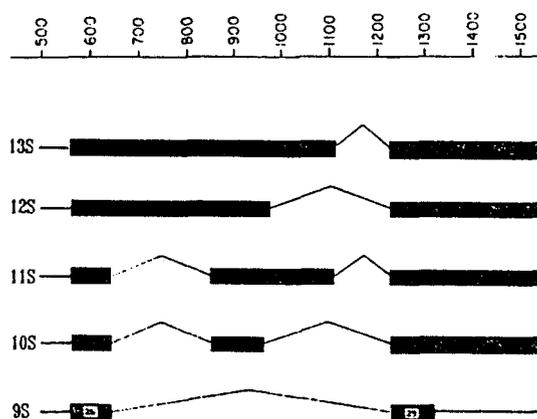


Figure 9: Représentation des transcrits épissés de la région E1A. Les 2 principaux ARNm sont appelés 12S et 13S. (Stephens et Harlow, 1987).

Les polypeptides correspondants sont généralement référencés par leur nombre d'acides aminés. Ainsi les ARNm 13S, 12S, 11S, 10S et 9S codent respectivement pour les

protéines 289R, 243R, 217R, 171R, ET 55R. Néanmoins les ARNm 12S et 13S sont les principaux ARN synthétisés et seules les protéines 243R et 289R sont étudiées. L'ARNm 9S utilise une autre phase de lecture pour produire la protéine 55R (Virtanen and Pettersson 1983).

Des produits à localisation nucléaire codés par les quatre plus grands ARNm ont été identifiés dans les cellules infectées (Schmitt *et al.*, 1987); la protéine 55R n'a pas été observée dans les cellules infectées mais peut être synthétisée dans des extraits cellulaires de traduction. Les exons des quatre ARNm les plus grands utilisent tous la même phase ouverte de lecture.

La comparaison des séquences primaires des protéines majeures E1A des différents sérotypes révèle l'alternance de domaines conservés et non conservés. Les séquences conservées phylogénétiquement ont été nommées régions conservées I, II et III (Kripl *et al.*, 1985; Lillie *et al.*, 1987; Moran *et al.*, 1986; Moran and Mathews, 1987)(RC I, RC II et RC III): (fig 13).

L'ARNm 13S contient ces trois régions, l'ARNm 12S ne contient que les RC I et II.

La RC III contient un motif potentiel de liaison au zinc appelé "doigt de zinc" (Culp *et al.*, 1988)(Fig 10).

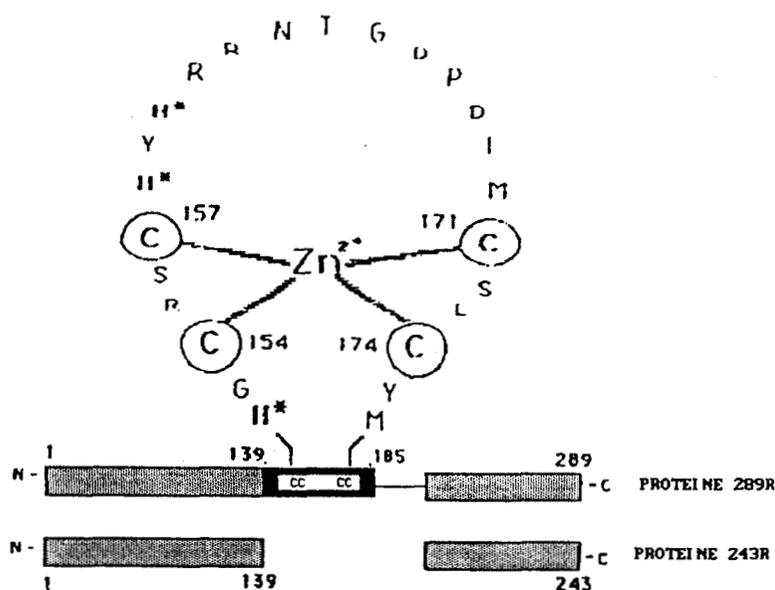


Figure 10: Schématisation du doigt de zinc de la région E1A.

Ce motif de liaison à l'ADN est situé dans les 43 acides aminés spécifiques du produit de traduction de l'ARNm 13S (Culp *et al.*, 1988).

Chacune de ces protéines subit des modifications post-traductionnelles. On a ainsi dénombré 60 formes de protéines E1A en gel bi-dimensionnel (Harlow *et al.*, 1985). La plupart de ces formes secondaires résultent d'une ou plusieurs phosphorylations. D'autres types de modifications sont suspectées mais aucune n'a été décrite jusqu'à présent.

Certaines formes de protéines E1A forment des complexes avec plusieurs protéines cellulaires: la cycline A, la p80, la p107, la p130, la p300 et notamment la p105-Rb qui a été étudiée dans le phénomène de transformation (Voir fonctions de E1A dans la transformation).

Ainsi, il existe cinq protéines E1A, 60 formes multiples et de nombreuses protéines cellulaires pouvant se complexer avec ces produits viraux; tout ceci explique l'observation des nombreuses propriétés de E1A.

2) Les fonctions de E1A (revue par Berk, 1986)

a) La transactivation.

Le gène E1A code pour une fonction transactivatrice de la transcription. Cette transactivation est effective au niveau des promoteurs des autres régions précoces de l'adénovirus mais également sur son propre promoteur (Weeks and Jones, 1983, Hen *et al.*, 1983, Hearing and Schenk, 1983, 1985, 1986, Berk, 1986, Dery *et al.*, 1987, Leite *et al.*, 1987, 1988).

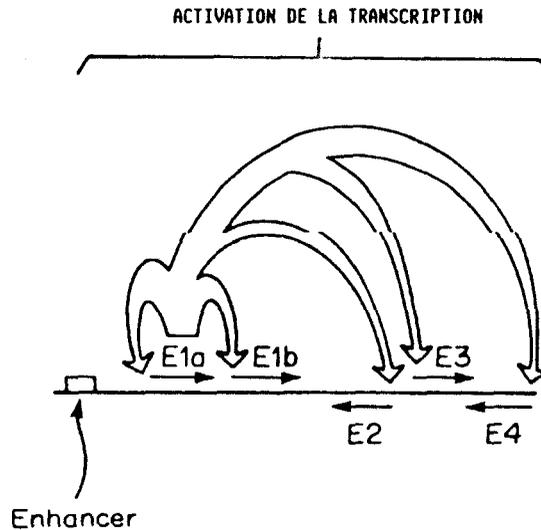


Figure 11: Transactivation des régions précoces de l'adénovirus par les protéines E1A de l'adénovirus. (Smith *et al.*, 1985).

Les protéines E1A répriment leur propre expression lors du stade tardif de l'infection qui suit le début de la réplication du génome viral. Les séquences activatrices du promoteur E1A ont été présumées comme site d'inhibition.

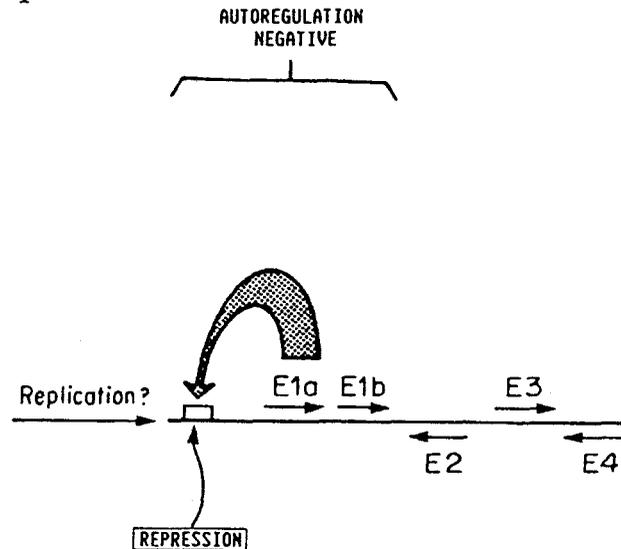


Figure 12: Auto-répression des produits de la région E1A sur leur propre promoteur. Le site d'inhibition correspondrait aux séquences enhancers du promoteur E1A. (Smith *et al.*, 1985)

La transactivation est reliée à la RC III (fig 13) qui est spécifique du produit de l'ARNm 13S. En effet, les mutations ponctuelles qui suppriment l'effet transactivateur de E1A sont situées dans cette région. Les virus reconstruits ne possédant que l'ADNc 12S ne transactivent plus les autres gènes précoces.

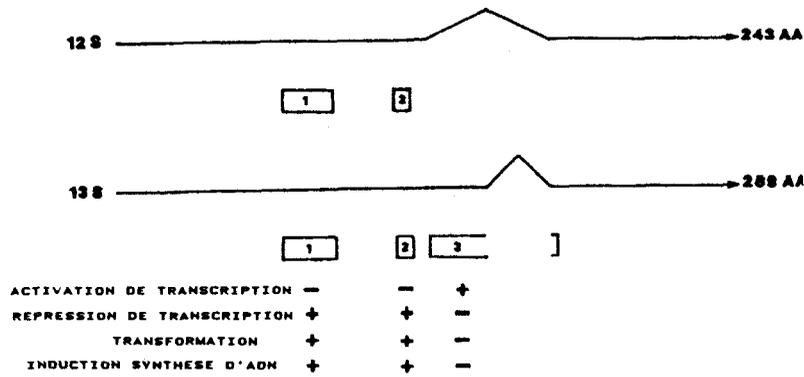


Figure 13: Alignement des ARNm 12S et 13S avec les régions conservées des protéines E1A.

Chaque région protéique conservée (CR) est reliée à une fonction particulière (Krippel *et al.*, 1985)

Les protéines E1A transactivent également des gènes cellulaires, tels les gènes de choc thermique (Kao and Nevins 1983), de β -tubuline et une grande variété de gènes cellulaires clonés lorsqu'ils sont co-transfectés en présence de E1A (Gaynor *et al.*, 1984, Borelli *et al.*, 1986).

La nature exacte de cette transactivation est encore mal connue; en effet, malgré la présence d'un doigt de zinc, caractéristique de la plupart des protéines se liant à l'ADN, E1A ne se lie pas à l'ADN (Fergusson *et al.*, 1985)(Néanmoins Chatterjee *et al.* (1988) ont photo-lié la 289R à l'ADN).

Les hypothèses tendant à expliquer ce phénomène sont diverses; E1A accroît la concentration ou l'activité d'un éventail de facteurs de transcription; l'hypothèse la plus récente est que E1A se lie avec certains facteurs de transcription et avec le facteur TFIID de liaison au motif TATA (Berk; personal communication), et stabiliserait ou modifierait ainsi le complexe transcriptionnel, alors plus efficace.

b) La trans-répression

Borelli *et al.* (1984) ont démontré que les protéines E1A inhibent la transcription d'un gène de β -globine placé sous le contrôle du promoteur du virus polyome. La cible de l'inhibition par E1A est la séquence activatrice ou "enhancer" du polyome. E1A inhiberait son propre promoteur selon un mécanisme semblable au stade tardif de l'infection. D'autres "enhancers", tels celui de SV40, du promoteur des chaînes d'immunoglobulines ou de l'insuline (Stein and Ziff, 1987) sont également réprimés par les protéines E1A. L'activité de trans-répression a été reliée aux RC I et RC II (Lillie *et al.*, 1986, 1987, Schneider *et al.*, 1987, Moran *et al.*, 1986).

Il semblerait également que la trans-répression résulterait de la liaison de E1A avec d'autres protéines cellulaires de régulation.

c) Régulation du cycle cellulaire

La 243R n'est pas nécessaire à la croissance virale dans les cellules HeLa mais active la réplication de l'adénovirus dans les cellules humaines quiescentes (Spindler *et al.*, 1985).

Ces fonctions ne sont pas bien comprises mais incluent la stimulation de la synthèse d'ADN cellulaire (Kazmarek *et al.*, 1986), l'induction de gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Braithwaite *et al.*, 1983) et la sécrétion d'un ou plusieurs facteurs de croissance (Bellet, 1983). Elles sont reliées aux domaines protéiques RC I et II.

d) La transformation.

Houweling *et al.* (1980) ont démontré qu'un fragment d'ADN comportant la région E1A de l'Ad5 peut immortaliser sans transformer complètement des cellules primaires de rongeurs. Le plus petit fragment capable de transformation comprend les 11% à gauche du génome viral. Ce fragment contient les gènes précoces E1A et une partie de E1B.

La transformation nécessite une intégration stable de l'ADN viral à des positions aléatoires dans l'ADN chromosomique.

E1A est capable seul d'immortaliser, à l'instar de l'antigène grand T du polyome, les cellules en culture. Les cellules immortalisées par E1A peuvent être cultivées indéfiniment sans être affectées par des phénomènes de sénescence; leur morphologie est de type fibroblastique, elles ne croissent pas en l'absence de support ou à hautes densités (Jochemsen *et al.*, 1986). Les deux protéines E1B de 19 kDa et 55 kDa sont capables d'induire indépendamment l'une de l'autre une transformation après immortalisation par E1A (Bernards *et al.*, 1983, 1984, 1986).

La protéine E1B de 55 kDa, nucléaire peut s'associer à la p53 comme l'antigène grand T de SV40 (fig 16). La protéine E1B de 19 kDa est partagée entre le réticulum endoplasmique et la paroi nucléaire, les rôles de ces 2 protéines sont mal connus (Stillman, 1986).

Des cellules transformées par un adénovirus oncogène peuvent échapper à la surveillance immunitaire en éliminant les antigènes d'histocompatibilité de surface.

Si l'on teste la tumorigénicité de cellules transformées par Ad12 ou Ad2 chez des animaux, seules les cellules transformées par l'Ad12 sont tumorigènes. Mais chez les souris "nude", celles transformées par l'Ad2 peuvent, quoique moins tumorigènes que les cellules transformées par l'Ad12, induire la formation de tumeurs (Jochemsen *et al.*, 1986).

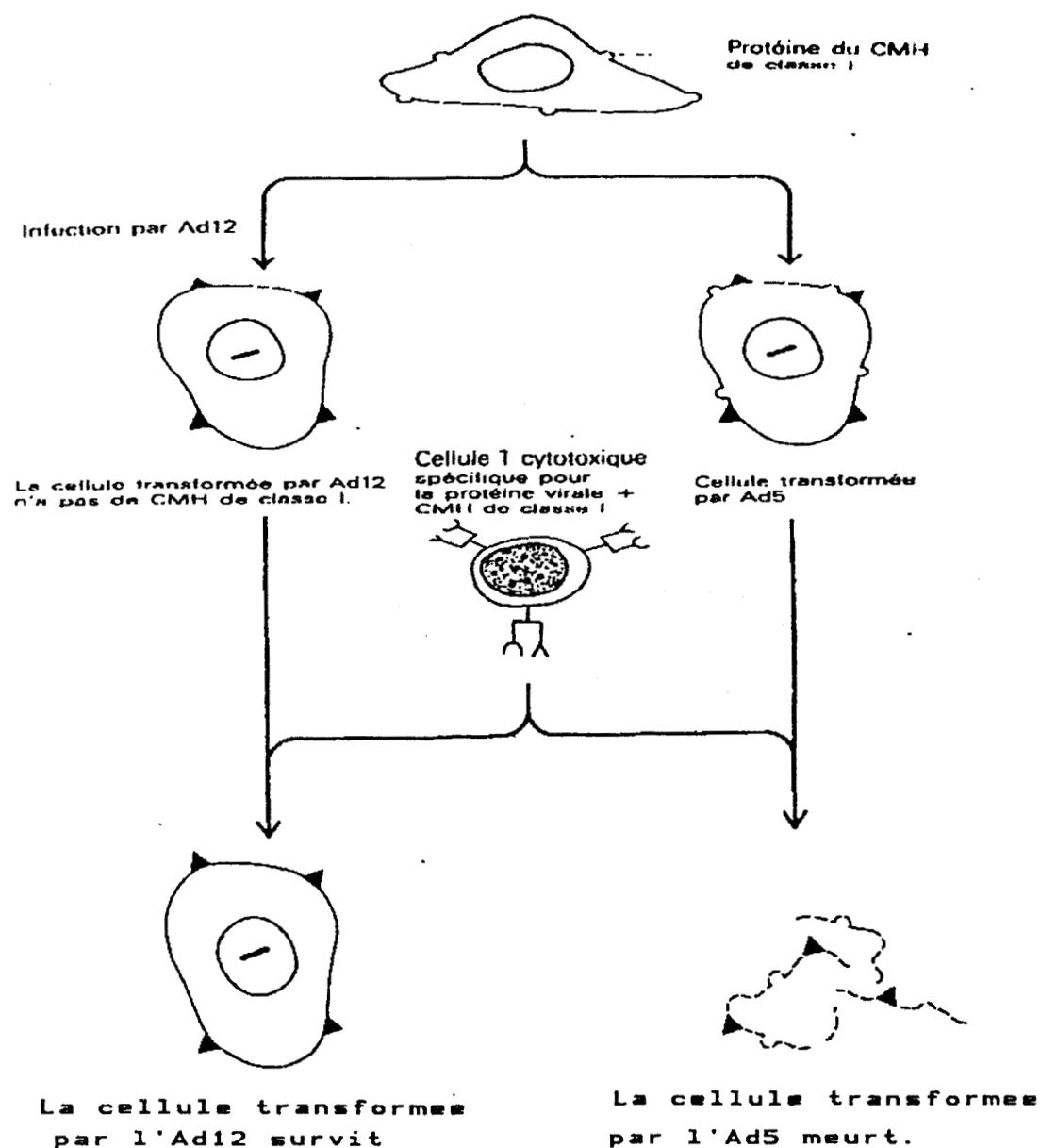


Figure 14: Transformation d'une cellule par les sérotypes 5 et 12 de l'adénovirus. La cellule transformée par l'adénovirus 5 est lysée par les cellules T cytotoxiques car elle présente en surface des protéines du CMH de classe I.

Les cellules de rat transformées par l'Ad12 ne possèdent pratiquement plus à leur surface les antigènes du CMH de classe I (Sawadaga *et al.*, 1985). L'absence d'antigènes de CMH rendrait les antigènes viraux et par conséquent les cellules transformées, invisibles pour les cellules T cytotoxiques. En fait, la région E1A de l'Ad12 inhibe l'expression des

antigènes du CMH de classe I, alors que E1A d'Ad2 l'active au contraire (Vasavada *et al.*, 1986; Vaessen *et al.*, 1987).

Les protéines E1A 243R et 289R sont capables d'induire l'immortalisation de cellules de rongeurs et produire un phénotype transformé en coopération avec l'oncogène activé *ras*. Cependant les protéines issues des ARNm 10S et 11S (Stephens and Harlow, 1987) ne peuvent pas coopérer avec *ras* pour la transformation. Ceci suggère que la RC I est impliqué pour la coopération oncogénique.

L'analyse des mutations indique que les RC I et II, mais pas la RC III, sont requises pour la transformation (Lillie *et al.*, 1987; Moran *et al.*, 1986; Schneider *et al.*, 1987). Les deux domaines impliqués dans la trans-répression sont requis pour la transformation. Ceci indique que ces deux fonctions sont probablement liées.

Un second modèle pour le rôle des RC I et II dans la transformation se base sur la liaison des protéines E1A à la protéine du gène de susceptibilité au rétinoblastome, la p105-Rb (Whyte *et al.*, 1988, 1989). La perte ou la mutation de ce gène est à l'origine du rétinoblastome; celui-ci serait probablement nécessaire au maintien de l'état non transformé de la cellule et est nommé anti-oncogène. Il est possible que les protéines E1A inhibent cette fonction en se liant aux domaines concernés de la p105-Rb.

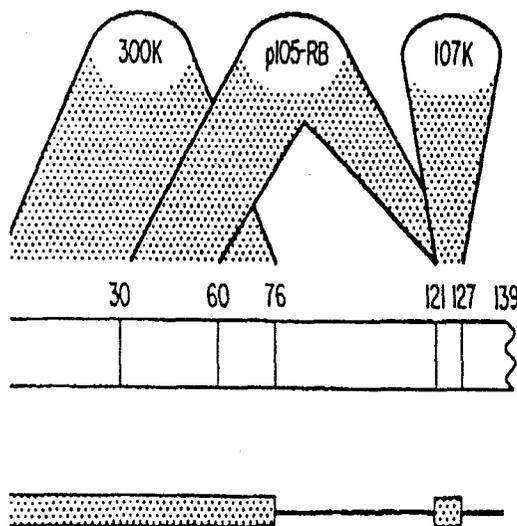


Figure 15: Liaison des protéines E1A avec les protéines cellulaires anti-oncogènes: p105-Rb, p107K et p300K (Harlow, 1988)

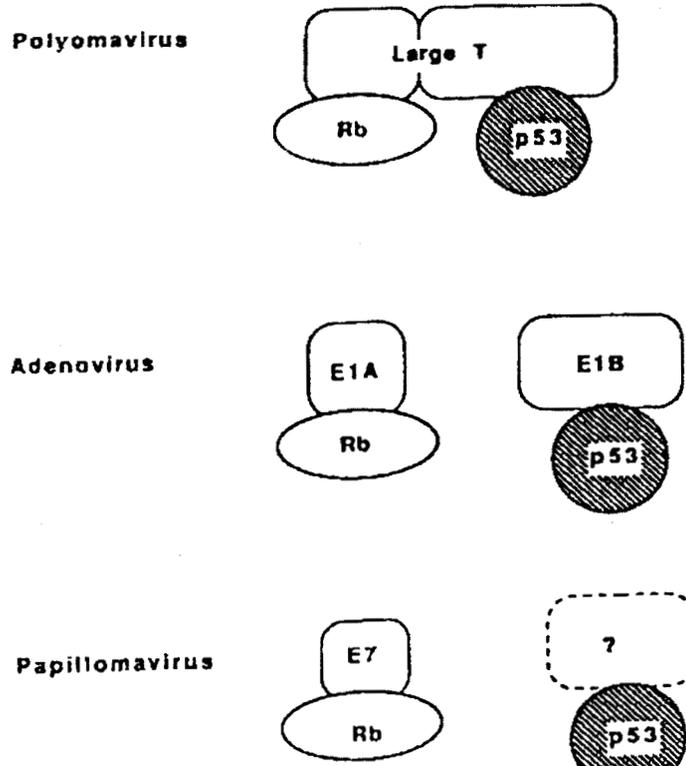


Figure 16: Liaison de antioncogènes p105-Rb et p53 en fonction des protéines oncogènes de virus à ADN

V - LE PROMOTEUR DE LA REGION E1A

Situé 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 (Khoury and Gruss, 1983)), des séquences "TATA box" et "CAAT box".

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; Baker and Ziff, 1981).

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 pb en amont du site d'initiation (Benoist *et al.*, 1980; Mc Knight and Tjian, 1986).

1) Les séquences activatrices ou 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 par 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 17).

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 nt: 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'.

Ces régions activatrices sont connues pour induire une courbure de l'ADN (Eckdahl and Anderson, 1988; Ohyama and Hashimoto, 1989).

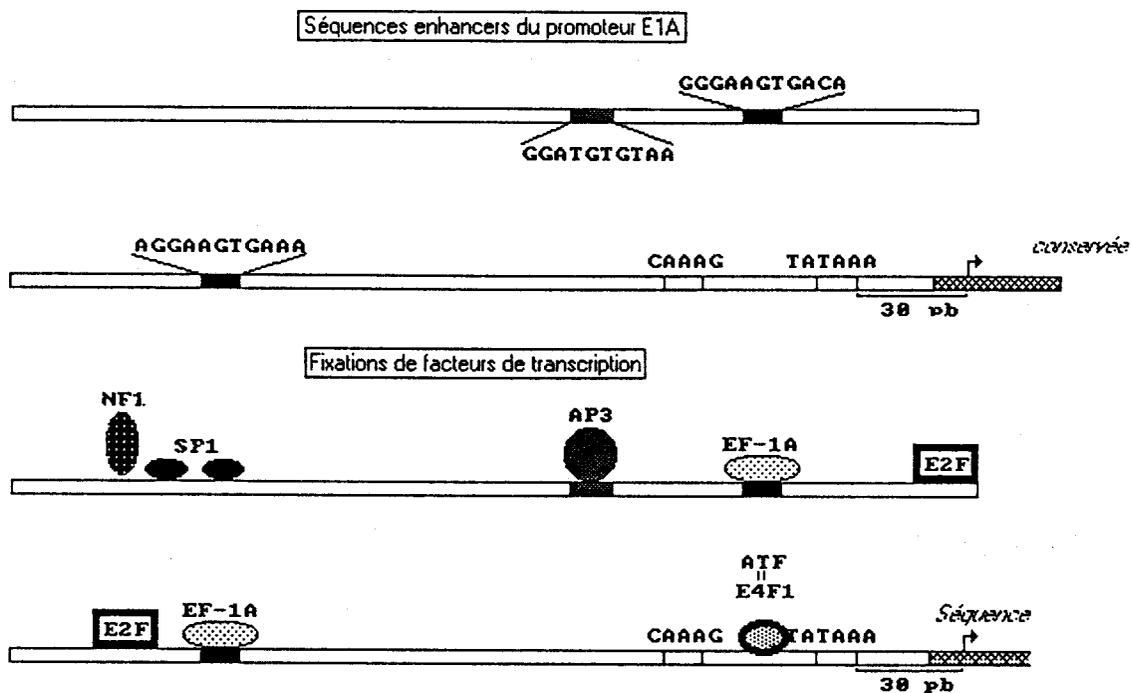


Figure 17: Schématisation du promoteur E1A.

Les séquences "enhancers" ont été figurées dans la première moitié. Les facteurs de transcription nucléaire sont représentés en face de leur site de fixation.

2) Les facteurs cellulaires impliqués

Les séquences décrites comme activatrices ("enhancers") ont fait l'objet de nombreux travaux au cours des années 80. A l'heure actuelle la plupart d'entre elles ont été

reconnues comme site de fixation de protéines nucléaires. L'analyse informatique du promoteur E1A de l'adénovirus de type 2 permet de situer de nombreux sites consensus de fixation de facteurs de transcription connus (fig 17). Néanmoins peu d'entre eux ont été étudiés. Décrit par Kovessi *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 induit par E1A. Absent des promoteurs E1B, E3, E4 et MLP, ainsi que des promoteurs de la hsp 70 et de la β -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. Hearing (Bruder and Hearing, 1989) a étudié la fixation du facteur qu'il nomme EF-1A sur la séquence qu'il avait précédemment identifiée comme activatrice (Hearing and Shenk, 1983). Ce site a depuis été identifié comme étant le site de fixation des oncogènes de la famille de *c-ets* (Wasylyk *et al.* 1990).

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. 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. Cette séquence est retrouvée dans l'élément II de E1A de l'Ad5.

Herbst *et al.* (1990) ont démontré la fixation des facteurs E2F et ATF sur le promoteur E1A; cependant la fixation d'une protéine AP3, présente en grandes quantités dans des cellules indifférenciées (cellules CREF), supprime l'activation induite par les précédents facteurs. Yoshida *et al.* (1989) ont observé la fixation de 21 protéines nucléaires au niveau du promoteur E1A, de la séquence terminale répétée au site d'initiation de la transcription. Néanmoins aucune recherche d'activité biologique n'a été associée à ces observations.

3) Etudes concernant la région entourant le site d'initiation de la transcription.

Deux équipes se sont intéressées à la région entourant le site d'initiation de la transcription. Hearing et Shenk (1983) ont introduit de petites délétions de part et d'autre du site d'initiation de la transcription (fig 18) et ont analysé la transcription de plasmides contenant la région E1A délétée *in vitro* et de quelques virus reconstruits à partir de ceux-ci. La transcription *in vitro* a révélé que ces délétions induisaient une chute du taux de transcription de deux à trois fois par rapport au type sauvage. Cependant la délétion de trois paires de bases séparant la séquence TATA de la *séquence conservée* (la délétion 36) réduisait de 90% le taux de transcription.

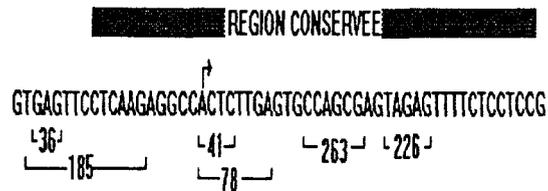


Figure 18: Délétions introduites dans la *séquence conservée* par Hearing et Shenk (1983).

Les mutants 263 et 226 n'ont pas fait l'objet d'expérimentations rapportées dans la littérature.

Néanmoins les délétions introduites dans le génome viral affecte beaucoup moins la transcription *in vivo* (une réduction maximale de 40% pour la délétion 41). Ce travail n'a pas été poursuivi par la même équipe.

Osborne *et al.* (1982) ont publié un travail relatant l'effet de délétions s'étendant graduellement du site *Pvu* II en amont de la séquence TATA jusqu'au codon initiateur de la traduction ATG et réintroduites dans le virus (fig 19). Leurs résultats indiquent que, en dehors de la séquence TATA, ces délétions affectent peu le niveau de transcription du virus. Il est à noter que ces résultats ne sont pas significatifs en ce qui concerne la *séquence*

conservée car les délétions l'affectant affectent également la séquence TATA.

Spindler et Berk (1984) ont repris les mêmes virus mutants pour étudier l'effet de ces délétions sur la traduction et concluent que la délétion de la séquence 5'-non codante affecte peu la traduction. Néanmoins leur délétions affectent également la séquence d'initiation de la traduction ATG. Ils étudient donc la traduction d'un ARNm transcrit à partir d'un site différent et codant pour une autre protéine par rapport à la région E1A naturelle.

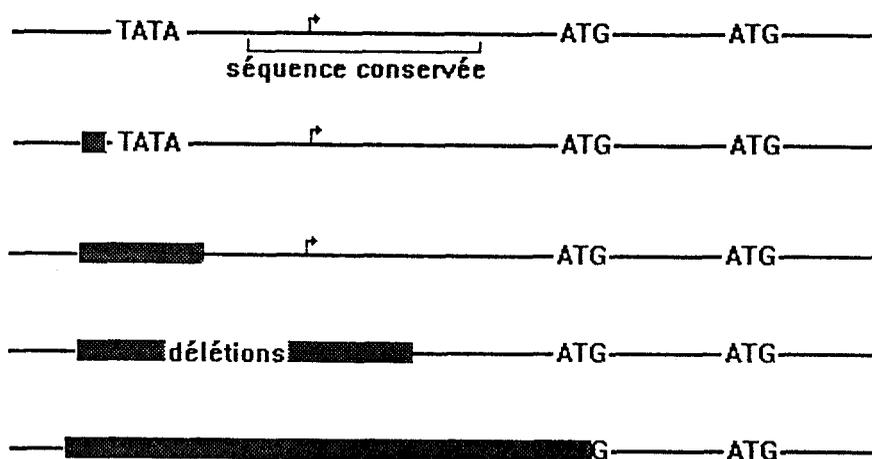


Figure 19: Etendue des délétions introduites par Osborne *et al.* (1982).
Celles ci s'étendent du site *Pvu* II en amont de la séquence TATA

VI ROLES DES SEQUENCES 5'-NON CODANTES.

Certaines séquences 5' non-codantes des ARNm sont responsables d'une régulation de la stabilité des ARNm.

La région 5' non-codante de l'ARNm codant pour la VSP (Virion Stimulatory Protein) du virus de l'Herpès contient une séquence dont la présence est indispensable pour le maintien de la stabilité des ARNm. (Brawerman, 1987)

Cependant l'ARNm de l'oncogène *c-myc*, est plus stable lorsqu'une séquence située dans le premier exon non codant est déléetée (Brawerman, 1987).

Enfin la longueur de la région 5' non-codante est primordiale pour assurer la stabilité ainsi que l'épissage de la séquence 5' non-codante de l'ARNm tardif du virus du polyome (Adamir and Carmichael, 1987).

Les régions 5' non-codantes des ARNm eucaryotes contrôlent l'initiation de la traduction: le modèle du parcours ("Scanning model", Kozak, 1989)

La plupart des études menées jusqu'à présent et notamment le brillant travail de M Kozak ont permis de modéliser le mécanisme de l'initiation de la traduction, mettant en jeu les séquences 5' non-codantes des ARNm et les protéines impliquées dans la traduction (revue par M. Kozak, 1989). Ce modèle, appelé "Scanning model" se déroule en trois étapes:

- La petite sous-unité de 40S du ribosome s'associe au facteur eIF-4, protéine de 46 kDa., pour reconnaître l'extrémité 5' de l'ARNm coiffée par la structure "cap": m⁷ppG.
- Le complexe sous-unité 40S-eIF4 migre le long de la séquence 5' non-codante
- Le complexe protéique reconnaît la première séquence AUG qui est initiatrice de la traduction et codon de la méthionine.

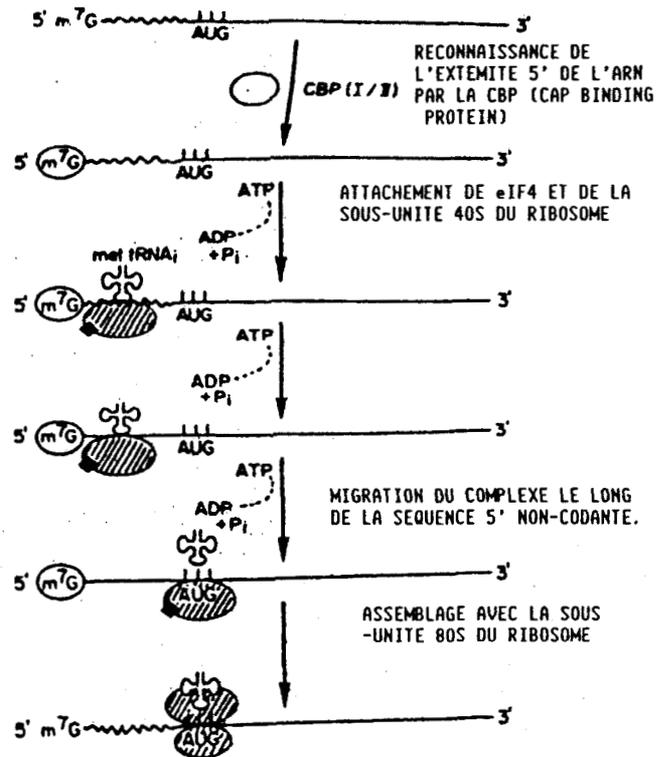


Figure 20: Initiation de la traduction selon Shatkin (1985).

Cette séquence AUG doit être entourée d'une séquence, dont le consensus est GCCGCC(A/G)CCAUGG (M. Kozak, 1988), pour initier efficacement le début de la traduction qui est suivie d'une élongation de la chaîne polypeptidique.

Cette séquence consensus a été établie d'après des études de mutagenèse et la compilation de 699 séquences eucaryotiques précédant les séquences AUG "efficaces". La présence de la Guanine (G), située juste après l'AUG est indispensable et la base localisée trois nucléotides avant celui-ci est généralement une Adénine (A).

Il est à noter que la séquence entourant le premier AUG de la région E1A de l'adénovirus, généralement considéré comme l'initiateur de la traduction des protéines E1A, ne répond que très partiellement à ce consensus:

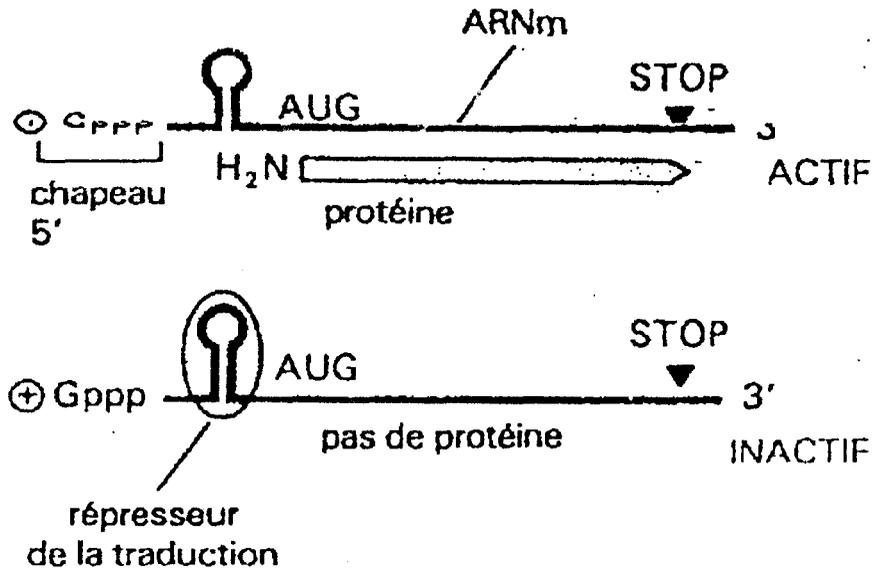
E1A: GGACTGAAAUGA
 I I III
 CONSENSUS: GCCGCCACCAUGG

Cette séquence est cependant bien conservée chez les adénovirus.

Plusieurs observations démontrent ce "Scanning model". De nombreuses séquences nucléotidiques de régions 5' non-codantes d'ARNm responsables d'une régulation de la traduction ont été identifiées. Ce sont en général des séquences induisant la formation de structures secondaires en épingles à cheveux qui sont parfois la cible d'une protéine régulatrice s'y fixant. Des séquences inhibitrices de la traduction associées à la présence de structures en épingles à cheveux, ont ainsi été observées chez les picornavirus (Poliovirus et virus de l'encéphalomyocardite), le virus de la stomatite vésiculaire (dont la séquence AUUAUUA est la cible d'une protéine cellulaire de 65 kDa.), l'oncogène *c-sis*, et l'ARNm de la ferritine (Starzyk, 1988).

Ce dernier constitue un exemple intéressant de régulation; en effet la région "leader" de l'ARNm de la ferritine, dont la séquence, appelée IRE (Iron Responsive Element) induit la formation d'une épingle à cheveux, constitue le site de fixation d'une protéine cellulaire de 85 kDa (Starzyk *et al.*, 1988). Cette protéine est sensible à la présence de fer et élimine le phénomène d'inhibition de la traduction, induite par l'épingle à cheveux, en s'y fixant en présence de fer.

M. Kozak a étudié l'influence des structures en épingles à cheveux de différentes tailles et stabilités potentielles introduites en amont d'un AUG "efficace" sur l'initiation de la traduction à partir de ce dernier (Kozak, 1989). Ses résultats ont montré que plus une structure en épingle à cheveux est stable (dont l'énergie est inférieure à $\Delta G = -30$ kcal/mol.) plus elle inhibe la traduction. D'autre part, plus celle-ci est proche de l'extrémité 5' de l'ARNm plus ce phénomène est efficace (fig 21). Une structure d'énergie $\Delta G = -30$ kcal/mol située à +12 nucléotides après le site de coiffe sera ainsi plus inhibitrice qu'une épingle à cheveux de -61 kcal/mol. située 52 nucléotides après le site de coiffe.



CONTROLE NEGATIF DE LA TRADUCTION

Figure 21: Illustration de l'inhibition de la traduction par l'intermédiaire d'une interaction avec une structure secondaire de la région 5' non-codante de l'ARNm.

Il existe des séquences 5' non-codantes activant la traduction chez le virus de la mosaïque du tabac, mais également dans la séquence tripartite 5' non-codante des ARNm tardifs de l'adénovirus dont la transcription est initiée à partir du promoteur majeur tardif (MLP). Cette séquence tripartite est souvent utilisée dans les clonages afin d'augmenter l'efficacité de la traduction des séquences situées en aval.

**TRAVAUX
PERSONNELS**

I ETUDE INFORMATIQUE DES HOMOLOGIES ET DE LA STRUCTURE SECONDAIRE POTENTIELLE DE LA SEQUENCE CONSERVEE.

1) Comparaison des homologues de séquences nucléotidiques existant au niveau du site d'initiation de la transcription entre différents adénovirus.

La région E1A a été séquencée pour 9 sérotypes d'adénovirus humains (van Ormondt *et al.*, 1980; Dijkema *et al.*, 1980; Gingeras *et al.*, 1982; Tokunaga *et al.*, 1986; van Loon *et al.*, 1987) ou simiens ainsi que les adénovirus du chien (Spibey *et al.*, 1989), de la souris (Ball *et al.*, 1988) et de l'oiseau Tupaïa. Nous avons utilisé un support informatique afin de comparer ces différentes séquences nucléotidiques E1A et de déceler les homologues de séquences qui se retrouvent le plus fréquemment.

Ces séquences conservées dans l'évolution sont supposées être importantes pour la propagation et la "survie" de l'adénovirus. Les homologues entre les séquences des différents sérotypes sont presque parfaitement conservées entre les adénovirus humains ou simiens. Nous retrouvons une très bonne homologie entre l'adénovirus canin (CAV2) et l'adénovirus humain de type 2. Cependant cette séquence n'a pas été retrouvée chez l'adénovirus du Tupaïa et l'adénovirus murin. La présence de cette séquence est donc en relation avec l'hôte infecté par l'adénovirus.

2) Localisation de la séquence conservée.

Une séquence, longue de 45 nucléotides, se distingue du reste de la région E1A par son remarquable taux de conservation (fig 22) de l'ordre de 95%. Cette séquence entoure le site d'initiation de la transcription (fig 23) et s'étend de -11 nucléotides, par rapport au site d'initiation de la transcription, à +34 nucléotides. La séquence dite conservée est donc présente tant au niveau de l'ADN qu'au niveau de l'ARN et constitue la séquence 5' non-codante des ARNm E1A. Son influence potentielle peut donc être effective à plusieurs

niveaux de contrôle de l'expression de la région E1A qui vont de la transcription jusqu'à la traduction.

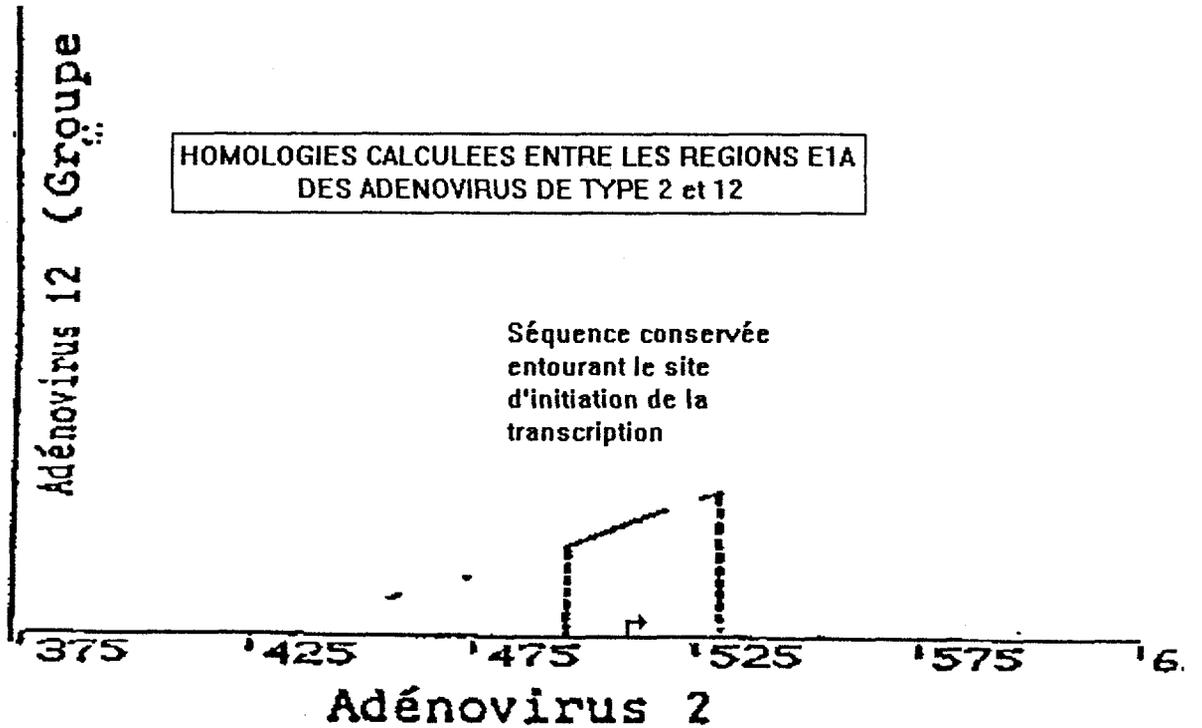


Figure 22: Illustration des recherches d'homologies entre les différents adénovirus. Ici la séquence de la région E1A de l'adénovirus 2 est comparé à celle de l'adénovirus 12.

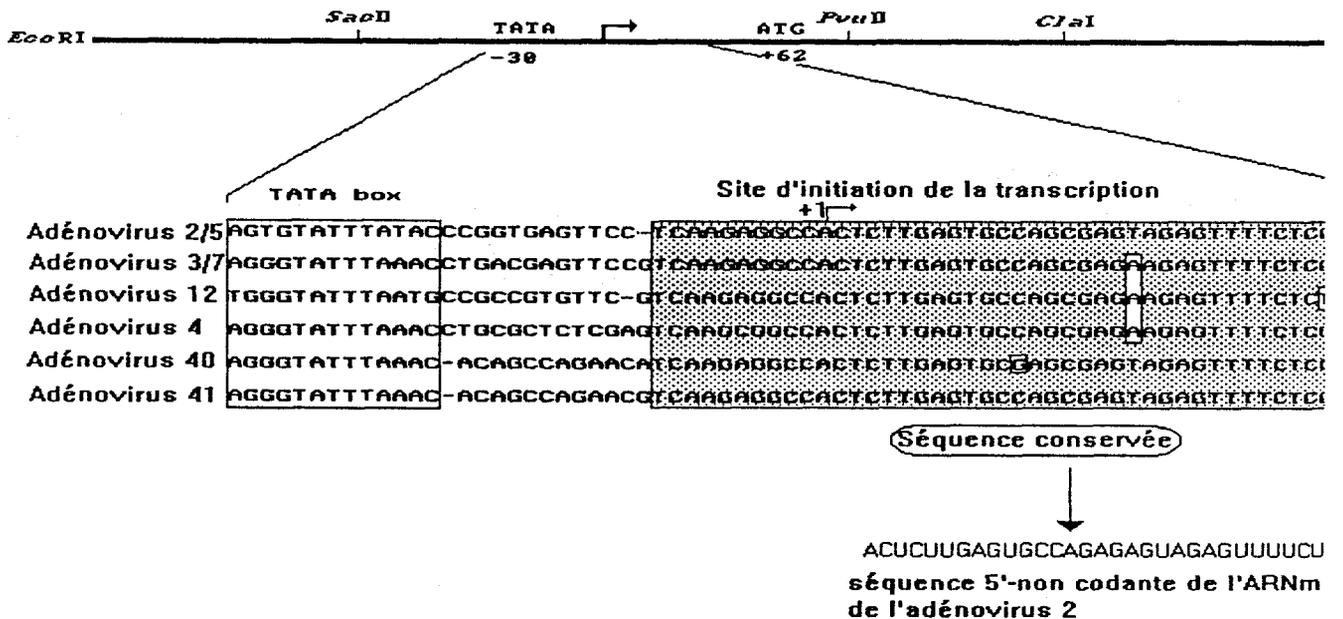


Figure 23: Alignement des séquences conservées entourant le site d'initiation de la transcription des adénovirus humains de types 2, 3, 4, 5, 7, 12, 40 et 41.

3) Homologies avec des séquences de régulation connues

La *séquence conservée* telle qu'elle a été définie a fait l'objet d'une recherche de séquences homologues au sein de la banque de données Genbank. Peu d'homologues cellulaires ont été retrouvés. La région correspondant au site d'initiation de la transcription de l'alpha-antitrypsine humaine est la région dont le degré d'homologie est le plus élevé. Néanmoins elle n'a pas fait l'objet de travaux concernant la régulation de l'expression de l'alpha-antitrypsine.

DE HUMAN MACROPHAGE ALPHA1-ANTITRYPSIN (ALPHA1-AT) MRNA 5'-
END (L17)

```
SEQCONS          7- AGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGTAGAG
                   :::::::::::  :::::  ::  ::  ::::
HSA1ATR3         143- AGGCCACUCUCCUGUGCCUGCCAGAAGAG
```

DE HUMAN MACROPHAGE ALPHA1-ANTITRYPSIN CAP SITE REGION

```
SEQCONS          7- AGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGTAGAG
                   :::::::::::  :::::  ::  ::  ::::
HSA1ATCA         358- AGGCCACUCUCCUGUGCCUGCCAGAAGAG
```

La *séquence conservée* répond bien au site consensus d'initiation de la transcription défini par Bucher (1990): CA⁺CTCTT. On retrouve une homologie intéressante concernant la séquence consensus d'interaction de l'antigène T du virus SV40: la séquence GAGGCC correspond aux 6 bases précédant le site d'initiation de la transcription. Le site consensus de liaison au facteur NFI/CTF (GGCCAATC) correspond à une base près à la séquence entourant le site d'initiation de la transcription: GGCCACTC. Enfin le site de fixation du facteur USF situé dans le promoteur MLP de l'adénovirus correspond pour la première moitié de sa séquence aux séquences précédemment citées : GGCCACT.

4) Structure de la *séquence conservée* sous forme d'ADN

La séquence étudiée est riche en bases G et C (environ 55%). Les séquences CTC ou GAG se retrouvent à de nombreuses reprises au long de la séquence; ce qui laisse présager l'hybridation de ces séquences entre elles, entraînant la formation de structures secondaires.

Ainsi une séquence inversée de 8 paires de bases est située de part et d'autre du site d'initiation de la transcription et permet la formation potentielle d'une épingle à cheveux dont la boucle est formée de 4 bases contenant le site d'initiation de la transcription (fig 24). Néanmoins l'énergie nécessaire à sa stabilisation (-9,4 kcal/mol) ne permet pas d'envisager sa présence à l'état naturel sans l'apport d'une interaction stabilisante (Fixation d'une protéine par exemple).

D'autres structures similaires, mais moins stables, peuvent être envisagées dans la *séquence conservée*.

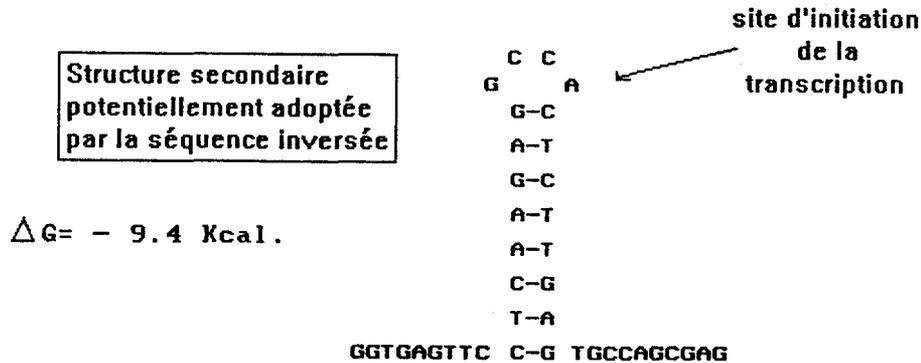


Figure 24: Illustration de la structure secondaire potentielle calculée en fonction de la séquence symétrique entourant le site d'initiation de la transcription de la région E1A de l'adénovirus 2.

L'énergie de structure est de -9,4 kcal/mol. ; cette valeur est trop élevée pour que cette structure soit stable sans apport énergétique (Le minimum d'énergie requise étant de -50 kcal/mol).

5) Calcul de la structure secondaire potentielle de la séquence 5' non-codante de l'ARNm E1A.

La *séquence conservée* est présente sur une longueur de 35 nucléotides au début de la séquence 5' non-codante de l'ARNm E1A.

La méthode de Zucker (1981) permet de localiser les différentes hybridations

possibles entre les nucléotides d'un ARN, conduisant à la formation de structures secondaires complexes type "épingles à cheveux" et de calculer les interactions les plus stables du point de vue énergétique. Une structure complexe résulte alors de ce calcul et peut être modélisée par l'informatique.

Cependant cette méthode ne tient pas compte du déroulement de la transcription et calcule la structure d'un ARN "fini", alors que les structures se forment au fur et à mesure de la transcription et sont susceptibles de ne plus être déstabilisées, par la suite, par la formation d'interactions plus stables avec d'autres régions de l'ARN.

Nous avons donc tenu compte de ce paramètre, conforté par la publication d'une nouvelle méthode de calcul, et calculé la structure secondaire de la séquence 5' non-codante de l'ARNm E1A. Les résultats indiquent qu'une structure en épingle à cheveux très stable (-45 kcal/mol) est potentiellement présente. Cette structure est proche de l'extrémité 5' de l'ARNm et met en jeu la *séquence conservée*. La principale boucle de cette structure présente la suite de quatre uridines présentes dans la *séquence conservée*. La partie centrale de cette structure est bien conservée chez les adénovirus humains ou canins.

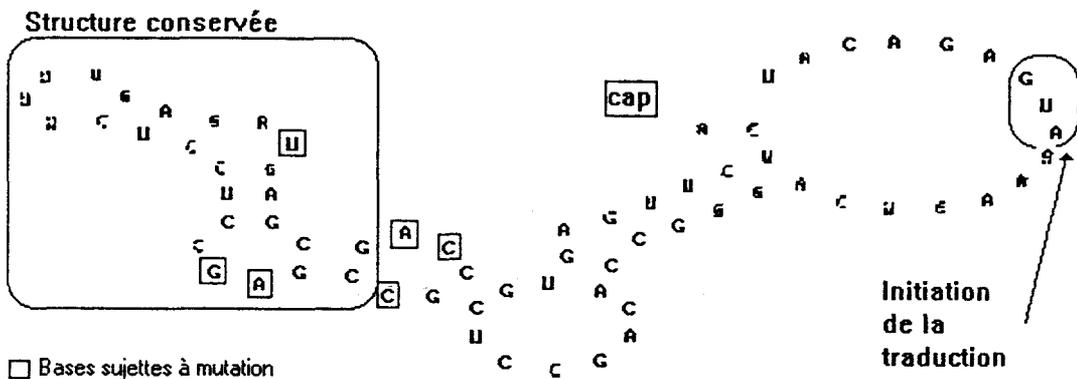


Figure 25: Structure secondaire potentielle de la séquence 5' non-codante des ARNm E1A calculée selon la méthode de Zucker (1981).

Il est à noter qu'une structure tertiaire, plus complexe, peut être envisagée si l'on considère une hybridation de la boucle UUUU avec les quatre adénines conservées précédant le codon AUG, initiateur de la traduction (fig 25). Cette structure parfois observée dans les séquences d'ARN est appelée "pseudoknott" (Pleij, 1990).

II TRANSFORMATION DE CELLULES PRIMAIRES PAR LA REGION E1A MUTEE DANS LA SEQUENCE CONSERVEE EN COOPERATION AVEC HA-RAS

1) Clonage de la région E1A.

La région précoce de l'adénovirus, contenant les régions E1A et E1B clonées entre les sites d'enzymes de restriction *Eco* RI et *Bam* HI, a été obtenue auprès de José Leite (1988).

La région E1A a été sous-clonée dans un plasmide pUC13 entre les sites *Eco* RI et *Pst* I. Le plasmide pUC13 a l'avantage de se répliquer en de nombreuses copies au sein de la bactérie et de ne pas posséder de séquences dites "poisons" qui inhibent l'expression des gènes clonés dans le plasmide couramment utilisé pBR322 (Leite *et al.*, 1989).

2) Mutation par délétion de la séquence conservée.

Afin de déléter spécifiquement la séquence étudiée, la région E1A a été soumise à deux séries de digestions par l'exonucléase *Bal* 31: La région E1A a été clivée par les enzymes de restrictions *Sac* II, dont le site est situé du côté 5'P à -150 paires de bases par rapport au site d'initiation de la transcription, et l'enzyme *Cla* I dont le site de clivage est du côté 3'OH à +318 paires de bases après le site d'initiation de la transcription. Les plasmides, ainsi linéarisés, ont été soumis à une cinétique de digestion par *Bal* 31. Celle-ci a généré des fragments de plus en plus courts en fonction du temps.

Des échantillons ont donc été prélevés de 0 à 5 minutes; puis les fragments linéaires ont été recircularisés par l'ADN ligase du phage T4 en présence d'un oligonucléotide long de 8 paires de bases représentant le site d'enzyme de restriction *Hind* III.

Après transformation dans la souche de bactéries HB101, les clones bactériens transformés ont été lysés par la méthode de dénaturation par la chaleur afin de libérer les plasmides. Ceux ci ont été sélectionnés d'abord en fonction de la présence du site d'enzyme

de restriction *Hind* III inséré au sein de la délétion puis de l'étendue de la délétion, de façon à ce que celle-ci affecte la *séquence conservée*.

Les plasmides obtenus après délétion à partir du site *Sac* II ont été reliés au niveau du site *Hind* III avec ceux digérés à partir du site *Cla* I, de façon à obtenir la région E1A délétée au niveau de la *séquence conservée* et ayant le site *Hind* III inséré au sein de la délétion (fig 26). Deux fragments délétés du côté 3'OH ont été obtenus et séquencés par la méthode de Sanger (1975). Le séquençage a révélé une délétion à partir de +1 par rapport au site d'initiation de la transcription pour le premier et une délétion située à +12 pour le second fragment (fig 28). Quatre fragments, délétés en 5'P de la *séquence conservée*, ont été isolés. Les délétions s'étendent respectivement jusqu'à +16, +22, +34 et +53 paires de bases après le site d'initiation de la transcription (fig 28).

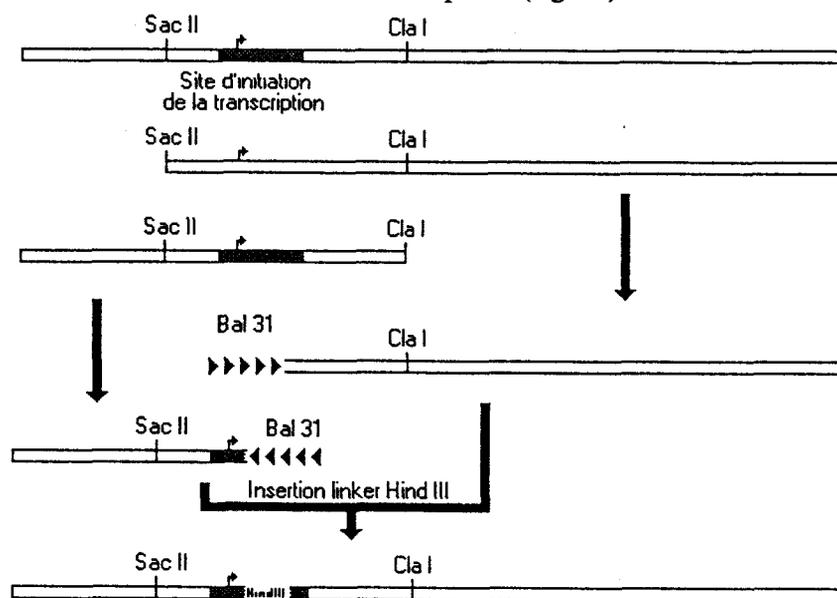


Figure 26: Illustration de la stratégie de délétion:

Le plasmide contenant la *séquence conservée* a été clivé séparément de part et d'autre de celle-ci aux sites d'enzymes de restriction *Sac* II et *Cla* I. Ces plasmides linéarisés ont été soumis séparément à la digestion contrôlée par l'exonucléase *Bal* 31. Ils ont ensuite été "ligaturés" entre eux avec insertion d'un oligonucléotide *Hind* III à l'intérieur de la délétion.

3) Transformation des cellules primaires de reins de rat

Les plasmides contenant la région E1A délétée dans la zone étudiée (fig 28) ont été co-transfectés avec l'oncogène *Ha-ras* dans des cellules primaires provenant de reins de rats nouveaux-nés.

L'apparition de foyers de transformation a été notée en fonction du temps pour chaque mutant et totalisée après 6 semaines de culture. Une moyenne a été effectuée sur un total de 14 co-transfections (fig 29).

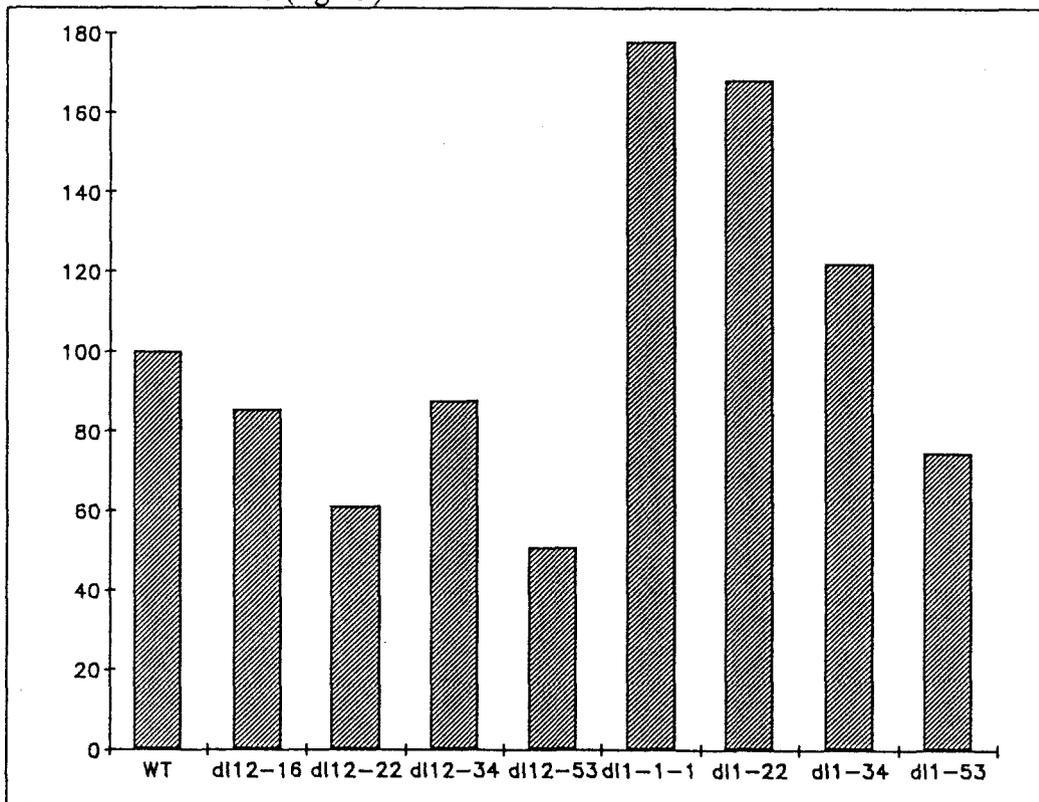


Figure 29: Taux de transformation induit après transfection de cellules primaires de reins de rats nouveau-nés par les mutants E1A délétés dans la *séquence conservée* en coopération avec *ras*.

A partir du schéma résumant ces expériences, plusieurs observations peuvent être faites:

- Les plasmides dont la délétion s'étend à partir de +12 par rapport au site d'initiation de la transcription ont un taux de transformation plus faible en comparaison des plasmides délétés juste après ce dernier.

- Le taux de transformation chute au fur et à mesure de l'extension des délétions en

aval du site d'initiation de la transcription à l'exception du plasmide dl12-34 dont l'efficacité de transformation est exceptionnellement élevée.

- Les variations d'efficacité de transformation sont peu élevées. Néanmoins l'histogramme suit une certaine logique qui est fonction des délétions.

4) Etablissement de lignées de cellules transformées par les mutants et étude de l'expression de E1A.

Lors d'une des dernières expériences de transformation, dont les résultats reflétaient la moyenne enregistrée, nous avons cultivé l'ensemble des foyers de transformation pour chaque délétion, afin d'établir des lignées de cellules transformées correspondant à chaque délétion. Ces cellules ont été divisées en moyenne au dixième à raison de deux fois par semaine.

Au trentième passage, les ARN et les protéines ont été extraits afin d'analyser parallèlement les taux de transcription et de traduction dans chacune des lignées.

5) Analyse des taux de transcription dans les lignées en fonction des délétions.

La figure 30 représentant un "Northern blot" nous montre les variations importantes enregistrées en fonction des délétions.

Ces taux de transcription ne varient pas parallèlement avec l'efficacité de transformation.

Le taux de transcription du "type sauvage" est faible en comparaison de certains mutants tels dl12-16, dl12-34, dl1-16 et dl12-34.

Une observation que l'on peut tirer est qu'il semble que la délétion de la zone +12 à +16 ou +22 à +34 par rapport au site d'initiation de la transcription induise une augmentation du taux de transcription; Alors que la délétion des zones +16 à +22 ou +34 à +53 entraîne une chute de celui-ci.

6) Mesure des taux de traduction au sein des lignées établies

La figure 31 représente un "western blot" des protéines extraites des lignées transformées révélé à l'aide d'un sérum polyclonal dirigé contre E1A. Un artefact important est situé aux environs d'un poids apparent en gel de 50 kDa. On observe néanmoins en dessous de cette bande de nombreuses autres correspondant aux protéines E1A exprimées dans les lignées. Il semble, à première vue, que les protéines E1A subissent de multiples modifications induisant une différence de migration en gel. Le poids apparent en gel de ces protéines varie de 25 à 45 kDa.

On peut cependant noter que les deux bandes correspondant aux poids de 30 et 32 kDa. sont retrouvées ensemble ou séparément d'une façon apparemment logique: Les deux bandes sont présentes pour le type sauvage, dl12-34 et dl1-34. La bande inférieure est seule présente pour dl12-16, dl12-22 et dl12-53; La bande supérieure est détectée pour dl1-16, dl1-22 et dl1-53. Enfin les taux de traduction ne reflètent pas les taux de transcription enregistrés précédemment.

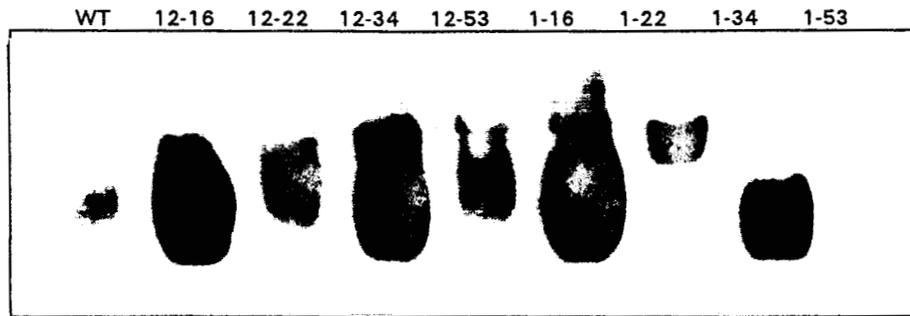


Figure 30: Transcription dans les lignées de cellules transformées par les mutants E1A en coopération avec l'oncogène *ras* activé.

Les ARNm ont été extraits, déposés, à raison de $10\mu\text{g}$, sur gel agarose, transférés sur nitrocellulose et hybridés avec une sonde spécifique marquée au dCTP $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$. Les délétions correspondantes sont figurées pour chaque piste

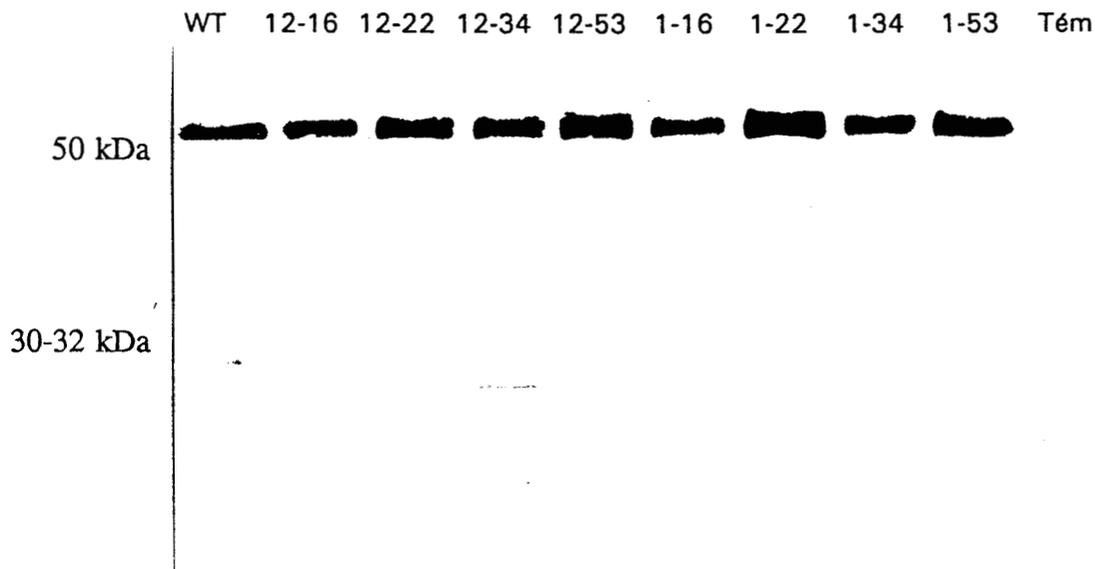


Figure 31: Traduction dans les lignées de cellules transformées.

Les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose et celles correspondant à E1A révélées à l'aide d'un sérum polyclonal spécifique. Les délétions sont figurées pour chaque piste. WT: "type sauvage". Tém: Témoin virus (peu révélé par le sérum anti-E1A).

III IDENTIFICATION D'INTERACTIONS ADN-PROTEINES AU NIVEAU DE LA *SEQUENCE CONSERVEE*.

1) Sous-clonage de la *séquence conservée* isolée.

Dans le but d'obtenir un fragment d'ADN, restreint à la *séquence conservée*, le fragment généré par l'enzyme de restriction *Hpa* II clivant l'ADN de part et d'autre de la zone étudiée (-21 et +49 par rapport au site d'initiation de la transcription) a été sous cloné dans le site d'enzyme de restriction compatible *Acc* I du plasmide pUC13.

Le site *Acc* I est situé dans une zone riche en sites d'enzymes de restriction appelée "polylinker". Les sites voisins peuvent ainsi être utilisés pour générer un fragment d'ADN marqué radioactivement après remplissage par l'enzyme de Klenow ou phosphorylation par une polynucléotide kinase avec un groupement gamma-³²P. La sonde ainsi générée est appelée sonde *Hpa* dont la séquence est:

5'CGGTGAGTTCCTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGTAGAGTTTTCTCCTCCGAGCCGCTCCGACAC 3' 3'GCCACTCAAGGAGTTCTCCGGTGAGAACTCACGGTCGCTCATCTCAAAAGAGGAGGCTCGGCGAGGCTGTG5'

2) Détection et caractérisation des interactions ADN-protéines.

Un extrait nucléaire a été préparé à partir de cellules HeLa-S3 cultivées en suspension. Incubé en présence de quantités croissantes de cet extrait nucléaire, un fragment d'ADN contenant la *séquence conservée* est retardé en gel de polyacrylamide. Plusieurs observations peuvent être faites:

- La figure 32 nous montre l'apparition de deux bandes lorsque la sonde est incubée avec 2 μ l d'extrait nucléaire. Ces bandes seront nommées A et B en fonction de leur cinétique d'apparition.

- En présence de 4 μ l on note l'apparition d'une troisième bande C au dessus de la première bande A puis cette dernière disparaît au profit de la bande C en présence de 6

microlitres d'extrait.

- La bande supérieure B disparaît pour laisser place à une bande plus diffuse et migrant plus lentement: la bande D.

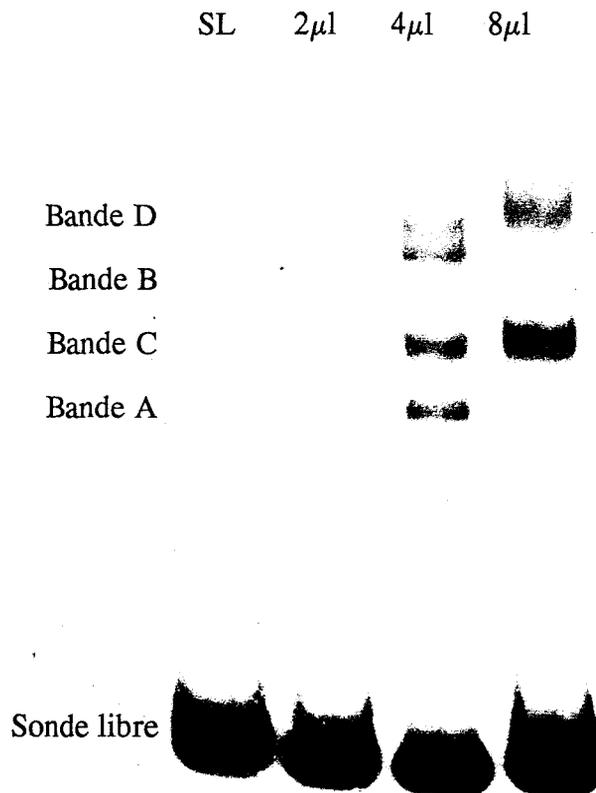


Fig 32: Détection des interactions ADN-protéines

La sonde *Hpa* a été incubée à raison de 10000 cpm en présence de quantités croissantes d'extrait nucléaire de HeLa purifié, 2µg de polydI-dC et 1µG de SAB (Serumalbumine bovine). La concentration de l'extrait est de 10 mg/ml.(SL: Sonde Libre incubée sans extrait).

La figure 33 représente le retardement en gel d'acrylamide de la *séquence conservée* en présence de quantités croissantes d'extrait nucléaire de cellules humaines KB3. On remarque que la bande A observée avec 2 microlitres d'extrait de HeLa n'apparaît pas; seule la bande C résultant de la disparition de cette dernière s'amplifie au fur et à mesure de l'accroissement d'extrait nucléaire incubé. La bande supplémentaire D de migration lente apparaît rapidement au dessus des bandes précédentes.

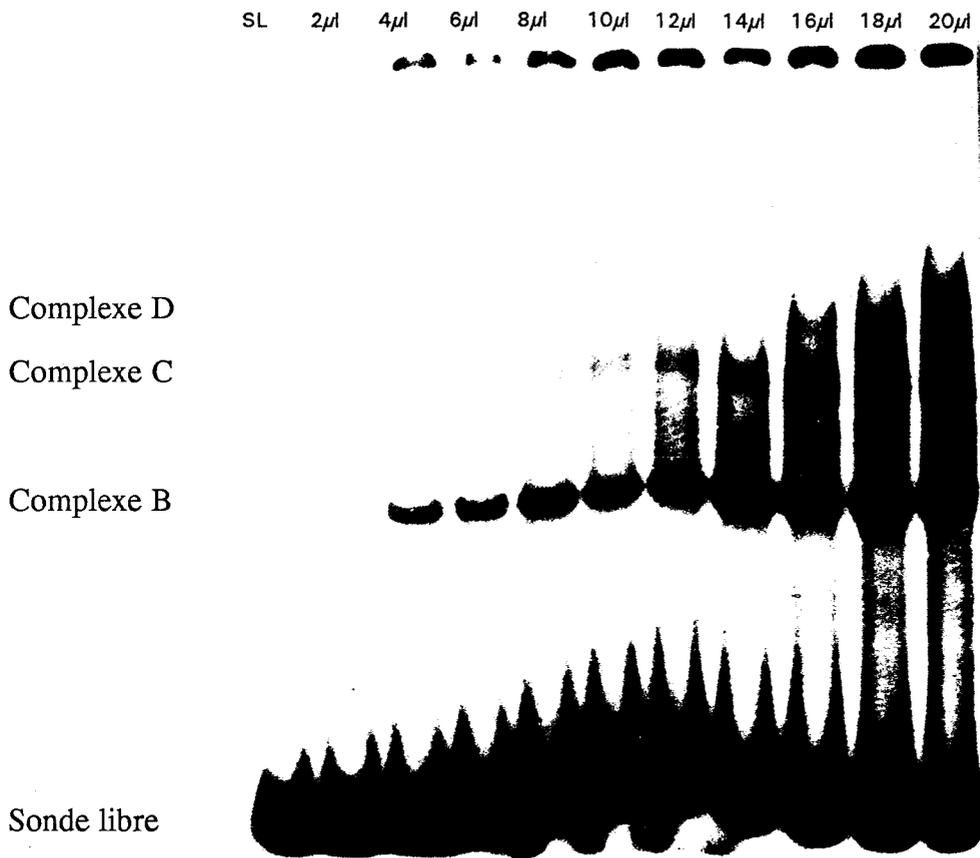


Figure 33: Interactions ADN-protéines dans un extrait nucléaire de cellules KB3
 La sonde *Hpa* a été incubée, à raison de 10000 cpm (environ 0,5 ng) en présence d'extrait nucléaire de cellules KB3 croissant de 0 à 20 μ l.

3) Analyse des variations de protéines affines pour la *séquence conservée* en fonction du type de cellule.

La figure 34 représente le retard en gel de polyacrylamide de la *séquence conservée* incubée en présence de quantités croissantes d'extraits nucléaires de cellules HeLa, KB3 et HEK-293 (lignée de cellules humaines qui expriment les régions E1A et E1B de l'adénovirus de type 5 intégrées au génome). On remarque que:

- l'extrait nucléaire de KB3 est le plus riche en protéines se liant à la *séquence conservée*, suivi de l'extrait de cellules HEK-293. Alors que l'extrait de cellules HeLa est le plus pauvre.

- La bande D est présente rapidement et en quantités importantes dans les pistes contenant les extraits de cellules KB3 et HEK-293. Elle apparaît faiblement dans l'extrait de HeLa.

- De nombreuses bandes supplémentaires sont apparues, probablement en raison de fixations non spécifiques, de la fraîcheur de l'extrait (Les protéines labiles y étant encore présentes) ou de l'accumulation des protéines sur le fragment d'ADN.

Les protéines affines pour la *séquence conservée* sont présentes en quantités moindres dans les extraits nucléaires de cellules infectées par l'adénovirus.

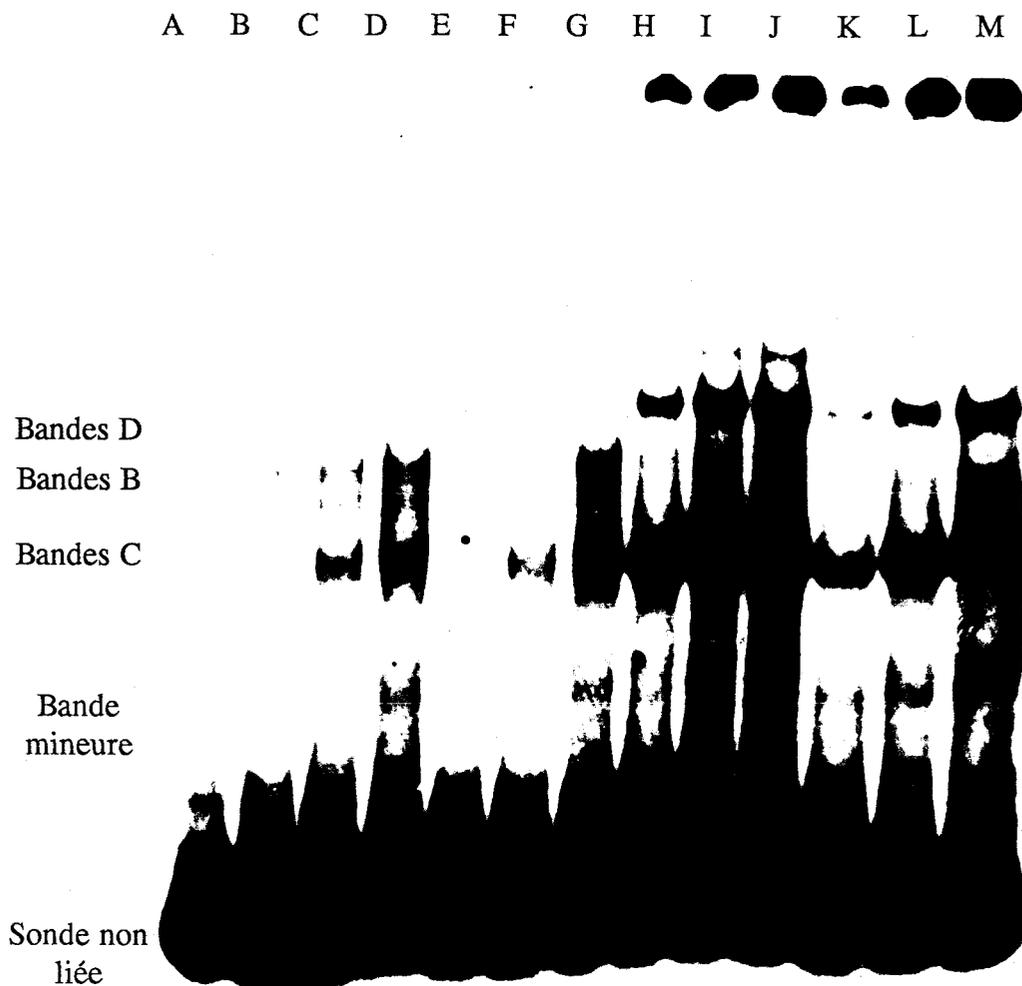


Figure 34: Retard en gel de polyacrylamide de la *séquence conservée* en présence d'extrait de HeLa, KB3 ou HEK-293.

La sonde *Hpa* a été incubée à raison de 10.000 cpm (environ 0,5 ng) en présence d'une quantité d'extrait nucléaire croissante de différentes lignées cellulaires saines ou infectées par l'adénovirus 2. Piste A: sonde libre. Pistes B, C, D: 2, 5, 15 μg d'extrait de HeLa saines; Pistes E, F, G: 2 μg , 5 μg , 10 μg d'extrait de HeLa infectées 6 heures après infection; Pistes H, I, J: 2 μg , 5 μg , 10 μg d'extrait de KB3; pistes K,L,M: 2 μg , 5 μg , 10 μg d'extrait de HEK-293.

- Il n'apparaît pas de modifications qualitatives dans la fixation des protéines

nucléaires ou de bandes supplémentaires lors de l'infection par l'adénovirus.

4; Restriction des interactions ADN-protéine sur un oligonucléotide correspondant à la *séquence conservée*.

Un oligonucléotide correspondant à la zone entourant le site d'initiation de la transcription a été synthétisé et marqué par phosphorylation, ce fragment d'ADN est appelé oligoWT. Sa séquence est:

**CTCAAGAGGCCACTCTTGAGTG
GAGTTCTCCGGTGAGAACTCAC**

Incubé en présence d'extrait nucléaire de cellules KB3 préparé 8 mois auparavant, le fragment est retardé. On note l'apparition figure 35 de la bande C importante et la bande D en plus faible quantité.

5) Mutagenèse de la *séquence conservée* au niveau du site d'initiation de la transcription.

Un oligonucléotide correspondant à l'oligoWT mais ayant une mutation au niveau du site d'initiation de la transcription est incubé parallèlement à l'oligoWT en présence d'extrait nucléaire de cellules KB3. Sa séquence est :

**CTCAAGAGGCCAAGCTTGAGTG
GAGTTCTCCGGTTCGAACTCAC**

Le retard en gel de polyacrylamide (fig 35) nous montre que cette mutation ne modifie pas l'affinité de la protéine pour son site de fixation.

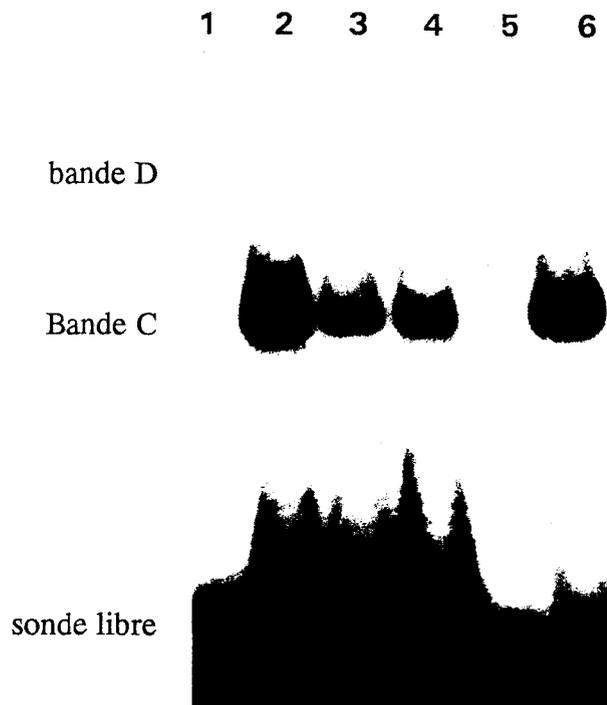


Figure 35: Retard en gel de polyacrylamide de l'oligonucléotide correspondant à la séquence palindromique incubé en présence de 10 μ g d'extrait nucléaire de cellules KB3.

Pistes 1 à 4: oligoWT; pistes 5 et 6: oligoWT muté (introduction d'un site HindIII). Piste 3: oligoWT (0,5 ng)+100 ng oligoWT muté. Piste 4: oligoWT+ 100ng oligoWT. Pistes 1 et 5: sondes incubées sans extraits nucléaires.

6) Identification de la masse apparente en gel des protéines se fixant sur la séquence entourant le site d'initiation de la transcription de E1A.

La sonde correspondant au fragment de restriction *Hpa* II (c.f. clonages) a été marquée uniformément par le alpha-³²P dCTP et le Br-dUTP. La sonde, à raison de 10⁵ cpm a été incubée en présence de 50 μ g d'extrait nucléaire et ponté par rayons ultra violets durant une heure. Les complexes ont ensuite été incubés en présence de nucléases puis soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS. Le gel séché a été autoradiographié durant une nuit. L'autoradiographie représente la migration des protéines complexées à la *séquence conservée* en gel de polyacrylamide SDS (fig 36). Les trois pistes correspondent aux extraits nucléaires de cellules HeLa, KB3 et HEK-293.

De nombreuses protéines se complexent à la *séquence conservée*. On observe parfois ces complexes sous forme de doublets. Les cinq protéines majeures ont une masse apparente en gel respective de 37 kDa, 31-33 kDa, 23 kDa, 18,5 kDa et 10-12 kDa. Une protéine supplémentaire de 57 kDa apparaît dans les noyaux de cellules HEK-293. Les quantités de protéines se liant à la séquence étudiée sont moindres dans les cellules HeLa par rapport aux autres extraits.

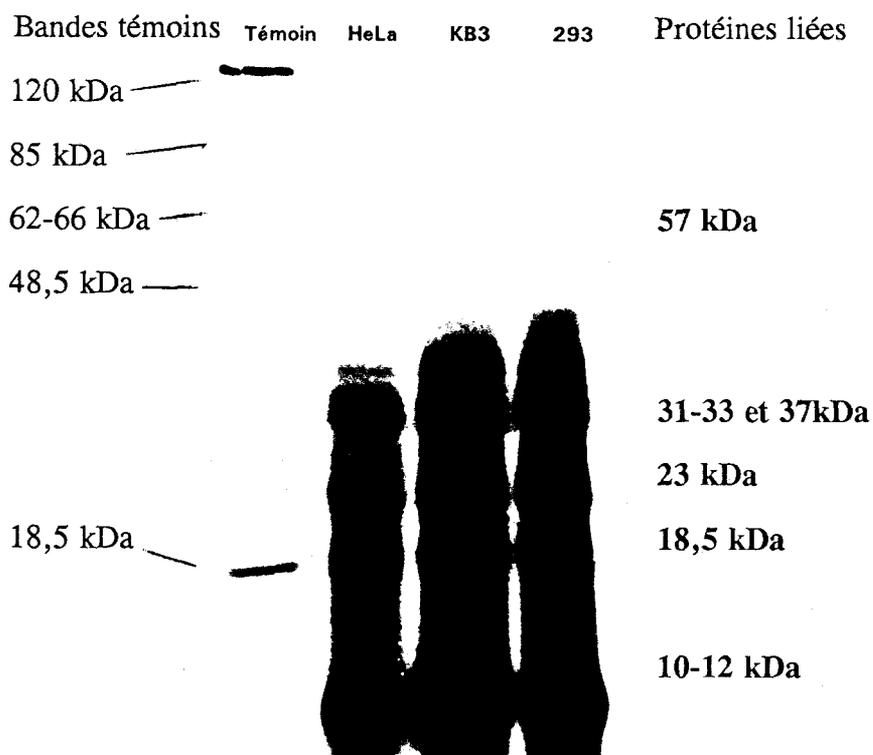


Figure 36: Protéines affines pour la *séquence conservée*.

40000 cpm de sonde *Hpa* bromée ont été incubés en présence d'extraits nucléaires de cellules HeLa, KB3 et HEK-293 puis photo-lié aux protéines par irradiation ultra-violet durant une heure.

7) Localisation des interactions ADN-protéines dans la séquence entourant le site d'initiation de la transcription par "footprinting"

La technique d'empreinte à la DNase I ou "footprinting" permet de localiser les séquences spécifiques de fixation des protéines sur l'ADN (Galas and Schmitz, 1978).

La sonde, fragment *Hpa* II, marquée au alpha-³²P dCTP par remplissage avec la transcriptase inverse à son extrémité 3'OH a été incubée en présence de quantités croissantes d'extraits nucléaires de cellules KB3 puis soumise à la digestion contrôlée par la DNase I. Les complexes ont été soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide-urée. Le gel a été séché et autoradiographié.

Les sites d'interactions ADN-protéines se révèlent au niveau des "blancs" induits par la protection de l'ADN par les protéines s'y liant contre la DNase I (fig 37). Les zones se révélant plus claires en fonction des quantités croissantes de protéines sont situées autour du site d'initiation de la transcription de façon non symétrique. La séquence en question, partagée en 2 régions s'étend de -11 à +14 par rapport au site d'initiation de la transcription (fig 37).

Quantité d'extrait nucléaire de KB3

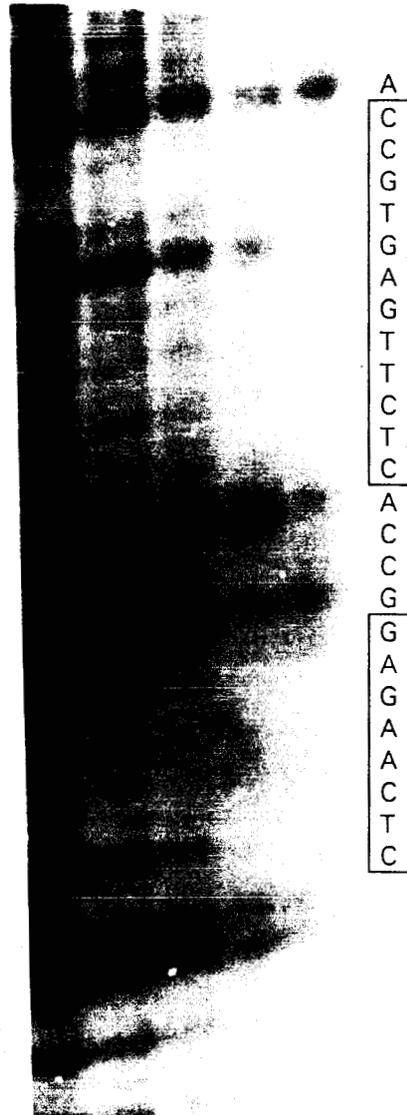
0 μ l 5 μ l 10 μ l 15 μ l 20 μ l

Figure 37: Empreinte à la DNase I de la zone d'interaction des protéines avec la *séquence conservée*.

20000 cpm de sonde *Hpa* marquée en 3'OH ont été incubés en présence de quantité croissante d'extrait nucléaire de cellules KB3 variant de 0 à 20 μ l, puis soumis à la digestion modérée par la DNase I à raison de 0,05 unités pour la sonde libre et 0,1 unités pour la sonde incubée en présence d'extrait.

IV TRANSCRIPTION *IN VITRO* DES REGIONS E1A DÉLETÉES

Entourant le site d'initiation de la transcription, la *séquence conservée* peut être impliquée dans l'activation de celle-ci. Le système de transcription *in vitro* nous permet d'étudier ce phénomène pris isolément des autres étapes de l'expression de la région E1A.

Les plasmides contenant la région E1A délétée au niveau de la *séquence conservée* et la région E1A intacte ont été utilisés comme matrices de transcription *in vitro*.

L'extrait nucléaire utilisé est originaire de cellules HeLa cultivées en suspension. Chaque plasmide est ajouté à raison d'un microgramme pour chaque essai; la transcription est réalisée "à chaud", c'est à dire en présence d'alpha-³²P UTP. L'histogramme (fig 38) représente le taux de transcription mesuré en fonction des délétions.

Le taux de transcription des mutants est relativement plus faible que celui produit par le type sauvage. Les plasmides contenant la séquence comprise entre le site d'initiation de la transcription et +12 par rapport à celui ci ont un taux de transcription sensiblement plus élevé que ceux produits par leurs "homologues" délétés de celle-ci.

Les délétions progressives vers l'aval induisent une baisse sensible du taux de transcription à l'exception de la délétion entre +34 et +53 qui induit une augmentation de la transcription. Néanmoins cette zone se situe, en majeure partie, en dehors de la *séquence conservée*.

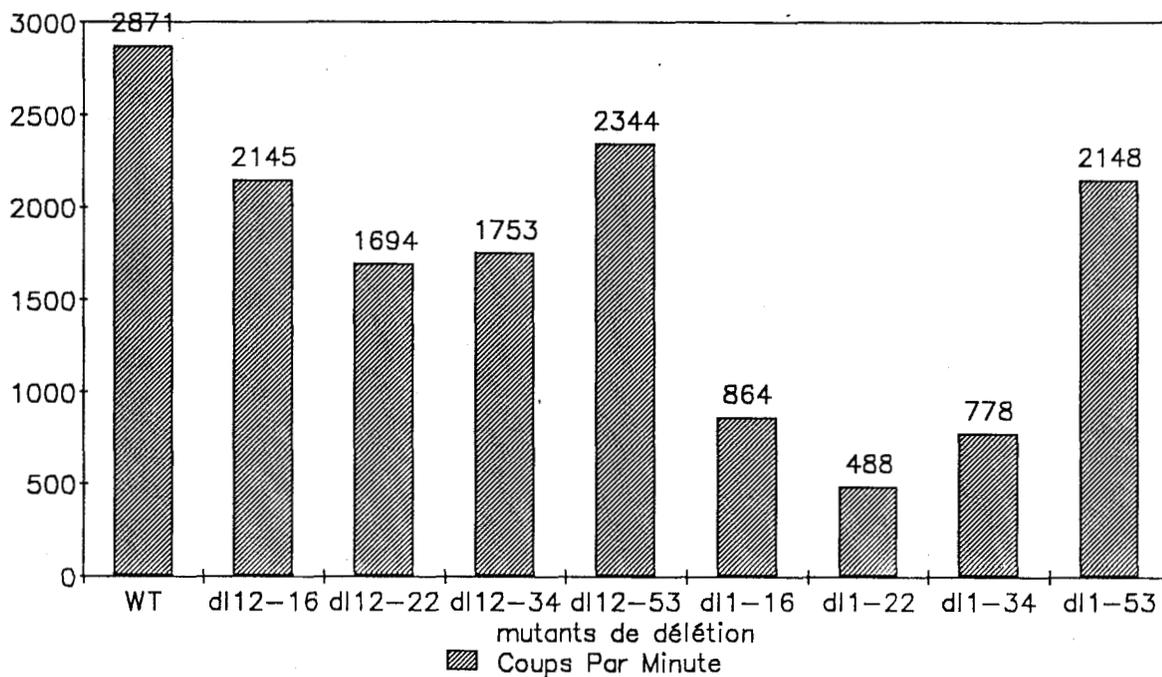
Transcription *in vitro*

Figure 38: Transcription *in vitro* des plasmides délétés de la séquence conservée.

Les plasmides ont été incubés, à raison de $1\mu\text{g}$ par essai, en présence de $7\mu\text{l}$ d'extrait nucléaire et des quatre nucléotides dont l' $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ UTP. Les ARN transcrits ont été déposés sur gel agarose - formaldéhyde; puis le gel a été séché et autoradiographié. Les bandes correspondant aux transcrits de E1A ont été découpées et comptées. Les taux de transcription sont donc exprimés en cpm.

V COMPLEXES ARN-PROTEINES NUCLEAIRES: INFLUENCE DE LA SEQUENCE CONSERVEE.

1) sous-clonage des fragments E1A dans le vecteur pSP64 permettant la synthèse d'ARN *in vitro*.

Les fragments E1A, délétés ou mutés dans la *séquence conservée* et contenant la zone codante E1A ont été sous-clonés entre les sites *Hind* III et *Pst* I dans le plasmide vecteur pSP64. Le pSP64 contient le site promoteur de l'ARN polymérase du phage SP6 en amont du site *Hind* III.

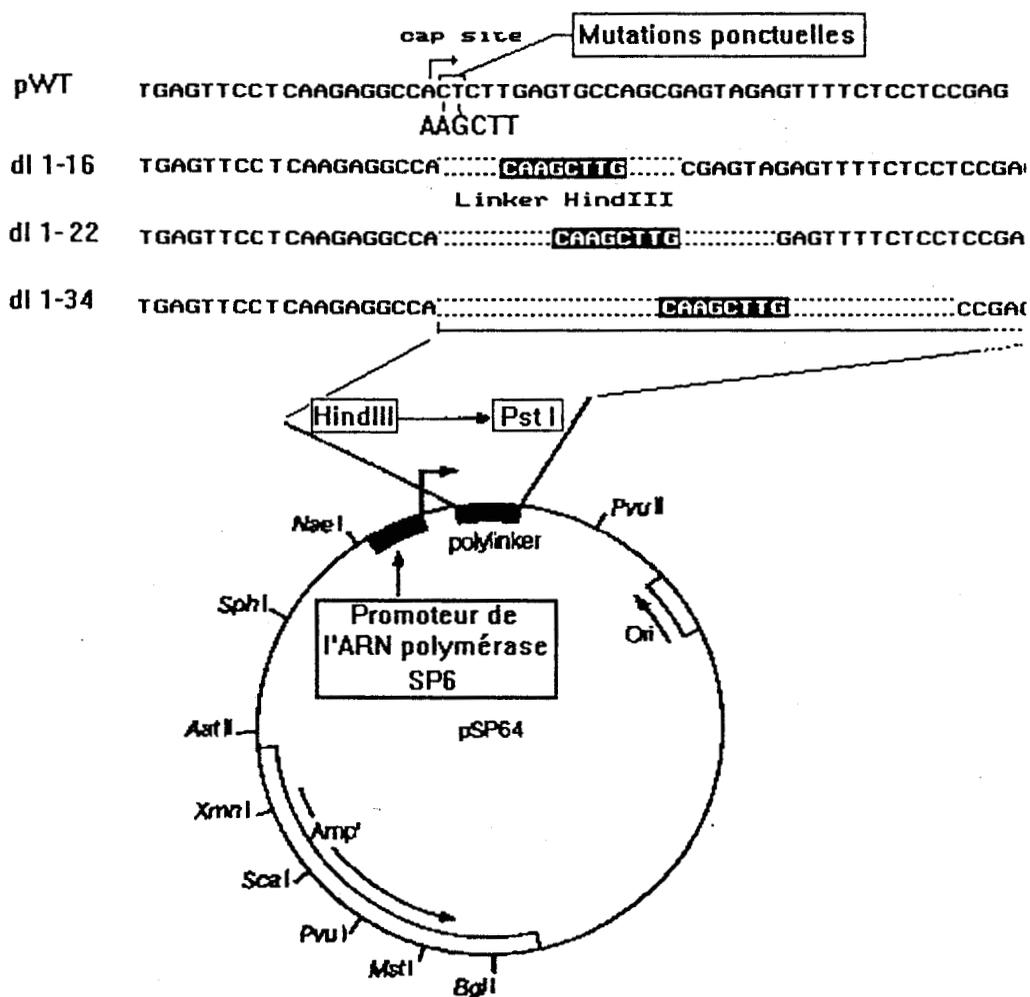


Figure 39: Clonage des séquences transcrites de l'ADNc 12S E1A délétées ou mutées dans la *séquence conservée* dans le plasmide vecteur pSP64 à l'aide des sites d'enzymes de restriction *Hind* III et *Pst* I.

L'ARN transcrit (après coupure du plasmide matrice par *Pst* I aura une longueur de 1000 nucléotides

Les fragments d'ADN clonés en aval de ce promoteur peuvent ainsi être transcrits *in vitro* après adjonction de l'ARN polymérase SP6 commercialisée (fig 39). Les plasmides pSPWT, pSP+16, pSP+22, pSP+38 et pSP+50 ont ainsi été obtenus (fig 39).

2) Pontage ARN-protéines nucléaires par irradiation U.V.

L'ARNm transcrit au noyau subit un certain nombre de modifications avant d'être transporté au cytoplasme. Ces modifications influent sur la stabilité et le transport des ARNm et sont sujettes à des variations au cours du cycle infectieux.

Les ARN synthétisés ont été pontés aux protéines nucléaires s'y fixant à l'aide de rayons UV. Les différents extraits nucléaires ont été préparés à différents stades du cycle infectieux de l'adénovirus: stade précoce (6 heures après infection), stade répliatif (12 heures après infection), stade tardif (24 heures) et cellules non infectées. Les ARN synthétiques utilisés ont une taille analogue aux ARNm naturels (les ARN plus courts donnent les mêmes résultats). L'ARN synthétique correspondant au gène *néo* (gène procaryote de résistance à l'antibiotique néomycine) a été utilisé comme témoin.

Les complexes ARN-protéines ne présentent pas de différence en fonction des délétions de la *séquence conservée*. Néanmoins les protéines se complexant aux ARN nucléaires varient en fonction du stade d'infection virale. Un éventail de protéines dont les masses apparentes en gel varient de 36 à 50 kDa et une protéine de 78 kDa sont associées aux ARN dans les noyaux de cellules saines (fig 40). Ces complexes sont moins importants dans les cellules infectées au stade précoce. Néanmoins deux protéines dont les masses apparentes en gel sont respectivement de 10 et 20 kDa apparaissent. L'observation précédente se confirme au stade répliatif, néanmoins la quantité des deux dernières protéines semble être accrue. Au stade tardif de l'infection ces dernières sont majoritaires alors que la fixation des premières protéines s'est atténuée.

3) Etude de la stabilité des ARN délétés dans un extrait nucléaire en fonction de la complexation ARN-protéine.

L'expérience précédente a été réitérée en l'absence d'inhibiteur de RNase et en incubant au préalable les ARN et les extraits nucléaires durant 30 minutes avant l'irradiation par les rayons U.V. L'autoradiographie, représentée figure 40, nous montre une chute de la quantité d'ARN complexés aux protéines nucléaires décrites précédemment au fur et à mesure de l'étendue des délétions. Alors que l'ARN témoin et le "type sauvage" demeurent relativement stables.

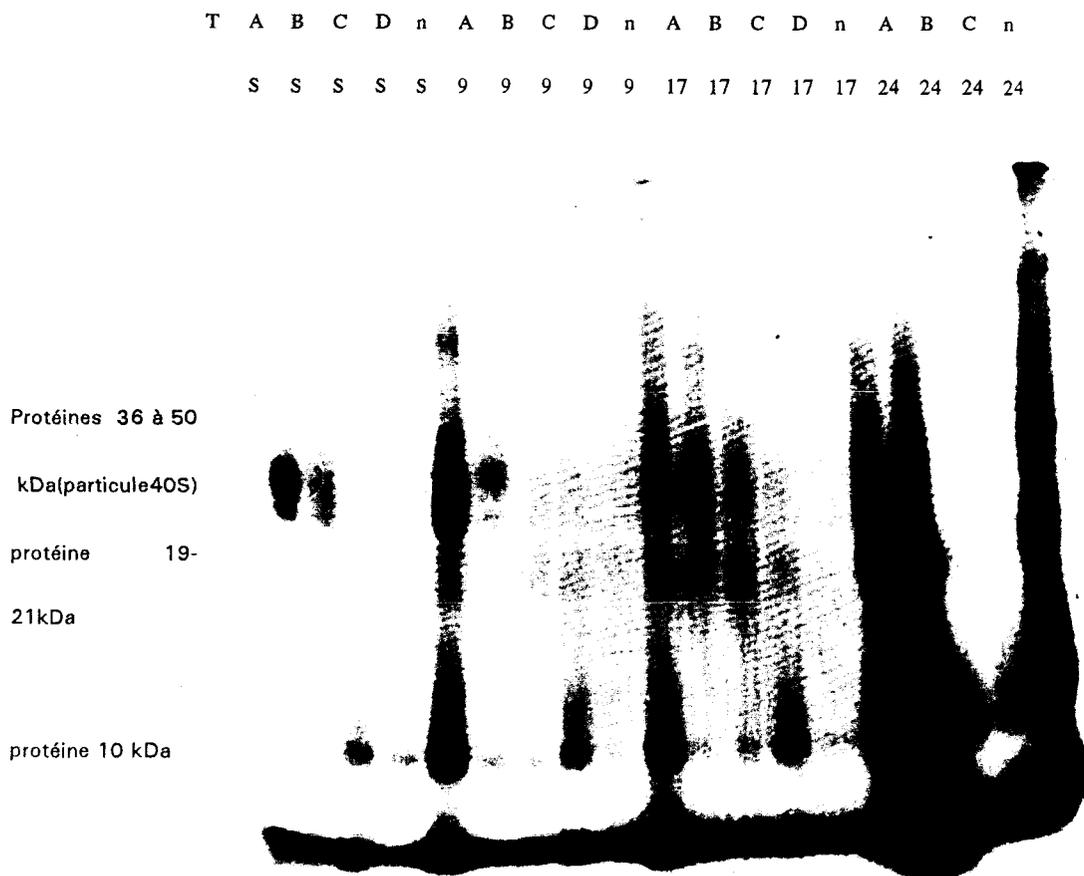


Figure 40: Instabilité des ARN délétés de la *séquence conservée* dans un extrait nucléaire:

Les ARN synthétiques marqués par l' α - ^{32}P UTP et le Br-UTP sont pré-incubés 30 min. à température ambiante et photo-liés aux protéines nucléaires affines ($30 \mu\text{g}$ d'extrait nucléaire) par rayons U.V. durant 1 heure et déposés sur gel de polyacrylamide SDS à 15%. T: Témoin de taille, A, B, C et D: WT, dl 16, dl 22, dl 34; n : témoin ARN du gène *néo*; S extrait de cellules HeLa non infectées; 9: extrait de cellules 9 heures après infection, 17: extrait de cellules infectées après 17 heures; 24: extrait cellules infectées après 24 heures.

VI INFLUENCE DE LA SEQUENCE CONSERVEE SUR L'EXPRESSION DU GENE CAT CLONE SOUS LE CONTROLE DU PROMOTEUR E1A

1) Sous-clonage du gène de la Chloramphénicol acétyl-transférase sous le contrôle du promoteur E1A type sauvage ou délété dans la *séquence conservée*.

Le plasmide pWT*cat*, obtenu auprès du docteur Leite (1988), contient le gène de l'enzyme dosable Chloramphénicol acétyl-transférase sous-cloné en aval du promoteur E1A au niveau d'un site *Hind* III situé à +40 par rapport au site d'initiation de la transcription (fig 41). Les fragments, contenant le promoteur E1A délété dans la *séquence conservée*, générés précédemment (fig 28) ont été sous clonés entre les sites *Eco* RI et *Hind* III du pWT*cat* en remplacement du promoteur E1A contenant la *séquence conservée* intacte. Nous avons ainsi obtenu les plasmides suivants pdl1*cat* et pdl12*cat* (fig 41). Ces plasmides, transfectés dans une cellule, expriment un ARN messager transcrit à partir du promoteur E1A et codant pour la Chloramphénicol acétyl-transférase (CAT). L'activité CAT est alors dosable après lyse des cellules et est fonction de l'activité du promoteur placé en amont du gène *cat*. Néanmoins la séquence 5' non-codante introduite au début de l'ARN *cat* peut influencer la traduction de celui-ci.

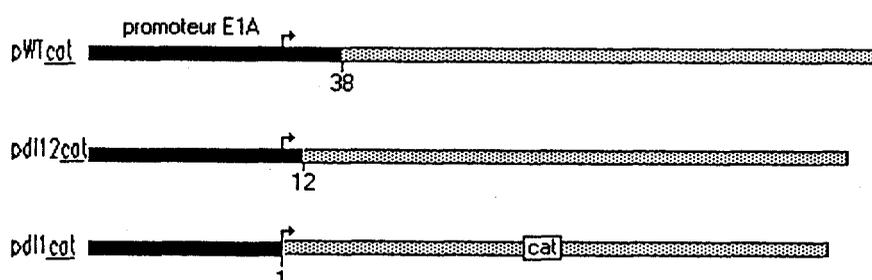


Figure 41: Clonage du gène *cat* en aval des promoteurs E1A délétés ou non dans la *séquence conservée*.

Le plasmide pWT*cat* contient la totalité de la *séquence conservée*. Le gène *cat* ainsi placé sous le contrôle du promoteur code pour l'enzyme CAT dont l'activité dosée est proportionnelle à l'"activité" du promoteur étudié.

2) Dosage de l'activité CAT *in vivo* sous le contrôle du promoteur E1A.

La transfection des plasmides précédemment décrits dans des cellules HeLa nous permet d'évaluer l'activité du promoteur E1A dans la cellule. Ces plasmides ont été transfectés seuls ou avec la région E1A entière de l'adénovirus 2 dans le but d'évaluer l'influence éventuelle des protéines E1A au niveau de la *séquence conservée*.

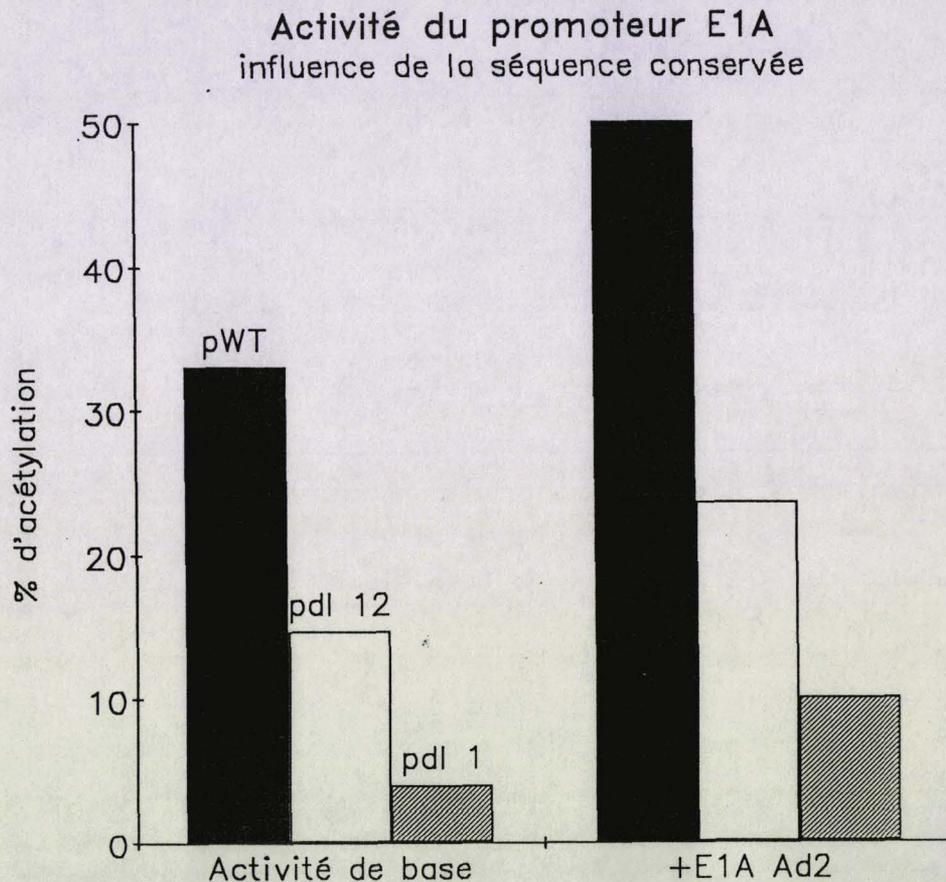


Figure 42 : Mesure de l'activité du promoteur E1A délété dans la *séquence conservée*: Les plasmide pWTcat, pdl1cat et pdl12cat ont été transfectés dans des cellules HeLa seuls ou avec la région E1A de l'adénovirus 2 à raison de 10 μ g pour chaque plasmide (20 μ g au total). L'activité CAT a été dosée 48heures après transfection.

Les résultats représentés sous forme d'histogramme (fig 42) montrent une chute drastique, de l'ordre de 2 à 10 fois inférieures au taux de base enregistré pour le pWTcat.. Ils sont stimulés de façon analogue par les protéines E1A (le pdl12cat étant toutefois stimulé jusqu'à trois fois son taux de base alors que celui du pWTcat n'est multiplié que par 1,5).

VII INFLUENCE DE LA SEQUENCE 5'-NON CODANTE SUR LA TRADUCTION *IN VITRO*

1) Mutagénèse dirigée: obtention d'un site *Hind* III au niveau du site d'initiation de la transcription

Afin d'obtenir un fragment de la région E1A pouvant être sous-cloné à partir de son site d'initiation de la transcription, nous avons utilisé une technique de mutagénèse dirigée et introduit un site d'enzyme de restriction *Hind* III à ce niveau. Un fragment de la région E1A a été sous cloné dans le plasmide p-Select (Société Promega) entre les sites *Eco* RI et *Xba* I (situé à +838). Après obtention de l'ADN simple brin, l'oligonucléotide suivant y a été hybridé: 5'P-CACTCAAAGCTTGGCCTCTTGAG-3'OH. L'introduction de deux "erreurs" en remplaçant respectivement le C⁺¹ et le T⁺² par un A et un G, a permis de générer un site d'enzyme de restriction *Hind* III: AAGCTT (fig 39).

2) Traduction *in vitro*

Présente au niveau de la séquence 5'-non-codante ou séquence "leader" de l'ARNm E1A, la *séquence conservée* est potentiellement influente sur la régulation de la traduction des protéines E1A. C'est pourquoi nous avons entrepris d'analyser l'influence des délétions introduites dans celle-ci dans un système de traduction *in vitro*.

Les ARN ont été transcrits et coiffés *in vitro* à partir des plasmides pSPWT, pSP+16, pSP+22 et pSP+34 décrits précédemment et dont les délétions couvrent l'ensemble de la *séquence conservée*. Ces ARN codent pour la protéine de 243 résidus. Les ARN synthétiques ont été traduits tels quels ou préalablement chauffés à 68°C dans le but de dénaturer les structures secondaires.

La traduction a été effectuée durant une heure à 30°C. La moitié du mélange réactionnel, soit 25 µl, a été déposée sur gel de polyacrylamide SDS.

La figure 43 représente l'autoradiographie "type" obtenue après expérimentation

(résultats analysés sur 8 expériences). Le témoin de taille, composé des protéines de la capsid virale marquées au ^{14}C , nous permet d'estimer la taille du produit de traduction *in vitro* qui est de 30 kDa.

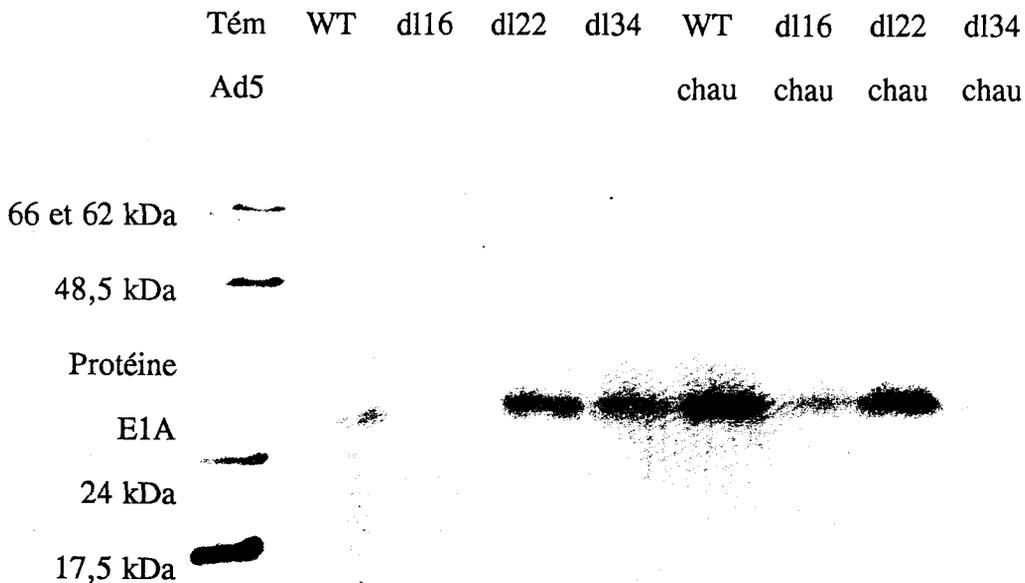


Figure 43: Traduction *in vitro* des ARN délétés dans la séquence conservée dans un lysat de réticulocytes.

Les ARN ont été traduits tel quels ou chauffés au préalable à 68°C durant 10 minutes. Les protéines E1A, marquées avec la méthionine ^{35}S ont été déposées sur gel de polyacrylamide SDS.

Les variations de traduction enregistrées sont sensiblement proportionnelles entre chaque ARN mutant qu'il soit chauffé ou non. Cependant l'efficacité de traduction des ARN chauffés est sensiblement plus élevée.

l'ARN dl+16 est traduit moins efficacement par rapport à l'ARN dit de "type sauvage"; alors que l'ARN dl+22 est au contraire traduit en quantités élevées par rapport à ce dernier. Le taux de traduction de l'ARN dl+34 chute par rapport au précédent et est peu influencé par la dénaturation.

Il est à noter que le poids moléculaire attendu de la protéine E1A de 289R était de 36 kDa.

VIII INTERACTIONS DE PROTEINES CYTOPLASMIQUES AVEC LA SEQUENCE CONSERVEE DE LA REGION 5' NON-CODANTE DE L'ARNm E1A

Nous avons établi précédemment que la *séquence conservée* influait l'efficacité de traduction *in vitro*. Cette propriété peut être induite par la fixation plus ou moins spécifique de protéines du cytoplasme sur cette séquence. Pour étudier cette fixation nous avons effectué le pontage UV entre des ARN synthétiques bromés et marqués à l' α - ^{32}P UTP et les protéines cytoplasmiques s'y complexant.

Les ARN ont été synthétisés sous forme longue (sous la forme utilisée pour la traduction) ou courte (la matrice ADN étant clivée au site *Pvu* II au nucléotide +122). Les extraits cytoplasmiques utilisés sont proviennent de cellules HeLa non-infectées ou infectées au stade précoce.

La figure 44 représente l'autoradiographie d'un gel de polyacrylamide SDS. Celle-ci nous révèle que le pontage UV d'un ARN "long" est effectif avec une protéine de masse apparente en gel de 50 kDa et ceci quel que soit l'ARN utilisé. En effet les ARN témoins utilisés en parallèle et correspondant respectivement au gène *neo* et au plasmide pSP64 clivé par l'enzyme de restriction *Pvu* I (générant un ARN long de 1670 nucléotides) sont complexés avec la même protéine de 50 kDa. Cependant l'ARN dl+34 est complexé en plus grande quantité. Le pontage UV des ARN de taille inférieure restreints à la partie 5'P de l'ARNm sont complexés différemment. Une protéine de masse apparente en gel de 36 kDa se fixe sur la majeure partie d'entre eux à l'exception de l'ARN dl+34 dont le pontage UV se révèle par une traînée diffuse intermédiaire entre la protéine de 50 kDa observée plus haut et la protéine de 36 kDa. Néanmoins l'observation la plus intéressante se situe au niveau de l'ARN dl+16 qui est complexé de façon quasi exclusive avec une protéine de masse apparente en gel de 33 kDa. Cette protéine est présente dans les cellules non-infectées et celles infectées au stade précoce.

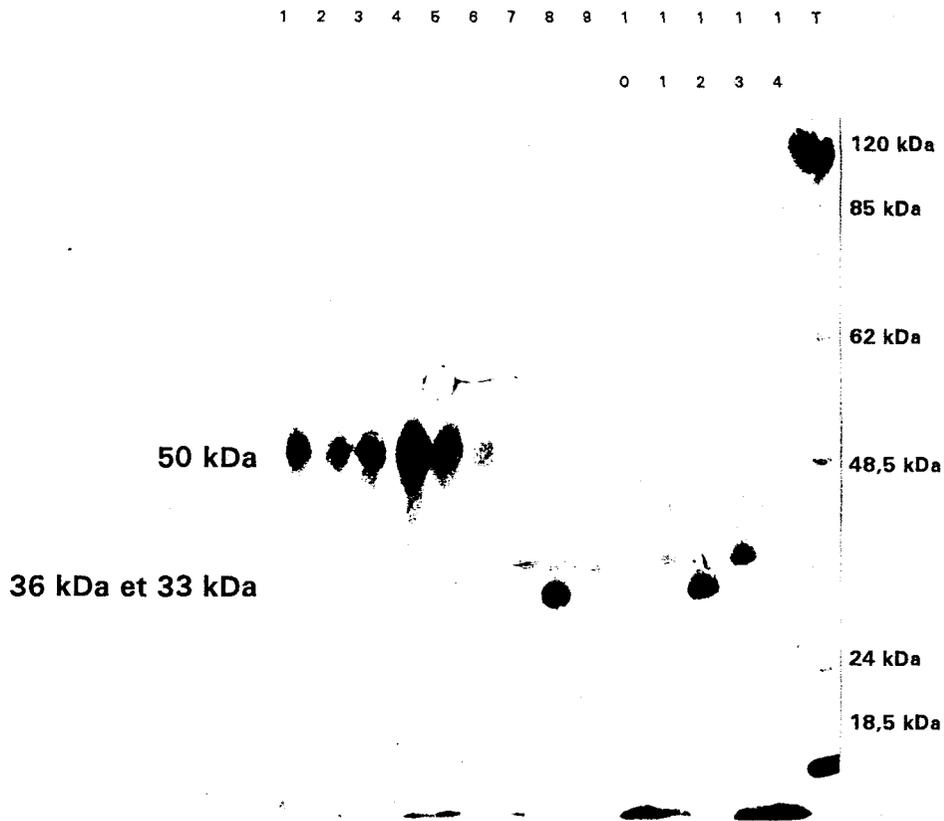


Figure 44: Protéines cytoplasmiques se liant à la séquence 5' non-codante de l'ARNm E1A en fonction des délétions introduites dans celle-ci.

Les ARN ont été photo liés sous rayons ultra-violet aux protéines cytoplasmiques. Pistes 1, 7 et 11: ARN WT; pistes 2, 8 et 12: dl16; pistes 3, 9 et 13: dl22; 4, 10 et 14: dl34. T : témoin protéines marquées au ^{14}C ; 5: ARN du gène *néo*; 6: ARN du pSP64; pistes 1 à 6: ARN longs; pistes 7 à 14: ARN courts (E1A clivée au site *Pvu* II: +124); pistes 1 à 10: Extrait cytoplasmique de cellules HeLa saines; 11 à 14 extrait cytoplasmique de cellules HeLa infectées 9 heures après infection.

IX EXPRESSION DES PROTEINES E1A EXPRIMEES A PARTIR DES DIFFERENTS MUTANTS

1) Transactivation du promoteur E2A cloné en amont du gène *cat*:

Le taux d'expression de la région E1A est le résultat de la transcription de ses ARNm, de leur modifications, de leur stabilité, de leur transport vers le cytoplasme et de l'efficacité de leur traduction en protéines E1A. Nous avons donc voulu estimer de quelle manière la délétion de la *séquence conservée* affectait ce taux d'expression *in vivo*. Nous avons utilisé une méthode indirecte qui consiste à doser l'activation d'un promoteur par les protéines E1A.

Les protéines E1A transactivent le promoteur E2A, son activité est donc fonction de la quantité de protéines E1A. Les plasmides mutants ont été co-transfectés avec un plasmide comportant le promoteur de la région précoce E2A de l'adénovirus contrôlant l'expression du gène dosable *cat*. L'histogramme représenté figure 45 résume, en pourcentage d'acétylation, les moyennes des activités CAT dosées en fonction des délétions.

L'introduction de délétions dans la *séquence conservée* induit une baisse d'activation du promoteur E2A, ce qui laisse supposer une expression des protéines E1A amoindrie. La délétion entre +1 et +12 provoque une chute notable de l'expression des protéines E1A pour l'ensemble des mutants (dans la seconde partie de l'histogramme). La délétion 16-22 augmente au contraire l'efficacité de traduction (le % d'acétylation passe de 20 à 42). Celle-ci diminue pour la délétion 22-34 pour remonter après délétion des bases situées entre +34 et +53.

Activation du promoteur E2A par E1A
Influence des délétions sur l'expressi

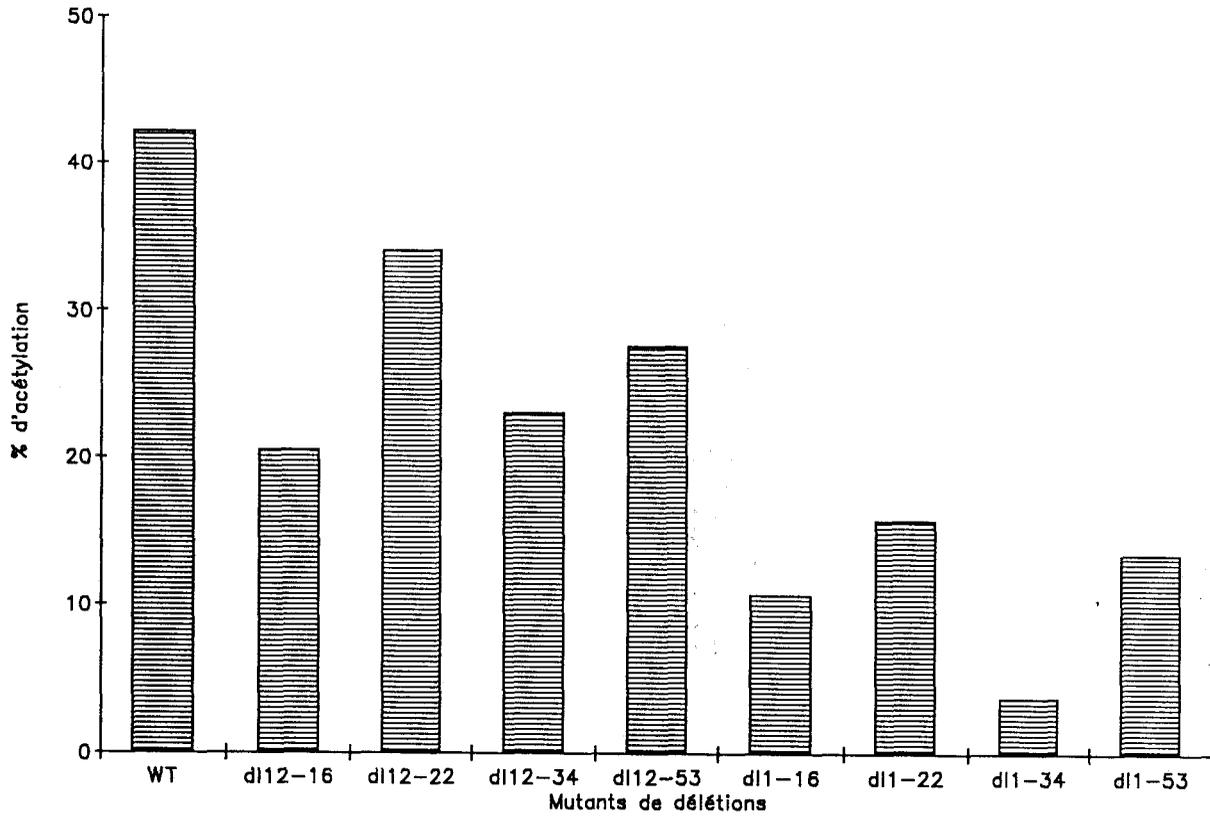


Figure 45: Estimation de l'expression des protéines E1A à partir de plasmides délétés dans la *séquence conservée*.

Chaque région E1A mutante a été co-transfectée dans des cellules HeLa avec le plasmide pE2Acat qui contient le gène *cat* placé sous le contrôle du promoteur de la région E2A de l'adénovirus. L'activité CAT est mesurée 40 heures après transfection.

X LOCALISATION DU SITE D'INHIBITION INTERSÉROTYPIQUE

Delsert et D'Halluin (1984) ont découvert le phénomène de transdominance intersérotype entre les adénovirus. Celui-ci repose sur l'observation d'une inhibition par l'adénovirus de sérotype 3 de la réplication des adénovirus des autres sérotypes. Leite (1988) a démontré que les produits de la région E1A de l'Ad3 et de l'Ad12 régulent négativement le promoteur E1A de l'Ad2. Des études de délétions ont montré que le site d'inhibition était situé entre la séquence TATA du promoteur E1A de l'Ad2 et la séquence ATG, initiateur de la traduction (Leite, 1988). Dans le but de vérifier si le site d'inhibition était, comme le supposait Leite, la séquence TATA, l'introduction de mutations ponctuelles dans la séquence TATA de la région E1A de l'Ad2 a permis de transformer cette séquence en séquence TATA de la région E1A de l'Ad3. Les résultats montrent que la séquence TATA n'est pas le site d'inhibition des protéines E1A de l'Ad3 (Verwaerde, Leite et D'Halluin, manuscrit en préparation). La seconde partie de la séquence mise en cause contient la *séquence conservée*. C'est pourquoi nous avons étudié l'activation des produits E1A des sérotypes 2, 3 et 12 sur le promoteur E1A délété ou non de la *séquence conservée*. Les plasmides WT*cat*, dl12*cat* et dl1*cat* ont été transfectés seuls ou en compagnie des régions E1A des sérotypes 2,3 et 12. L'histogramme (fig 46) représente le pourcentage d'acétylation dosé en fonction des délétions du promoteur E1A et de l'influence des protéines E1A sur ce dernier. L'activité CAT chute brutalement après délétion des séquences en aval du site d'initiation de la transcription. Les protéines E1A de l'Ad2 transactivent leur propre promoteur proportionnellement à son activité de base. Les protéines E1A de l'Ad3 inhibent le promoteur E1A non délété de la *séquence conservée* mais ne semblent pas ou peu affecter l'activité de base des promoteurs délétés. Les protéines E1A du sérotype 12 inhibent le promoteur E1A à l'exception du dl12*cat* dont le taux de base est triplé. De façon générale la délétion d'une partie de la *séquence conservée* atténue l'inhibition par les protéines E1A de l'Ad3 ou de l'Ad12.

Activité CAT des promoteurs E1A
Influence des sérotypes 2, 3 et 12

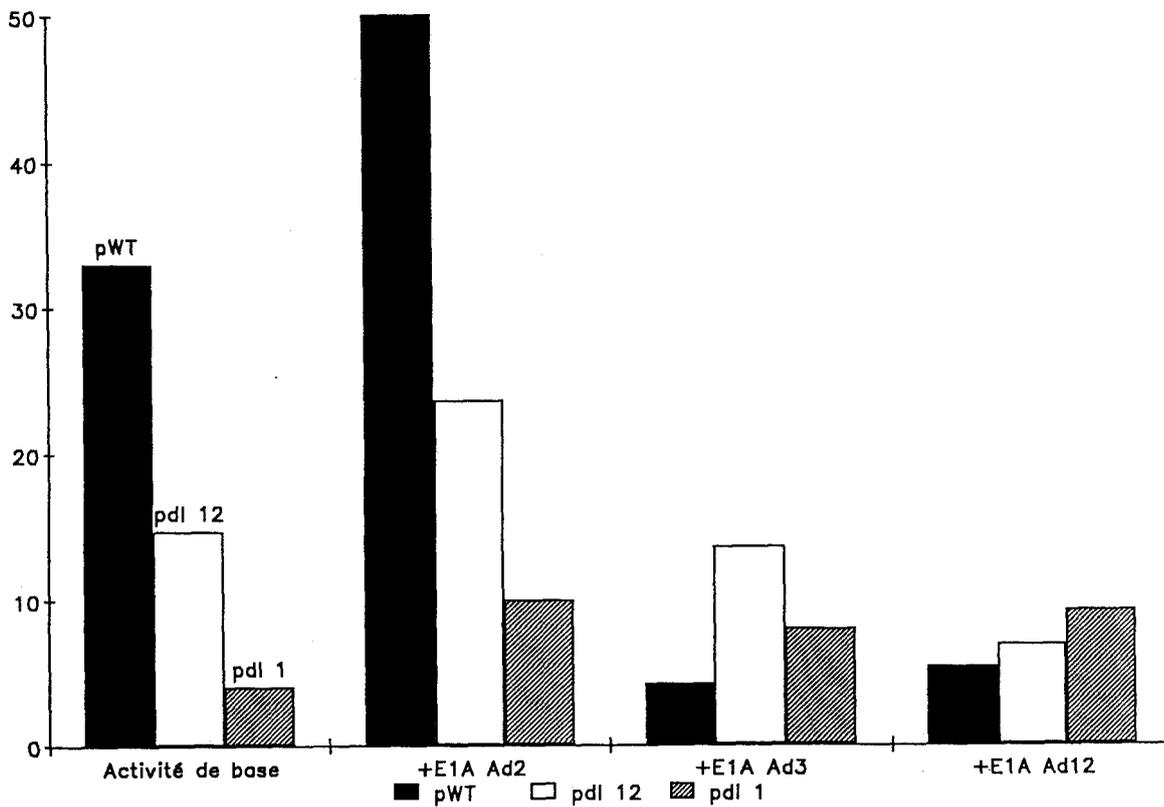


Figure46: Influence des protéines E1A des sérotypes 2, 3 et 12 sur l'activité du promoteur E1A délété de la *séquence conservée*.
Chaque plasmide a été transfecté à raison de 10 μ g.

DISCUSSION

I HOMOLOGIES DE SEQUENCES ET ROLES POTENTIELS

La séquence nucléotidique entourant le site d'initiation de la transcription est hautement conservée chez tous les adénovirus humains et simiens dont la séquence est connue et est peu modifiée dans le génome des adénovirus canins. Cependant elle n'est pas retrouvée dans le génome des adénovirus murins et aviaires. Cette conservation liée à l'espèce doit être liée à une spécificité d'hôte plus ou moins directement.

La recherche d'homologues de cette séquence dans les différentes séquences eucaryotes connues n'a pas donné de résultats probants. On retrouve toutefois une séquence proche dans le promoteur de l'alpha-antitrypsine humaine; il n'existe cependant pas d'analogie de régulation ou de fonction entre cette protéine et E1A. Cette absence quasi totale d'homologues cellulaires peut nous laisser supposer que cette séquence est essentiellement impliquée dans une régulation virale.

Quelques homologies sont détectées entre la *séquence conservée* et des sites d'interactions de protéines affines pour l'ADN connues. Ainsi la première partie du site de liaison du facteur USF (Upstream Factor Element; Cartew *et al.*, 1985, Sawadogo *et al.*, 1985; Moncollin *et al.*, 1986)), situé en amont du promoteur MLP est analogue à la séquence précédant le site d'initiation de la transcription: GGCCAC. Cette même séquence représente le site consensus d'interaction de l'Ag T de SV40 et proche de celui du facteur NFI/CTF (à une base près). Ces deux protéines ont pour caractéristique commune d'être impliquées dans les phénomènes de réplication et de transcription de l'ADN. La *séquence conservée* serait-elle impliquée dans ces deux mécanismes ?

Nos résultats confirment cependant l'influence de la *séquence conservée* sur la transcription *in vitro*; la réplication n'a pas fait l'objet d'attention de notre part. Les auteurs ayant étudié ce phénomène au niveau de la région E1A n'ont pas relaté de régulations particulières impliquant la *séquence conservée* dans la réplication du génome viral.

La principale homologie retrouvée représente le site consensus du site d'initiation de

la transcription publié par Bucher (1990). En effet le site d'initiation de la transcription de la région E1A des adénovirus répond presque parfaitement à ce consensus. Ce site conservé dans les génomes eucaryotes est peut-être, comme nous le discuterons plus loin, à mettre en relation avec l'interaction secondaire du facteur TFIID en aval de la séquence TATA.

II STRUCTURES POTENTIELLES.

La structure en épingle à cheveux qui peut être déduite de la séquence d'ADN entourant le site d'initiation de la transcription possède une énergie ΔG trop élevée ($\Delta G = -9,4$ kcal/mol, cette énergie doit être au plus égale à -50 kcal/mol) pour être stable à l'état naturel. Cependant elle peut être stabilisée par une interaction protéique.

La structure et la forme de l'ADN de cette région nous a toujours intrigués. En effet nous avons remarqué, au fil des expérimentations, que l'exonucléase *Bal31* s'arrêtait souvent à ce niveau (ce qui nous a donné la chance d'obtenir des délétions localisées à cet endroit). D'autre part nous avons mesuré la déviation en dichroïsme circulaire de l'oligoWT par rapport à la forme B majoritaire dans un échantillon d'ADN de sperme de hareng (résultat non illustré). La quantité d'oligonucléotide était trop faible pour obtenir une courbe d'amplitude comparable à celle de la forme B. Néanmoins la projection de la courbe obtenue était décalée par rapport à cette dernière et laissait supposer une forme Z de l'ADN.

Une structure en épingle à cheveux peut être déduite à partir de la séquence 5' non-codante de l'ARNm E1A. Cette structure est relativement bien conservée et met en évidence à son extrémité une boucle composée de quatre uridines. Il est à noter que les bases non appariées formant des boucles intermédiaires sont les seules à être sujettes à des mutations parmi les différentes espèces. La conservation des bases stabilisant la structure secondaire apporte un argument supplémentaire au maintien de cette forme dans l'évolution.

Néanmoins les bases appariées à la première partie de la *séquence conservée* sur

l'ARN ne sont pas elles mêmes conservées. Il semble, au vu des résultats de traduction *in vitro* que nous étayerons plus loin que ces interactions ne soient pas indispensables au maintien de l'épingle à cheveux.

III INFLUENCE DE LA SEQUENCE CONSERVEE SUR LA TRANSFORMATION PAR E1A

Les écarts d'efficacité de transformation enregistrés en fonction des délétions impliquent plus particulièrement la zone de la *séquence conservée* contenant les 12 premières paires de bases en aval du site d'initiation de la transcription. En effet, la délétion de cette courte séquence entraîne une chute du nombre de foyers. Or nous avons constaté lors de la transcription *in vitro* que la délétion de cette zone impliquait une chute du taux de transcription. Ces résultats semblent en contradiction, cependant Adami et Babiss (1990) ont récemment mis en évidence que le taux de transformation par E1A était inversement proportionnel au taux d'expression de E1A. La transformation est elle fonction de l'expression de la région E1A sous forme libre ou intégrée ?

Rappelons que la transformation nécessite l'intégration des fragments d'ADN transformants dans le génome cellulaire. Cependant les taux de transcription enregistrés dans les lignées cellulaires établies ne reflètent pas l'efficacité de transformation par les plasmides correspondants. La traduction dont le niveau a été enregistré dans ces mêmes lignées n'est proportionnelle ni au taux de transcription ni à l'efficacité de transformation par les plasmides correspondants.

La diversité des formes protéiques observées en "Western blot" est difficilement explicable en fonction des délétions si ce n'est une influence potentielle de la séquence étudiée sur l'épissage des ARN. Cependant l'analyse de ceux-ci en gel n'a pas révélé de formes épissées associées logiquement aux protéines de masse apparente en gel différentes.

Il apparait donc que, hormis l'efficacité de transformation, l'analyse de l'expression de E1A dans la transformation ne nous a pas permis de conclure sur une influence précise

de la *séquence conservée* à quelque niveau que ce soit. Il semble en effet, au vu des résultats, que cette influence ou ce rôle potentiel soit impliqué à plusieurs niveaux de l'expression de E1A. C'est pourquoi nous avons décidé d'analyser ces phénomènes séparément les uns des autres en utilisant notamment des techniques d'étude *in vitro*.

En conclusion de ce travail sur la transformation on peut s'interroger sur l'intérêt d'étudier l'influence d'une séquence sur la transformation cellulaire dans le but de comprendre son rôle. La transformation est un phénomène complexe mettant en jeu de nombreux paramètres et notamment l'intégration au hasard de l'ADN transformant dans le génome cellulaire qui peut influencer l'expression de celui-ci et par conséquent fausser les résultats. Néanmoins de nombreux auteurs ont utilisé cette méthode d'investigation (Courtois and Berk, 1984).

IV LES INTERACTIONS ADN-PROTEINES

L'expérience de retard d'ADN en gel de polyacrylamide illustrée figure 32 nous fournit de précieux renseignements sur l'organisation et le nombre des interactions de la *séquence conservée* avec les protéines. Les bandes A et B, apparaissant en premier ne disparaissent pas au profit l'une de l'autre; ce qui laisse supposer que deux protéines se fixent sur la même séquence d'ADN avec une affinité proche. Les bandes C et D semblent être, au contraire, le résultat d'une dimérisation des facteurs impliqués ou de la fixation d'une deuxième protéine identique. La bande C apparaissant aux dépens de la bande A et la bande D suivant la disparition de la bande B. On peut rapprocher cette double interaction avec la structure inversée entourant le site d'initiation de la transcription.

Deux autres interactions mineures sont décelables sur la figure 34 correspondant à une bande de migration rapide apparaissant dans tous les extraits et une bande migrant plus lentement que les autres et présente uniquement dans les extraits de cellules KB3 et HEK-293.

Ces résultats et remarques sont à rapprocher de l'illustration du pontage UV (fig 36). A première vue le nombre important de protéines complexées par les rayons ultra-violet à la *séquence conservée* est supérieur à celui présumé précédemment. Mais l'addition de certaines masses apparentes en gel, qui résulteraient du pontage des protéines entre elles en raison de leur proximité, argumentent l'hypothèse précédentes. En effet la dimérisation du peptide de 10-12 kDa résulterait en un complexe de 20-24 kDa détecté sur l'autoradiographie (23 kDa). D'autre part les complexes de 31-33 kDa et 36 kDa résulteraient de l'"addition" respective des peptides de 10-12 kDa + 18,5 kDa et 18,5kDa+18,5 kDa. Les calculs de masse apparente en gel établis après "scanning" du gel et analyse informatique sont toutefois approximatifs.

La zone d'interaction semble être limitée à la séquence palindromique entourant le site d'initiation de la transcription (fig37) à l'exception des bases TGCC qui suivent celle-ci. L'oligoWT fixe faiblement la protéine correspondant à la bande D que nous supposons être la protéine de 18,5 kDa (associée ou non à un complexe plus important). Celle-ci peut être labile (l'extrait utilisé fig 8 étant préparé plusieurs mois auparavant) ou se fixe sur une zone plus large comprenant les bases TGCC. Un "footprint" effectué sur le brin complémentaire (en marquant l'autre extrémité de l'ADN) nous permettrait de vérifier l'étendue de l'empreinte de la 18,5 kDa de part et d'autre de la séquence inversée. Les figures 47 et 48 schématisent les modèles inspirés de ces hypothèses.

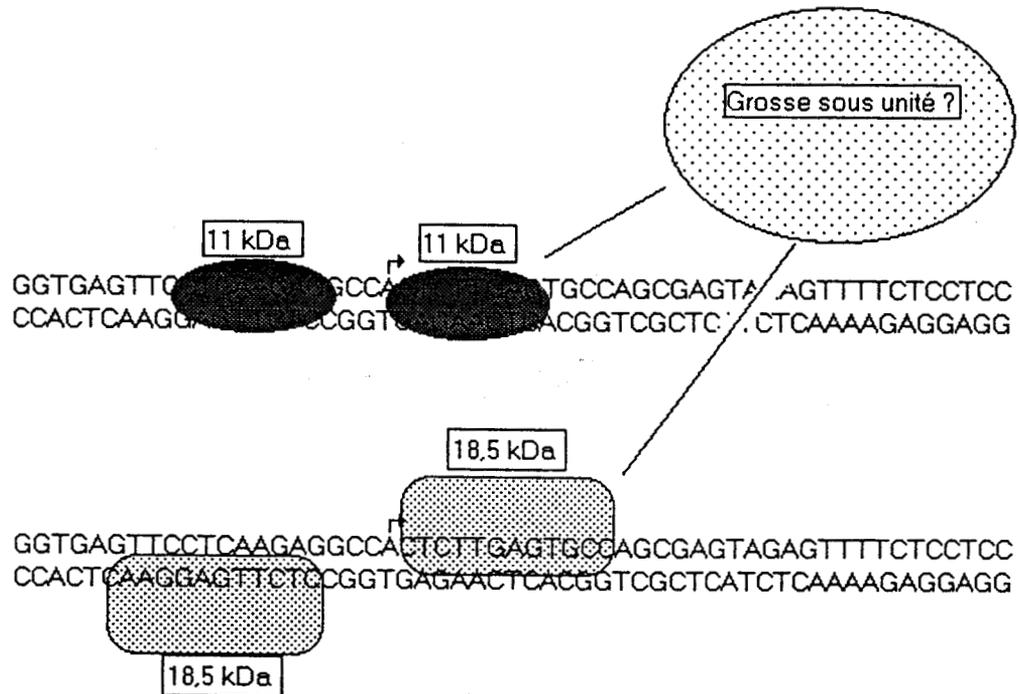


Figure 47: Fixation hypothétique des protéines de 10-12 kDa (11 kDa) et 18,5 kDa sur la séquence entourant le site d'initiation de la transcription.

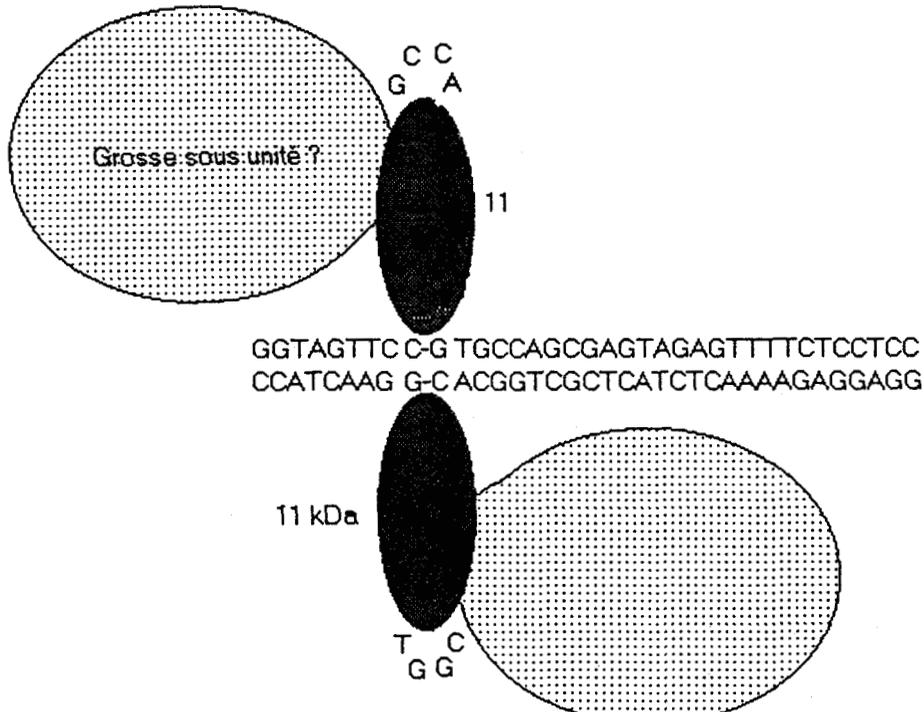


Figure 48: Fixation possible de la protéine de 10-12 kDa (11 kDa) sur la structure secondaire potentielle calculée d'après la séquence primaire. Cette interaction permettrait de stabiliser l'épingle à cheveux.

V TRANSCRIPTION *IN VITRO*

La technique de transcription *in vitro* permet d'étudier l'initiation de la transcription et l'élongation des messagers en dehors de toute autre étape de l'expression d'un gène.

Le résultat du comptage radioactif, correspondant à la quantité de transcrits illustré figure 38, démontre une fois encore l'influence notable de la séquence située entre +1 et +12 (deuxième moitié de la séquence palindromique). L'élimination de cette séquence induit une chute du niveau de transcription basal enregistré pour le plasmide non muté. Nous remarquons toutefois une augmentation importante de la transcription après délétion de la séquence située entre +34 et +53. Cependant cette zone est située, en grande partie, en dehors de la *séquence conservée*. Les résultats obtenus par Hearing et Shenk (1983) en transcription *in vitro* étaient du même ordre. En effet la délétion 41 (fig 18), située sur la symétrie inversée réduisait de trois fois le niveau de transcription du type sauvage.

Ces résultats sont à rapprocher de la détection de la fixation des protéines sur la même zone. Il semble donc que la séquence inversée entourant le site d'initiation de la

transcription soit la cible sur laquelle se fixe une protéine dont la fonction possible, *in vitro*, est de favoriser la transcription de la région E1A.

Blair *et al.* (1987) et Alonso-Caplen *et al.* (1988) ont reporté une activation de la transcription induite par structure secondaire de la séquence 5' non-codante des ARNm du virus de l'herpès et du MLP de l'adénovirus (fig 49).

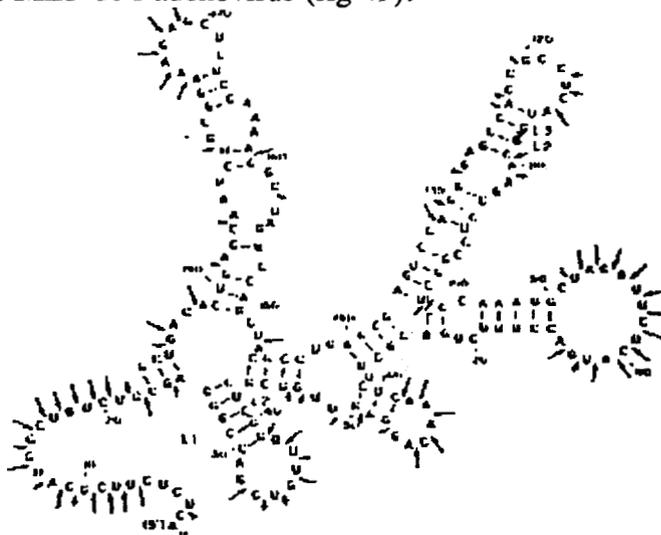


Figure 49: Structure complexe de la séquence 5' non-codante transcrite à partir du MLP de l'adénovirus.

Quelle peut être la part active de la structure potentielle de l'ARNm E1A dans la transcription ? La destabilisation effective de cette structure pour les mutants dl1-22 et dl12-22 accompagne une chute de transcription. Cependant la chute est faible et aucun argument supplémentaire ne nous permet d'infirmer ou d'affirmer cette hypothèse. Enfin l'augmentation du taux de transcription accompagnant la délétion des bases +34 à +53 est difficilement explicable. Aucun site consensus d'activation connu n'est présent dans cette zone qui est située, par ailleurs, en majeure partie en dehors de la *séquence conservée*.

Enfin une dernière hypothèse intéressante peut être envisagée. Un nouveau concept a récemment été mis en évidence: le facteur se liant à la séquence TATA, TFIID, interagirait avec des séquences situées en aval de celle-ci (Carcamo *et al.*, 1990; Nakatani *et al.*, 1990). La *séquence conservée* peut correspondre à cette hypothèse. L'un des résultats obtenus par Hearing et Shenk (1983) semble intéressant à ce sujet. En effet, la délétion 36 (fig 18) qui était située entre la séquence TATA et la zone conservée enlevait juste trois

paires de bases non conservées. Néanmoins cette petite délétion entraînait une très importante baisse du taux de transcription et également une initiation de la transcription différente. Ce résultat argumenterait une interaction possible entre un facteur se liant sur la *séquence conservée* et TFIID ou la fixation de TFIID à cheval sur ces deux séquences (fig 50). Un écartement ou le rapprochement de ces deux zones d'interaction entraînerait une déstabilisation du complexe de transcription. Pour étudier la *séquence conservée* il serait peut-être nécessaire de déléter les séquences situées à coté de celle-ci (!). D'autre part la conservation du site d'initiation de la transcription, CACTTC, chez les eucaryotes supérieurs (Bucher, 1990) pourrait être l'un des sites d'interactions conservés.

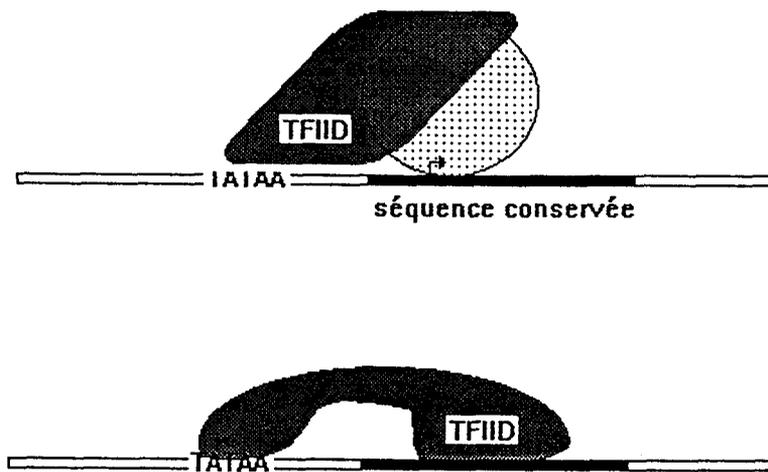


Figure 50: Interaction possible de la *séquence conservée* avec le facteur TFIID par liaison directe ou par l'intermédiaire d'un facteur protéique.

VI COMPLEXES RIBONUCLEOPROTEIQUES NUCLEAIRES ET STABILITE DES ARN

L'association des ARN synthétiques avec les protéines nucléaires détectées figure 40 ne varie pas en fonction des délétions en présence d'inhibiteur de RNase et lorsque le "pontage" par les rayons ultra-violets est effectué rapidement. Nous n'avons pas détecté de protéine se liant de façon spécifique à la *séquence conservée* sous forme ARN dans un extrait nucléaire. Les protéines détectées comme étant associées à l'ARN synthétique E1A

correspondent aux ribonucléoprotéines nucléaires connues comme composant la particule 40S localisée dans le noyau (Beyer *et al.*, 1977). Cependant nous détectons deux autres protéines associées de masse apparente en gel de 10 kDa et 19-21 kDa. Ces deux protéines sont présentes en quantités importantes au cours du stade tardif de l'infection. On peut rapprocher cette dernière protéine de 19-21 kDa de la protéine de 19 kDa codée par la région E1B de l'adénovirus dont l'expression est accrue lors du stade tardif de l'infection virale. Nous ne pouvons, toutefois, pas affirmer à coup sûr que cette protéine n'est pas d'origine cellulaire.

Les résultats intéressants d'associations des ribonucléoprotéines nucléaires au cours du cycle de l'adénovirus n'ont pas fait l'objet de publications. L'utilisation de cette technique permettrait d'étudier ce phénomène dans le but de déterminer la régulation des modifications et du transport des ARNm par les protéines virales dont on connaît peu de choses (Flint, 1985).

La pré-incubation des ARN synthétiques dans l'extrait nucléaire induit une baisse de l'association des protéines de la particule 40S avec ceux-ci. Il apparaît donc que, l'association en question n'étant pas spécifique de la séquence étudiée, les ARN délétés de la *séquence conservée* soient plus sensibles à la dégradation et donc plus instables *in vitro*.

Ce phénomène a déjà été étudié par Furuichi *et al.* (1977). En effet, la délétion des structures 5' de l'ARNm des réovirus a été montrée comme la cause de l'augmentation de leur dégradation. D'autre part la fusion des séquences 5' de l'ARNm de globine à l'ARNm de l'oncogène *c-fos* rend ce dernier plus sensible à la dégradation (Treissman, 1985). La demi-vie des ARNm de l'adénovirus est contrôlée au cours du stade précoce par la protéine de 72 kDa codée par la région E2A (Carter and Blanton, 1978; Babich and Nevins, 1981). Cette protéine se fixerait sur l'ARN et contrôlerait la dégradation de celui-ci (Cleghon and Klessig, 1986; Lazarides *et al.*, 1988). Nous n'avons pas détecté de protéine proche de cette masse en gel associée aux ARN synthétiques.

L'une des caractéristiques de la *séquence conservée* serait donc potentiellement de protéger l'ARNm E1A de la dégradation. Les structures secondaires potentielles de la

séquence en question sont peut-être mises en cause. Il serait en effet plus difficile de dérouler la "pelote de laine" que représente l'ARNm E1A associé aux protéines (Konings *et al.* 1987) si l'extrémité est elle-même sous forme de "noeud".

Le renouvellement des ARNm et la régulation de leur dégradation constitue un contrôle important de l'expression des gènes en lui-même et est encore peu étudié ou pris en compte par les auteurs (Ross, 1989).

VII ESTIMATION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES E1A EN FONCTION DES DELETIONS

L'analyse du taux d'expression de E1A en fonction de l'activité CAT s'est avérée ardue au cours des premières expérimentations. En effet les paramètres intervenant avant l'obtention du résultat final étant nombreux, les artefacts susceptibles d'affecter chaque étape pouvaient modifier l'activité CAT mesurée en fin de compte. L'expérience nous a montré que la *séquence conservée* était impliquée à la fois dans la régulation de la transcription, dans le contrôle de la traduction et potentiellement dans la stabilité des messagers.

Néanmoins les moyennes enregistrées se sont révélées compatibles avec les hypothèses concernant le rôle de la *séquence conservée*. L'histogramme représenté figure 45 nous montre indirectement que l'expression des protéines E1A est diminuée après délétion des nucléotides situés entre +1 et +12. Ce résultat est comparable à ceux obtenus en traduction *in vitro*. L'augmentation de l'activité CAT en fonction de la délétion s'étendant de +16 à +22 est comparable à l'augmentation de la traduction *in vitro* de l'ARN délété de la même zone (fig 43). Cependant la transfection de la région E1A "type sauvage" induit une activité CAT importante.

Les résultats de ces expériences, pris isolément, sont difficilement interprétables. Mais leur analyse, en connaissance des résultats d'expériences *in vitro*, permettant d'isoler chaque phénomène, argumente les hypothèses concernant les influences de la *séquence*

conservée.

VIII TRADUCTION *IN VITRO* DES ARN DELETES DE LA SEQUENCE CONSERVEE

La traduction *in vitro* des ARN synthétiques permet de définir quels sont les zones de la séquence 5' non-codante qui influent sur la traduction des protéines E1A et si la structure complexe de ces séquences est impliquée. Les ARN, préalablement chauffés ou non (pour détruire partiellement les structures secondaires), ont été traduits. Les ARN chauffés sont traduits plus facilement si les structures secondaires, détruites dans ce cas, inhibent l'initiation de la traduction (néanmoins ces ARN se renaturent probablement dans le milieu, atténuant ainsi l'effet observé). L'illustration de l'une de ces expériences (fig 43) montre que les ARN, à l'exception de l'ARN délété entre +22 et +34, ont probablement une structure secondaire affectant la traduction. L'ARN correspondant au "type sauvage" possède probablement une structure secondaire affectant la traduction. Il est traduit plus efficacement que le plasmide délété des nucléotides situés entre +1 et +16 et adopte probablement une structure secondaire complexe car il est traduit plus efficacement après chauffage. La délétion 16-22 provoque une forte augmentation de la traduction; mais celle-ci est peu augmentée par le chauffage. La dernière délétion, située entre +22 et +34 induit une chute de la traduction qui est peu modifiée après chauffage de l'ARN .

Le calcul des structures secondaires de chaque ARN peut expliquer les résultats obtenus. La structure en "épingle à cheveux" calculée d'après la séquence originale de l'ARNm E1A est affectée différemment selon les délétions. L'ARN synthétique correspondant théoriquement au type sauvage a une structure secondaire potentielle différente de celui-ci. En effet la mutation *Hind* III introduite dans le type sauvage modifie les deux premières bases de celui-ci et déstabilise un peu la structure secondaire (fig 51).

IX FIXATION DE PROTEINES CYTOPLASMIQUES SUR LA SEQUENCE 5'-NON CODANTE

La synthèse d'ARN synthétiques bromés nous a permis d'estimer la masse apparente en gel des protéines du cytoplasme affines pour la séquence 5' non-codante contenant notamment une partie de la *séquence conservée*. Une protéine de masse apparente en gel de 50 kDa s'associe avec les ARN synthétiques longs. Cette protéine correspondrait probablement au facteur eIF2 de poids moléculaire de 49 kDa qui est l'une des protéines majeures associées aux ARNm dans le cytoplasme (Spirin and Ajtkhozhin, 1985; Dreyfuss *et al.*, 1988). La protéine de 36 kDa associée aux ARN courts serait alors potentiellement l'autre protéine majeure associée aux ARN dont la masse apparente en gel a été ici peu modifiée par la liaison aux nucléotides "pontés" (Spirin and Ajtkhozhin, 1985; Dreyfuss *et al.*, 1988). Ces résultats montrent une spécificité particulière de fixation de ces protéines en fonction de la longueur de l'ARN et probablement des séquences 5' non-codantes. Cette observation ne semble pas avoir fait l'objet de publications dans la littérature. L'absence de fixation de la protéine de 36 kDa sur l'ARN le plus délété peut être due au besoin de cette protéine d'une séquence de longueur suffisante pour initier la traduction comme nous l'avons relaté plus haut. La fixation particulière d'une protéine sur l'ARN délété entre les nucléotides +1 et +16 est spécifique à ce dernier. Cette protéine possède une masse apparente en gel de 33 kDa et n'a pas fait l'objet, à notre connaissance, d'observation dans la littérature. Nous ne l'avons pas détectée dans les lysats de réticulocytes. Cependant la fixation en grande quantité de la protéine de 36 kDa peut masquer cette protéine.

Cette découverte intéressante se rapproche des observations précédentes concernant la traduction de l'ARN correspondant et la structure en épingle à cheveux qu'il est susceptible d'adopter. L'ensemble de ces résultats nous permet de formuler une hypothèse concernant le rôle de la structure en épingle à cheveux: la séquence 5' non-codante des ARNm E1A de l'adénovirus adopte une structure secondaire complexe présentant une boucle formée de quatre uridines. Cette structure complexe est formée à partir d'une *séquence conservée* chez tous les adénovirus humains, simiens et canins. Elle est la cible de

fixation d'une protéine de masse apparente en gel de 33kDa. Cette structure inhibe la traduction efficace des ARNm E1A. La fixation de la protéine de 33 kDa est potentiellement liée à l'activité d'inhibition de la traduction.

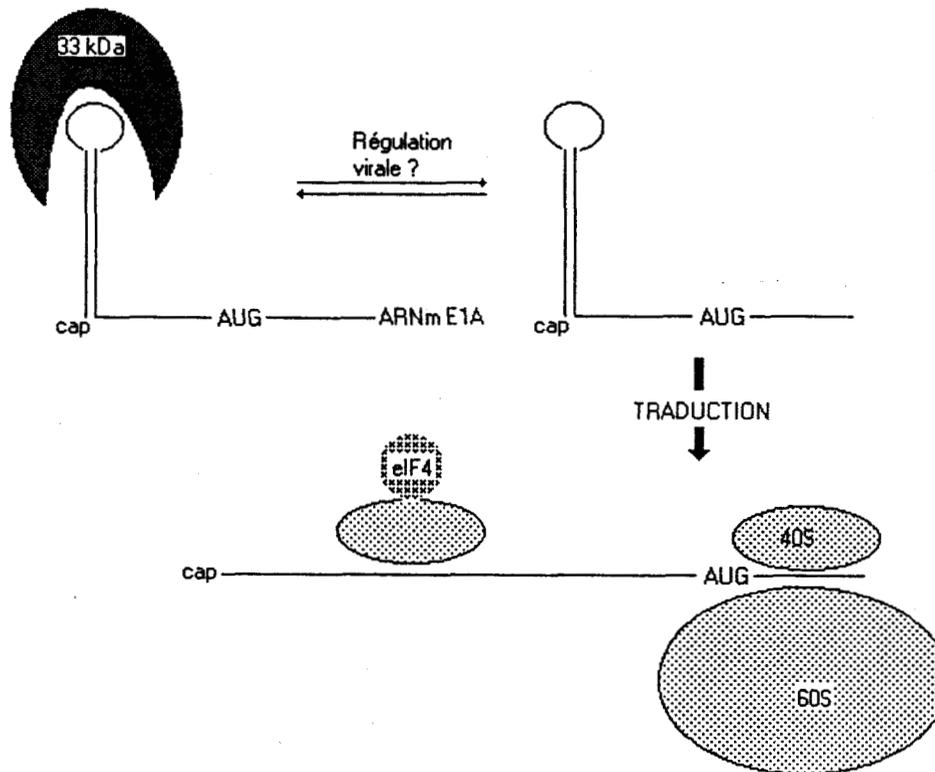


Figure 52: Modélisation des interactions de la 33 kDa avec la structure complexe conservée de l'ARNm E1A.

Cette structure serait la cible de fixation d'une protéine qui inhiberait, soit par stabilisation de la structure, soit par interférence avec d'autres molécules, la traduction efficace des protéines E1A

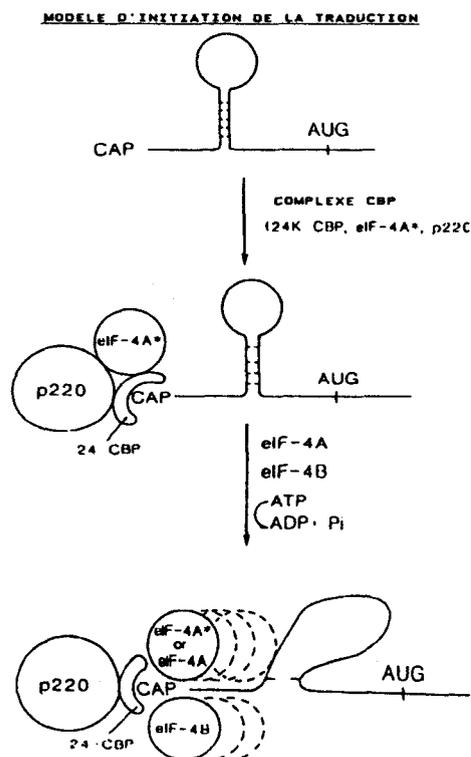


Figure 53: Illustration de l'inhibition de la traduction par une structure complexe de la séquence 5' non-codante de l'ARNm.
Le complexe d'initiation doit passer outre une structure stable.

X LOCALISATION DU SITE D'INHIBITION INTERSEROTYPIQUE DES REGIONS E1A DES ADENOVIRUS DE TYPE 2,3 ET 12.

La traduction de la chloramphénicol-acétyl transférase dont le gène est cloné en aval de la séquence 5' non codante de l'ARNm E1A a été estimée en fonction de son activité enzymatique. Les différents plasmides contenant le gène *cat* ont été co-transfectés avec les régions E1A des sérotypes d'adénovirus 2, 3 et 12. D'une façon générale, la délétion de tout ou partie de la *séquence conservée* induit une chute drastique de l'expression du gène. Comme nous l'avons relaté plus haut cette baisse peut être attribuée à la séquence réduite dont la longueur ne permet pas une initiation efficace de la traduction. La faible expression de base du plasmide délété de la séquence située entre +1 et +12 peut être attribuée à une transcription plus faible (c.f. transcription *in vitro*).

Cependant les plasmides délétés de la *séquence conservée* ne sont pas affectés de la même manière que le plasmide porteur de cette séquence par l'inhibition des protéines E1A

des sérotypes 3 et 12. Il semble donc que l'une des cibles potentielles de cette inhibition soit située au niveau de la *séquence conservée*. Prenons le cas de l'inhibition par l'Ad3. Il fait chuter d'un facteur 10 l'activité de base du promoteur E1A contenant la *séquence conservée*. Il ne modifie pas l'activité du plasmide contenant les nucléotides +1 à +12 et augmente légèrement celle du promoteur délété de ces derniers. L'Ad12, outre la forte inhibition qu'il exerce au niveau du pWT*cat*, provoque la chute de l'activité du promoteur p+12*cat* d'un facteur 2 tandis qu'il augmente celle du p+1*cat*.

En conclusion on peut situer le site d'inhibition des protéines E1A des adénovirus de type 3 et 12 au niveau de la *séquence conservée*. Cette inhibition peut être effective à deux niveaux. D'abord l'absence des nucléotides situés entre +12 et +38 lève la majeure partie de l'inhibition. Cependant la présence de la séquence située entre +1 et +12 permet une faible inhibition par l'Ad12, alors que la délétion de cette séquence autorise une augmentation de l'activité de base.

L'inhibition intersérotypique peut être effective lors de la transcription au niveau de la séquence inversée entourant le site d'initiation de la transcription et/ou lors de l'initiation de la traduction. En tenant compte des hypothèses formulées précédemment on peut supposer qu'il existe des interactions plus ou moins directes entre les protéines E1A des adénovirus oncogéniques et la protéine cytoplasmique de 33 kDa et/ou les protéines se fixant sur la forme ADN de la *séquence conservée*. Cette régulation de la *séquence conservée* par les produits E1A des sérotypes 3 et 12 révèle probablement l'un des mécanismes d'auto-régulation de la région E1A. Il faut rappeler que la région E1A se régule négativement au stade tardif de l'infection; le site présumé de cette rétro-inhibition étant les séquences "enhancers". L'un des autres sites potentiels prévalant est la *séquence conservée* sous forme ADN (le site palindromique) ou ARN (la structure complexe 5' non-codante). Ce dernier élégant modèle de régulation a été décrit pour les gènes de tubuline (Cleveland, 1988).

CONCLUSION

I QUEL EST LE ROLE DE LA SEQUENCE CONSERVEE ?

D'abord, au fil des résultats et de la discussion, une évidence est apparue; il n'existe pas une *séquence conservée* mais deux séquences conservées imbriquées l'une dans l'autre ou proches l'une de l'autre. Ces deux séquences influent sur l'expression de la région E1A à deux niveaux différents: la transcription et la traduction.

C'est pourquoi les premières investigations concernant l'étude fonctionnelle d'une telle séquence se sont avérées d'abord inextricables et parfois incohérentes. Néanmoins des éléments de réponses sont apparus grâce notamment aux techniques d'études *in vitro* qu'il a fallu maîtriser ou mettre au point. Nos hypothèses se fondent donc sur les résultats obtenus à partir de ces techniques.

La séquence entourant le site d'initiation de la transcription de la région E1A possède une structure symétrique et est la cible de fixation de deux facteurs protéiques nucléaires. Les sous-unités affines pour l'ADN de ces protéines ont une masse apparente en gel de 10-12 kDa et 18,5 kDa. Cette séquence, par l'intermédiaire ou non des interactions énoncées ci-dessus, facilite la transcription basale de la région E1A.

La séquence 5' non-codante de l'ARNm E1A adopte potentiellement une structure secondaire complexe en épingle à cheveux surmontée d'une boucle. Cette structure peut être la cible de fixation d'une protéine cytoplasmique de masse apparente en gel de 33 kDa. Elle inhibe, en relation ou non avec cette interaction, la traduction des protéines E1A.

A l'avenir il sera important de réintroduire cette séquence modifiée dans son contexte naturel, c'est à dire le virus. Nos essais répétés se sont avérés infructueux. Néanmoins cette opération permettra de vérifier nos hypothèses notamment lors du cycle viral.

II POURQUOI LA *SEQUENCE CONSERVEE* L'EST-ELLE ?

La question principale qui a motivé l'entreprise de ce travail était de déterminer le rôle fondamental d'une séquence nécessitant la conservation presque parfaite de celle-ci lors de l'évolution. Il est légitime de s'interroger sur la conservation "obligée" d'un site d'activation de transcription à ce niveau. Il faut se rappeler que la région E1A est la première à être transcrite au tout début de l'infection virale (fig 6). Les protéines E1A vont permettre l'expression des autres régions précoces. Mais la question qui reste en suspens est de savoir ce qui permet l'expression quasi instantanée de cette région E1A. Le génome de l'adénovirus est encore sous forme nucléoprotéique lorsque la transcription de E1A débute. D'autre part l'ADN à transcrire n'est donc pas intégré dans la chromatine active (Wong et Hsu, 1989).

La publication par Wong et Hsu (1989) de la structure du génome viral "enrobé" dans les protéines du core, pV et pVII nous a vivement intéressé. La figure 54 montre cette structure hypothétique. Si l'on observe la zone correspondant à la région E1A on s'aperçoit qu'elle est située au niveau d'un coude libre de toute interaction avec les protéines du core. La mesure à l'aide d'un double décimètre de la longueur du "bras" libre et le rapide calcul en fonction de la longueur et de la carte du génome nous indique que la position de ce coude correspond à quelques dizaines de bases près à la *séquence conservée* ! La forme de coude n'est pas sans rappeler la forme particulière, plus ou moins tordue, que nous avons évoquée en discutant de la forme de la structure de la *séquence conservée*.

Si nous poussons l'hypothèse un peu plus loin, la *séquence conservée* située autour du cap site permettrait d'exposer une séquence en dehors du complexe ribonucléoprotéique et de capter un facteur protéique permettant l'initiation de la transcription ou la détorsion de l'ADN permettant celle-ci. Cette interaction pourrait aussi permettre l'ancrage de la région E1A dans la chromatine active. En fait la situation dans laquelle se trouve E1A au début du cycle viral pourrait être rapprochée du plasmide contenant cette région transcrit *in vitro* qui doit être exprimé en dehors de toute chromatine active. A l'opposé du plasmide transfecté, dont on connaît mal le processus d'expression, mais qui peut être transcrit au niveau des

structures cellulaires en place.

Enfin il est à priori paradoxal que l'ARNm E1A possède une structure inhibant sa traduction. Néanmoins ce n'est pas un cas isolé (Kozak, 1989; Sonenberg, 1988) et si l'on sait que la région E1A peut inhiber l'expression d'autres protéines nécessaires à la progression du cycle ou être toxique pour la cellule, la présence d'un tel site de régulation permet de contrôler ou d'éviter un tel risque.

Le mécanisme d'inhibition intersérotypique s'intègre bien dans cette dernière hypothèse. Les mécanismes d'inhibition mis en évidence entre les différents sérotypes, trahissent peut-être l'un des processus généraux d'autorégulation des protéines E1A sur leur expression, telle la rétroinhibition effective au stade tardif de l'infection (fig 12).

Enfin la recherche des rôles des séquences conservées proches du site d'initiation de la transcription de E1A nous a permis de suivre les principales étapes de l'expression d'un gène et, en fonction de celles-ci, d'utiliser des techniques variées.

Les mécanismes de régulation complexes de la cellule sont souvent imbriqués entre eux. L'étude précise de l'une de ces régulations nécessite d'avoir une vision élargie du monde cellulaire afin d'être à même de la replacer dans le contexte de la cellule, de l'organe ou de l'individu.

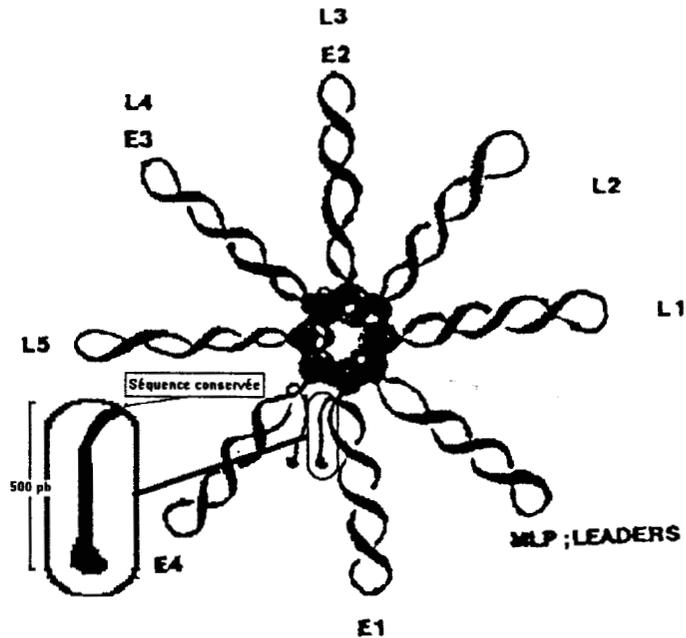


Figure 54: Schématisation du complexe ADN-protéines représentant le génome de l'adénovirus lié avec les protéines du core: pV et pVII (Wong et Hsu, 1989). L'ADN de l'adénovirus commence à être transcrit sous cette forme au début du cycle viral. La *séquence conservée* est d'après nos calculs, située au niveau du coude d'"entrée" et pourrait être le site potentiel d'initiation de la transcription en dehors de toute chromatine active.

BIBLIOGRAPHIE

ADAM, S. A. and DREYFUSS G. 1987. Adenovirus protein associated with mRNA and hnRNA in infected HeLa cells. JOURNAL OF VIROLOGY., 61, 3276-3283

ADAMI, G.R., and BABISS, L.E. 1990. The efficiency of adenovirus transformation of rodent cells is inversely related to the rate of viral E1A gene expression. JOURNAL OF VIROLOGY. 64, 3427-3436.

ADRIAN, T., WIGAND, R., and HIERHOLZER, J.C. 1985. Immunological and biochemical characterization of human adenovirus from subgenus B. II. DNA restriction analysis. ARCHIV OF VIROLOGY, 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, Martimus Hijhall publishing

ALONSO-CAPLEN F. V., KATZE M. G. and KRUG R. M. 1988. Efficient transcription, not translation, is dependent on adenovirus tripartite leader sequences at late times of infection. JOURNAL OF VIROLOGY., 62, 1606-1616.

ANDERSON K.P and FENNIE E.H. 1987. Adenovirus early region 1A modulation of interferon antiviral activity. JOURNAL OF VIROLOGY, 61: 787-795

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

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. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 149, 189-221

BARETT, P., CLARK, L., and HAY, R.T. 1987. A cellular protein binds to a conserved sequence in the adenovirus type 2 enhancer. NUCLEIC ACIDS RESEARCH., 15, 2719-2735

BELLETT A.J. 1983. Adenovirus-induced alterations of the cell growth cycle: a requirement for expression of E1A but not of E1B. JOURNAL OF VIROLOGY, 45, 192-199

BERK A.J. 1986. Adenovirus promoters and E1A transactivation. ANNUAL REVIEW OF GENETICS, 20, 45-79

BERK A.J. 1986. Functions of adenovirus E1A. CANCER SURVEYS, 5, 367-387

BERK A.J. and SHARP P.A.. 1977. Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. CELL. 12, 721-732

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., DE LEEUW M.G., HOUWELING A., van der EB A.J. 1986. Role of the adenovirus early region 1B tumor antigens in transformation and lytic infection. *VIROLOGY*, 150, 126-139

BERNARDS R., SCHRIER P.I., BOS J.L., van der EB A.J. 1983. Role of adenovirus types 5 and 12 early region 1b tumor antigens in oncogenic transformation. *VIROLOGY*, 127, 45-53

BERNARDS, R., and van der EB, A.J. 1984. Adenovirus: transformation and oncogenicity. *BIOCHEMICA AND BIOPHYSICA ACTA*, 783, 187-204

BORELLI E., HEN R., WASYLYK C., WASYLYK B. and CHAMBON P. 1986. The immunoglobulin heavy chain enhancer is stimulated by the adenovirus type 2 E1A products in mouse fibroblasts. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*,

BORRELLI E, HEN R, CHAMBON P. 1984. Adenovirus-2 E1A products repress enhancer-induced stimulation of transcription. *NATURE*, 312, 608-612

BOS J.L. and van der EB A.J. 1985. Adenovirus region E1A: transcription modulator and transforming agent. *TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES* 310-313

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 72, 248-254

BRAITHWAITE A.W., CHEETHAM B.F., LI P., PARISH C.R., WALDRON-STEVENSON L.K. 1983. Adenovirus-induced alterations of the cell growth cycle: a

requirement for expression of E1A but not of E1B. JOURNAL OF VIROLOGY, 45, 192-199

BRANTON P.E., BAYLEY S.T., GRAHAM FL. 1984. Transformation by human adenoviruses. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 780, 67-94

BRANTON P.E., BAYLEY S.T., and GRAHA, F.L. 1985. Transformation by human adenovirus. BIOCHEMICA AND BIOPHYSICA ACTA, 780, 67-94

BRAWERMAN G. 1987. Determinants of messenger RNA stability. CELL. 48, 5-6

BUCHER P. 1990. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY 212, 563-578.

CARTER T.H., and BLANTON R.A. 1978. Possible role of the 72 kDa DNA binding protein in regulation of adenovirus type 5 early gene expression. JOURNAL OF VIROLOGY, 25, 664-674

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

CARCAMO J. MALDONADO E., CORTES P., AHN M. H. , ILHO-HA, KASAI Y., FLINT J. and REINBERG D. 1990. A TATA like sequence located downstream of the transcription initiation site is required for expression of an RNA polymerase II transcribed gene. GENES AND DEVELOPMENT. 4, 1611-1622

CHARDONNET Y., and DALE, 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 JOURNAL, 7, 835-841

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

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. JOURNAL MOLECULAR BIOLOGY, 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*. PROCEEDINGS OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 83, 8947-8951

CLEVELAND D. W. 1988. Autoregulated instability of tubulin mRNAs: a novel regulatory mechanism. TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES 13, 339-343

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. PROCEEDINGS OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 69, 2110-2115

COURTOIS G, BERK A. 1984. Adenovirus E1A protein activation of an integrated viral gene. *EMBO JOURNAL*, 3, 1145-1149

CULP S.J., WEBSTER C.L., FRIEDMAN, D.J., SMITH, L.C., HUANG, WEI-J., WU F.Y.H., ROSENBERG, M., and RICCIARDI, P., R. 1988. The 289-amino acid E1A protein of adenovirus binds zinc in a region that is important for trans-activation. *PROCEEDINGS OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA USA*, 85, 6450-6454.

D'HALLUIN J.C. 1980. Génétique de l'adénovirus. *BULLETIN DE L'INSTITUT PASTEUR*, 78, 347-405

DAHLBERG E.A. 1989. The functional role of ribosomal RNA in protein synthesis. *CELL*, 57, 525-529.

DEKKER B. M. M., KONINGS A. M., DENISOVA T. S., GIBADULIN R. A. and van ORMONDT H. 1984. The nucleotide sequence of the leftmost fragment (6%) of simian adenovirus SA7P. *JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY*, 65; 1699-1708

DELSERT C. 1985. Permissivité et hiérarchie de transdominance intersérotypique dans le système adenovirus humain-cellules simiennes . Thèse, Université de Lille I.

DELSERT C., and D'HALLUIN J.C. 1984. Genetic expression of human adenoviruses in simian cells: evidence for interserotypic inhibition of viral DNA synthesis. *VIRUS RESEARCH*, 1, 365-380

DERY C.V., HERRMANN C.H., and MATHEWS M.B. 1987. Response of

individual adenovirus promoters to the products of the E1A gene. *ONCOGENE*, 2, 15-23

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. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 11, 1475-1489

DIJKEMA R, DEKKER BM, van der FELTZ MJ, van der EB AJ. 1979. Transformation of primary rat kidney cells by DNA fragments of weakly oncogenic adenoviruses. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 32, 943-950

DIJKEMA R, DEKKER BM, van ORMONDT H, DE WAARD A, MAAT J, BOYER HW. 1980. Gene organization of the transforming region of weakly oncogenic adenovirus type 7: the E1a region. *GENE*, 12, 287-299

DREYFUSS G. , SWANSON M. and PINOL-ROMA S. 1988. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES* 13, 86-91

ECHARDT, T. 1979. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *PLASMID*, 1, 584-588

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

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. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 5, 2653-2661

FLEWETT, T.H., BRYDEN, A.S., DAVIES, H., and MORRIS, C.A. 1975. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. Lancet, 1, 4-5

FLINT S. J. 1986. Regulation of adenovirus mRNA formation. ADVANCES IN VIRUS. RES. 31, 169-228

FRANZA BR JR, MARUYAMA K, GARRELS JI, RULEY HE. 1986. *In vitro* establishment is not a sufficient prerequisite for transformation by activated *ras* oncogenes. CELL, 44, 409-418

GALAS, D.L., and SCHMITZ, A. 1978. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 5, 3157-3171

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. PROCEEDINGS OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES AMERICA , 81, 1193-1197

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. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 257, 13475-13491

GLENN G. M. and RICCIARDI R. P. Detailed kinetics of adenovirus type-5 steady-state transcripts during early infection. VIRUS RESEARCH? 9, 73-91

GLISIN, V., GKVENJAKOV, R., and BYUSS, C. 1977. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. BIOCHEMISTRY, 13, 2633-2637

GORMAN,C.M., MOFFART, L.F., and HOWARD,B.H. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl-transferase in mammalian cells. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 2, 1044-1051

GRAHAM FL, EB AJ van der.1973. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5.VIROLOGY, 1973 , 536-539

GRAHAM FL, ROWE DT, MCKINNON R, BACCHETTI S, RUBEN M, BRANTON PE. 1984. Transformation by human adenoviruses.JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY Suppl, 3: 151-163

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

HARLOW E, FRANZA BR JR, SCHLEY C. 1985. Monoclonal antibodies specific for adenovirus early region 1A proteins: extensive heterogeneity in early region 1A products.JOURNAL OF VIROLOGY, 55, 533-546

HARLOW E, WHYTE P, FRANZA BR JR, SCHLEY C. 1986. Association of adenovirus early-region 1A proteins with cellular polypeptides.MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 6, 1579-1589

HEARING P, SHENK T. 1983. Functional analysis of the nucleotide sequence surrounding the cap site for adenovirus type 5 region E1A messenger RNAs. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 167, 809-822

HEARING P, 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. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 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., 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

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. NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 11, 8747-8761

HEARING P, SHENK T. 1983. Functional analysis of the nucleotide sequence surrounding the cap site for adenovirus type 5 region E1A messenger RNAs. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 167, 809-822

HEARING P, 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. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 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., 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

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. NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 11, 8747-8761

HERBST R.S., PELLETIER M., BOZCKO E.M., and BABISS L.E. 1990. The state of cellular differentiation determines the activity of the adenovirus E1A enhancer element : evidence for negative regulation of enhancer functions. JOURNAL OF VIROLOGY. 64, 161-172.

HOEFFLER, W.K., KOVELMAN, R., and ROEDER, R. 1988. Activation of transcription factor IIIc by the adenovirus E1A protein. CELL, 59, 907-920

HORNE, R.W., BRENNER, S., WATERSON, A.P., and WILBY, P. 1959. The icosahedral form of an adenovirus. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 1, 84-86

HUEBNER, R.J., ROWE, W.P., and LANE, W.T. 1962. Oncogenic effects in hamsters of adenovirus types 12 and 18. PROCEEDINGS OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES AMERICA , 48, 2051-2058

ISHIBASHI, M., and MAIZEL, J.V., Jr. 1974. The polypeptides of adenovirus. VI. Early and late glycopeptides. VIROLOGY, 58, 345-361

JOCHEMSEN AG, BERNARDS R, van KRANEN HJ, HOUWELING A, BOS JL, van der Eb AJ. 1986. Different activities of the adenovirus types 5 and 12 E1A regions in transformation with the EJ *Ha-ras* oncogene. JOURNAL OF VIROLOGY, 59, 684-691

JOCHEMSEN AG, BOS JL, van der EB AJ. 1984. The first exon of region E1a genes of adenoviruses 5 and 12 encodes a separate functional protein domain. EMBO JOURNAL, 3, 2923-2927

JONES, N., and TIBBETTS, C. 1989. Upstream DNA sequences determine different auto-regulatory responses of the adenovirus types 5 and 3 E1A promoters. JOURNAL OF VIROLOGY, 63, 1833-1838

KACZMAREK L, FERGUSON B, ROSENBERG M, BASERGA R. 1986. Induction of cellular DNA synthesis by purified adenovirus E1A proteins. *VIROLOGY*, 152, 1-10

KAUFMAN R. J. 1985. Identification of the components necessary for adenovirus translational control and their utilization in cDNA expression vectors. *PROCEEDINGS OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 82, 689-693

KHOURY, G., and GRUSS, P. 1983. Enhancer elements. *CELL*, 33, 313-314

KONINGS D. A. M., HOGEWEG P. and HESPER B. 1987. Evolution of the primary and secondary structures of the E1a mRNAs of the adenovirus. *MOLECULAR AND BIOLOGICAL EVOLUTION*. 4, 300-314

KOZAK M. 1986. Regulation of protein synthesis in virus-infected animal cells. 1986. *ADVANCES IN VIRUS RESEARCH*. 31, 229-293.

KOZAK M. 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eukaryotic mRNA . *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*. 9, 5134-5142

KOZAK M. 1989. The scanning model for translation: an update. *JOURNAL OF CELLULAR BIOLOGY* , 108, 229-241

KRIPPL B, FERGUSON B, ROSENBERG M, WESTPHAL H. Functions of purified E1A protein microinjected into mammalian cells. 1984. *PROCEEDINGS OF THE*

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 81, 6988-6992.

LASSAR, A.B., MARTIN, P.L., and ROEDER, R.G. 1983. Transcription of class III genes: formation of preinitiation complexes. *SCIENCE*, 222, 740-748

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

LEITE JP, NIEL C, D'HALLUIN JC. 1986. Expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in human cells under the control of early adenovirus subgroup C promoters: effect of E1A gene products from other subgroups on gene expression. *GENE*, 41, 2

LEITE, J.P.G. 1988. La région E1A des sérotypes 2,3 et 12 de l'adénovirus: transdominance et regulation 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 LETTERS*, 235, 233-236

LEONG, K., BRUNET, L., and BERK, A.J. 1988. Factors responsible for the higher transcriptional activity of extracts of adenovirus-infected cells fractionate with the

TATA box transcription factor. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 8, 1765-1774.

LILLIE JW, GREEN M, GREEN MR. 1986. An adenovirus E1a protein region required for transformation and transcriptional repression. CELL, 46, 1043-1051

LILLIE, J.W., LOEWENSTEIN, P.M., GREEN, M.R., and GREEN, M. 1987. Functional domains of adenovirus type 5 E1A proteins. CELL, 50, 1091-1100

MAIZEL, J.V., WHITE, D.O., and SHARFF, M.D. 1968. The poly-peptides of adenovirus II. Soluble proteins, core, top components and the structure of the virion. VIROLOGY, 36, 126-136

MEIJER, I., JOCHEMSEN, WIT, de C., M., BOS, L.J., MORELLO, D, and van der EB A.J. 1989. Adenovirus type 12 E1A Down regulates expression of a transgene under control of a major histocompatibility complex class I promoter : Evidence for transcriptional control. JOURNAL OF VIROLOGY. 63, 4039-4042.

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 JOURNAL, 5, 2577-2584

MORAN E, MATHEWS M.B. 1987. Multiple functional domains in the adenovirus E1A gene. CELL, 48, 177-178

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. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 6,

3470-3480

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. JOURNAL OF VIROLOGY, 4, 777-796

NAGATA, K., GUGGENHEIMER, R.A., and HURWITZ, J. 1983. Adenovirus DNA replication *in vitro*: synthesis of full length DNA with purified proteins. PROCEEDINGS OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES AMERICA, 80, 4266-4270

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. PROCEEDINGS OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 79, 6438-6442

NAKATANI Y., HORIKOSHI M., BRENNER M., YAMAMOTO T., BESNARD F., ROEDER R. G. and FREESE E. 1990. A downstream initiation element required for efficient TATA box binding and *in vitro* function of TFIID. NATURE. 348, 86-88

NERMUT, M.V. 1979. Structural elements in adenovirus cores: evidence for a "core shell" and linear structures in "relaxed" cores. ARCHIV OF VIROLOGY. 62, 101-106

NEVINS J. R. 1987. Regulation of early adenovirus gene expression. MICROBIOLOGICAL REVIEWS. 41, 419-430

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 Flandres Artois.

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. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 263, 931-937

OSBORNE TF and BERK AJ. 1983. Far upstream initiation sites for adenovirus early region 1A transcription are utilized after the onset of viral DNA replication. JOURNAL OF VIROLOGY, 45, 594-599

OSBORNE TF, GAYNOR RB, BERK AJ. 1982. The TATA homology and the mRNA 5' untranslated sequence are not required for expression of essential adenovirus E1A functions. CELL, 29, 139-148

PARKIN. N. T., COHEN E. A., DARVEAU A., ROSEN C. HASELTINE W. and SONENBERG N. 1988. Mutational analysis of the 5' non-coding region of human immunodeficiency virus type 1: effects of secondary structure on translation. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 7, 2831-2837.

PEI, R., and BERK, A.J. 1989. Multiple transcription factor binding sites mediate adenovirus E1A transactivation. JOURNAL OF VIROLOGY, 63, 3499-3506

PHILIPP, B., and Edward, N., Trifonov. 1986. Compilation and analysis of eukaryotic POL II promoter sequences. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 14, 10009-10026.

PINA, M., and GREEN, M. 1965. Biochemical studies on adenovirus multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenoviruses.

PROCEEDINGS OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES AMERICA, 54, 447-451

PLEIJ C. W. A. 1990. Pseudoknots: a new motif in the RNA game. *TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES*, 15, 143-147

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. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 62, 3092-3102

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

RICHTER J. D. 1988. Information relay from gene to protein: the mRNP connection. *TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES* 13, 483-485

ROBINSON, A.J., YOUNGHUSBAND, H.B., and BELLET, A.J.D., 1973. A circular DNA protein complex from adenoviruses. *VIROLOGY*, 56, 54-69

ROSEN K. 1991. Regulation of HIV gene expression by RNA-protein interactionq. *TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES* . 7, 9-14

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. *PROCEEDINGS OF THE SOCIETY FOR BIOLOGICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE*, 84, 570-573

SANGER, D., NICKLEN, S., and COULSON, A.R. 1977. DNA sequencing with

chain-terminating inhibitors. PROCEEDINGS OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES AMERICA, 74, 5463-5467

SAWADA Y, FOHRING B, SHENK TE, RAOSKA K Jr. 1985. Tumorigenicity of adenovirus-transformed cells: region E1A of adenovirus 12 confers resistance to natural killer cells. VIROLOGY, 147, 413-421

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

SEIBERG, M., ALONI, Y. and LEVINE A.J. 1988. The adenovirus type 2 DNA-Binding protein interacts with the major late promoter attenuated RNA. JOURNAL OF VIROLOGY, 63, 1134-1141.

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

SHAPIRO, J.D., SHARP P. A., WALTER W.W. and KELLER M. J. 1988. A high-efficiency HeLa cell nuclear transcription extract. DNA. 7, 47-55.

SOLOWAY P. and SHENK T. 1990 The adenovirus type 5 i-leader Open Reading Frame Functions in cis to reduce the half life of L1 mRNAs. JOURNAL OF VIROLOGY 64, 551-558

SONENBERG N. 1988. Regulation of translation by poliovirus. ADVANCES IN VIRUS RESEARCH, 33, 175-184

SPIBEY N., McCLODY R. S. and CAVANAGH M.A. Identification and nucleotide sequence of the early region 1 from canine adenovirus types 1 and 2. *VIRUS RESEARCH*. 14, 241-256

SPINDLER KR and BERK AJ. 1984. Translation efficiency of adenovirus early region 1A mRNAs deleted in the 5' untranslated region. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 51, 884-888

SPRIN A. S. and AJTKHOZHIN M. A. 1985. Informosomes and polyribosomes-associated proteins in eukaryotes. *TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES*, April, 162-165

STEIN R.W and ZIFF E.B. 1987. Repression of insulin gene expression by adenovirus type 5 E1a proteins. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 7, 1164-1170

STEPHENS, C., and HARLOW, E. 1987. Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNAs that encode 30 kDa and 35 kDa proteins. *EMBO JOURNAL*, 6, 2027-2035

STILLMAN, B.W. 1986. Functions of the adenovirus E1B tumor antigens. *CANCER SURVEYS*, 5, 389-404

TIBBETTS C, LARSEN P.L and JONES S.N. 1986. Autoregulation of adenovirus E1A gene expression. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 57, 1055-1064

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.

TSUKAMOTO A.S., FERGUSON B., ROSENBERG M., WEISSMAN I.L and BERK AJ. 1986. An immunodominant domain in adenovirus type 2 early region 1A proteins. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 60, 312-6

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 JOURNAL*, 6, 2037-2044

VAESSEN R. T. M. J., HOUWELING A. and van der EB. 1987. Post-transcriptional control of class I MHC mRNA expression in adenovirus 12-transformed cells. *SCIENCE*. 235, 1486-1488

van EEKELEN, C.A.G., MARIMAN, E.C.M., REINDERS, R.J., and van VENROOIJ, W.J. 1981. Adenoviral heterogeneous nuclear RNA is associated with host cell proteins. *EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY* 119, 461-467.

van LOON A. E. , LIGTENBERG M., REEMST A. M. C. B., SUSSENBACH J. S. and ROZIJN T. H. 1987. Structure and organization of the left terminal DNA regions of fastidious types 40 and 41. *GENE*, 58, 109-126

VASAVADA R, EAGER KB, BARBANTI-BRODANO G, CAPUTO A,

RICCIARDI RP. 1986. Adenovirus type 12 early region 1A proteins repress class I HLA expression in transformed human cells. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 1986. 83, 5257-61

VIRTANEN A, PETTERSSON U. 1983. The molecular structure of the 9S mRNA from early region 1A of adenovirus serotype 2. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 165, 496-499

van der EB AJ, BERNARDS R. 1984. Transformation and oncogenicity by adenoviruses. CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY. 110, 23-51

van EEKELEN C. A. G., MARIMAN E. C. M. , REINDERS R. J. and van VENROOIJ W. J. 1981. Adenoviral heterogeneous nuclear RNA is associated with host cell proteins. EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY. 119, 461-467

van ORMONDT H, MAAT J, DIJKEMA R. 1980. Comparison of nucleotide sequences of the early E1a regions for subgroups A, B and C of human adenoviruses. GENE, 12, 63-76

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

WADELL, G. 1978. Classification of human adenovirus by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of structural polypeptides. INTERVIROLOGY, 11, 47-57

WASYLYK B., WASYLYK C., FLORES P., BEGUE A., LEPRINCE D. and

STEHELIN D. 1990. The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-fos and c-jun for transcriptional activation. NATURE 346, 191-193

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. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 7, 1222-1234

WHITE E, STILLMAN B. 1987. Expression of adenovirus E1B mutant phenotypes is dependent on the host cell and on synthesis of E1A proteins. JOURNAL OF VIROLOGY, 61, 426-435

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

WICKENS M. P. and DAHLBERG J. E. 1987. RNA-proteins interactions. CELL. 51, 339-

WILLIAMS JF. 1973. Oncogenic transformation of hamster embryo cells *in vitro* by adenovirus type 5. NATURE. 243, 162-163

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. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY. 148, 231-251

WINBERG G and SHENK T. 1984. Dissection of overlapping functions within the adenovirus type 5 E1A gene. EMBO JOURNAL, 3, 1907-1912

WOLFSON, J., and DRESSLER, D. 1972. Adenovirus DNA contains an inverted terminal redundancy. PROCEEDINGS OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES AMERICA, 64, 3054-3057

WONG M. and HSU M. 1989. Linear adenovirus DNA is organized into supercoiled domains in virus particles. NUCLEIC ACIDS RESEARCH. 17, 3535-3551

YOSHIDA K., NARITA M., and FUJINAGA K. 1989. Binding sites of HeLa cell nuclear proteins on the upstream region of adenovirus type 5 E1A gene. NUCLEIC ACIDS RESEARCH. 17, 10015-10034

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 ANALYSIS TECHNIQUES. 2, 89-94

ZERLER B, MORAN B, MARUYAMA K, MOOMAW J, GRODZICKER T, RULEY HE. 1986. Adenovirus E1A coding sequences that enable *ras* and *pmt* oncogenes to transform cultured primary cells. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 6, 887-899

ZUCKER M. and STIEGLER P. 1981. Calculation of RNA folding structure. NUCLEIC ACIDS RESEARCH. 9, 45-52.

**APPENDICE
TECHNIQUE**

I TECHNIQUES DE GENIE GENETIQUE

A) 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).

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 échantillonnées par 0,1 ml. Chacun des échantillons de bactéries est mis en contact avec 25 µl de solution d'ADN transformant. Après 20 mn dans la glace, cinq chocs thermiques de 30 sec chacun sont effectués (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 50µg/ml). Les boîtes sont incubées 18 h à 37°C et les clones résistants sont isolés.

2 - TRANSFORMATION D'E. coli SOUCHE JM109 (phage M13)

Cette souche est un hybride E.coli K12, E.coli B de génotype A96. 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 JM109 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

a) 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 H_3BO_3 89 mM pH 8,3) contenant du lysozyme à 10 mg/ml et de la ribonucléase A à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final. La suspension est déposée dans un gel d'agarose à 1 % contenant du Bromure d'Ethidium (BrEt) à 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 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).

b) 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.

B) 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 solubilisé dans 2,5 ml de Tris-HCl 50 mM pH8, saccharose 25%. Les bactéries sont placées à 0°C, on ajoute d'abord 1 ml de lysozyme à 10 mg/ml dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH8, puis, après 10 min, 1 ml d'EDTA 0,2 M pH8. Au bout de 10 mn, la lyse est complétée par addition de 4,5 ml d'une solution de Tris-HCl 50 mM pH8, EDTA 20 mM, 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 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 10 mM, EDTA 1 mM pH8. La mesure de la D.O. à 260 nm permet une évaluation de la concentration en ADN ($D.O._{260} = 0,21 \text{-----} > 10 \text{ µg/ml d'ADN}$).

C) TECHNIQUES DE MUTAGENESE

1) Délétions d'ADN par l'exonucléase Bal31

Le fragment d'ADN étudié est clivé, séparément et de part et d'autre, à une distance de 100 à 200 paires de bases de la zone à déléter.

Après précipitation à l'éthanol, les plasmide linéarisés sont resuspendus dans le tampon de digestion. Une unité d'enzyme Bal 31 (Boehringer) est ajoutée pour deux µg d'ADN. Un échantillon est prélevé à intervalles réguliers de 0 à 5 minutes.

Les échantillons sont rassemblés et co-précipités avec un oligonucléotide *Hind III* par l'éthanol. Après centrifugation et séchage, l'ADN est ligaturé par la ligase T4 puis transformé dans des bactéries Hb101.

La sélection des clones de taille désirée est effectuée par la méthode de dénaturation par la chaleur.

2) Mutagenèse dirigée

Le fragment d'ADN contenant la séquence destinée à être mutée est sous cloné dans le vecteur pSelect. Ce phagemide vecteur contient les séquences d'amplification du phage M13 ainsi que les gènes de résistance aux antibiotiques tétracycline et ampicilline. Cependant ce dernier a été muté artificiellement de façon à l'inactiver. Le sous clonage est donc effectué dans la souche JM109 et sélectionné sur milieu contenant de la tétracycline.

Le phagemide est obtenu sous forme simple brin avec l'aide d'un phage M13 mutant, le phage R408.

L'oligonucléotide contenant la mutation ainsi que l'oligonucléotide rétablissant la résistance à l'ampicilline sont hybridés au phagemide simple brin. L'enzyme de Klenow est alors ajoutée en présence des 4 désoxynucléotides de façon à synthétiser le brin complémentaire.

Les extrémités sont ligaturées par la ligase T4. Le phagemide double brin ainsi obtenu est introduit dans une bactérie et sélectionné sur milieu contenant de l'ampicilline.

Une mutation générant un site d'enzyme de restriction sera ainsi aisément repérable.

3) Séquençage de l'ADN

a) 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 μ M, dATP 100 μ M, dCTP 2 mM, dGTP 2 mM, dTTP 2 mM

- la solution de chasse 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%, BBO 0,3%.

b) Préparation de l'ADN plasmidique

1,5 μ g d'ADN sont placés dans 8 μ l d' H_2O , 2 μ l de NaOH 2 M et la réaction est laissée 5 mn à température ambiante. 7 μ l d'amorce (2 μ Mol/ μ l), 3 μ l de $CH_3COO^-Na^+$ 3 M pH 4,5 et 75 μ l d'EtOH 100 % sont ajoutés. L'ADN est laissé 20 mn dans la carboglace +éthanol Après centrifugation 15 mn à +4°C à 12000 rpm en centrifugeuse "Eppendorf", le culot est rincé avec 200 μ l 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 μ l d' H_2O .

c) Séquençage

Les mélanges ddNTP/dNTP sont échantillonnés dans les quatre tubes A, G, C, T, et un pré-mélange est préparé contenant par essai: 4 μ l de tampon transcriptase reverse 5 X, 4 μ l d'alpha- ^{32}P dCTP, 0,4 μ l DTT 50 mM, 1,6 μ l d' H_2O et 20 U de transcriptase inverse. Les 11 μ l d'ADN sont placés dans 9 μ l de pré-mélange et les 4 μ l du mélange obtenu sont ajoutés dans chaque tube A, G, C, T

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

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

II CULTURE CELLULAIRE

1) LIGNEES CONTINUES

a) Culture sur boites

Les cellules Hela et 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 3 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄-2H₂O 16 mM, KCl 2,7 mM-trypsine 1mg/ml) et réparties dans des boites de Pétri (FALCON de 60 mm de diamètre) à raison de 5 x 10⁶ cellules par boite, dans un volume de 5 ml du milieu initial.

b) Culture 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.

2) Culture de cellules primaires

Les rats nouveaux nés sont sacrifiés à l'éther entre 3 et 8 jours après leur naissance. Les reins sont prélevés après dissection. Les cellules BRK (Baby Rat Kidney) sont mises en culture après dilacération des reins et traitement à la trypsine (2,5 µg/ml). Les cellules, centrifugées 5 min à 1000g, sont reprises dans 20 ml de milieu MEM (Milieu Minimum Essentiel) contenant 20% de sérum de cheval, puis mises en culture dans des flacons (Falcon de 75 cm²) et incubées à 37 °C.

3) Techniques virologiques

a) Infection virale

L'infection est effectuée en milieu minimum sans sérum (Dulbecco). Les cellules cultivées en flacon ou sur boîtes de pétri sont lavées 3 fois avec du milieu Dulbecco. Puis les virus sont ajoutés, à raison de 10 à 50 particules par cellule dans 1 ml de milieu de Dulbecco, sur les cellules. Celles-ci sont incubées durant 1 heure à 37°C dans une étuve à CO₂ puis rincées par du milieu Dulbecco contenant 10 % de sérum de veau foetal et cultivées sur ce milieu.

b) Purification de virus

Les adénovirus 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), 1 volume de fréon 113 est additionné 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).

III ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES

1) Transfection de plasmides dans les cellules

La transfection a lieu dans les cellules confluentes à 70%. La méthode, dérivée de celle décrite par Graham et van der Eb (1973), consiste en une précipitation de l'ADN en présence de phosphate de calcium.

Environ 10 à 20 μg d'ADN sont mis dans 250 μl de tampon CaCl_2 62,5 mM et mélangé avec 250 μl d'HBS x 2 (NaCl 0,28M, Hepes 50 mM et Na_2HPO_4 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 CO_2 avec changement du milieu après 16 h.

2) Analyse des ARNm

a) Extraction des ARNs totaux

Les cellules sont rincées 3 fois par du PBS puis lysées dans les boîtes de culture par ajout de 6 ml de tampon GT (Isothiocyanate de guanidium 4M, acétate de sodium 20 mM pH 5,2, dithiothréitol 0,1 mM et N-lauryl sarcosine 0,5 %). L'ADN cellulaire est fragmenté après trois passages de la solution contenant les cellules lysées au travers d'une aiguille 21-G. Le lysat est déposé sur un coussin de césium (3,2 ml de CsCl 5,7 M, EDTA 0,1 M) dans un tube pour rotor Beckman SW41 ayant été autoclavé et siliconisé. Celui-ci est centrifugé durant 16 h à 18°C à raison de 32000 rpm.

Le surnageant est éliminé à l'aide d'une pompe à vide. Le culot d'ARN est resuspendu dans 360 μ l de TES (Tris-Cl 10 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, Sodium Dodecyl Sulfate 1%). Les protéines sont éliminées après ajout d'un volume équivalent de Chloroforme-Buthanol (4/1), mélange, centrifugation et élimination de la phase non aqueuse.

La phase aqueuse est précipitée à l'éthanol. L'ARN est resuspendu dans 100 μ l d'H₂O traitée au DEPC. La densité optique est estimée pour un échantillon de 10 μ l dilué dans 1 ml aux longueurs d'onde 260 nm et 280 nm. Une densité optique égale à 1 à 260 nm indique la présence de 40 μ g/ml d'ARN. Un rapport de densités optiques mesurées à 280 nm et 260 nm compris entre 1,8 et 2 indique une préparation d'ARN de bonne qualité (Pas ou peu contaminée par des protéines).

b) Transfert des ARNs sur membrane: "Northern blot"

10 μ g d'ARN total dissous dans un tampon prémix (5 μ l MOPS 10X, 8,75 μ l de formaldéhyde à 37%, 25 μ l de formamide) sont incubés 15 min à 55°C puis déposés sur un gel agarose-formaldéhyde (4,2 g d'agarose, 304,5 ml d'H₂O, 35 ml MOPS 10X, 10,5 ml de formaldéhyde à 37%).

La migration est effectuée 3 heures à 120 Volts. Le gel est ensuite rincé plusieurs fois dans l'eau et placé dans un milieu SSC 10X durant 45 min. Le transfert est effectué par capillarité sur une membrane de nitrocellulose en présence de milieu SSC 20X durant la nuit. Le filtre de nitrocellulose est cuit durant 2 h à 80°C puis placé dans la solution de préhybridation durant 3 heures à 45°C.

Une sonde ADN marquée par technique d'initiation au hasard est préparée:

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. La sonde est ajoutée à la solution d'hybridation et dénaturée dans l'eau bouillante. le filtre de nitrocellulose est placé dans cette solution. Après 16 heures d'hybridation, le filtre est lavé 2 fois durant 15 min dans une solution SSC 1X plus SDS 0,1% à température ambiante, 2 fois dans SSC 0,25X et SDS 0,1%. Le filtre séché est ensuite mis en autoradiographie durant la nuit.

c) Cartographie des ARNm: protection contre les RNases par ARN anti-sens.

Les plasmides sont transfectés dans les cellules, et les ARNs 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' α -³²P UTP, d'UTP non radioactif, et des trois autres ribonucléotides. 5.10⁵ 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*-ARN_{tot} sont placés dans le tampon Tris-HCl 10 mM pH7,6, EDTA 5 mM et NaCl 500 mM, contenant 40 µg/ml de ribonucléase A et 2 µg/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).

d) Transcription *in vitro*

d-1 Préparation d'extrait transcriptionnel

L'extrait est préparé selon la méthode de Shapiro *et al.* (1988). Les cellules Hela sont cultivées en suspension jusqu'à densité de $4,5 \cdot 10^5$ cellules/ml.

Les cellules sont culottées par centrifugation à 170 g durant 10 min à 4°C, resuspendues dans 50 volumes de PBS froid (Na₂PO₄ 10 mM pH7,4, NaCl 150 mM) et recentrifugées. Le culot est resuspendu dans un petit volume de PBS et transféré dans un tube conique et gradué de 15 ml pour être centrifugé à 300 g durant 10 min à 4°C. Le volume du culot (VC) est mesuré et les cellules sont resuspendues dans 5 VC de tampon hypotonique (Hepes 10 mM pH7,9, Spermidine 0,75 mM, spermine 0,15 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, DTT 1 mM, KCl 10 mM).

Les cellules sont incubées 10 min dans la glace et centrifugées à 300 g durant 10 min à 4°C. Le culot est resuspendu dans 2 VC de tampon hypotonique. Les cellules sont cassées par trois coups d'homogénéiseur Dounce B. 0,1 volume de tampon Saccharose (9 volumes de Saccharose à 75% (exempt de RNases) ajoutés 0 1 volume de Tampon salin 10X (Hepes 500 mM pH7,9, Spermidine 7,5 mM, Spermine 1,5 mM, KCl 100 mM, EDTA 2 mM, DTT 10 mM)).

La solution est homogénéisée par deux coups supplémentaires de dounce B puis centrifugée 30 secondes à 16000 g à 4°C. Le culot de noyaux visqueux est resuspendu dans 3 ml pour 10^9 cellules de tampon de resuspension nucléaire (Hepes 20 mM pH7,9, spermidine 0,75 mM, spermine 0,15 mM, EDTA 0,2 mM, EGTA 2 mM, DTT 2 mM, glycérol 25%). La solution est agitée durant 30 min à 4°C puis centrifugée à 150000 g durant 90 min à 4°C. Le surnageant est repris, mélangé avec du sulfate d'ammonium à raison de 0,33 g/ml et agité durant 20 min après dissolution du sulfate d'ammonium. Le précipité est récupéré après centrifugation à 85000 g durant 20 min à 2°C. Le culot est dissous dans du tampon de dialyse (Hepes 20 mM, glycérol 20%, KCl 100 mM, EDTA 0,2

mM, EGTA 0,2 mM, DTT 2 mM) et dialysé à deux reprises contre 200 volumes de ce même tampon durant 90 min.

L'extrait transcriptionnel ainsi préparé est congelé rapidement dans l'azote liquide et stocké à -70°C.

d-2 Transcription

Chaque essai contient dans un volume total de 20 μ l:

- 8 mM de MgCl₂
- 100 μ M d'ATP, GTP, CTP (et UTP pour une transcription "à froid")
- 10 μ M UTP et 10 μ Ci d' α -³²P UTP (Transcription "à chaud")
- 5 mM de phosphate de créatine
- 2 ng de phosphokinase de créatine
- 16 unités de RNasin (Promega)
- 1 μ g da matrice ADN

L'incubation est effectuée durant 1 h à 30°C. 20 μ l da tampon stop (0,4 mg/ml de protéinase K, Tris-Cl 100 mM pH7,5, SDS 2% EDTA 20 mM) sont ajoutés et l'ensemble incubé 10 min à 37°C. L'extraction est effectuée après ajout de 200 μ l de tampon d'extraction (Tris-Cl 10 mM pH7,8, Urée 7,5 M, EDTA 10 mM, SDS 0,5%) puis de 240 μ l de Phénol/Chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). La phase aqueuse est mélangée avec 200 μ l d'acétate d'ammonium 2 M et 1 ml d'éthanol.

L'ARN est précipité par incubation durant 15 min dans un bain de carboglace/éthanol et centrifugé 15 min à 14000 g.

3) Analyse des protéines

a) Transfert de protéines sur membrane et révélation par anticorps spécifiques: Immunoblots.

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de 15% de polyacrylamide SDS. Le contenu du gel est transféré sous tension électrique sur une membrane de nitrocellulose durant au moins 6 heures. La membrane de nitrocellulose est rincée durant 10 min dans une solution de Tris salin (Tris-Cl 10 mM pH7,4, NaCl 0,9%) et saturée dans le même tampon contenant 5% de poudre de lait écrémé durant 1 h à 45°C.

La membrane saturée est incubée en présence du sérum spécifique dilué au 1/500 à 1/2000 dans le précédant milieu durant 1 à 2 heures à 37°C ou une nuit à 4°C sous agitation. La membrane est rincée 2 fois en Tris salin, 2 fois en Tris salin plus 0,1% de tween20 et 2 fois en Tris salin durant 10 min à chaque reprise. Le second sérum contenant le conjugué à la peroxydase anti-lapin dilué au 1/1000 dans le Tris salin plus lait. durant 45 min à température ambiante. Les rinçages précédants sont effectués une nouvelle fois et la membrane est révélée par ajout de 30 ml d'une solution contenant Tris-HCl 50 mM pH7,6, 30 mg de diaminobenzidine et 60 μ l d'H₂O₂. La membrane est rincée à l'eau distillée, séchée et gardée à l'abri de la lumière.

b) Dosage de l'activité Chloramphénicol acétyl transférase (activité CAT)

Quarante heures après transfection, les cellules sont décollées au versène, lavées dans du sérum physiologique et centrifugées 10 mn à 2000 rpm. Le culot est resuspendu dans 100 μ l de Tris-HCl 0,25 M pH 7,5 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 μ l de surnageant (dont la concentration relative est estimée par D.O. à 280 nm) sont incubés une heure à 37°C avec 70 μ l de Tris-HCl 0,25 M pH7,8; 20 μ l d'acétyl coenzyme A 4 mM, 0,5 μ l de ¹⁴C-dichloroacétyl 1,2 chloramphénicol à 0,05

mCi/0,5 ml (NEN) et 35 μ l d' H_2O . 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 μ l d'acétate d'éthyle et chromatographié sur couche mince de gel de silice (20 x 20 cm- polygram). La concentration du dépôt est réalisée par migration dans l'acétone durant 1 mn et la séparation des formes acétylées des formes non acétylées du substrat initial est réalisée par migration pendant 45 mn en solvant chloroforme/méthanol (95/5).

Les couches minces sont alors mises en autoradiographie à $-70^{\circ}C$ 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).

c) Traduction *in vitro*

c-1) Synthèse de la matrice ARN coiffée

Le mélange réactionnel comprend dans un volume de 50 μ l:

- 10 μ l de tampon 5X (Tris-Cl 200 mM pH7,5, $MgCl_2$ 30 mM, spermidine 10 mM, NaCl 50 mM)
- 5 μ l de DTT 0,1 M
- 2,5 μ l de sérum-albumine bovine (2 mg/ml)
- 2 μ l de RNasin (Promega)
- 5 μ l de chaque NTP (ATP,CTP,UTP 5mM et GTP 0,5 mM)
- 5 μ l GpppG 5 mM
- 5 μ l de matrice plasmidique linéarisée (1mg/ml)
- 40 unités d'ARN polymérase SP6

L'incubation est effectuée 1 h à $40^{\circ}C$. L'ARN est purifié par extraction phénolique

et précipitation à l'éthanol.

c-2) Traduction *in vitro*

Le mélange réactionnel comprend dans 50 μ l:

- 35 μ l de lysat de réticulocytes (Promega)
- 7 μ l d'H₂O
- 1 μ l de RNasin (Promega)
- 2 μ l de matrice ARN
- 1 μ l de mélange d'acides aminés (1 mM) sans méthionine
- 4 μ l de méthionine ³⁵S (1200 Ci/mmole) à 10 mCi/ml

L'incubation est effectuée durant 1 h à 30°C. La moitié du mélange réactionnel est déposée sur gel de polyacrylamide SDS.

IV INTERACTIONS PROTEINES-ACIDES NUCLEIQUES.

1) Préparation d'extraits cellulaires

a) Extrait nucléaire

La méthode utilisée est celle adaptée de Dignam *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 (Dignam *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 12000 rpm et le surnageant est dialysé contre le tampon HEPES 20 mM pH 7.9, glycérol 20% (v/v), KCl 0,1M, EDTA 0,2 mM, PMSF 0,5 mM pendant 2 h (conservation à -70°C ou en N₂ liquide).

- Lee *et al.* suggèrent qu'approximativement 10 boites 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).

b) Extrait cytoplasmique

2) Retard d'ADN en gel d'acrylamide

La 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 µg/ml final de sérumalbumine bovine, 1 µl de glycérol 100% et 10µg d'extraits protéiques. Le volume final est de 15 µl. Ce milieu d'incubation est laissé 20 min à 30°C. 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 H₂O.

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, $\text{Aco}^- \text{Na}^+$ 3,3 mM et EDTA 1 mM)

Les gels sont séchés sous vide et mis en autoradiographie.

3) Pontage UV ADN-protéines

Méthode originale: Le fragment étudié est sous cloné dans un vecteur puc13 comprenant de part et d'autre du site de clonage les séquences permettant l'hybridation des amorces commerciales du phage M13. 1,5 μg d'ADN sont placés dans 8 μl d' H_2O , 2 μl de NaOH 2 M et la réaction est laissée 5 mn à température ambiante. 7 μl d'amorce (2 $\mu\text{Mol}/\mu\text{l}$), 3 μl de $\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$ 3 M pH 4,5 et 75 μl d'EtOH 100 % sont ajoutés. L'ADN est laissé 20 mn dans la carboglace +éthanol. 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' H_2O .

Les brins complémentaires de l'ADN simple brin sont alors synthétisés à partir des amorces en présence de transcriptase inverse, dATP 1mM, dGTP 1 mM, Br-dUTP 1mM et 200 μCi de dCTP alpha- ^{32}P .

La sonde purifiée et marquée uniformément est incubée en présence d'extrait nucléaire et de poly dI-dC, à raison de cinq fois la quantité utilisée de façon standard en retard sur gel acrylamide, durant 1 h sous un banc UV dont la longueur d'onde émise est de 302 nm. Le complexe ADN-protéine est soumis à la digestion par la DNase I et la nucléase micrococcale. Le produit de la réaction est soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide au SDS; celui-ci est séché et autoradiographié.

4) Détermination du site d'interaction ADN-protéine: "Footprinting"

La sonde ADN est marquée à l'une de ses extrémités 3'OH par remplissage à la transcriptase inverse ou 5'P par phosphorylation à la kinase T4 après action de la phosphatase alcaline. Dans un tube eppendorf sont ajoutés:

- l'extrait nucléaire complété à 25 μ l par du tampon de dialyse
- 1 μ l de sonde ADN (10000 cpm)
- 1 μ l de poly dI-dC (2 μ g)
- 10 μ l d'alcool polyvinylique 10%

Le mélange est incubé à température ambiante durant 15 min. 50 μ l de CaCl₂ (5 mM)/EDTA (1,5 mM) sont ajoutés avant la DNase I (à raison de 0,05 unités pour la piste témoin jusqu'à 0,5 unités pour la réaction en présence d'extrait). La réaction est incubée durant 2 min à température ambiante et stoppée par l'ajout de 100 μ l de solution d'arrêt (NaCl 200 mM, EDTA 20 mM, SDS 1%, ARNt 50 μ g/ml).

Les protéines sont extraites par traitement au phénol/chloroforme et l'ADN est précipité par l'éthanol et resuspendu dans 5 μ l de solution de dépôt. Chaque essai est déposé sur un gel de polyacrylamide dénaturant.

5) Pontage UV ARN-protéines

1) Synthèse des matrices ARNs bromées(Méthode originale)

Le mélange réactionnel comprend dans un volume de 50 μ l:

- 10 μ l de tampon 5X (Tris-Cl 200 mM pH7,5, MgCl₂ 30 mM, spermidine 10 mM, NaCl 50 mM)
- 5 μ l de DTT 0,1 M
- 2,5 μ l de sérum-albumine bovine (2 mg/ml)
- 2 μ l de RNasin (Promega)
- 5 μ l de chaque NTP (ATP,CTP,GTP 5mM)
- 5 μ l de Br-UTP 0,5 mM

- 20 μCi d'alpha- ^{32}P UTP
- 5 μl de matrice plasmidique linéarisée (1mg/ml)
- 40 unités d'ARN polymérase SP6

2) pontage UV

40000 cpm de matrice ARN sont incubés en présence d'extrait protéique sous un banc UV de longueur d'onde émise de 302 nm durant une heure.

Les complexes ARN-protéines sont soumis à une digestion par les RNases A et T1 durant 10 min à 37°C puis déposés sur gel de polyacrylamide au SDS. Celui-ci est soumis à électrophorèse, séché et autoradiographé.



Les adénovirus, agents d'infections respiratoires bénignes chez l'homme, sont connus pour leur propriétés oncogéniques chez les rongeurs. Le principal agent responsable de ce pouvoir transformant est la région E1A située à l'extrémité gauche du génome viral. Au cours de cette étude une séquence nucléotidique hautement conservée entre les adénovirus a été localisée autour du site d'initiation de la transcription.

Cette séquence d'une cinquantaine de nucléotides est en fait partagée entre deux zones conservées sous forme d'ADN, pour la première, et d'ARN pour la seconde. La séquence conservée ADN est une séquence palindromique (répétée et inversée) entourant exactement le site d'initiation de la transcription. Cette région est la cible de fixation de deux protéines nucléaires de faible masse moléculaire (11 kDa et 18,5 kDa). Ces facteurs nucléaires se fixent à raison de deux exemplaires identiques chacun étant affine pour l'une des séquences inversées citées précédemment.

Cette même séquence palindromique a été caractérisée comme activant ou facilitant la transcription *in vitro* de la région E1A. La relation hypothétique entre les interactions ADN-protéines et l'activation de transcription est discutée.

La séquence conservée sous forme ARN adopte potentiellement une structure secondaire complexe sous forme d'"épingle à cheveux" dans la région 5' non-codante de l'ARNm E1A. Cette séquence préserve la stabilité des ARN *in vitro*.

Les ARNm E1A délétés dans cette séquence ont été traduits *in vitro*. La structure en "épingle à cheveux" semble impliquée dans l'inhibition de l'initiation de la traduction. D'autre part elle serait la cible potentielle de fixation spécifique d'une protéine cytoplasmique de 33 kDa. Un modèle reliant cette fixation et l'inhibition de la traduction est envisagé.

Les résultats d'expériences, menées après transfections dans des cellules HeLa, confirment ceux obtenus dans les systèmes *in vitro* précédents. Les séquences étudiées précédemment constituent la cible d'une inhibition de l'expression par les protéines E1A des adénovirus de sérotype 3 et 12.

Enfin un modèle remplaçant les séquences conservées ADN et ARN dans le contexte de l'infection virale est proposé.