

50376
1993
61

50376
1993
61

N° D'ORDRE 1018

UNIVERSITE

DE LILLE PLAINVILLE

THESE

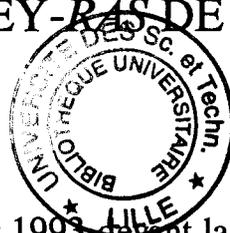
Présentée pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
EN
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

Jean-Baptiste TELLIEZ

ROLE DU PREMIER INTRON DANS LA REGULATION
TRANSCRIPTIONNELLE DU GENE
HARVEY-RAS DE SOURIS

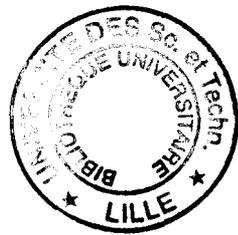


Soutenu le 27 janvier 1993 devant la commission d'examen :

PRESIDENT : Professeur A. VERBERT
RAPORTEURS : Docteur C. CREMISI
Docteur H.G. SUAREZ
EXAMINATEURS : Professeur S. BALL
Professeur J. KREMBEL
Docteur B. BAILLEUL

A Kay,
A mes parents,
A ma famille,
A mes amis,

A tous les miens, en témoignage
de mon affection.



Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué à l'IRCL dans le laboratoire d' "expression des gènes et cancérogénèse chimique" U 124 de l'INSERM, dirigé par le Dr M.H.Loucheux-Lefebvre, sous la direction du Dr B. Bailleul. Qu'ils en soient remerciés.

Je tiens à remercier M. A. Verbert qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Mme C. Crémisi et M. H.G. Suarez ont bien voulu juger ce travail et en être les rapporteurs. Je les remercie vivement d'avoir accepté cette tâche délicate.

MM. J. Krembel et S. Ball m'ont fait le plaisir d'accepter de siéger à ce jury. Je tiens à leur exprimer tous mes remerciements.

Je tiens particulièrement à témoigner ma sympathie et mes remerciements à A. Balmain et M. Plumb qui m'ont accueilli au Beatson Institute à Glasgow et sans qui ce travail n'aurait pu être ce qu'il est.

Mes remerciements s'adressent également à C. Cocquerelle pour sa bonne humeur et son enthousiasme de tous les moments, ainsi qu'à M. C. Duviouxbourg pour les photographies présentées dans ce mémoire.

Je dédie enfin ce travail à Kay Mackod que je remercie pour ses conseils scientifiques avisés et pour son soutien durant ces années.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	15
GENERALITES	19
A. <u>Les gènes <i>ras</i></u>	20
I. Les gènes <i>ras</i>	20
I.1 Expression des gènes <i>ras</i> dans les cellules normales	22
I.2 Les promoteurs des gènes <i>ras</i>	23
II. Structure et organisation fonctionnelle des protéines Ras	24
III. Le cycle d'activation des protéines Ras; le cycle GDP/GTP	27
IV. Fonctions biochimiques de la p21 ^{ras}	29
IV.1 Quel est l'effecteur de l'action de la p21 ^{ras} ?	29
IV.2 La p21 ^{ras} et GAP	29
IV.2.1 Evidences pour un rôle régulateur de l'activité de la p21 ^{ras} par GAP	30
IV.2.2 GAP effecteur de la p21 ^{ras}	31
IV.2.3 Régulation de GAP	32
IV.3 La p21 ^{ras} et NF1 (Neurofibromine)	35
IV.4 Les protéines Ras et les facteurs de relâchage des nucléotides à guanine	37
IV.5 Les protéines RAS et l'adénylate-cyclase	38
IV.6 Cibles biochimiques de la p21 ^{ras}	40
IV.6.1 La protéine kinase C	40
IV.6.2 La phospholipase C	41
IV.6.3 La phospholipase A ₂	42
V. Propriétés biologiques de la p21 ^{ras}	43
V.1 Les protéines Ras et la prolifération cellulaire	43
V.2 Les protéines Ras et la différenciation cellulaire	44

V.2.1 Les protéines Ras et la maturation de l'oocyte de Xénope	45
V.2.2 Les protéines Ras et la différenciation des cellules R7 de l'ommatide de la drosophile	46
VI. Activation de l'oncogène <i>ras</i>	48
VI.1 Mécanismes d'activation	48
VI.1.1 Activation des gènes <i>ras</i> par mutation ponctuelle	48
VI.1.2 Activation des gènes <i>ras</i> par surexpression	50
VI.2 Expression des gènes <i>ras</i> dans les cellules tumorales ou transformées	51
VI.3 Coopération de <i>ras</i> avec des oncogènes nucléaires dans la transformation cellulaire <i>in vitro</i>	52
VII. L'oncogène <i>ras</i> et cancer	53
VII.1 Oncogènes <i>ras</i> et cancers humains	53
VII.2 Oncogènes <i>ras</i> et tumeurs animales (tumeurs induites par des agents carcinogènes)	54
VII.3 Tumorigénèse de la peau de souris	56
 B. <u>Régulation de l'expression des gènes</u>	 60
 I. Rôle de la conformation de la chromatine dans la régulation de l'expression des gènes	 60
I.1 Structure de la chromatine et agencement en nucléosomes	60
I.2 Méthylation de l'ADN	60
Influence de la méthylation sur l'expression des gènes <i>ras</i>	61
I.3 Les domaines actifs de la chromatine sont sensibles aux nucléases	62
II. Régulation de l'initiation de la transcription	62
II.1 Promoteurs et <i>enhancers</i> .	62
II.2 Domaines de fixation à l'ADN et domaines activateurs des facteurs de transcription	63
II.2.1 Domaines de fixation à l'ADN	64

Domaine hélice-boucle-hélice	64
Domaine homéo	64
Domaine en doigt de zinc	64
II.2.2 Domaines activateurs	65
II.2.3 Domaines de dimérisation (le motif leucine zipper)	66
II.3 Modulation de l'activité des facteurs de transcription par phosphorylation	67
C. <u>Objectifs</u>	68
Etat des connaissances sur les éléments régulant l'expression des gènes <i>ras</i>	69
RESULTATS	71
I. Analyse structurale du promoteur du gène <i>Ha-ras</i> de souris	72
Identification des séquences promotrices par empreinte à la DNase I	72
II. Analyse fonctionnelle du 1 ^{er} intron par délétions dans la partie 3' de celui-ci	80
II.1 Construction des vecteurs pPras, pSras, pHras; pAras et pMras	80
II.2 Etude fonctionnelle des différentes constructions plasmidiques dans les lignées cellulaires NIH 3T3, C5N, Car B, 3TDM1 et 17-S1-T984	82
II.2.1 Etude fonctionnelle dans les cellules NIH 3T3	83
II.2.2 Etude fonctionnelle dans les cellules C5N	83
II.2.3 Etude fonctionnelle dans les cellules Car B	86
II.2.4 Etude fonctionnelle dans les cellules 3TDM1 et 17-S1-T984	86
II.3 La région d'homologie ne possède pas d'activité promotrice	89
II.4 Influence de la région d'homologie sur l'activité promotrice d'un promoteur hétérologue : le promoteur TK	89
II.4.1 Etude fonctionnelle dans les cellules NIH 3T3	91
II.4.2 Etude fonctionnelle dans les cellules Hela	91

II.5 Analyse fonctionnelle de l'intron 0 en utilisant le gène de l'hormone de croissance humaine comme gène reporteur	94
II.5.1 Construction des vecteurs pSGH, pHGH et pAGH	95
II.5.2 Etude fonctionnelle des constructions pSGH, pHGH et pAGH dans les cellules C5N	95
II.5.3 Analyse des ARNm produits à partir des constructions pSGH, pHGH et pAGH	96
III. Identification de séquences dans l'intron 0 fixant des facteurs nucléaires	98
III.1 Analyse des séquences F1, F3, F6, F7, F8, F9, F10 et F11	104
III.2 Analyse de la séquence F2	110
III.3 Analyse de la séquence F4	114
III.4 Analyse de la séquence F5	117
IV. Analyse fonctionnelle des séquences F2, F4, F5 et F7	122
IV.1 Etude des séquences F4 et F5 par mutagenèse dirigée	122
IV.2 Etude de la séquence F2 par délétion	126
IV.3 Analyse de la séquence F7 dans la construction pAras par délétion	128
 DISCUSSION	 129
 I. Rôle du promoteur dans la régulation transcriptionnelle du gène <i>Ha-ras</i> de souris	 130
II. Rôle de l'intron 0 dans la régulation transcriptionnelle du gène <i>Ha-ras</i> de souris	134
III. L'intron 0 possède des séquences, fixant des facteurs nucléaires, impliquées dans la régulation transcriptionnelle du gène <i>Ha-ras</i> de souris	137
IV. Intron 0 et spécificité tissulaire de l'expression	144
V. Intron 0 et progression maligne	145

CONCLUSIONS-PERSPECTIVES	146
MATERIELS & METHODES	149
I. Techniques courantes de la biologie moléculaire	150
I.1 Techniques électrophorétiques	150
I.1.1 Electrophorèse en gel d'agarose	150
I.1.2 Electrophorèse en gel de polyacrylamide	150
I.2 Digestion enzymatique des plasmides	150
I.3 Purification des fragments d'ADN	151
I.4 Sous-clonage des fragments d'ADN	151
I.5 Marquage au ³² P des sondes d'ADN	152
I.5.1 Marquage en 5' des oligonucléotides double-brins	152
I.5.2 Marquage en 5' des fragments de restriction	152
I.5.3 Synthèse d'une sonde à partir d'ADN simple brin	153
I.6 Séquençage de l'ADN	154
I.7 Techniques de mutagénèse	155
I.7.1 Mutagénèse dirigée par PCR	155
I.7.2 Délétion de séquence par PCR	158
I.8 Transformation bactérienne	161
I.8.1 Transformation de la souche JM 83	161
I.8.2 Transformation de la souche JM 101	162
I.9 Préparation rapide de plasmides	162
I.10 Purification de plasmides en gradient de chlorure de césium	163
I.11 Préparation d'ADN plasmidique simple brin	164
I.12 Purification des ARN par le RNazol	164
I.13 Extraction des ARN totaux par la méthode à l'isothiocyanate de guanidium	165

II. Culture cellulaire	166
III. Etude de l'expression des gènes	168
III.1 Préparation des lysats cellulaires	168
III.2 Transfection des plasmides dans des cellules de souris	168
III.3 Dosage de l'activité β -galactosidase	168
III.4 Dosage de l'activité chloramphénicol acétyl-transférase	169
III.5 Dosage de l'hormone de croissance humaine (hGH)	170
III.6 Analyse des ARNm par cartographie à la nucléase S1	170
IV. Interactions ADN-Protéines	171
IV.1 Préparation d'extrait de protéines nucléaires	171
IV.2 Retard sur gel	172
IV.3 Empreinte à la DNase I	173
BIBLIOGRAPHIE	174

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Généralités

Tableau 1	Famille des gène <i>ras</i> .	21
Figure 1	Domaines de la p21 ^{ras} .	26
Figure 2	Cycle d'activation et d'inactivation des protéines Ras.	28
Figure 3	Rôle de la phosphorylation de GAP dans la transduction du signal par la p21 ^{ras} .	34
Figure 4	Comparaison des domaines des protéines stimulant l'activité GTPasique des protéines Ras.	36
Figure 5	Les protéines RAS et l'adénylate-cyclase chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	39
Figure 6	Les protéines Ras et la différenciation neuronale des cellules R7 dans l'ommatide de drosophile.	40
Tableau 2	Incidence de l'activation des gènes <i>ras</i> dans les tumeurs animales.	55
Figure 7	Modèle de la cancérogénèse de la peau de souris.	57
<u>Résultats</u>		
Figure 8	Locus du gène Ha- <i>ras</i> de souris. Positions du promoteur et du site hypersensible à l'action des DNases.	73
Figure 9	Protection des séquences promotrices contre l'action de la DNase I.	75
Figure 10	Séquences des empreintes à la DNase I au niveau du promoteur.	76
Figure 11	Séquence d'homologie entre l'homme et la souris au niveau du premier intron.	78
Figure 12	Séquence de la région 5' du gène contenant les exons -1, 1 et 2.	79
Figure 13	Schéma des constructions plasmidiques contenant des délétions dans la partie 3' de l'intron 0.	81
Figure 14	Histogrammes des valeurs CAT obtenues dans les cellules NIH 3T3.	84
Figure 15	Histogrammes des valeurs CAT obtenues dans les cellules C5N.	85
Figure 16	Histogrammes des valeurs CAT obtenues dans les cellules Car B.	87

Figure 17	Constructions plasmidiques dérivant du vecteur pTK.	90
Figure 18	Histogrammes des valeurs CAT des constructions pTK obtenues dans les cellules NIH 3T3.	92
Figure 19	Histogrammes des valeurs CAT des constructions pTK obtenues dans les cellules HeLa.	93
Figure 20	Autoradiographie d'une expérience de cartographie à la nucléase S1.	97
Figure 21	Localisation par rapport à la séquence génomique des sondes utilisées pour les expériences de protection contre l'action de la DNase I.	99
Figure 22	Protection contre l'action de la DNases I de la sonde de 369 pb à partir des extraits C5N et RAW.	101
Figure 23	Protection contre l'action de la DNases I de la sonde de 472 pb à partir des extraits C5N, SN 161 et STO.	102
Figure 24	Protection contre l'action de la DNases I de la sonde de 472 pb à partir des extraits PDV, PDVC57 et M707/T.	103
Figure 25	Séquences des empreintes à la DNase I dans l'intron 0.	105
Figure 26	Retard sur gel de l'oligonucléotide F3.	106
Figure 27	Retard sur gel des oligonucléotides F6 et F8-1.	107
Figure 28	Retard sur gel des oligonucléotides F7-1 et F7-2.	109
Figure 29	Retard sur gel de l'oligonucléotide F2.	111
Figure 30	Retard sur gel de l'oligonucléotide F8-2.	113
Figure 31	Retard sur gel des oligonucléotides F4 et F4Sac.	115
Figure 32	Retard sur gel des oligonucléotides F4 et F4Xba.	116
Figure 33	Retard sur gel de l'oligonucléotide F5.	118
Figure 34	Retard sur gel des oligonucléotides F5 et F5Sac.	120
Figure 35	Retard sur gel des oligonucléotides F5 et Sp1.	121
Figure 36	Constructions mutantes de pHras et valeurs CAT obtenues dans les cellules NIH 3T3 et C5N.	124

Figure 37	Autoradiographie d'un essai fonctionnel CAT réalisé à partir de lysats de cellules NIH 3T3.	125
Figure 38	Construction pSras et constructions mutantes de pHras et valeurs CAT obtenues dans les cellules NIH 3T3 et C5N.	127
<u>Discussion</u>		
Figure 39	Comparaison des sites de fixation à Sp1 au niveau des promoteurs Ha- <i>ras</i> humain et murin.	132
Figure 40	Positions des éléments fonctionnels et des sites protégés contre l'action de la DNaseI dans l'intron 0.	135
Figure 41	Éléments positifs et négatifs localisés dans le premier intron du gène Ha- <i>ras</i> humain (d'après Honkawa <i>et al.</i> , 1987).	141
<u>Matériels & méthodes</u>		
Figure 42	Schéma de la technique de PCR utilisée pour la mutagenèse dirigée.	156
Figure 43	Schéma de la technique de PCR utilisée pour déléter une séquence.	160

ABREVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
AMP	adénosine monophosphate
ATP	adénosine triphosphate
DNase	désoxyribonucléase
RNase	ribonucléase
hGH	hormone de croissance humaine
A	adénine
C	cytosine
G	guanine
T	thymidine
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
dATP	désoxyadénosine triphosphate
dTTP	désoxythymidine triphosphate
dCTP	désoxycytosine triphosphate
dGTP	désoxyguanosine triphosphate
ml	millilitre
μ g	micro gramme
pb	paire de bases
kb	kilo bases
kDa	kilo daltons
UV	ultra violet
% v/v	volume en millilitres pour 100 ml d'eau
% p/v	poids en grammes pour 100 ml d'eau
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
DTT	dithiothréitol
PEG	polyéthylèneglycol
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyle
SDS	dodécylsulfate de sodium
TRIS	Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane

INTRODUCTION

Depuis environ une décennie, nous avons pu assister à une explosion dans la connaissance des oncogènes qui fonctionnent anormalement durant la transformation maligne des cellules.

Les oncogènes sont des gènes viraux (v-oncogènes) ou cellulaires (c-oncogènes), dont l'expression anormale ou le produit altéré est impliqué dans l'apparition d'un phénotype malin. Quelques uns de ces gènes (c-oncogènes) ont été isolés par transfection d'ADN de diverses cellules tumorales dans des cellules 3T3 normales de souris et identifiés par leur homologie avec des oncogènes viraux. Cependant, tous les c-oncogènes n'ont pas d'homologues viraux. Les c-oncogènes dérivent de gènes cellulaires normaux ou proto-oncogènes. Leur présence dans des espèces très divergentes et leur fort degré de conservation de séquences, suggèrent qu'ils auraient un rôle essentiel dans le métabolisme, la croissance et la différenciation cellulaire.

Les mécanismes d'activation oncogénique qui induisent la conversion des proto-oncogènes en oncogènes, sont des événements génétiques critiques dans la transformation néoplasique. Les altérations qui induisent cette conversion peuvent correspondre à de gros réarrangements ou être très subtiles comme une simple modification dans la séquence nucléotidique par substitution d'un nucléotide. Elles peuvent être produites par quatre mécanismes différents :

- (i) par mutation ponctuelle conduisant à une altération structurale de la protéine ;
- (ii) par amplification génique souvent associée à une surexpression de la protéine ;
- (iii) par réarrangement génique, notamment des translocations chromosomiques, produisant parfois des protéines chimériques et
- (iiii) par surexpression par acquisition d'un nouveau promoteur transcriptionnel.

Les oncogènes viraux peuvent être portés par des virus à ARN (i.e. AMV, virus de Rous) ou à ADN (i.e. polyome, SV 40, adénovirus). Dans le cas des virus à ARN ou rétrovirus, les oncogènes dérivent de proto-oncogènes cellulaires, alors que les virus tumorigènes à ADN n'ont manifestement pas de progéniteur cellulaire.

Depuis quelques années est apparue une nouvelle classe de gènes impliquée dans les processus transformants non pas par activation d'un gène, comme dans le cas des oncogènes, mais par inactivation de celui-ci. Ces gènes remplissent des fonctions qui limitent la prolifération cellulaire, c'est pourquoi leur inactivation libère la cellule de certaines contraintes limitant cette prolifération. Ces gènes sont de ce fait appelés gènes suppresseur de tumeur.

Par ailleurs, les études effectuées jusqu'à ce jour tendent à montrer que la combinaison de plusieurs oncogènes viraux ou cellulaires ou gènes suppresseur de tumeur est généralement requise pour convertir une cellule normale en cellule tumorigène.

Cependant, le processus de cancérisation ne peut être expliqué par la seule présence de ces types de gènes. D'autres paramètres tels que, des modifications de la structure membranaire et l'apparition de nouveaux antigènes cytoplasmiques et membranaires, tels que certaines cytokines, joueraient un rôle très important dans le développement des tumeurs. Néanmoins, l'étude des oncogènes et gènes suppresseur de tumeur représente un grand intérêt clinique pour l'identification et la classification des pathologies et ils pourraient représenter des cibles privilégiées pour la thérapie.

L'oncogène Harvey-*ras* fait partie d'une famille de trois oncogènes (c-Ha-*ras*, c-Ki-*ras*, c-N-*ras*). Les deux oncogènes Ha-*ras* et Ki-*ras* ont été identifiés par homologie avec les oncogènes viraux v-Ha-*ras* et v-Ki-*ras* des virus transformants Harvey et Kirsten du sarcome de rat, alors que N-*ras* n'a pas d'équivalent viral connu. Ces trois c-oncogènes sont fréquemment impliqués dans des cancers humains (tels que les cancers des poumons, du colon, de la thyroïde) et animaux (tel que les tumeurs de la peau de souris induites par un agent cancérigène). Une mutation ponctuelle au niveau de codons bien précis est généralement impliquée dans le processus transformant impliquant ces oncogènes.

De plus, les mutations au niveau des oncogènes *ras* sont fréquemment associées à une surexpression de ceux-ci, comme c'est le cas pour l'oncogène Ha-*ras* dans les tumeurs de la peau de souris. Le mécanisme de cette surexpression reste jusqu'à ce jour inexpliqué. Le travail présenté dans ce mémoire a pour but de mieux appréhender les mécanismes de la

régulation transcriptionnelle de l'oncogène *Ha-ras*. En effet, l'initiation de la transcription est un des mécanismes clefs dans le contrôle de l'expression des gènes eucaryotes et la dérégulation au niveau transcriptionnel de l'expression de certains oncogènes a pu être mis en cause dans l'apparition de pathologies cancéreuses. Ainsi, l'étude de la régulation transcriptionnelle du gène *Ha-ras* devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la surexpression de ce gène dans les tumeurs de la peau de souris.

GENERALITES

A. LES GENES RAS

I. Les gènes *ras*.

La plupart des eucaryotes, incluant *Saccharomyces cerevisiae* et les mammifères, possèdent plusieurs gènes *ras* (pour *rat sarcoma*). Depuis quelques années, il est devenu clair que les gènes *ras* font partie d'une superfamille de petites protéines G qui peut être divisée en trois principaux groupes (tableau 1, pour revue voir Grand & Owen, 1991). La famille *ras* elle-même contient les trois gènes *ras* ainsi que *R-ras*, *ral A* et *B*, *rap 1A*, *1B* et *2* et *TC21*, qui présentent à peu près 50% d'homologie avec les gènes *ras*. La famille *rho* consiste en *rho A*, *B* et *C*, *rac 1* et *2* et *TC10*, présentant environ 30% d'homologie avec les gènes *ras*. Finalement, la famille *rab*, qui présente également 30% d'homologie avec les gènes *ras* consiste en 6 gènes *rab*, *BRL-ras*, *smg 25A*, *B* et *C*. Cette dernière comporte également les gènes de levure *YPT1* et *SEC4* qui ont été bien caractérisés et servent de modèles pour l'étude des gènes *rab* de mammifères.

Un analogue procaryotique des gènes *ras* a également été décrit : le produit du gène *era* de *Escherichia coli* qui présente 50% d'homologie avec le gène de levure *RAS1* dans les deux-tiers N-terminaux de la protéine (March *et al.*, 1988).

Chez les mammifères, la famille des gènes *ras* comporte trois membres oncogènes : Harvey-, Kirsten- et N-*ras*. Les deux premiers ont été identifiés initialement comme les homologues cellulaires des virus oncogènes Harvey et Kirsten du sarcome de rat (Harvey, 1964 ; Kirsten & Mayer, 1967). Il a été démontré que ces deux rétrovirus transformants ont été générés par la transduction des deux gènes cellulaires Ha-*ras* et Ki-*ras* (DeFeo-Jones *et al.*, 1981 ; Ellis *et al.*, 1981). Le gène N-*ras* n'a pas d'équivalent viral connu et a été isolé à partir d'ADN de tumeur humaine (un Neuroblastome) grâce à son aptitude à transformer certaines cellules par transfection (Murray *et al.*, 1983 ; Shimizu *et al.*, 1983). Chez l'homme, les gènes Ha-, Ki-, et N-*ras* sont localisés respectivement sur les bras courts des chromosomes 11 (11p15.1-p15.5), 12 (12p12-pter) et 1 (1p22-p32) et chez la souris, respectivement sur les chromosomes 7, 6 et 3 .

Famille <i>ras</i>		Famille <i>rho</i>		Famille <i>rab</i>		Intermédiaires Ras/Gα
Mammifère	Analogues	Mammifère	Analogues	Mammifère	Analogues	
Ha- <i>ras</i>	Sc <i>RAS1</i>	<i>rho</i> A	Sc <i>RHO 1</i>	<i>rab</i> 1A	Sc <i>YPT 1</i>	<i>ARF1</i>
Ki- <i>ras</i> (A+B)	Sc <i>RAS2</i>	<i>rho</i> B	Sc <i>RHO 2</i>	<i>rab</i> 1B	Sc <i>SEC 4</i>	<i>ARF2</i>
N- <i>ras</i>	Sp <i>RAS</i>	<i>rho</i> C		<i>rab</i> 2	Dd <i>Sas 1</i>	<i>SAR1</i>
	Dm <i>ras1</i>	<i>rac</i> 1 (TC25)		<i>rab</i> 3A (<i>smg25A</i>)	Dd <i>Sas 2</i>	
	Dd <i>ras</i>	<i>rac</i> 2		<i>rab</i> 4	Sp <i>YPT 2</i>	
	Apl <i>ras</i>	TC10		<i>rab</i> 5	Sp <i>YPT 3</i>	
<i>rap</i> 1A (<i>Krev1/smg21</i>)	Dm <i>ras3</i>					
	Sc <i>RSR 1</i>			BRL- <i>ras</i>		
<i>rap</i> 1B				<i>smg 25A</i>		
<i>rap</i> 2				<i>smg 25B</i>		
R- <i>ras</i>				<i>smg 25C</i>		
<i>ral</i> A						
<i>ral</i> B						
TC21						

Tableau 1 : Superfamille des gènes *ras*. Abréviations : Sc, *Saccharomyces cerevisiae* ; Sp, *Schizosaccharomyces pombe* ; Dm, *Drosophila melanogaster*; Dd, *Dictyostelium discoideum* ; Apl, *Aplysia*. (D'après Grand & Owen, 1991).

Les gènes *ras* sont hautement conservés d'un gène à l'autre. Les séquences codantes de Ha- et N-*ras* sont distribuées sur quatre exons codant pour des protéines de 189 acides aminés alors que Ki-*ras* possède cinq exons codant. Dans ce dernier cas, il existe en effet, deux exons quatre (4A et 4B) soumis à un épissage alternatif qui permet la synthèse de deux isomorphes de 188 et 189 acides aminés, qui diffèrent dans le domaine carboxy-terminal (Capon *et al.*, 1983b ; McGrath *et al.*, 1983 ; Shimizu *et al.*, 1983). De la même manière, les gènes *ras* sont hautement conservés entre les espèces.

I.1 Expression des gènes *ras* dans les cellules normales.

Les gènes *ras* sont exprimés dans tous les tissus et au cours de tous les stades du développement à un niveau relativement faible. Ils sont de ce fait classés dans une catégorie de gènes appelée *housekeeping gene*. Néanmoins, il existe des différences significatives dans le taux d'expression de la p21^{ras} en fonction du type cellulaire (Furth *et al.*, 1987). Il a été montré au niveau de certains tissus humains normaux que les cellules immatures, capables de prolifération, contiennent plus de p21^{ras} que les cellules matures. A l'inverse, certaines cellules fortement différenciées comme les neurones ou les cellules épithéliales des glandes endocrines expriment de façon abondante la p21^{ras} (Furth *et al.*, 1987). De tous les tissus, le cerveau est celui qui exprime le plus la p21^{ras} (Swanson *et al.*, 1986). Il a de plus été démontré au niveau des tissus de la souris que, en plus de la variation du taux de protéines Ras en fonction du type cellulaire, il existe une variation dans le taux des différents transcrits des trois gènes *ras* en fonction des tissus et durant le développement pré- et post-natal (Leon *et al.*, 1987). Ces observations amènent à se poser la question quant au(x) rôle(s) des différents gènes *ras*. En effet, il existe une hypothèse selon laquelle les différents gènes *ras* auraient des fonctions cellulaires différentes. Il existe peu d'évidences expérimentales en faveur de cette hypothèse. Néanmoins, Carbone et ses collaborateurs (1991) ont montré que seul Ha-*ras* semble capable d'inhiber l'induction de *c-fos* par le TPA alors que Ki-*ras* et N-*ras* ne semblent pas avoir d'effet sur cette induction.

Il est également possible que ces gènes codent pour une même fonction dont l'expression pourrait être régulée de façon différentielle en fonction des différents stades du développement et des différents tissus, grâce à l'existence de ces trois gènes. Les observations des profils d'expression des différents gènes *ras* durant le développement et en fonction des tissus suggèrent que ces gènes doivent être fortement régulés pour répondre à divers besoins physiologiques et éviter les risques de surexpression qui peuvent conduire à la transformation cellulaire.

I.2 Les promoteurs des gènes *ras*.

Les régions promotrices des trois gènes *ras* ont été caractérisées et analysées chez l'homme (Ishii *et al.*, 1985 ; Hall & Brown, 1985 ; Trimble & Hozumi, 1987 ; Yamamoto & Perucho, 1988 ; Thorn *et al.*, 1991) et diverses espèces animales comme le rat et la souris (Damante *et al.*, 1987 ; Hoffman *et al.*, 1987 ; Honkawa *et al.*, 1987 ; Brown *et al.*, 1988 ; Paciucci & Pellicer, 1991). Bien que ces promoteurs soient différents, on retrouve certaines caractéristiques communes à la classe de gènes dite *housekeeping* ou ayant des fonctions cellulaires en rapport avec la croissance : ils ne possèdent pas de boîte TATA, ils sont tous riches en bases G et C avec plusieurs sites de fixation pour les facteurs de transcription Sp1 ou de la famille Sp1 (Ishii *et al.*, 1986 ; Lee & Keller, 1991 ; Plumb *et al.*, 1991). Sp1 est un facteur de transcription ubiquitaire ; il a été purifié (Briggs *et al.*, 1986) et l'ADNc a été cloné (Kadonaga *et al.*, 1987). La protéine Sp1 est impliquée dans la transcription de nombreux gènes viraux et cellulaires. Elle possède trois motifs en doigt de zinc qui sont impliqués dans le domaine de fixation à l'ADN (Kadonaga *et al.*, 1987). De plus, cette protéine possède un domaine transactivateur riche en glutamine (Courey *et al.*, 1988). Actuellement, le rôle des promoteurs de type *housekeeping*, dans l'initiation et l'activation de la transcription de ces gènes, n'est pas bien compris. Seul Sp1 est un facteur commun que l'on retrouve impliqué au niveau de tous ces promoteurs. Ainsi, les études des interactions des facteurs nucléaires avec le promoteur des gènes *ras* a permis dans tous les cas de mettre

en évidence la fixation de facteurs nucléaires au niveau des boîtes GC (Ishii *et al.*, 1986 ; Hoffman *et al.*, 1990 ; Thorn *et al.*, 1991 ; Lee *et al.*, 1991 ; Paciucci & Pellicer, 1991 ; Plumb *et al.*, 1991). Il est à noter que le nombre des sites potentiels pour la fixation des facteurs de transcription de la famille Sp1 varie d'un promoteur et d'une espèce à l'autre. De plus, les expériences de protection contre l'action de la DNase I ont montré que certains de ces sites potentiels ne sont pas protégés contre l'action de la DNase I au niveau des promoteurs des gènes *ras*. Ces expériences ont également mis en évidence des séquences de fixation à des facteurs nucléaires identifiés ou non, et qui diffèrent d'un promoteur et d'une espèce à l'autre. Par exemple, au niveau du promoteur Ha-*ras* humain, il existe six boîtes GC dont une semble être essentielle pour l'activité promotrice ainsi qu'un deuxième élément HRE-I (Ha-*ras element 1* : CCGGAA) fixant un facteur non identifié. A part ces deux éléments essentiels, les autres semblent avoir une contribution mineure dans l'activité de ce promoteur (Lee & Keller, 1991). Au niveau du promoteur N-*ras* humain, sept sites de fixation à des facteurs nucléaires ont été caractérisés, qui présentent des homologies de séquences avec des sites déjà connus (MLTF/Myc, CREB/ATF, AP-1, AP-2, Myb et E4TF1). A l'inverse, il existe quatre sites potentiels Sp1 qui ne sont pas protégés contre l'action de la DNase I (Thorn *et al.*, 1991).

L'étude des régions promotrices des différents gènes *ras* a permis de mettre en évidence que les promoteurs des gènes Ha-*ras* humain et Ki-*ras* murin ont une activité promotrice bidirectionnelle (Lowndes *et al.*, 1989 ; Hoffman *et al.*, 1987) alors que celui du gène N-*ras* humain ne montre pas d'activité de ce type (Thorn *et al.*, 1991).

II. Structure et organisation fonctionnelle des protéines Ras.

Les gènes *ras* codent pour des protéines d'un poids moléculaire de 21 kDa (Shih *et al.*, 1979a). La structure primaire des protéines Ras est très conservée à l'intérieur d'une même espèce (par exemple Ha-, Ki- et N-Ras humains ont plus de 80% d'homologie en séquence d'acides aminés) avec la moitié N-terminale des protéines qui est identique. La conservation

d'un gène *ras* d'une espèce à l'autre se retrouve au niveau de la protéine ; ainsi les protéines Ha-Ras chez l'Homme et le Rat sont identiques et il n'y a que quatre substitutions d'acides aminés lorsque l'on compare la séquence à celle du Poulet.

Les protéines Ras peuvent être divisées en trois régions (figure 1) : la boîte CAAX à l'extrémité C-terminale, un domaine hétérogène (acides aminés 165 à 185) et le domaine catalytique (du côté N-terminal) (Lowy *et al.*, 1991). Les quatre derniers acides aminés formant la boîte CAAX sont communs à différentes classes de protéines. C est invariablement une cystéine, A un acide aminé aliphatique et X peut correspondre à différents acides aminés. Les protéines Ras ne peuvent être actives que lorsqu'elles sont ancrées au niveau de la face interne de la membrane cytoplasmique (Willumsen *et al.*, 1984) après une série de modifications post-traductionnelles (Glomset *et al.*, 1990). Ces modifications comprennent une étape de farnésylation de la cystéine (Casey *et al.*, 1989), le clivage protéolytique des trois derniers acides aminés et la carboxyméthylation de la cystéine (Hancock *et al.*, 1989). Ces modifications ainsi que la palmitoylation de cystéines localisées dans la région hétérogène juste en amont de la cystéine farnésylée permettent l'attachement de la p21^{ras} à la membrane cytoplasmique (Hancock *et al.*, 1990 ; Gibbs, 1991). La région hétérogène codée par l'exon 4B de *Ki-ras* ne contient aucune cystéine ; dans cette protéine une série de six lysines augmente l'affinité de la protéine pour la membrane cytoplasmique comme le font les cystéines palmitoylées dans les autres protéines Ras.

La séquence des vingt et un acides aminés de la région hétérogène (acides aminés 165 à 185) est très divergente au niveau des quatre protéines Ras (Ha-Ras, N-Ras, Ki-RasA et Ki-RasB). D'un autre côté, pour chaque protéine Ras, cette séquence d'acides aminés est très conservée entre l'homme et les rongeurs.

Les 165 acides aminés N-terminaux contiennent le domaine catalytique ; cette région est conservée à plus de 90% chez les trois gènes *ras*, les 86 premiers acides aminés étant identiques d'une espèce à l'autre.

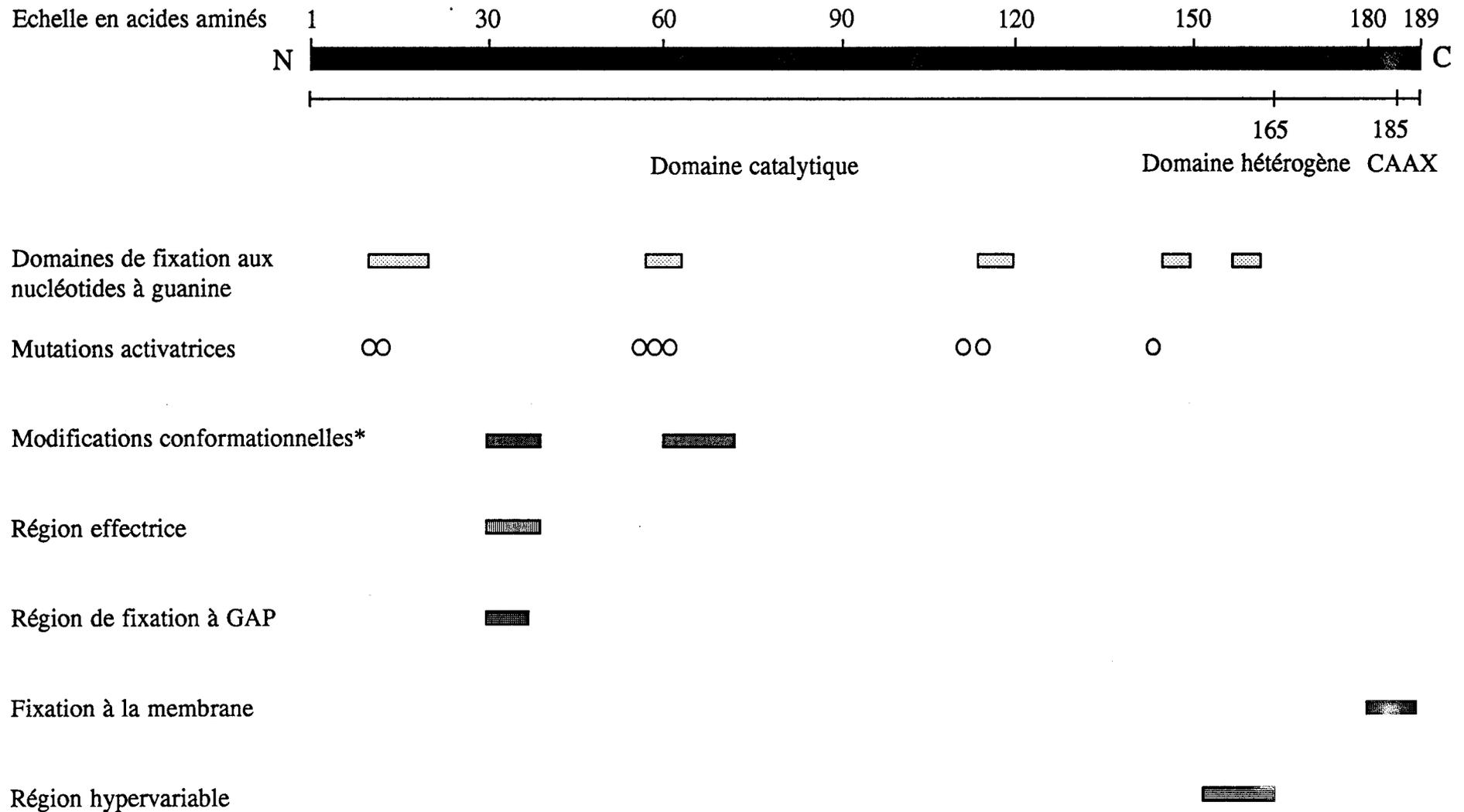


Figure 1 : Représentation linéaire de la p21^{ras} dont les différentes régions importantes ont été déterminées par des études cristallographiques ou de mutagenèse. *Régions subissant des modifications conformationnelles lors de l'hydrolyse du GTP. (D'après Downward, 1992, et Lowy *et al.*, 1991).

La mutagénèse des gènes *ras* (Sigal *et al.*, 1986) et la cristallographie aux rayons X des protéines Ras (Paï *et al.*, 1991 ; Tong *et al.*, 1991 ; De Vos *et al.*, 1988) ont permis d'obtenir beaucoup d'informations sur la structure et l'organisation fonctionnelle de cette petite protéine G. En effet, Schlichting et ses collaborateurs (1990), ainsi que Milburn et ses collaborateurs (1990) ont mis en évidence, par cristallographie aux rayons X à 1,35 Å de résolution, les changements de conformation de la p21^{ras} après l'hydrolyse du GTP et la fixation au GDP. Ces modifications surviennent d'une part dans une région définie comme la région effectrice qui est également la région d'interaction avec la protéine GAP, ainsi que dans une autre région impliquée dans les interactions avec les nucléotides à guanine (figure 1).

III. Le cycle d'activation des protéines Ras ; le cycle GTP/GDP.

L'activité GTPasique du domaine catalytique et le taux de dissociation des nucléotides contrôlent l'état d'activation de la protéine Ras (figure 2). Dans les cellules, le rapport GTP/GDP est très élevé, signifiant que le GTP se fixera préférentiellement aux molécules de p21^{ras} libres de nucléotides après dissociation, l'affinité de la p21^{ras} pour le GTP et le GDP étant similaire. La protéine GTP-p21 hydrolyse le GTP en GDP à un faible taux convertissant de cette manière la forme active GTP-p21 en forme inactive GDP-p21. Du fait que Ras joue un rôle important dans la transduction de signaux, la régulation de son activité est très contrôlée. Deux types de protéines contrôlent la fixation de Ras au GTP ou GDP. Les *Guanine nucleotide-releasing proteins* (GNRPs) ou facteurs d'échanges facilitent le relâchage du GDP permettant ainsi au GTP de se fixer (Feig & Cooper, 1988). Les *GTPase-activating proteins* (GAPs) accélèrent l'hydrolyse du GTP. Ces protéines se trouvent en amont de l'action des protéines Ras dans la transduction des signaux.

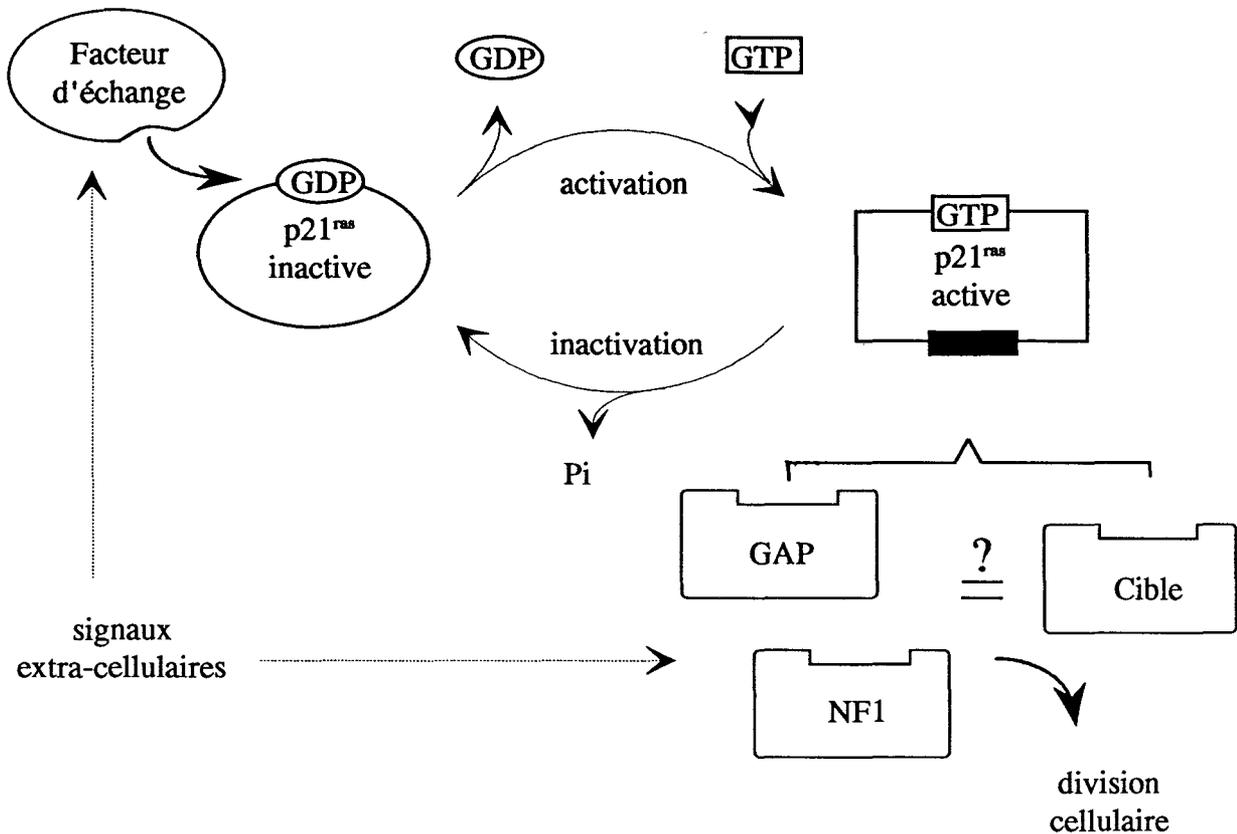


Figure 2 : Cycle d'activation et d'inactivation de la p21^{ras} et sa régulation par des facteurs cellulaires. Les signaux extracellulaires sont transmis via des récepteurs membranaires activés, ce qui résulte en l'activation de la p21^{ras} par stimulation du relâchement du GDP par le facteur d'échange, ou en inhibant les facteurs stimulant l'activité GTPasique (GAP, NF1), ou par ces deux mécanismes à la fois. La fixation du GTP induit un changement conformationnel permettant de présenter le domaine effecteur (rectangle noir) dans une conformation reconnaissable par les protéines stimulant l'activité GTPasique (GAP, NF1) et la ou les molécule(s) cible(s), effectrice(s). L'hydrolyse du GTP en GDP induit un retour de la p21^{ras} dans une conformation inactive. (D'après Lowy *et al.*, 1991).

IV. Fonctions biochimiques de la p21^{ras}.

IV.1 Quel est l'effecteur de l'action de la p21^{ras}?

La seule activité enzymatique connue de la p21^{ras} est l'hydrolyse du GTP servant de régulateur interne à l'activité de la protéine. Il est donc probable que la p21^{ras} génère des signaux pour la prolifération cellulaire ou la différenciation cellulaire, en interagissant avec d'autres protéines dans la cellule et en activant ainsi un chemin de transmission du signal. Ceci est analogue au système des protéines G classiques dans lequel la sous unité α complexée au GTP interagit avec une enzyme effectrice pour réguler l'activité de l'effecteur.

Une analyse génétique (Willumsen *et al.*, 1986) a permis d'identifier le domaine effecteur des protéines Ras grâce à des mutants de délétion au niveau des acides aminés 32 à 40 qui sont défectifs pour la transformation. Les mutations dans cette région n'altèrent pas les autres propriétés de la p21^{ras} comme la fixation aux nucléotides à guanine ou la localisation membranaire. Cette région est exposée à la surface de la molécule (Paï *et al.*, 1989) et considérée comme le domaine qui doit interagir avec son effecteur ou molécule cible. Actuellement, on connaît deux protéines qui interagissent avec ce domaine : la protéine GAP et la protéine NF1.

IV.2 La p21^{ras} et GAP.

La protéine GAP (pour *GTPase activating protein*) découverte par Trahey et McCormick a la propriété d'augmenter l'activité GTPasique des protéines Ras (Trahey & McCormick, 1987). GAP est également la première protéine mise en évidence comme interagissant avec la p21^{ras}. Il existe deux formes de la protéine GAP chez l'homme (Trahey *et al.*, 1988). Le type I de 125 kDa est exprimé dans tous les tissus, alors que le type II, ne contenant pas les 180 premiers acides aminés du type I, a été détecté uniquement dans le placenta (McCormick, 1990). La protéine GAP possède deux domaines SH2 (*Src Homology*)

et un domaine SH3. Ces régions sont homologues à des domaines non-catalytiques de la pp60^{src}. Le domaine SH2 est impliqué dans la reconnaissance d'autres protéines au niveau de séquences contenant une phosphotyrosine (Cantley *et al.*, 1991). Le rôle de GAP dans la transduction de signaux régulée par Ras est le centre d'intérêt de nombreuses recherches. En effet, GAP contrôle-t-il l'activité de Ras (action en amont de Ras), ou est-il un effecteur de Ras (rôle en aval de Ras)?

IV.2.1 Evidences pour un rôle régulateur de l'activité de la p21^{ras} par GAP.

La protéine GAP, qui est cytosolique, a la propriété d'inactiver la p21^{ras} en stimulant l'activité GTPasique (Trahey & McCormick, 1987). Le gène codant pour GAP a été purifié et cloné (Vogel *et al.*, 1988). GAP augmente l'activité GTPasique de la p21^{ras} de 20 000 fois et maintient ainsi, *in vivo*, la p21^{ras} essentiellement sous forme inactive, complexée au GDP. GAP a donc un rôle potentiel de régulateur agissant en amont de la p21^{ras}. Différentes observations récentes vont dans ce sens. L'activation de la protéine kinase C (PKC) dans les lymphocytes T augmente la quantité de p21^{ras} complexée au GTP, apparemment en réduisant l'activité de GAP (Downward *et al.*, 1990). Zhang et ses collaborateurs (1990) ont également démontré que la surexpression de GAP dans des cellules NIH3T3 supprime le phénotype transformé induit par la surexpression du proto-oncogène *c-ras*. Par contre, GAP ne semble pas supprimer la transformation induite par l'oncogène *v-ras* (Zhang *et al.*, 1990).

Si le rôle de GAP est de réguler négativement Ras, on peut s'attendre à ce que la transduction de signaux, via Ras, requiert l'inactivation de GAP, pour que Ras-GTP puisse interagir avec son effecteur. Tsai et ses collaborateurs (1989) ont montré que les effets de GAP sur Ras sont inactivés par certains lipides et leurs produits secondaires, produits en réponse à des signaux mitogènes. L'interaction de GAP avec des lipides pourrait donc jouer un rôle important dans la régulation de l'activité de Ras lors de la stimulation mitogène (voir paragraphe sur la régulation de GAP).

IV.2.2 GAP effecteur de la p21^{ras}.

Par ailleurs, d'autres études montrent que GAP semble remplir une fonction d'effecteur, c'est à dire de cible biologique, régulée par les protéines Ras (Bollag & McCormick, 1991). Les premiers résultats en faveur d'un rôle effecteur de GAP ont été obtenus en étudiant la région de la p21^{ras} qui interagit avec GAP (Calès *et al.*, 1988 ; Adari *et al.*, 1988). Ces auteurs ont montré que des mutations ponctuelles dans le domaine effecteur (Willumsen *et al.*, 1986 ; Sigal *et al.*, 1986), détruisent l'activité biologique de l'oncogène v-Ha-ras et empêchent la stimulation de l'activité GTPasique de la p21^{ras} normale par GAP. Néanmoins ces résultats peuvent être interprétés comme montrant une compétition entre l'effecteur réel de Ras et un régulateur en amont (GAP) se fixant au niveau du même site. Mais GAP ne se fixe qu'à la p21^{ras} complexée au GTP (Vogel *et al.*, 1988), ce qui est également en faveur d'un rôle effecteur de GAP.

Des évidences plus directes, pour une fonction effectrice de GAP, découlent de l'étude du rôle de la p21^{ras} et de GAP, dans l'ouverture de canaux potassiques couplés à des récepteurs muscariniques dans des cellules atriales (Yatani *et al.*, 1990). Le canal potassique est couplé au récepteur par la protéine hétérotrimérique G_k. L'addition de protéines GAP ou de p21^{ras} recombinantes à une préparation de membrane inhibe l'ouverture des canaux. Cette inhibition est dépendante de l'interaction p21-GAP et peut être empêchée par une incubation préalable avec un anticorps anti-GAP. Une autre approche a permis de mettre en évidence le fait qu'une interaction fonctionnelle entre la p21^{ras} et GAP est une condition nécessaire et suffisante pour activer la kinase MPF-H1 (*Maturation Promoting Factor H1-kinase*) dans les oocytes de xénope (Dominguez *et al.*, 1991). Récemment, il a été montré que les domaines SH2 et SH3 sont responsables des effets observés et un modèle a été établi, dans lequel la p21^{ras} induirait des changements conformationnels au niveau de GAP, qui permettraient aux domaines SH2 et SH3 d'être fonctionnels (Martin *et al.*, 1992).

Les travaux d'autres groupes montrent également le rôle probable de GAP comme effecteur de Ras. Dans ces expériences, une protéine mutante de Ras et une apparentée à Ras,

ayant des affinités pour GAP augmentées par rapport à la p21^{ras}, inhibent la fonction biologique de Ras. Un double mutant de la protéine RAS1 de levure [Leu 68]RAS1(term.), qui forme un complexe stable avec le GTP, est cytosolique et inhibe l'action de la p21^{ras}. Cette inhibition de l'action de la p21^{ras} peut être supprimée en augmentant le taux de protéine GAP dans la cellule (Gibbs *et al.*, 1989). Le gène *K-rev-1* (*rap1A*) codant pour une protéine de la famille Ras présente la propriété d'inhiber la transformation induite par *ras* (Kitayama *et al.*, 1989). Comme le mutant [Leu 68]RAS1(term.), la protéine K-Rev fixe GAP avec une affinité supérieure à celle de la p21^{ras} pour GAP (Frech *et al.*, 1990). Il est tentant de conclure que [Leu68]RAS1(term.) et K-Rev inhibent l'action de la p21^{ras} par un mécanisme de compétition en se fixant à GAP.

IV.2.3 Régulation de GAP.

Régulation de GAP par phosphorylation.

La p120^{GAP} ayant un rôle de régulateur négatif et probablement d'effecteur de la p21^{ras}, tout chemin de transduction du signal contrôlant l'activité de GAP devrait avoir une répercussion au niveau de l'activité de la p21^{ras}. Un certain nombre de ces chemins, dans lesquels la p120^{GAP} est modifiée ou régulée, ont été identifiés. Les plus étudiés sont ceux impliquant une phosphorylation sur des résidus tyrosines de la p120^{GAP}. La p120^{GAP} peut être phosphorylée par des tyrosine-kinases de la famille des récepteurs membranaires (Récepteurs au CSF-1, au PDGF et à l'EGF) ainsi que par des tyrosine-kinases cytoplasmiques (pp60^{src}, pp160^{src-abl}, pp130^{src-fps} et la pp155^{v-fms}) (Ellis *et al.*, 1990 ; Kaplan *et al.*, 1990 ; Molloy *et al.*, 1989 ; Reedijk *et al.*, 1990). Néanmoins, le taux de phosphorylation de GAP par ces tyrosine-kinases est faible et il n'a pas été démontré qu'il modifiait l'activité de GAP.

Par ailleurs, ces tyrosine-kinases pourraient contrôler l'activité de la p120^{GAP} en se complexant avec celle-ci. Cette complexation a été décrite avec le récepteur au PDGF (Kazlauskas *et al.*, 1990 ; Kaplan *et al.*, 1990), le récepteur au CSF 1 (Reedijk *et al.*, 1990),

et avec la p60^{src} (Brott *et al.*, 1991). Ces interactions ont été reproduites *in vitro* en utilisant les domaines SH2 de GAP, exprimés dans des bactéries (Anderson *et al.*, 1990), qui se fixent au niveau de phosphotyrosines sur ces kinases. L'étude de la phosphorylation sur des résidus tyrosine de Ras-GAP et de son association avec des protéines cellulaires cytosoliques devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'activité de la p21^{ras} (figure 3).

Deux autres protéines plus récemment identifiées, la p62 et la p190 s'associent également avec la p120^{cap} (Ellis *et al.*, 1990). Initialement ces deux protéines ont été co-purifiées avec GAP et il a été montré que ces trois protéines sont phosphorylées au niveau de résidus tyrosines, dans des cellules transformées par des récepteurs membranaires à activité tyrosine-kinase ou par des tyrosine-kinases cytoplasmiques (Ellis *et al.*, 1990). La p62 est hautement phosphorylée au niveau de résidus tyrosines dans des cellules transformées par *v-src* ou traitées avec de l'EGF (Ellis *et al.*, 1990). Seule une petite proportion des protéines GAP est associée avec la p62. Celle-ci se trouve au niveau membranaire et pourrait jouer un rôle dans le changement de localisation sub-cellulaire de GAP. La p62 se fixe à GAP grâce aux domaines SH2. Elle a été clonée et séquencée (Wong *et al.*, 1992). La séquence révèle une forte homologie avec la protéine hn RNP (*high nuclear Ribo-Nucleo Protein*) GRP33, et la p62 possède des propriétés de fixation aux acides nucléiques.

La p190 est localisée au niveau cytoplasmique. Elle contient plus de phosphothréonines et phosphosérines que de phosphotyrosines et se fixe de façon presque stoechiométrique à GAP dans des cellules stimulées par des agents mitogènes ou transformées par des tyrosine-kinases (Ellis *et al.*, 1990 ; Moran *et al.*, 1991). Cette protéine a également été clonée et séquencée. L'analyse de la séquence montre des similitudes avec les membres de la famille des GTPases. Par ailleurs, la plus grande partie de la p190 est virtuellement identique, en séquence d'acides aminés, à un facteur de transcription nucléaire (Settleman *et al.*, 1992). Ceci suggère que la p21^{ras} pourrait, via GAP et p190, transmettre directement un signal au noyau, modulant ainsi l'expression de gènes spécifiques. Néanmoins, ceci reste à démontrer.

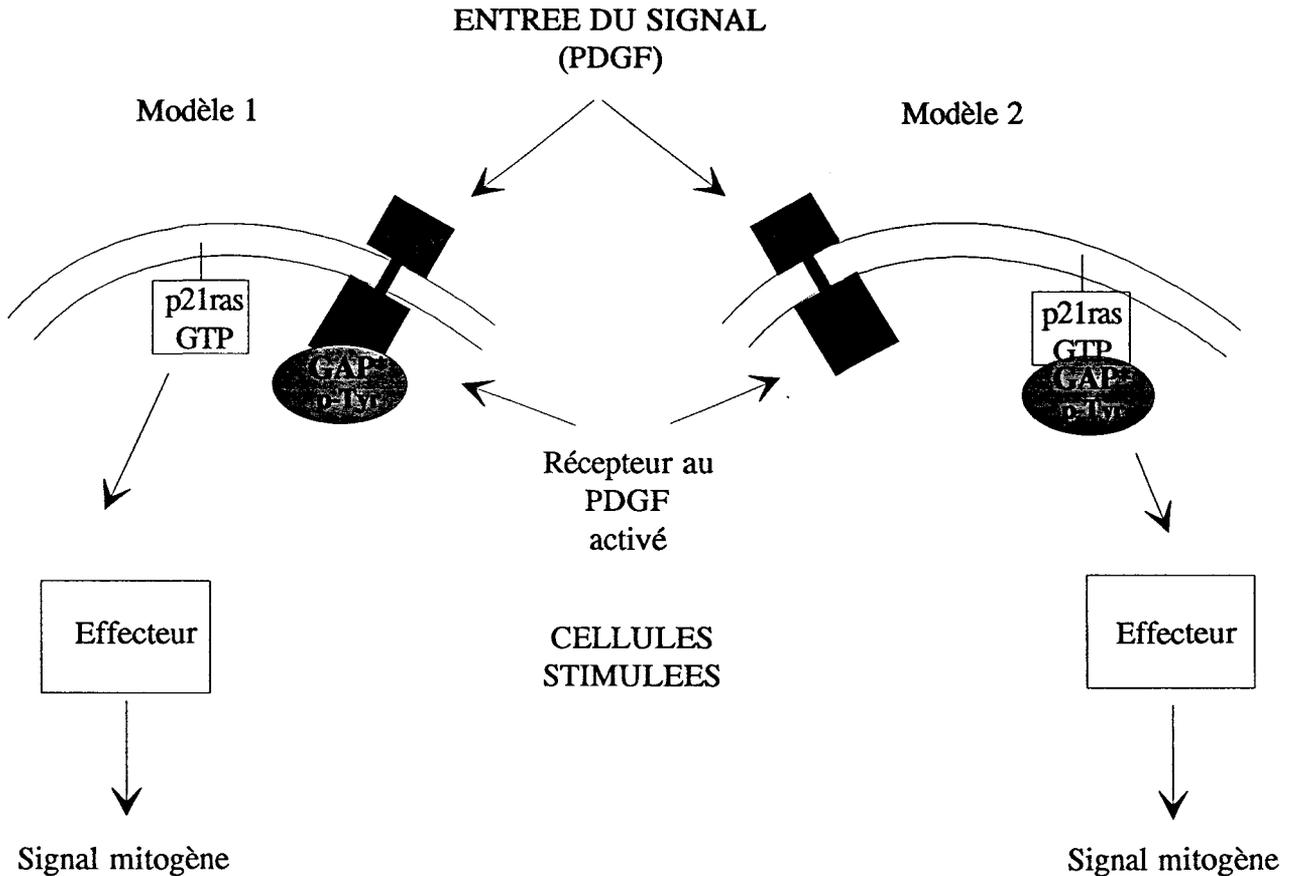
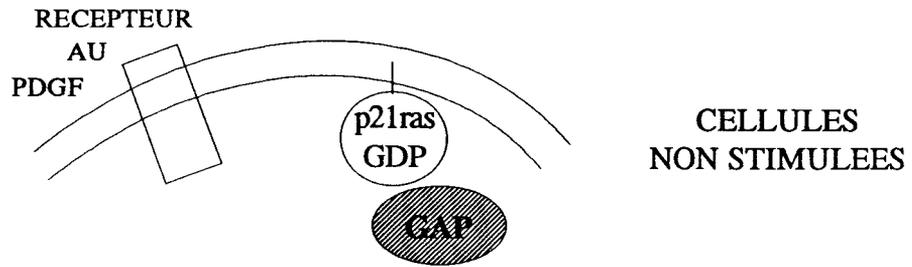


Figure 3 : Deux modèles alternatifs expliquant le rôle de la phosphorylation de GAP dans la transduction du signal par la p21^{ras}. Modèle 1 : Si GAP est un atténuateur de la fonction de Ras, en limitant l'accumulation de forme active complexée au GTP, la phosphorylation sur un résidu tyrosine pourrait inhiber la conversion de Ras-GTP en Ras-GDP médiée par GAP, permettant ainsi l'accumulation de protéines Ras actives, impliquées *via* des effecteurs en aval dans la transmission du signal mitogène. Modèle 2 : Par contre, si GAP ou un complexe Gap-p21^{ras} agit directement comme effecteur, la phosphorylation d'un résidu tyrosine de GAP pourrait augmenter la formation ou l'interaction du complexe GAP-p21^{ras} avec d'autres composants en aval dans le chemin de transmission du signal mitogène. (D'après Parsons, 1990).

Régulation de GAP par des lipides.

Des études *in vitro* ont montré que certains lipides peuvent contrôler l'activité de GAP. En effet, l'activité de GAP dans des extraits cytosoliques peut être inhibée par certains lipides associés à la réponse mitogène comme l'acide phosphatidique, l'acide arachidonique et les phosphatidyl inositol phosphates (Tsaï *et al.*, 1990). La stimulation de fibroblastes de rat subconfluents par le sérum induit la production de lipides qui inhibent GAP *in vitro* (Yu *et al.*, 1990). Serth et ses collaborateurs (1991) ont montré que GAP interagissait avec des lipides micellaires par l'intermédiaire de son domaine carboxy-terminal.

IV.3 La p21^{ras} et NF1 (Neurofibromine).

Le schéma de transduction du signal, via la p21^{ras} s'est compliqué avec la découverte d'une deuxième protéine de mammifère ayant la propriété de stimuler l'activité GTPasique de la p21^{ras}, la protéine codée par le gène de la neurofibromatose de type 1 : *Neurofibromatosis type 1 gene (NF1)* (Martin *et al.*, 1990). La neurofibromatose est une maladie héréditaire probablement causée par la mutation de l'un des deux allèles dans les lignées germinales. Cette maladie est caractérisée par une haute fréquence de tumeurs bénignes (neurofibromes) et de tumeurs malignes (neurofibrosarcomes) originaires de la crête neurale, ainsi que d'anomalies survenant lors du développement. Le gène responsable a été cloné et séquencé (Viskochil *et al.*, 1990 ; Cawthon *et al.*, 1990 ; Wallace *et al.*, 1990). La protéine NF1 possède un domaine appelé NF1 GRD, pour *GAP related domain*, qui est fortement homologue au domaine catalytique de la p120^{GAP} (figure 4) (Xu *et al.*, 1990a ; Buchberg *et al.*, 1990). Ce domaine a la propriété de réguler négativement les protéines Ras en activant leur activité GTPasique intrinsèque comme GAP (Xu *et al.*, 1990b ; Ballester *et al.*, 1990 ; Martin *et al.*, 1990). Le domaine catalytique de NF1 possède une affinité supérieure pour la p21^{ras} (50nM) à celle de GAP pour la p21^{ras} (2µM), mais NF1 présente un renouvellement plus lent que GAP (Martin *et al.*, 1990). De même que pour la p120^{GAP}, le domaine catalytique

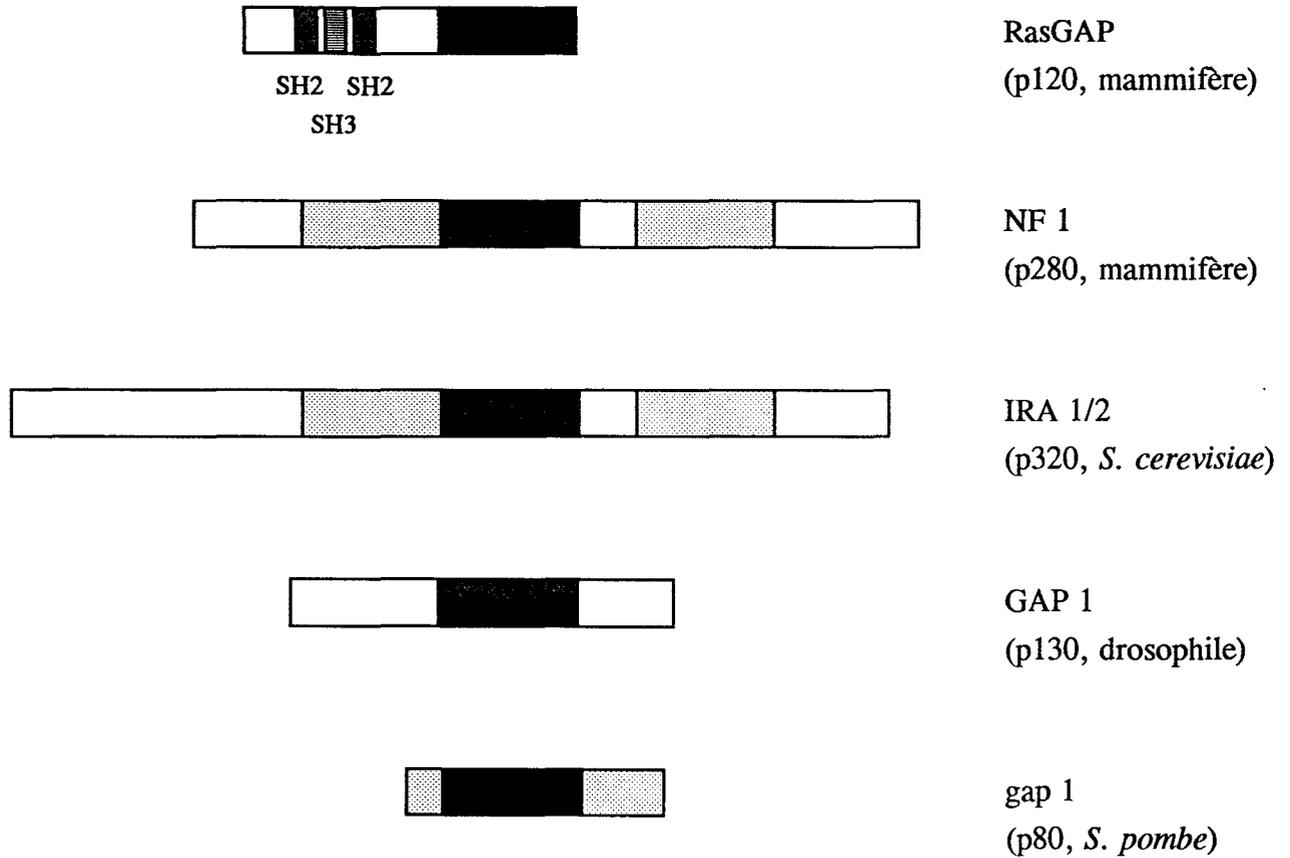


Figure 4 : Comparaison des protéines activant stimulant GTPasique des protéines Ras. Les boîtes noires représentent le domaine catalytique, les boîtes grises les régions d'homologie de séquence entre la neurofibromine (NF 1), IRA 1, IRA 2, et gap 1 (D'après Hall, 1992).

de NF1 est inapte à stimuler l'activité GTPasique des mutants activés de la p21^{ras} ainsi qu'inapte à fixer les mutants dans le domaine effecteur (Basu *et al.*, 1992 ; DeClue *et al.*, 1992).

La protéine NF1 fait plus de 2 500 acides aminés. En plus du domaine catalytique GAP, il existe des régions flanquantes à ce domaine qui sont homologues à ceux des protéines IRA 1 et 2 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ces dernières stimulent l'activité GTPasique des protéines RAS (Tanaka *et al.*, 1990 ; Ballester *et al.*, 1990). La protéine NF1 ne possède pas de domaines SH2 et SH3 et donc moins susceptible d'être sujette à régulation par des tyrosine-kinases comme dans le cas de la p120^{GAP}. D'un point de vue génétique, le gène *NF1* agit comme un gène suppresseur de tumeur : quand un allèle est inactivé dans la lignée germinale, les mutations somatiques inactivant l'autre allèle génèrent des cellules n'ayant pas de protéines NF1 fonctionnelles et donc soumises à des stimuli transformants. Ces observations sont compatibles avec l'idée selon laquelle NF1, comme les protéines IRA, n'auraient qu'un rôle de régulation négative de l'activité de la p21^{ras}.

IV.4 Les protéines Ras et les facteurs de relâchage des nucléotides à guanine.

La stimulation de certains récepteurs à la surface de la cellule induit l'accumulation de protéines Ras sous forme active complexée au GTP. Cette étape est cruciale dans le chemin de transduction du signal, car l'inhibition de l'activation de Ras, par un anticorps anti-Ras ou par un mutant négatif dominant de Ras, bloque un certain nombre des effets sur la fonction cellulaire induits par ces récepteurs (Cai *et al.*, 1990 ; Medema *et al.*, 1991 ; Mulcahy *et al.*, 1985 ; Szeberenyi *et al.*, 1990).

Pour pouvoir être activée sous forme complexée au GTP, la protéine Ras doit d'abord relâcher le GDP. Cette étape clef est contrôlée par des facteurs de relâchage de nucléotides à guanine (GRF : guanine-nucleotide-releasing factor) (Downward *et al.*, 1990 ; Jones *et al.*, 1991 ; Wolfman & Macara, 1990). Un tel facteur d'échange a pu être purifié à partir de cerveau de boeuf (West *et al.*, 1990 ; Huang *et al.*, 1990) ou de levure (Jones *et al.*, 1991).

Récemment, un facteur d'échange spécifique du cerveau a été cloné chez l'homme (Shou *et al.*, 1992). Il est possible que certaines fonctions spécifiques de Ras soient médiées par différents facteurs de relâchage du GDP, et récemment, il a été montré que le NGF stimule les activités de Ras-GRF et de GAP (Li *et al.*, 1992).

IV.5 Les protéines RAS et l'adénylate-cyclase.

Malgré de nombreuses études structurales, biologiques et biochimiques, le mécanisme d'action exact des protéines Ras n'est pas encore complètement élucidé. Les premiers résultats dans ce domaine ont été obtenus chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette espèce de levure contient deux gènes *RAS* nommés *RAS1* et *RAS2* (DeFeo *et al.*, 1983 ; Powers *et al.*, 1984) codant pour deux protéines de 36 kDa et 40 kDa respectivement (309 acides aminés pour *RAS1* et 322 acides aminés pour *RAS2*). Les régions de fixation aux nucléotides à guanine de ces protéines sont très conservées au niveau des régions équivalentes chez leurs homologues de mammifères. Le domaine effecteur quant-à lui est identique. Les produits des gènes *RAS* de levure montrent les mêmes propriétés biochimiques que leurs homologues mammifères (Temeles *et al.*, 1985). La perte de l'un des deux gènes est viable, mais la perte des deux gènes est létale (Kataoka *et al.*, 1985 ; Tatchell *et al.*, 1985). De plus, les spores *RAS1-RAS2* ne sont pas capables d'avoir une croissance végétative (Kataoka *et al.*, 1984 ; Tatchell *et al.*, 1984). Ces résultats illustrent bien l'importance des gènes *RAS* dans la prolifération cellulaire normale. De plus, il a clairement été démontré que l'une des fonctions majeures des protéines RAS se trouve être la régulation de l'activité de l'adénylate-cyclase (figure 5). Cette découverte est le résultat d'analyses génétiques de souches de *Saccharomyces cerevisiae* contenant des gènes *RAS* mutants ou de souches déficientes pour ces gènes (Tatchell *et al.*, 1985 ; Toda *et al.*, 1985). En effet, les lignées de levures déficientes en fonction *RAS* présentent des propriétés similaires aux lignées déficientes en adénylate-cyclase. Chez les mammifères, les protéines Ras n'activent pas l'adénylate-cyclase (Beckner *et al.*, 1985). Par contre, les p21^{ras} peuvent compenser certaines déficiences de croissance de

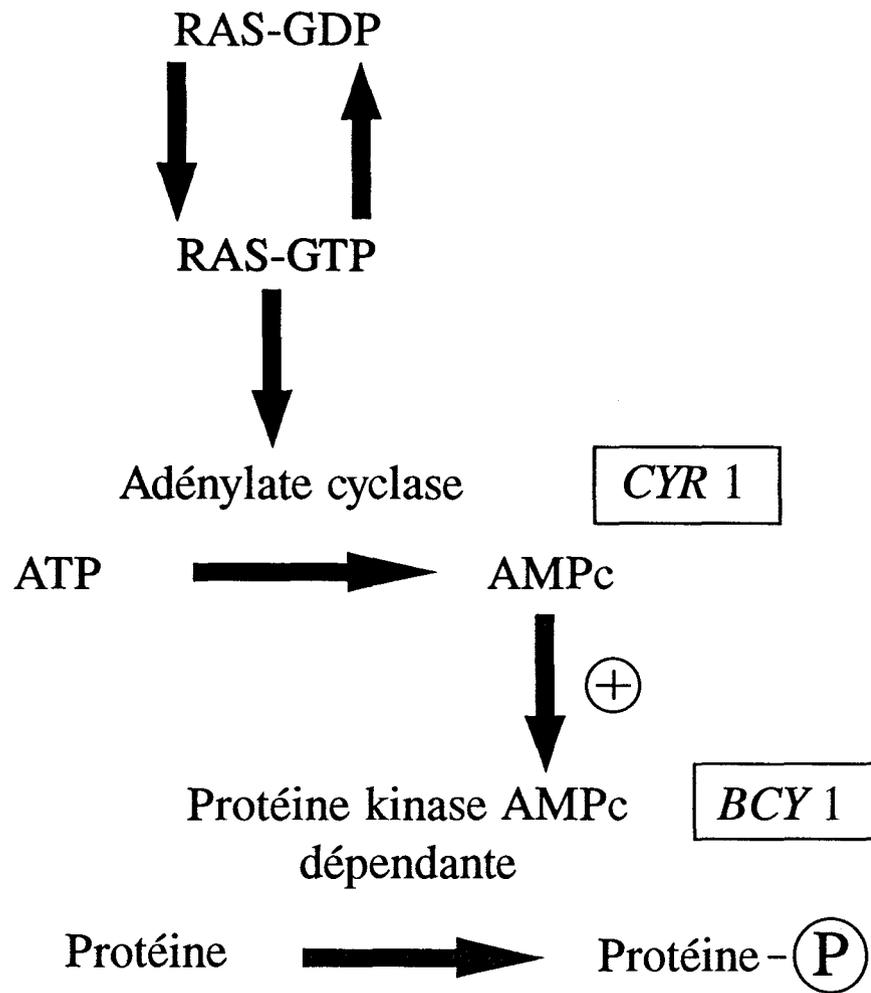


Figure 5 : Contrôle de l'activité de l'adénylate cyclase par les protéines RAS chez *Saccharomyces cerevisiae*. La protéine RAS-GTP active l'adénylate cyclase (codée par le gène *CYR 1*), qui catalyse la conversion de l'ATP en AMPc. L'AMPc active la protéine kinase dépendante de l'AMPc. La sous unité régulatrice étant codée par le gène *BCY 1*. Des mutations dans le gène *BCY 1* qui permettent une activation de la kinase, indépendante de l'AMPc, peuvent pallier à l'absence de gènes *RAS* dans la cellules. (D'après McCormick, 1989).

Saccharomyces cerevisiae dûes à l'inactivation des gènes *RAS*. Par ailleurs, il a également été démontré que les protéines *RAS* de levure n'activent pas l'adénylate-cyclase au sein des cellules de mammifères (Beckner *et al.*, 1985).

IV.6 Cibles biochimiques de la p21^{ras}.

IV.6.1 La protéine kinase C.

La protéine kinase C (PKC) est une sérine/thréonine kinase spécifique dont l'activité dépend du taux de calcium et de phospholipides (Nshizuka, 1984). Cependant, à des concentrations physiologiques en calcium, l'activité de cette enzyme dépend du diacylglycérol insaturé (DAG). Ainsi, le DAG est défini comme un second messager pour l'activation de la PKC (Bell, 1986). Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré que la PKC pouvait être directement activée par la fixation d'esters de phorbol, promoteurs de tumeur. L'activation de la PKC joue un rôle crucial dans le contrôle de la prolifération cellulaire. L'étude du profil d'activation de la PKC induite par des esters de phorbol est très intéressante. En effet, peu de temps après le traitement de cellules par le TPA (12-*O*-tétradécanoylphorbol-13-acétate), la PKC est activée. D'un autre côté, le traitement prolongé de cellules par des esters de phorbol provoque une diminution très marquée de l'activité de la PKC (Rodrigues-Pena & Rozengurt, 1984).

Ce phénomène a été utilisé pour étudier le rôle de la PKC dans la réponse mitogène induite par les protéines Ras. La microinjection de protéines Ras oncogènes dans des cellules quiescentes résulte en une stimulation de la synthèse de l'ADN (Feramisco *et al.*, 1984 ; Stacey & Kung, 1984). Lacal et ses collaborateurs (1987c) ont montré que la régulation négative de la PKC, dans des cellules «Swiss 3T3», par un traitement prolongé au TPA provoque une inhibition de la réponse mitogène induite par la microinjection de protéines Ras oncogènes. De plus, la microinjection de PKC dans ces cellules restaure la réponse mitogène induite par les protéines Ras oncogènes, suggérant une interaction entre la PKC et les

protéines Ras dans la réponse mitogène observée. Par ailleurs, la PKC seule n'est pas capable d'induire un effet mitogène et il a été proposé que la p21^{ras} agirait de façon proximale de la PKC dans la voie de transduction de signaux conduisant à la synthèse d'ADN.

Il est important de remarquer que dans d'autres types de cellules comme la lignée de fibroblastes embryonnaires de rat REF-52 ayant subi un traitement prolongé au TPA, les protéines Ras oncogènes microinjectées gardent leur capacité à induire la synthèse d'ADN (Feramisco *et al.*, 1988). Ainsi l'activation de la PKC ne peut pas être considérée comme un événement indispensable dans les effets mitogènes induits par les protéines Ras. Il semblerait plutôt que la coopération entre la PKC et Ras dans l'induction d'effets mitogènes soit spécifique à certains types cellulaires ou à certaines caractéristiques de croissance pour l'instant inconnues.

Les travaux de Downward et ses collaborateurs (1990) suggèrent que dans les lymphocytes T, la p21^{ras} soit un médiateur important de l'action de la PKC. En effet, la stimulation du récepteur antigénique des lymphocytes T provoque une activation rapide de la p21^{ras}. Le mécanisme de cette activation semble impliquer une diminution de l'activité de GAP, dépendante de la PKC. Le mécanisme le plus probable de l'inactivation de GAP par la PKC serait la phosphorylation d'une protéine par la PKC, qui en retour agirait comme un inhibiteur sur GAP.

IV.6.2 La phospholipase C.

La phospholipase C (PLC) est impliquée dans l'hydrolyse des polyphosphoinositides en DAG et inositol phosphate. Le DAG est un activateur de la PKC et l'inositol phosphate mobilise le calcium de compartiments intracellulaires non mitochondriaux. Différentes études ont montré que des cellules transformées par des protéines Ras possédaient une augmentation dans le taux de DAG résultant d'une augmentation du métabolisme des phosphoinositols (Fleischman *et al.*, 1986 ; Wolfman & Macara, 1987). Quoi qu'il en soit, le profil des modifications métaboliques associé au processus de transformation cellulaire est

très complexe et il est difficile d'établir jusqu'où l'augmentation de production du DAG est directement reliée à l'action de Ras. Lacal et ses collaborateurs (1987a) ont montré que 20 minutes après la microinjection d'oncoprotéines Ras dans des oocytes de *Xenopus Laevis*, une légère augmentation (1,5 à 2 fois) du taux de phosphoinositides et d'inositols phosphate est observée. Cependant, l'effet le plus marqué est l'augmentation de cinq fois du taux de DAG après la même période de temps. D'un autre côté, la microinjection de p21^{ras} normale ne provoque pas les effets décrits précédemment, ou alors les provoque à un niveau plus faible. Ainsi, il a été suggéré que l'augmentation rapide du taux de DAG reflétait un effet précoce des protéines Ras sur le catabolisme des phospholipides, via la PLC. Cependant, il a été montré, au niveau des oocytes de xénope (*Xenopus Laevis*) et de cellules en culture, que l'augmentation dans le taux de DAG ne se fait pas conjointement à une augmentation du renouvellement des phosphoinositides (Wolfman & Macara, 1987 ; Lacal *et al.*, 1987a,b). Il a donc été proposé l'existence d'autres sources que le catabolisme des phosphoinositides pour expliquer l'accumulation de DAG. Lacal et ses collaborateurs (1987b) ont montré que des cellules transformées par Ras possèdent des concentrations élevées en phosphocholine et phosphoéthanolamine.

IV.6.3 La phospholipase A₂.

La microinjection de protéines Ras dans des fibroblastes d'embryon de rat (REF) induit le phénomène de pinocytose et s'accompagne d'une stimulation de la phospholipase A₂ (PLA₂) (Bar-Sagi & Feramisco, 1986). En effet, ces auteurs ont montré que la microinjection de p21^{ras} n'a pas d'effet apparent sur le renouvellement des phosphoinositides 30 et 60 minutes après l'injection. Néanmoins, ils trouvent une augmentation de la formation de lysophospholipides qui sont des produits de l'action de la PLA₂. La signification physiologique de l'effet de la microinjection de protéines Ras sur l'activité de la PLA₂ restent à déterminer. Mais, il est important de noter que la stimulation de l'activité de la PLA₂ est impliquée dans l'initiation de signaux mitogènes induits par des facteurs de croissance

(Dinarello *et al.*, 1983 ; Vicentini *et al.*, 1984 ; Shier *et al.*, 1982). De plus, la localisation ultrastructurale de la PLA₂ et de la protéine Ras indique une proximité spatiale des deux protéines dans les rides (*ruffles*) des cellules transformées par *ras* (Bar-Sagi *et al.*, 1988). Ainsi, les effets apparents de Ras sur l'activité de la PLA₂ pourraient expliquer en partie l'effet mitogène des protéines Ras oncogènes.

V. Propriétés biologiques de la p21^{ras}.

La notion du rôle de Ras dans la prolifération cellulaire est étayée par l'existence de gènes *ras* activés capables d'induire un phénotype transformé (voir chap. VI). D'un autre côté, l'étude de l'expression des gènes *ras* dans les tissus différenciés, non proliférant, (comme le coeur, le cerveau ou les glandes endocrines) montre des taux élevés de p21^{ras} comparés à ceux trouvés dans les tissus en prolifération (Furth *et al.*, 1987). Ce manque de corrélation entre l'expression de *ras* et la prolifération cellulaire reflète la diversité des effets biologiques que les protéines Ras peuvent avoir en fonction du contexte cellulaire.

V.1 Les protéines Ras et la prolifération cellulaire.

La prolifération des cellules en culture est largement régulée par des facteurs de croissance du sérum. La technique de microinjection a permis de mettre en évidence la propriété qu'ont les protéines Ras à mimer l'action de facteurs de croissance sur la prolifération cellulaire. En effet, l'un des effets les plus précoces induit par des facteurs de croissance dans des cellules quiescentes, est l'activation de l'antiport Na⁺/H⁺ qui conduit à l'alcalinisation du cytoplasme (Moolenaar *et al.*, 1983). De même, Hagag et ses collaborateurs (1986) ont montré que la microinjection de protéines Ras oncogéniques dans des fibroblastes de souris NIH 3T3, induit une alcalinisation rapide du cytoplasme. Ce changement de pH induit par *ras* est inhibé lorsque les cellules sont préalablement traitées par l'amiloride qui est un inhibiteur spécifique de l'antiport Na⁺/H⁺. Par ailleurs, l'augmen-

de croissance sont également des facteurs de différenciation. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, le rôle de Ras dans la prolifération cellulaire a clairement été mis en évidence par différents types d'approches. Il est maintenant intéressant d'appréhender le rôle de Ras dans la différenciation cellulaire.

Le NGF ou *Nerve Growth Factor* est connu pour induire la différenciation neuronale des cellules PC-12. L'un des principaux effets du NGF est notamment de promouvoir la croissance de neurites. Il a été montré qu'en absence de NGF, la microinjection de protéines Ha-Ras humaines dans des cellules PC-12, induisait une différenciation morphologique similaire à celle induite par le NGF (Bar-Sagi & Feramisco, 1985). Dans les deux cas, l'induction de la croissance de neurites est dépendante de la synthèse d'ARN et de protéines. Elle est associée à une cessation de la prolifération cellulaire et initiée dans les 24 heures de façon réversible (Bar-Sagi & Feramisco, 1985). A cause de ces similitudes, il a été proposé que les protéines Ras et le NGF agissent via des voies de transduction du signal cellulaire qui sont communes. Cette hypothèse est supportée par les travaux de Hagag et ses collaborateurs (1986) qui ont montré que la microinjection d'anticorps anti-Ras (Y13-259) inhibait la formation de neurites induite par le NGF. Plus récemment, deux groupes ont montré que Ras est essentiel pour la phosphorylation, au niveau de résidus tyrosines de kinases, induite par le NGF. En effet, ils ont montré que la phosphorylation de trois kinases (MAP kinases, Raf-1 et RSK), impliquées dans la transduction de signaux, par le récepteur au NGF est médiée par Ras (Thomas *et al.*, 1992 ; Wood *et al.*, 1992). Murroya et ses collaborateurs (1992) ont également montré que le NGF induit une accumulation rapide des protéines Ras complexées au GTP dans les cellules PC-12 de rat.

V.2.1 Les protéines Ras et la maturation de l'oocyte de Xénope.

Initialement, la raison ayant poussé à étudier la fonction de Ras dans les oocytes de xénope, vient de l'observation importante concernant les protéines Ras : elles peuvent activer l'adénylate-cyclase chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Toda *et al.*, 1985). Les oocytes

de *Xenopus laevis* représentent un système intéressant pour étudier la conservation de cette fonction de Ras au cours de l'évolution, car ils contiennent une adénylate cyclase qui, comme dans les cellules de mammifères, est régulée par les protéines Gs et Gi. De plus, la maturation des oocytes (c'est à dire, l'induction de la méiose) est modulée par l'AMPc.

Birchmeier et ses collaborateurs (1985) ont montré que la microinjection de protéines Ras oncogènes dans les oocytes de xénope induit la maturation des oocytes, comme le font l'insuline (Muller & Koontz, 1981) ou la progestérone (Muller J.L., 1983) *in vitro*. A l'inverse de la progestérone, la p21^{ras} n'a pas d'effet sur le taux intracellulaire d'AMPc (Birchmeier *et al.*, 1985). Ces résultats montrent que le chemin de transduction du signal impliquant Ras est différent de celui impliquant la progestérone. La microinjection d'un anticorps monoclonal anti-Ras dans des oocytes bloque les effets de l'insuline sur la maturation mais pas ceux de la progestérone (Korn *et al.*, 1987 ; Deshpande & Kung, 1987). Cet anticorps bloque également l'aptitude des protéines Ras oncogènes à induire la maturation des oocytes (Korn *et al.*, 1987 ; Deshpande & Kung, 1987).

V.2.2 Les protéines Ras et la différenciation des cellules R7 de l'ommatide de la drosophile.

Le développement de l'oeil chez la drosophile représente un excellent modèle qui a permis de mettre en évidence le rôle fondamental de Ras dans ce processus. En effet, l'activation de Ras apparait comme étant une clef médiant l'induction due à des interactions de cellule à cellule, durant le développement de l'oeil de la drosophile (Simon *et al.*, 1991 ; Fortini *et al.*, 1992). L'oeil de la drosophile adulte consiste en approximativement 800 ommatides composées de 20 cellules. Chaque ommatide contient 8 cellules photoréceptrices, R1 à R8, ainsi que 4 cellules sécrétrices et 8 cellules accessoires.

L'adoption d'un destin de cellule neuronal par le précurseur de la cellule photoréceptrice R7 requiert un signal induit par la cellule voisine R8 (figure 6). Trois gènes ont été identifiés dans ce mécanisme de recrutement de la cellule R7 : *bride of sevenless* ou *boss* (Reinke et

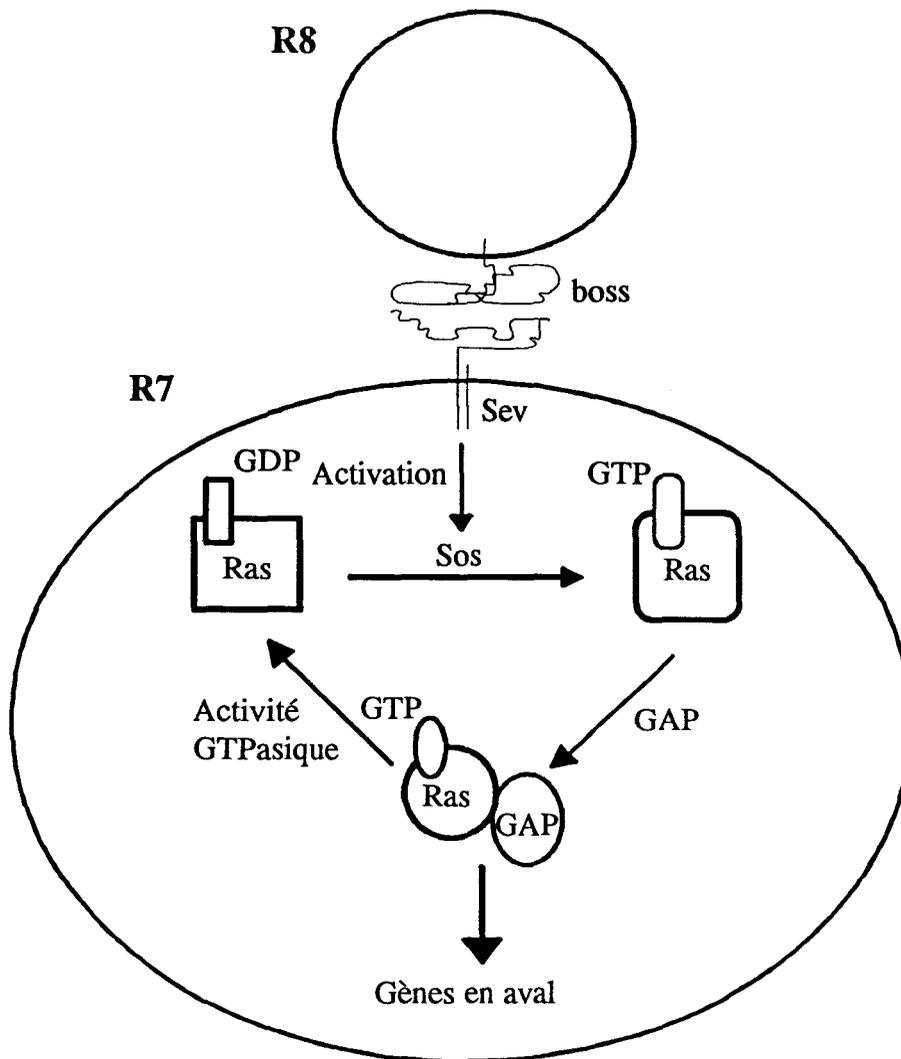


Figure 6 : Modèle expliquant la destinée d'une cellule neuronale R7 dans l'ommatide de drosophile. La protéine Boss de la cellule R8 se fixe au récepteur Sevenless (Sev) du précurseur de la cellule R7. Cette fixation a pour effet de stimuler l'activité tyrosine kinase de Sevenless, qui en retour active la protéine Sos. La protéine Sos activée, active la protéine Ras en stimulant le relâchement des nucléotides à guanine. Une cascade d'évènements s'en suit, conduisant à l'adoption d'une destinée neuronale de la cellule. (D'après Bonifini *et al.*, 1992).

Zipurski, 1988), *sevenless* ou *sev* (Tomlinson & Ready, 1986), et *seven-in-absentia* ou *sina* (Carthew & Rubin, 1990). Le gène *sev* code pour un récepteur à activité tyrosine-kinase localisé sur la surface de la cellule R7 (Hafen *et al.*, 1987 ; Tomlinson *et al.*, 1987) : il est activé par un ligand codé par *boss*, lui-même présenté par la cellule R8 (Krämer *et al.*, 1991). Le gène *sina* code pour un facteur nucléaire qui est requis par la cellule R7 (Carthew et Rubin, 1990). En l'absence de l'un de ces gènes, le précurseur de la cellule R7 évolue en une cellule cone au lieu d'une cellule neuronale. En recherchant des mutations diminuant l'efficacité du signal transmis par Sev, Simon et ses collaborateurs (1991) ont identifiés sept gènes qui semblent requis pour la transduction de signal médiée par Sev. Un de ces locus est *Ras1*, un autre est *sos*, qui code pour une protéine homologue à la protéine CDC25 de *Saccharomyces cerevisiae*, qui est un activateur de l'échange des nucléotides à guanine par les protéines RAS. Ces résultats suggèrent que la stimulation de l'activité de la protéine Ras1 est un élément clef dans la transduction du signal transmis par Sev et cette stimulation pourrait être effectuée en activant l'échange du GDP par du GTP au niveau des protéines Ras1. Ceci est renforcé par l'observation montrant que l'expression de Ras1 activé peut se substituer au signal transduit par Sev (Fortini *et al.*, 1992).

VI. Activation de l'oncogène *ras*.

VI.1 Mécanismes d'activation.

VI.1.1 Activation des gènes *ras* par mutation ponctuelle.

Depuis la découverte de leurs allèles transformants dans certaines tumeurs humaines, notamment dans la lignée cellulaire T24/EJ dérivant d'une tumeur de la vessie, en 1982 (Shih & Weinberg, 1982 ; Goldfarb *et al.*, 1982 ; Santos *et al.*, 1982 ; Parada *et al.*, 1982 ; Pulciani *et al.*, 1982), les gènes *ras* sont le sujet de nombreuses recherches. Ces gènes peuvent acquérir des propriétés transformantes par des mécanismes quantitatifs ou qualitatifs (Barbacid, 1987).

Les gènes *ras* peuvent être activés par de simples mutations ponctuelles au niveau de codons bien précis. En effet, des mutations ponctuelles au niveau des codons 12, 13, 59 et 61, *in vivo*, sont suffisantes pour conférer des propriétés transformantes à ces gènes (Reddy *et al.*, 1982 ; Tabin *et al.*, 1982 ; Bos *et al.*, 1985 ; Reynolds *et al.*, 1987). Des expériences de mutagénèse *in vitro* ont montré que des mutations ponctuelles au niveau d'autres codons comme les codons 63, 116, 119 ou 146 peuvent également conférer des propriétés transformantes aux gènes *ras* (Barbacid, 1987). Ces mutations provoquent des substitutions d'acides aminés qui, sauf dans le cas de la proline, confèrent des propriétés transformantes à ces protéines en diminuant leur activité GTPasique intrinsèque (Gibbs *et al.*, 1984 ; McGrath *et al.*, 1984 ; Seeburg *et al.*, 1984 ; Sweet *et al.*, 1984), en abolissant l'activité GTPasique induite par GAP (Trahey & McCormick, 1987) ou encore en facilitant l'échange GTP/GDP. Les résidus 12, 13, 59, 61 et 63 sont situés dans ou à proximité des sites d'interactions avec les phosphates bêta et gamma du nucléotide. Les mutations au niveau de ces résidus ont pour effet de diminuer l'activité GTPasique de la protéine. D'un autre côté, les mutations au niveau des résidus 116, 119 et 146 ont pour effet de diminuer l'affinité pour le nucléotide et ainsi d'augmenter l'échange du GDP avec du GTP cytosolique.

La découverte de mutants, comme la p21[Val¹²] ayant une activité GTPasique intrinsèque 10 fois plus faible que la protéine sauvage a été la première démonstration d'une différence biochimique entre une protéine normale et une version mutée de la p21^{ras}. Ces observations ont permis d'établir le modèle selon lequel la p21^{ras} serait biologiquement active sous forme complexée au GTP et inactive sous forme complexée au GDP. Le mutant [Val¹²] ayant une activité GTPasique déficiente resterait essentiellement sous forme active et augmenterait la quantité de signal transmis à l'effecteur. L'étude des propriétés biochimiques des mutants et des p21^{ras} normales a permis de mettre en évidence que la différence d'activité GTPasique intrinsèque des protéines mutantes ne pouvait pas rendre compte des propriétés biologiques de ces protéines. Par exemple, un mutant [Asp¹²] de la protéine N-Ras possède une activité GTPasique intrinsèque qui n'est que deux fois inférieure à celle de la protéine normale. Toutefois, cette dernière possède des propriétés transformantes très marquées

(Trahey *et al.*, 1987). Il en a été conclu qu'il doit exister d'autres différences biochimiques entre la protéine normale et les protéines activées. Ces conclusions ont conduit à étudier les propriétés biochimiques des protéines Ras dans des cellules vivantes où les activités biochimiques sont mesurées dans des conditions physiologiques. C'est ainsi que Trahey et McCormick (1987) ont découvert une protéine (GAP) capable d'activer l'activité GTPasique des protéines Ras normales mais pas des mutants au niveau des codons 12, 13 et 61. En présence de cette protéine, la p21^{ras} normale montre une activité GTPasique 500 fois supérieure à celle des mutants aspartate 12 et valine 12.

VI.1.2 Activation des gènes *ras* par surexpression.

Il a été montré que l'augmentation de l'expression des proto-oncogènes *ras* normaux peut induire des manifestations de phénotypes malins (Pulciani *et al.*, 1985). L'expression de gènes *ras* normaux placés sous la dépendance d'éléments de régulation comme les LTR rétroviraux conduit à une transformation maligne de cellules NIH3T3 (DeFeo-Jones *et al.*, 1981 ; Chang *et al.* 1982 ; McKay *et al.*, 1986). Des résultats similaires ont été obtenus en intégrant de multiples copies d'un clone d'ADN du gène Ha-*ras* humain normal (Pulciani *et al.*, 1985). Ces cellules tumorigènes montrent invariablement une expression du gène *ras* de 30 à 100 fois supérieure à celle de leurs homologues normales, ou transformées par un oncogène *ras* activé par une mutation ponctuelle. D'une manière générale les propriétés transformantes induites par la surexpression de proto-oncogènes *ras* normaux sont plus limitées que les effets induits par les allèles mutés, même lorsqu'ils sont sous la dépendance de leur propre promoteur. Par contre, la combinaison d'altérations qualitatives et quantitatives des gènes *ras* résulte en des oncogènes capables d'induire un phénotype néoplasique plus complet.

VI.2 Expression des gènes *ras* dans les cellules tumorales ou transformées.

Des altérations de l'expression des gènes *ras* peuvent avoir un rôle important dans la tumorigenèse humaine et animale. La surexpression des gènes *ras* a pu être observée dans divers types de tumeurs humaines (Barbacid, 1987 ; De Biasi *et al.*, 1989 ; Gallick *et al.*, 1985 ; Slamon *et al.*, 1984 ; Tanaka *et al.*, 1986). Cette surexpression pourrait représenter un mécanisme alternatif à l'activation par mutation ponctuelle, dans la dérégulation de la transduction du signal dans les cellules cancéreuses. En tout cas, ce mécanisme est complémentaire à l'activation par mutation ponctuelle des gènes *ras*, dans de nombreuses tumeurs ou lignées cellulaires, où la surexpression de la forme mutée est nécessaire pour l'apparition du phénotype malin (Pulciani *et al.*, 1985 ; Winter & Perrucho, 1986). La surexpression de la forme normale du gène Ha-*ras* ou N-*ras* est capable de transformer les cellules NIH 3T3 en culture (Pulciani *et al.*, 1985 ; McKay *et al.*, 1986). Westaway et ses collaborateurs (1986) ont montré au niveau d'un néphroblastome aviaire qu'il y avait surexpression du gène Ha-*ras* au niveau transcriptionnel provoquée par une insertion provirale. La surexpression du gène N-*ras* en conjonction avec une mutation dans la partie codante a été mise en évidence au niveau des cellules tumorales humaines de *Xeroderma pigmentosum* (Suarez *et al.*, 1989). Dans le modèle de la tumorigenèse de la peau de souris en plusieurs étapes (voir paragraphe A.VIII.3), il semble que le taux d'expression du gène Ha-*ras* muté joue un rôle important lors de la progression maligne. En effet, Pelling et ses collaborateurs (1986, 1987) ont pu montrer que dans les tumeurs de la peau de souris, il y a surexpression du gène Ha-*ras* muté et que cette surexpression n'est pas due à une amplification génique. Par ailleurs, il existe une énigme concernant le fait que l'on retrouve le gène Ha-*ras* activé par mutation dans les tumeurs de la peau de souris induite par un cancérigène chimique de façon spécifique, car on ne trouve pas les gènes Ki-*ras* et N-*ras* activés par des mutations, alors que ces trois gènes sont soumis de la même façon aux effets mutagènes de l'agent cancérigène utilisé. Il est donc possible que la régulation ou la dérégulation spécifique de l'expression du gène Ha-*ras* dans les cellules épithéliales soit responsable de cette spécificité.

VI.3 Coopération de *ras* avec des oncogènes nucléaires dans la transformation cellulaire *in vitro*.

Grâce à des expériences de complémentation *in vitro*, Land et ses collaborateurs (1983) ainsi que Rassoulzadegan et ses collaborateurs (1983) ont montré qu'il existe deux groupes d'oncogènes ayant les propriétés d'immortaliser les cellules pour l'un et de les transformer pour l'autre. Les oncogènes immortalisants ou du groupe I (*myc*, Ag T du virus du polyome ou de SV 40, gène E1A de l'adénovirus) codent pour des protéines ayant une localisation nucléaire qui ont la capacité d'immortaliser les cellules en culture. Les oncogènes transformants ou du groupe II (*ras*, gène E1B de l'adénovirus, Ag mt du virus du polyome) codent pour des protéines, ayant une localisation cytoplasmique, qui entraînent la conversion tumorigène des cellules préalablement immortalisées. Cette coopération entre des oncogènes est en accord avec le principe de tumorigenèse en plusieurs étapes. Ainsi, il a pu être montré que les oncogènes mt (*middle T*) et Ag T (*Large T*) du virus du polyome doivent travailler en collaboration pour pouvoir transformer des fibroblastes embryonnaires de rat (Rassoulzadegan *et al.*, 1983).

Dans le cas des oncogènes *ras*, il a été montré qu'ils ne sont pas capables de transformer des cellules primaires d'embryon de rat *in vitro* (Land *et al.*, 1983). En effet, la transformation des fibroblastes d'embryon de rat (REF) *in vitro* par *ras* nécessite la coopération avec des oncogènes nucléaires comme *c-myc* (Land *et al.*, 1983), *N-myc* (Schwab *et al.*, 1985), E1A de l'adénovirus (Ruley, 1983), l'antigène T du virus du polyome (Land *et al.*, 1983) ou la p53 (Eliyahu *et al.*, 1983 ; Parada *et al.*, 1983). Par contre, les oncogènes *ras* ont la propriété de transformer seuls les lignées cellulaires NIH 3T3, Rat 1 et Rat 2 qui sont déjà immortalisées.

Par ailleurs, l'efficacité de transformation des oncogènes *ras* n'est pas influencée par les proto-oncogènes endogènes ni par la co-transfection de leur allèle normal. D'un autre côté, leur niveau d'expression module leur potentiel transformant (Winter & Perucho, 1986). Les oncogènes *ras* sont nécessaires non seulement pour l'initiation, mais également pour le

maintien du phénotype transformé. Ceci a pu être démontré par l'existence d'un mutant thermosensible de *v-Ki-ras* (Shih *et al.*, 1979b), ou par des expériences *in vitro* dans lesquelles l'expression de *ras* est placée sous la dépendance d'un promoteur inductible (Huang *et al.*, 1981).

VII. L'oncogène *ras* et cancer.

VII.1 Oncogènes *ras* et cancers humains.

Les oncogènes *ras* activés se retrouvent dans environ 30% de toutes les tumeurs humaines (Barbacid, 1987 ; Bos, 1989 ; Tanaka *et al.*, 1986). Les études effectuées jusqu'à ce jour permettent certaines généralisations :

(i) L'incidence de la mutation activatrice d'un oncogène *ras* varie d'un type de cancer à l'autre. Par exemple, 90% des carcinomes du pancréas exocrine contiennent un gène *ras* activé (Almoguera *et al.*, 1988 ; Smit *et al.*, 1988). De même, dans les cancers de la thyroïde, environ 40% des tumeurs possèdent un des trois oncogènes *ras* activé (Lemoine *et al.*, 1989 ; Suarez *et al.*, 1990) et trente pour cent des leucémies myéloïdes aiguës contiennent un gène *ras* muté (Farr *et al.*, 1988). D'un autre côté, les mutations des gènes *ras* sont rarement décelées dans les carcinomes mammaires et l'analyse de plus de 100 cas de leucémies lymphocytiques chroniques et de lymphomes non Hodgkinien n'a pas pu mettre en évidence de mutations au niveau d'un gène *ras* (Neri *et al.*, 1988).

(ii) Il existe dans certains cas une corrélation entre un type particulier de cancer et un gène *ras* particulier activé de façon prédominante. Par exemple, *Ki-ras* est activé dans un certain nombre de cancers, comme les carcinomes pancréatiques (contenant presque exclusivement *Ki-ras*) (Almoguera *et al.*, 1988), carcinomes du colon (Bos *et al.*, 1987 ; Forrester *et al.*, 1987) ou carcinomes des poumons (Rodenhuis *et al.*, 1988). Par ailleurs, *N-ras* est prédominant dans certaines leucémies. L'oncogène *Ha-ras* est le plus souvent impliqué dans des tumeurs d'origine épithéliale, comme les kératoacanthomes (Corominas *et al.*, 1989).

Les raisons de cette spécificité ne sont pas clairement élucidées. Une interprétation évidente pourrait être que l'activation d'un gène *ras* particulier reflète une spécificité tissulaire dans l'expression de la forme proto-oncogénique dans le tissu normal, précurseur de la tumeur. Toutefois, cela ne semble pas être le cas. Par exemple, il a été montré que des cellules, provenant d'une leucémie myéloïde aigüe avec le gène *N-ras* activé, expriment les proto-oncogènes *Ha-ras* et *Ki-ras* (Shen *et al.*, 1987). Cependant, nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'une expression spécifique dans la cellule précurseur de la leucémie.

Une autre interprétation pourrait être que les différents gènes *ras* remplissent des fonctions différentes, même sous leur forme activée bien que la plupart des résultats aillent à l'encontre de cette possibilité. Néanmoins, Carbone et ses collaborateurs (1991) ont montré que dans des fibroblastes NIH 3T3 transformés par transfection par les oncogènes *Ha-ras*, *Ki-ras*, *N-ras*, *dbl* et *trk*, seul *Ha-ras* inhibe l'induction de *c-fos* par le TPA.

(iii) En général, la présence d'un gène *ras* activé ne permet pas de corrélation avec le stade de développement d'une tumeur particulière. Concernant le cancer colorectal, par exemple, dans lequel les adénomes évoluent en carcinomes malins, l'incidence de mutations *ras* est la même à tous les stades. Ceci indique que dans ces tumeurs, l'activation de *ras* survient relativement tôt dans le processus en plusieurs étapes de la progression tumorale. La détection de mutations *ras* ne peut donc pas avoir d'implications dans un diagnostic qui pourrait être utile dans les approches cliniques.

VII.2 Oncogènes *ras* et tumeurs animales (tumeurs induites par des agents carcinogènes).

Les oncogènes *ras* ont été impliqués dans le développement de nombreuses tumeurs animales. En particulier, ils sont fréquemment trouvés activés dans les tumeurs induites par un agent carcinogène physique ou chimique (tableau 2). Le cancer est une maladie qui est l'aboutissement de plusieurs étapes et résulte probablement de l'accumulation d'erreurs génétiques et épigénétiques indépendantes. L'implication fréquente des gènes *ras* dans les

Espèce	Agent Carcinogène	Tumeur	Oncogène	Incidence	Référence
Rat	NMU	Carcinome mammaire	Ha- <i>ras</i>	86%	Sukumar <i>et al.</i> , 1983 Zarbl <i>et al.</i> , 1985
	DMBA	Carcinome mammaire	Ha- <i>ras</i>	23%	Zarbl <i>et al.</i> , 1985
	DMN	Mésenchyme du pancréas	Ki- <i>ras</i>	40%	Sukumar <i>et al.</i> , 1986
	TNM	Carcinome pulmonaire	Ki- <i>ras</i>	74%	Barbacid, 1987
Souris	DMBA	Carcinome de la peau	Ha- <i>ras</i>	90%	Balmain <i>et al.</i> , 1983 Quintanilla <i>et al.</i> , 1986 Bizub <i>et al.</i> , 1986
	DBACR	Carcinome de la peau	Ha- <i>ras</i>	80%	Bizub <i>et al.</i> , 1986
	DMBA	Carcinome mammaire	Ha- <i>ras</i>	100%	Dandekar <i>et al.</i> , 1986
	Rayons X	Lymphome	N- <i>ras</i> , Ki- <i>ras</i>	57%	Guerrero <i>et al.</i> , 1984
	NMU	Lymphome	N- <i>ras</i> , Ki- <i>ras</i>	85%	Guerrero <i>et al.</i> , 1984
	MCA	Lymphome du thymus	Ki- <i>ras</i>	83%	Eva & Trimmer, 1986
	MCA	Fibrosarcome	Ki- <i>ras</i>	50%	Eva <i>et al.</i> , 1983
	HOAFF	Carcinome hépatocellulaire	Ha- <i>ras</i>	100%	Wiseman <i>et al.</i> , 1986
	VC	Carcinome hépatocellulaire	Ha- <i>ras</i>	100%	Wiseman <i>et al.</i> , 1986
	HODE	Carcinome hépatocellulaire	Ha- <i>ras</i>	100%	Wiseman <i>et al.</i> , 1986
	Furfural	Carcinome hépatocellulaire	Ha- <i>ras</i>	85%	Barbacid, 1987
TNM	Carcinome pulmonaire	Ki- <i>ras</i>	100%	Barbacid, 1987	

Tableau 2 : Activation des oncogènes *ras* dans les tumeurs animales induites par des agents carcinogènes. Abréviations : DBACR, dibenz(a,h)acridine; DMBA, diméthyl-benz(a)anthracène ; DMN, diméthylnitrosamine ; HOAFF, N-hydroxy-2-acétyl-aminofluorène ; HODE, 1'-hydroxy-2'-3'-dehydroestradiol ; MCA, 3-méthyl-cholanthrène ; NMU, nitroso-méthylurée ; TNM, tétranitrométhane ; VC, Carbamate de vinyle.

tumeurs spontanées chez l'homme et l'animal amène à se poser la question de savoir si les oncogènes *ras* participent à l'induction du développement néoplasique ou s'ils en sont une conséquence. Quelques résultats expérimentaux suggèrent que les oncogènes *ras* sont en fait activés après que la cellule ait acquis des propriétés néoplasiques (Albino *et al.*, 1984 ; Tainski *et al.*, 1984). Néanmoins, les résultats obtenus plus récemment dans des modèles animaux semblent indiquer qu'il est plus probable que les oncogènes *ras* participent à l'initiation du développement de la tumeur. En effet, les oncogènes *ras* sont activés dans la majorité des tumeurs induites par un agent carcinogène, chez la souris ou chez le rat (voir tableau 2). Chez le rat, par exemple, l'induction de carcinomes mammaires par une dose unique de nitroso-méthyl-urée (NMU), durant la puberté, conduit à l'activation de Ha-*ras* dans 86% des tumeurs (Sukumar *et al.*, 1983 ; Zarbl *et al.*, 1985). Un certain nombre d'agents carcinogènes sont connus pour leur capacité à former des adduits avec les bases de l'ADN (pour revue : Singer & Kusmierek, 1982). Par exemple, le NMU est connu pour induire des mutations en méthylant des résidus guanine, ce qui conduit à une substitution de cette guanine par une adénine. Dans les carcinomes mammaires induits par le NMU, les gènes *ras* sont activés par une transition de G en A de la seconde base du codon 12, il en résulte en une substitution d'un résidu glycine par un résidu glutamine dans la protéine p21^{ras}. Quand un agent carcinogène différent est utilisé, comme le DMBA (diméthylbenz[a]anthracène), il apparaît également des gènes *ras* activés, et une fois de plus, les mutations induites reflètent le mode d'action de l'agent carcinogène. Ces résultats suggèrent que, au moins dans ce système, les gènes *ras* sont directement la cible des molécules carcinogènes.

VII.3 Tumorigenèse de la peau de souris.

Le modèle de la tumorigenèse de la peau de souris développé dans le laboratoire d'Allan Balmain, au *Beatson institute* à Glasgow, est à l'origine du travail présenté dans ce mémoire. Ce modèle expérimental a beaucoup contribué à l'établissement du concept de carcinogénèse en plusieurs étapes : initiation, promotion et progression (figure 7). Un des avantages de ce

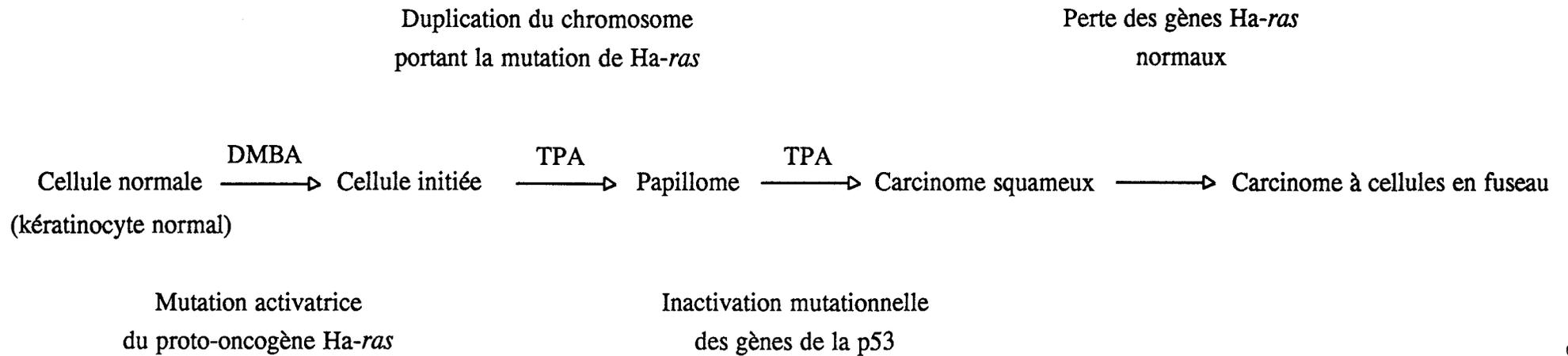


Figure 7 : Altérations génétiques survenant lors de la tumorigénèse en plusieurs étapes de la peau de souris.

modèle est que l'étiologie du développement de la tumeur peut être contrôlée, ce qui, bien sûr, n'est pas le cas avec les tumeurs humaines pour lesquelles, dans la majorité des cas, les agents responsables sont inconnus. De plus, l'existence de tumeurs bénignes ou prémalignes permet d'étudier les événements moléculaires séquentiels associés aux différents stades de la carcinogénèse.

Les cellules sont initiées par traitement de la peau de souris avec une dose unique d'un agent chimique tel que la DMBA (voir figure 7) (Balmain *et al.*, 1983, 1984). Ces cellules forment des papillomes bénins après 6 à 8 semaines de traitement avec le TPA comme agent promoteur de tumeur. Certains de ces papillomes évoluent en carcinomes lorsque le traitement par le TPA est prolongé. Toutes ces tumeurs initiées par le DMBA contiennent une mutation spécifique au niveau du codon 61 (transversion A en T) du gène *Ha-ras* (Quintanilla *et al.*, 1986). La fonction du gène *Ha-ras* altéré ne se restreint pas au stade d'initiation. En effet, d'autres modifications, comme l'amplification de l'allèle *ras* muté, la perte de l'allèle normal (Bremmer *et al.*, 1990 ; Bianchi *et al.*, 1990 ; Quintanilla *et al.*, 1986 ; Guerrero *et al.*, 1985 ; Santos *et al.*, 1984), l'expression des allèles normaux et mutés, sont observées durant la progression maligne (Bremmer *et al.*, 1990 ; Quintanilla *et al.*, 1991). Le rôle biologique de ces altérations séquentielles au niveau du locus de *Ha-ras*, a été analysé *in vitro* par des expériences de transfections et *in vivo* par des expériences de souris transgéniques. Ainsi, il a pu être montré que la transfection d'allèles mutants dans des kératinocytes induit une expression aberrante des kératines K8 et K18 (Diaz-Guerra *et al.*, 1992). Or, les cellules de carcinome en fuseau, dans lesquelles la plupart des caractéristiques de différenciation des cellules épithéliales sont perdues, présentent une perte de l'allèle *ras* normal au profit de l'allèle muté (Buchmann *et al.*, 1991). Dans ces cellules, on ne détecte pas les kératines normalement exprimées au niveau du derme, mais on peut détecter de petites quantités des kératines K8 et K18 qui sont caractéristiques de l'épithélium simple. De plus, des souris transgéniques, surexprimant l'oncogène *Ha-ras*, placé sous le contrôle du promoteur de la kératine 10 bovine, présentent un profil de différenciation de l'épiderme complètement altéré par rapport à une peau normale (Bailleul *et al.*, 1990). Il a été conclu

de ces différentes études que les gènes *ras* induisent une reprogrammation séquentielle de l'épiderme pour produire des kératines inhabituelles et finalement produire des cellules de carcinomes en fuseau ayant perdus la plupart des caractéristiques de différenciation de l'épiderme.

Par ailleurs, d'autres altérations géniques peuvent être observées au niveau du gène de la p53 dans les carcinomes mais pas dans les papillomes (Burns *et al.*, 1991). Les altérations mutationnelles au niveau du gène de la p53 représentent l'altération génétique la plus commune dans les tumeurs humaines. Ce gène code pour une phosphoprotéine nucléaire qui semble jouer un rôle crucial dans la régulation de la réplication de l'ADN. De plus, la perte des deux allèles de la p53 a été observée dans des tumeurs humaines, suggérant que ce gène est un gène suppresseur de tumeur. Néanmoins, il existe d'autres tumeurs possédant des gènes de la p53 mutés qui peuvent transformer les cellules en culture d'une manière similaire aux oncogènes classiques tel que *Ha-ras*. Quatre carcinomes sur les 13 étudiés présentent la perte totale d'un des deux allèles et des mutations dans le second provoquant des délétions dans la protéine codée. D'un autre côté, aucune anomalie au niveau du gène de la p53 n'a pu être détectée dans les 30 papillomes étudiés. Il semblerait donc que la perte de la fonction de la p53 soit mise en cause dans les carcinomes plutôt que l'acquisition de nouvelles propriétés par les protéines tronquées.

Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur l'étude de la régulation transcriptionnelle du gène *Ha-ras* de souris. Il m'a donc semblé intéressant de présenter dans le paragraphe suivant, des notions importantes pour bien comprendre certains des éléments qui régissent la transcription des gènes, avant d'exposer quels sont les objectifs de la thèse.

B. REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES

I. Rôle de la conformation de la chromatine dans la régulation de l'expression des gènes.

La plupart des gènes eucaryotes sont sous forme inactive dans le noyau, et il est probable que le mécanisme de répression de l'expression des gènes soit général et non spécifique. Certaines évidences suggèrent que ce mécanisme de répression est médié par la condensation de la chromatine en régions inactives dans le génome (Brown, 1984 ; Weisbrod, 1982).

I.1 Structure de la chromatine et agencement en nucléosomes.

Dans la chromatine décondensée (pour revue sur la nature et la structure de la chromatine se référer à Pederson *et al.*, 1986 ; Eissenberg *et al.*, 1985 ; Dilworth & Dingwall, 1988), les nucléosomes sont régulièrement espacés le long de l'ADN. Même lorsque la chromatine est décondensée, les nucléosomes peuvent toujours limiter l'accès, par les facteurs de régulation, à l'ADN qui doit être transcrit (pour revue sur le rôle de la chromatine dans la transcription, voir Felsenfeld, 1992). Mais, il a été montré que dans les régions où les gènes sont activement transcrits, il y a un déplacement des nucléosomes (Simpson & Stafford, 1983). Des travaux ont pu montrer que si l'assemblage des nucléosomes avec l'ADN empêche l'initiation de la transcription *in vitro* (Knezetic & Luse, 1986 ; Matsui *et al.*, 1987), il n'empêche pas l'élongation de la transcription par les complexes de préinitiation de la transcription (Lorch *et al.*, 1987 ; Knezetic *et al.*, 1988) et que la RNA polymérase II transcrit au travers du nucléosome en déplaçant les histones. Ceci pourrait expliquer le fait que les nucléosomes soient déplacés des séquences promotrices mais pas de tout le locus.

I.2 Méthylation de l'ADN.

La méthylation *in vitro* de séquences d'ADN empêche leur expression *in vivo*, comme

cela a pu être montré dans des fibroblastes de souris ou des oocytes de xénope (Fradin *et al.*, 1982 ; Stein *et al.*, 1982 ; Vardimon *et al.*, 1982), alors que la 5-aza-cytidine, qui est un agent hypométhylant, active l'expression de gènes préalablement inactivés (Jones, 1985).

Dans le génome, les méthylations se font principalement à la position 5' des dinucléotides CpG. A peu près 60-90% de tous les CpG du génome sont méthylés. Les CpG non méthylés tendent à être regroupés dans des îlots HTF (*Hpa II tiny fragments*), parce qu'ils contiennent plusieurs sites pour l'enzyme de restriction *Hpa II* qui reconnaît les sites CCGG non méthylés, alors que son isoschisomère *Msp I* reconnaît le même site méthylé : C^MCGG, ou non (Bird, 1984). La méthylation des îlots HTF inhibe l'expression du gène associé. Bird (1986) a proposé que les îlots HTF représentent de larges séquences de régulation fixant de multiples facteurs nucléaires qui empêchent stériquement les méthylases de méthyler l'ADN. La méthylation des îlots HTF empêcherait stériquement la fixation des facteurs de régulation. D'un autre côté, les gènes exprimés de façon constitutive, de type *housekeeping*, contiennent généralement dans la région 5' des îlots CpG qui sont non-méthylés dans les lignées germinales et dans les cellules somatiques, sauf lorsqu'ils sont localisés sur le chromosome X inactif (Bird *et al.*, 1985). Quoiqu'il en soit, il apparaît que des profils de méthylation ayant une spécificité tissulaire, à des sites critiques, peuvent être impliqués dans le contrôle du taux d'expression des gènes de type *housekeeping* (Mullins *et al.*, 1987).

Influence de la méthylation sur l'expression des gènes *ras*.

Des études réalisées sur les gènes Ha-*ras* de souris, Ha- et Ki-*ras* de rat et sur le gène Ki-*ras* humain ont montré qu'il semble y avoir une corrélation inverse entre le taux de méthylation de ces gènes et leur taux d'expression dans les différents tissus (Ramsden *et al.*, 1985 ; Bhave *et al.*, 1988 ; Metter & Cho, 1989). En effet, le gène Ha-*ras* de souris est hypométhylé dans l'épiderme normal ou néoplasique, comparé aux autres tissus comme le cerveau ou des lignées de cellules hématopoïétiques. L'état de méthylation du gène Ha-*ras* pourrait donc avoir une influence prédisposante à l'activation de ce gène *in vivo* (Ramsden

et al., 1985). Néanmoins le rôle de la méthylation dans la carcinogénèse reste à déterminer.

Des études sur l'influence de la méthylation au niveau du promoteur du gène *Ha-ras* humain ont montré que la méthylation au niveau des séquences *Hha* I et *Hpa* II réduit l'activité du promoteur de 70 à 80% et que la méthylation généralisée au niveau des séquences CpG inactive le promoteur à plus de 95% (Borrello *et al.*, 1987, 1988 ; Rachal *et al.*, 1989). Par ailleurs, l'étude de la méthylation au niveau du gène *Ki-ras* humain a permis de mettre en évidence que la région promotrice est hypométhylée dans tous les tissus analysés, mais qu'il existe des sites spécifiques, dans le premier et le deuxième intron, hypométhylés de façon différentielle et spécifique suivant les tissus considérés (Metter & Cho, 1989). Il est donc probable que la méthylation à des sites bien spécifiques, et pas seulement le taux de méthylation générale du locus, ait un rôle dans le contrôle de l'expression des gènes *ras*.

I.3 Les domaines actifs de la chromatine sont sensibles aux nucléases.

La sensibilité préférentielle aux DNases des domaines actifs de la chromatine par rapport aux domaines inactifs a été initialement décrite par Weintraub et Groudine (1976). Les domaines hypersensibles à l'action des DNases sont supposés représenter des sites accessibles aux facteurs de transcription par le déplacement des nucléosomes.

II. Régulation de l'initiation de la transcription.

II.1 Promoteurs et *enhancers*.

La régulation de l'expression des gènes par le contrôle de l'initiation de la transcription a été décrite dans de nombreux systèmes (Maniatis *et al.*, 1987 ; Jones *et al.*, 1988).

Certains éléments promoteurs régulent le niveau basal de la transcription, comme le site de fixation à Sp1 (Dyanan & Tjian, 1983), alors que d'autres contrôlent l'expression inductible, comme les éléments de réponse au *heat shock* (Pelham, 1982), ou la spécificité

tissulaire de l'expression, comme les motifs octamères des promoteurs des gènes des immunoglobulines dans les cellules lymphoïdes B (Grosschedl & Baltimore, 1985).

La distinction entre un élément promoteur et un élément *enhancer* devient de plus en plus arbitraire, mais initialement, les *enhancers* se distinguaient des promoteurs par leur aptitude à stimuler l'initiation de la transcription d'une manière indépendante de sa position et de son orientation (Serfling *et al.*, 1985). Une analyse plus en détails des *enhancers* a permis de montrer qu'ils peuvent être divisés en plusieurs éléments ou *enhansons*, qui peuvent être dupliqués ou combinés d'une manière hétérologue pour créer un nouvel *enhancer*. Dans un *enhancer* donné, l'espacement entre les différents *enhansons* est très important et détermine l'efficacité de l'*enhancer* (Ondek *et al.*, 1988). Ainsi, un élément comme la boîte octamère peut agir comme un élément promoteur dépendant de sa position et de son orientation dans la région 5' du gène de l'histone H2B, ou comme un *enhanson* dans le contexte de l'*enhancer* de SV40 où il interagit avec d'autres *enhansons* pour générer un *enhancer* agissant indépendamment de sa position et de son orientation. De plus, il a été montré que la multimérisation du motif octamère pour créer un *enhancer* spécifique d'un tissu particulier, génère un élément régulateur négatif, dominant sur l'activité de l'*enhancer* de SV40 (Yu *et al.*, 1989), illustrant bien le fait que l'activité d'un *enhanson* particulier dépend du contexte dans lequel il se trouve.

II.2 Domaines de fixation à l'ADN et domaines activateurs des facteurs de transcription.

L'interaction de facteurs protéiques avec des séquences de régulation de l'ADN est médiée par le domaine de fixation de la protéine (Wharton & Ptashne, 1985), alors que le domaine activateur de la protéine médie des interactions protéine-protéine qui modulent l'initiation de la transcription (Bushman & Ptashne, 1988). Le domaine de fixation à l'ADN et le domaine activateur correspondent à deux domaines qui sont généralement distincts au niveau des facteurs de transcription (Ptashne, 1988).

II.2.1 Domaines de fixation à l'ADN.

Domaine hélice-boucle-hélice.

Le domaine hélice-boucle-hélice a été identifié dans des protéines procaryotes incluant le répresseur du phage λ et les protéines Cro (Pabo & Sauer, 1984 ; Anderson *et al.*, 1981 ; Pabo & Lewis, 1982), mais également dans des protéines eucaryotes comme la protéine MAT $\alpha 2$ de levure (Laughon & Scott, 1984) et dans le domaine homéo des gènes de segmentation de la drosophile (Sheperd *et al.*, 1984). Le motif hélice-boucle-hélice est constitué de deux hélices alpha, l'une d'elles se couchant le long du grand sillon de la double hélice d'ADN de façon à créer des contacts spécifiques entre les acides aminés et les bases du site de reconnaissance (Wharton & Ptashne, 1985).

Domaine homéo.

Le domaine de la boîte homéo est un domaine de fixation à l'ADN constitué de 60 acides aminés présentant une hélice-boucle-hélice. Ce dernier a été identifié la première fois dans les gènes du développement de la drosophile (Laughon & Scott, 1984). Le rôle du domaine homéo dans la régulation transcriptionnelle est décrit dans la revue de Levine et Hoey (1988). Il a été montré *in vitro* que les domaines homéo des protéines codées par les gènes *fushi-tarazu*, *paired* et *zen* augmentent en synergie l'expression à partir du promoteur *engrailed* (Han *et al.*, 1989).

Domaine en doigt de zinc.

Le domaine en doigt de zinc a été initialement découvert dans le facteur de transcription TFIIIA de xénope (pour revue : Evans & Hollenberg, 1988). TFIIIA possède neuf doigts de zinc formés par la coordination d'un ion Zn^{2+} avec des résidus cytosines et histidines à des positions invariables (Miller *et al.*, 1985).

Depuis, de nombreux facteurs de transcription ont été montrés comme ayant des séquences primaires pouvant former des motifs en doigt de zinc, comme les récepteurs de l'hormone stéroïdienne, Sp1, GAL4, TDF (*testis-determining factor*), et NF-E1 (*erythroid factor 1*).

Il existe deux types de protéines à doigt de zinc : le groupe C₂H₂ comportant TFIIIA et Sp1, qui ont des paires de cystéines et histidines séparées par des boucles de 12 acides aminés (Berg, 1986), et le groupe Cx comportant les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, GAL4, EF-1, où les résidus cystéines sont arrangés de façon périodique.

Le facteur de transcription Sp1 a été originellement identifié dans les cellules Héla comme un facteur se fixant sur le motif GGGCGG du promoteur de SV40 et stimulant la transcription de nombreux promoteurs cellulaires *in vitro* (Dyran & Tjian, 1983 ; Gidoni *et al.*, 1985). Sp1 existe sous deux formes actives de 95 kDa et 110 kDa. La forme de 95 kDa pourrait être une forme tronquée de la protéine de 110 kDa générée par clivage protéolytique (Briggs *et al.*, 1986). Ces deux formes de Sp1 présentent les mêmes quantités de O-glycosylation (Jackson & Tjian, 1988). Certains membres de la famille de protéines CTF et AP1 sont glycosylés et il est possible qu'une glycosylation différentielle des facteurs de la même famille puisse altérer leur réponse à des signaux biologiques. Sp1 se fixe à l'ADN par un domaine C-terminal consistant en trois doigts de zinc de type C₂H₂ (Kadonaga *et al.*, 1987), mais le mécanisme par lequel Sp1 active la transcription et la régulation des gènes Sp1 reste à déterminer.

II.2.2 Domaines activateurs.

Des expériences d'échange de domaines et l'analyse de mutants inactivés mais se fixant toujours de façon spécifique à l'ADN a permis de déterminer trois types de domaines activateurs:

- (i) Des chaînes peptidiques avec des acides aminés chargés négativement (Hope & Struhl, 1986) qui forment des hélices alpha, avec les charges négatives d'un côté de l'hélice et les

groupes hydrophobes de l'autre, comme GAL4 (Ma & Ptashne, 1987), GCN4 (Hope *et al.*, 1988), AP1 (Struhl, 1987), la protéine virale VP16 du virus HSV (Sadowski *et al.*, 1988) et le récepteur glucocorticoïde (Hollenberg & Evans, 1988).

(ii) Des chaînes peptidiques hautement basiques, riches en glutamine, incluant Sp1 (Courey & Tjian, 1988), OTF-1 (Sturm *et al.*, 1988), OTF-2 (Clerc *et al.*, 1988), AP-2 (Williams *et al.*, 1988) et SRF (Norman *et al.*, 1988).

(iii) Des domaines riches en prolines qui sont les domaines fonctionnels dans CTF et NF-1 (Mermod *et al.*, 1989), ils jouent également un rôle dans AP1 (Struhl, 1987), AP2 (Williams *et al.*, 1988), OTF-2 (Clerc *et al.*, 1988) et SRF (Norman *et al.*, 1988).

Il existe probablement d'autres types de domaines activateurs dont les structures n'ont pas encore été caractérisées, comme le domaine A/B du récepteur oestrogène humain qui ne possède pas de région activatrice acide comme c'est le cas pour la région A/B du récepteur glucocorticoïde (Tora *et al.*, 1989).

Les domaines activateurs des différentes protéines diffèrent dans leur densité de charge, leur structure secondaire et probablement dans leur affinité pour la protéine cible. Ptashne (1988) a suggéré que les protéines avec des régions activatrices ayant la plus haute affinité pour la protéine cible, soient les plus efficaces pour agir à distance. Ainsi, de tels activateurs, ayant le même domaine de fixation à l'ADN mais des régions activatrices différentes, différeraient dans leur aptitude à activer la transcription.

II.2.3 Domaines de dimérisation (le motif leucine zipper).

Le motif structural de leucine zipper (Zip) a été initialement décrit pour le facteur protéique se fixant sur la boîte CCAAT (Landschulz *et al.*, 1988). Depuis, ce motif a été identifié dans de nombreuses protéines incluant Myc (Landshulz *et al.*, 1988), et plus récemment Max (Blackwood & Eisenman, 1991), ATF (Hai *et al.*, 1989), Fos et Jun (Kouzarides & Ziff, 1988).

Landschulz et ses collaborateurs (1988) ont proposé que le leucine zipper facilite la dimérisation de protéines contenant une répétition périodique d'un résidu leucine. En fait,



chaque monomère contient une hélice alpha avec une leucine tous les sept résidus d'acides aminés. Des expériences de délétions et de mutagenèse ont montré que 35 acides aminés de la région leucine zipper de Fos et de Jun sont nécessaires pour la formation d'un hétérodimère préférentiel (Ransone & Verma, 1990). Des expériences d'échange entre les domaines leucine zipper de Fos, Jun et GCN4 ont montré que le leucine zipper est indispensable pour l'activité de fixation sur l'ADN et que les domaines de fixation à l'ADN de ces protéines sont interchangeables.

Les facteurs de transcription de la famille Myc ont un domaine hélice-boucle-hélice, nécessaire à la dimérisation ; il est contigu à un motif leucine zipper (HLH-Zip). La dimérisation est donc requise pour la fixation à l'ADN par le domaine basique (b) précédant la région HLH-Zip (Benezra *et al.*, 1990 ; Davis *et al.*, 1990 ; Jones, 1990). Des travaux récents ont permis de montrer que le domaine b-HLH-Zip de Myc est capable, comme la protéine native, de reconnaître la séquence CACGTG (Blackwell *et al.*, 1990). Plus récemment, un partenaire pour la dimérisation avec les protéines Myc a été découvert (Blackwood & Eisenman, 1991) et il s'appelle Max. Max fait parti de la famille des protéines b-HLH-Zip. Le complexe Myc-Max reconnaît la séquence CACGTG de façon spécifique avec une meilleure affinité que les homodimères. La fixation à l'ADN dépend de la région basique ainsi que du domaine HLH-Zip (Blackwell *et al.*, 1990 ; Blackwood & Eisenman, 1991 ; Prendergast *et al.*, 1991).

II.3 Modulation de l'activité des facteurs de transcription par phosphorylation.

L'activité des facteurs de transcription peut être affectée par la phosphorylation de résidus sérines et thréonines dans leur domaine activateur. Cette phosphorylation modifie leur conformation ou altère les interactions par des ponts hydrogènes entre la RNA polymérase II et d'autres facteurs de transcription. Ces modifications pourraient expliquer le mécanisme par lequel un facteur de transcription répond à un stimulus extérieur (Hoeffler *et al.*, 1988). La glycosylation de résidus sérine et thréonine pourrait influencer l'activité de ces facteurs de transcription en empêchant la phosphorylation (Jackson & Tjian, 1988)

Il a été reporté que la phosphorylation est responsable de l'induction hormonale du gène de la somatostatine de rat par l'AMPc (Yamamoto *et al.*, 1988). Les gènes répondent à l'AMPc via une phosphoprotéine nucléaire de 43 kDa, qui est le facteur CREB (*cyclic AMP responsive element binding factor*) ou ATF qui se fixe sur l'élément de réponse à l'AMPc (Montminy & Bilezikjian, 1987). Le facteur CREB se fixe sur le CRE comme monomère et comme dimère, mais l'activité transcriptionnelle n'est associée qu'avec la fixation du dimère (Yamamoto *et al.*, 1988). Yamamoto et ses collaborateurs (1988) ont également montré que le traitement des protéines CREB avec la protéine kinase C (mais pas la protéine kinase A) induit une augmentation de la formation de dimères, et que le traitement de CREB avec une phosphatase réduit son activité transcriptionnelle. Ainsi, ils ont proposé que l'AMPc induise un déplacement de l'équilibre entre la forme monomère inactive et la forme dimère active, provoquant une activation de la transcription.

C. OBJECTIFS

Différentes études effectuées jusqu'à ce jour ont permis de montrer, comme je l'ai décrit dans l'introduction, que l'oncogène *Ha-ras* activé par une mutation ponctuelle au niveau des codons 12, 13, 59 ou 61 est impliqué dans certains cancers humains et animaux, comme dans les tumeurs de la peau de souris induites par un agent cancérigène. En général, cette activation par mutation ponctuelle est accompagnée d'une surexpression de cet oncogène par un mécanisme qui est encore inconnu.

Le but des travaux présentés dans ce mémoire est de mieux appréhender les mécanismes de régulation transcriptionnelle de l'oncogène *Ha-ras*. En effet, la régulation de l'initiation de la transcription est un mécanisme clef régulant l'expression de nombreux gènes. C'est pourquoi, une meilleure connaissance des éléments régulant la transcription de ce gène devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de la régulation de son expression et peut-être des mécanismes de dérégulation aboutissant à une surexpression de ce gène dans les cellules tumorales de la peau de souris.

Etat des connaissances sur les éléments régulant l'expression des gènes *ras*.

L'étude de la régulation des gènes *ras* a permis d'identifier, outre les régions promotrices, différents types d'éléments de régulation positive ou négative, localisés soit en amont de leur promoteur, soit dans le premier intron, soit dans le dernier intron. De plus, il est intéressant de remarquer que les études réalisées jusqu'à ce jour, mettent en évidence des éléments différents d'un gène *ras* à un autre, comme le montre les exemples suivants.

Un élément *enhancer* potentiel a été décrit dans la région distale du promoteur du gène *Ki-ras* humain (Jordano & Perucho, 1988). Ces auteurs ont identifié une séquence de fixation au facteur nucléaire NF-1 (*nuclear factor 1*) qui stimule la transcription du promoteur de la bêta-globine, en fonction de la distance et de l'orientation par rapport au promoteur et nécessite la présence des motifs CCAAT et CACCC au niveau du promoteur. Par contre, cet élément ne semble pas avoir d'effet sur l'activité du promoteur *Ki-ras*.

Un élément de régulation négative a été caractérisé au niveau du gène *N-ras* murin (Paciucci & Pellicer, 1991). Cet élément est localisé 180 pb en amont du premier site de début de la transcription et fixe un facteur nucléaire responsable de cet effet. Cet élément est également capable de diminuer l'activité du promoteur du gène de la thymidine kinase. De plus, il a récemment été montré l'existence de deux autres éléments régulant négativement pour l'un et positivement pour l'autre l'expression de ce gène (Jeffers & Pellicer, 1992). Le premier élément est localisé dans la première moitié du premier intron et contient un site de blocage de l'élongation de l'ARN prémessager. Ces auteurs émettent l'hypothèse qu'un tel élément pourrait prévenir de l'élongation de l'ARN prémessager codant pour le gène *unr* dont l'extrémité 3' est localisée 130 pb en amont du gène *N-ras* (Jeffers *et al.*, 1990). Le deuxième élément est localisé à la fin du premier intron et augmente l'activité du promoteur du gène *N-ras*. Il est à remarquer que chez l'homme, il a également été découvert un gène appelé *NRU* (*N-ras upstream*) localisé juste en amont du gène *N-ras* (c'est deux gènes sont séparés par environ 150 pb) (Nicolaiew *et al.*, 1991).

Il a été montré au niveau du gène *Ha-ras* humain l'existence un mécanisme de contrôle de l'expression par épissage alternatif au niveau du quatrième exon qui donne un transcrit non fonctionnel qui serait instable ou non maturé (Cohen & Levinson, 1988 ; Cohen *et al.*, 1989). Ainsi ces auteurs ont montré qu'une mutation ponctuelle dans le quatrième intron au niveau d'un site d'épissage accepteur a pour effet d'augmenter dix fois l'expression de ce gène. Une analyse fonctionnelle de la région 5' de ce gène a permis de mettre en évidence des éléments régulateurs dans le premier intron. Ces derniers régulent positivement et négativement l'expression de ce gène (Hashimoto-Gotoh *et al.*, 1988 ; Honkawa *et al.*, 1987). Par ailleurs, Lowndes et ses collaborateurs (1990) ont mis en évidence une séquence courte au niveau du premier intron du gène *Ha-ras* humain qui est hautement répétée dans le génome. Cette séquence de moins de 130 pb correspond en localisation avec un des éléments de régulation négative mis en évidence par Honkawa et ses collaborateurs (1987). Lowndes et ses collaborateurs ont montré que cet élément est capable de bloquer la transcription à partir du promoteur viral IE (*Immediate Early*) du virus de l'Herpès par un mécanisme de blocage d'élongation. Par contre, cet élément ne semble pas interférer avec la transcription initiée à partir du promoteur du gène *Ha-ras*.

Le groupe de Pelling s'intéressant également à la régulation de l'expression du gène *Ha-ras* de souris a mis en évidence des éléments de régulation dans la région 5' du gène, en amont du promoteur. Ils ont notamment caractérisé cinq sites potentiels de fixation au récepteur aux glucocorticoïdes (Strawhecker *et al.*, 1989), deux de ces sites étant capables de médier l'induction par la dexaméthasone. Par ailleurs, ils ont également montré l'existence d'un élément qui semble réguler de façon négative l'expression de *Ha-ras*, localisé dans les 1 kb en amont du promoteur. De la même façon, Damante et Rapoport (1988), ont mis en évidence un élément de régulation transcriptionnelle négatif, dans la région 5' du gène *Ha-ras* chez le rat.

Ces études apportent des réponses partielles sur les mécanismes de régulation de l'expression des gènes *ras* mais n'ont pas encore permis de comprendre les mécanismes provoquant la surexpression de ceux-ci dans certaines pathologies cancéreuses.

RESULTATS

I. Analyse structurale du promoteur du gène *Ha-ras* de souris.

Le but du travail décrit dans ce paragraphe est de caractériser les séquences et les facteurs nucléaires interagissant avec celles-ci au niveau de la région promotrice du gène *Ha-ras* de souris. Le séquençage de la région 5' du gène *Ha-ras* de souris réalisé par Brown et ses collaborateurs (1988) a permis au préalable de localiser la région promotrice de ce gène.

- Identification des séquences promotrices par empreinte à la DNase I.

Les promoteurs des gènes *ras* présentent les caractéristiques de gènes de type *housekeeping*. Ces gènes sont exprimés dans pratiquement tous les tissus et au cours de tous les stades du développement, se trouvent généralement situés au niveau d'îlots HTF/CpG qui sont très riches en bases G et C et hypométhylés. Ils contiennent plusieurs séquences consensus de fixation au facteur de transcription Sp1 connues sous le nom de boîtes GC : CCCGCCC (Bird, 1984, 1986). Les séquences proximales du promoteur du gène *Ha-ras* de souris répondent à ces critères. Par ailleurs, nous avons pu montrer par un travail mené en collaboration avec le groupe d'Allan Balmain et de Mark Plumb, que la région promotrice présente une conformation dans le noyau qui est accessible aux endonucléases, dans tous les types de tissus étudiés (Plumb *et al.*, 1991). Le site d'hypersensibilité aux endonucléases indique que le gène *Ha-ras* est, ou a le potentiel d'être activement transcrit (figure 8).

Nous avons donc entrepris de caractériser les séquences fixant des facteurs nucléaires au niveau du promoteur, en utilisant la technique de protection contre l'action de la DNase I *in vitro*. Pour ces expériences, nous avons utilisé les lignées cellulaires STO (fibroblastes de souris) et M707/T (lignée cellulaire dérivant d'une érythroleucémie), d'origines tissulaires différentes, afin de voir si les facteurs nucléaires interagissant avec les séquences promotrices sont de type ubiquitaire ou s'il existe des différences d'un type tissulaire à un autre.

Deux nanogrammes d'un fragment d'ADN de la région 5' du gène *Ha-ras* ont été utilisés comme sonde. Celle-ci a été réalisée à partir d'un fragment d'ADN de 380 pb (contenant

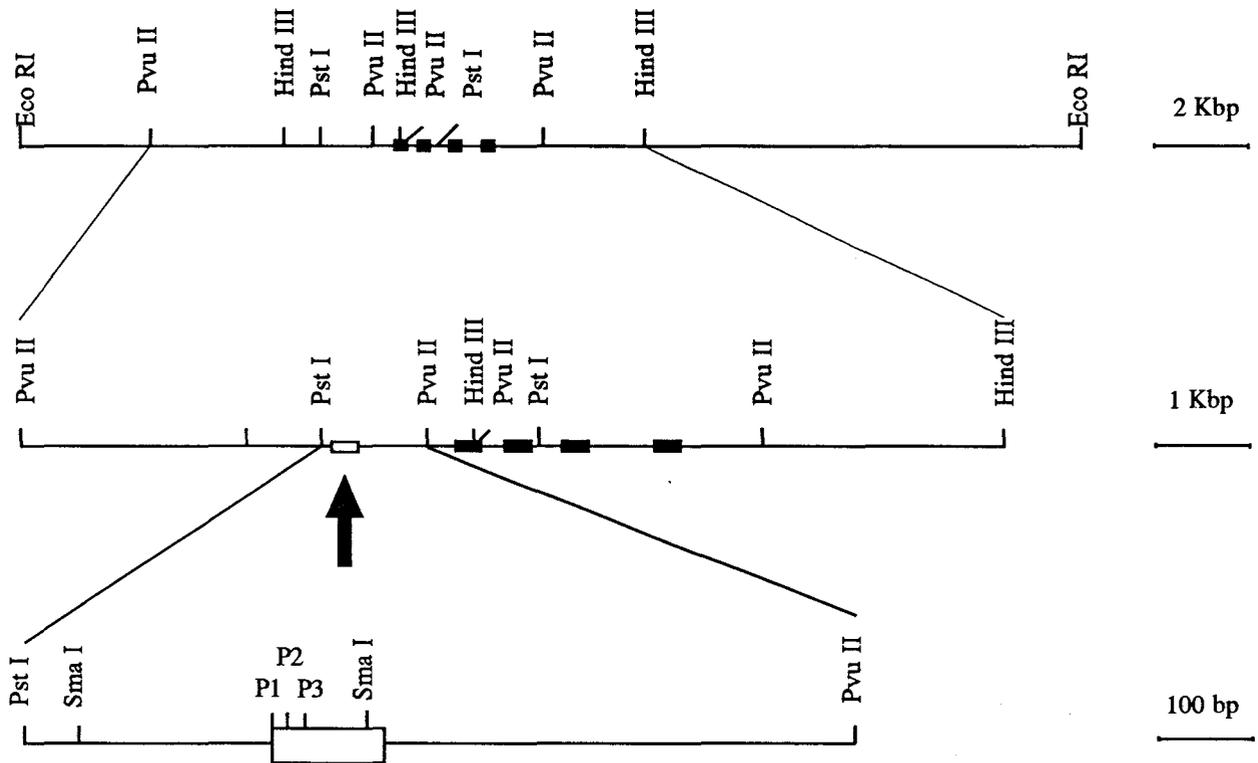


Figure 8 : Le gène *Ha-ras* et son promoteur. Carte de restriction du gène *Ha-ras* murin et des séquences adjacentes montrant les sites de restriction *Eco* RI, *Hind* III, *Pvu* II, *Pst* I et *Sma* I. Les positions approximatives des 4 exons codant sont visualisées par les boîtes sombres. La région promotrice est visualisée par la boîte claire. Le site d'hypersensibilité à l'action des DNases est localisé au niveau de la région promotrice comme l'indique la flèche (d'après Plumb *et al.*, 1991). Les trois sites d'initiation de la transcription sont notés P1, P2 et P3.

le promoteur cloné dans le plasmide pUC18) (figure 8) marqué en 5' au P³², soit sur le brin codant, soit sur le brin anti-sens. La sonde est ensuite incubée avec 25 ou 80 µl d'extrait de protéines nucléaires. Après digestion ménagée à la DNase I, les fragments d'ADN sont purifiés, séparés sur gel de polyacrylamide dénaturant et autoradiographiés.

L'analyse des empreintes à la DNase I des séquences promotrices révèle cinq séquences protégées contre l'action de la DNase I notées de A à E. Des sites de clivages hypersensibles à l'action de la DNase I peuvent être observés principalement en 3' et 5' des sites de fixation à des facteurs nucléaires et sont probablement dûs à des changements conformationnels induits par la fixation des facteurs nucléaires (figure 9). Les empreintes à la DNase I, notées A, C et E ne sont visibles qu'avec de fortes concentrations en extraits de protéines nucléaires (figure 9), suggérant que les protéines se fixant sur ces séquences sont en plus faibles quantités que celles se fixant sur les deux autres séquences B et D, ou qu'elles ont une plus faible affinité pour leur site respectif. Quatre de ces sites, A, B, D et E, sont des séquences riches en bases G et C (figure 10). Les séquences B et D sont quant à elles strictement homologues à la séquence consensus de fixation au facteur de transcription Sp1 : GGGCGGG (figure 10). Il existe un autre site GGGCGGG localisé 62 pb en aval du troisième site de début de transcription, mais la sonde utilisée dans nos expériences ne nous permet pas de visualiser cette séquence. Le site C contient la séquence CCAACCACAACAGGTCG (figure 10) et ne ressemble pas de façon évidente à une séquence de fixation à un facteur nucléaire déjà décrite. Le motif CCAAT (figure 10, -70 pb par rapport à P1) n'a pas montré une protection reproductible contre l'action de la DNase I. Ceci laisse supposer que ce site peut fixer une protéine avec une faible affinité. Cette dernière doit être trop diluée dans nos extraits de protéines nucléaires pour pouvoir être visualisée de façon reproductible.

Des expériences de compétition pour la fixation des facteurs nucléaires ont été réalisées en utilisant un oligonucléotide de synthèse double brin contenant la séquence de fixation au facteur de transcription Sp1 dans le promoteur (*immediate early promoter*) de HSV 1 (Jones & Tjian, 1985). Lors de l'incubation, cet oligonucléotide mis en excès (100 ng) dans le milieu, entre en compétition avec les facteurs nucléaires se fixant normalement au niveau des

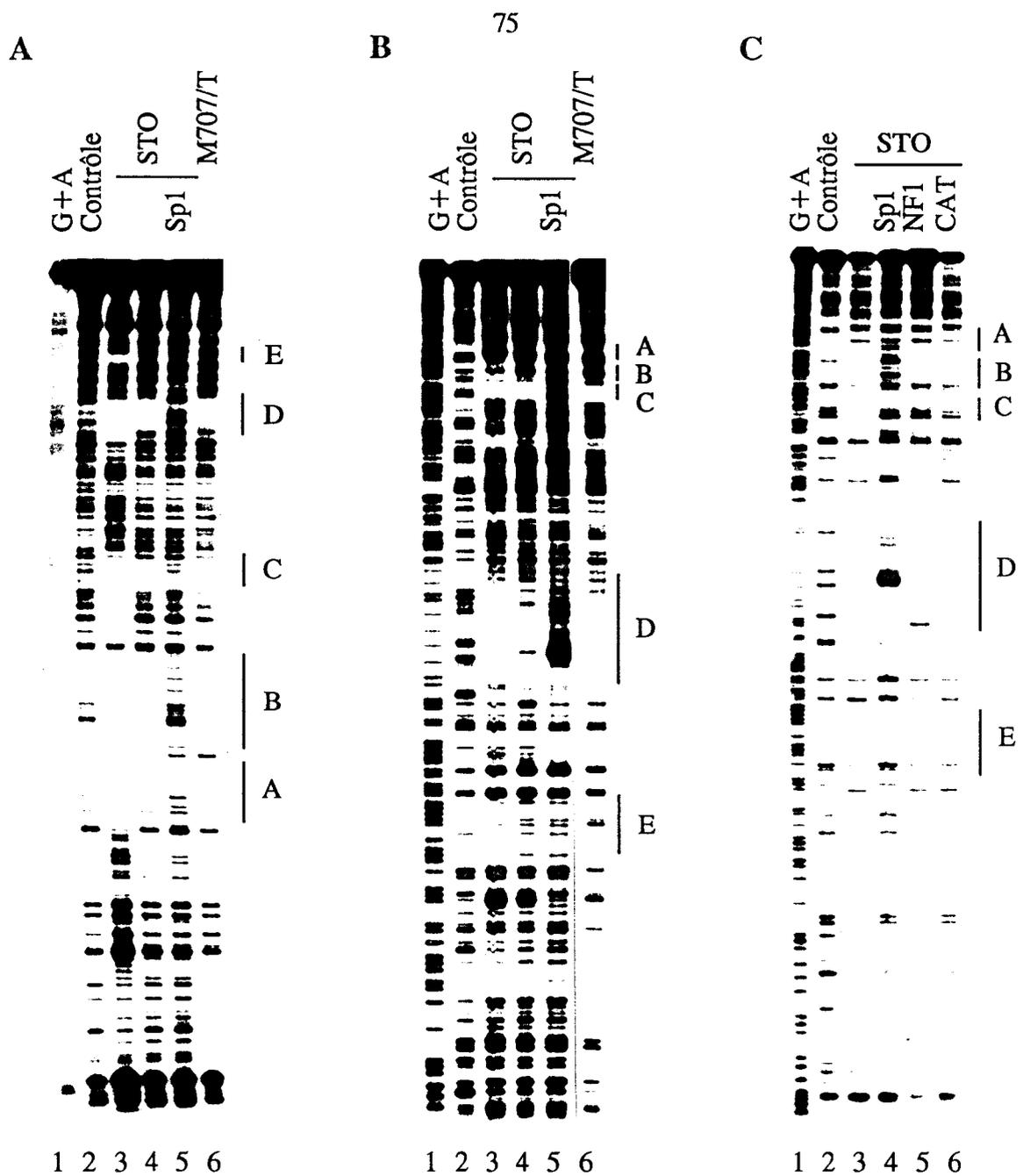


Figure 9 : Analyse par empreinte à la DNase I de la fixation des facteurs nucléaires au niveau du promoteur du gène *Ha-ras* de souris. Le fragment de restriction *Sma* I de 380 pb, contenant le promoteur a été marqué en 5' sur le brin codant (A) ou le brin antisens (B, C). La sonde (2 ng) a été incubée avec 0 μ l (contrôle) ou 25 μ l d'extrait de protéines nucléaires STO (sauf pour les lignes 3 des panneaux A et B qui ont été incubés avec 80 μ l) ou 80 μ l d'extrait de protéines nucléaires M707/T, en présence de 1 μ g de poly(dI-dC) et en présence ou non de 200 ng d'oligonucléotides compétiteurs Sp1, NF1 ou CCAAT (CAT). Les marqueurs de taille moléculaires ont été obtenus par une réaction de séquençage chimique G+A sur les mêmes sondes. Les cinq séquences principales protégées contre l'action de la DNase I sont dénommées A, B, C, D et E.

séquences A, B, D et E (figure 10). Il est donc probable que les facteurs nucléaires se fixant sur ces séquences soient Sp1 ou appartiennent à la famille Sp1. Ces expériences de compétition montrent au niveau du site D que l'oligonucléotide Sp1 n'entre en compétition que pour la partie 5' mais pas pour la partie 3' de ce site. La région 5' du site D contient la séquence GGGCGTGG pouvant être considérée comme une séquence de fixation de faible affinité pour Sp1, lorsque celle-ci est comparée à la séquence de fixation de haute affinité pour Sp1 GGGCGGG qui se trouve dans la partie 3' du site D, suggérant ainsi que le site D correspond à deux sites de reconnaissance pour Sp1 et ayant des affinités différentes. Les oligonucléotides contenant, soit la séquence de fixation au facteur de transcription NF1 de l'origine de répllication de l'adénovirus, soit le motif CCAAT du gène de l' α -globine de souris n'entrent pas en compétition avec les facteurs nucléaires se fixant au niveau des sites A, B, C, D et E confirmant la spécificité d'interaction. Néanmoins, les résultats sont moins évidents concernant le site C, site faiblement protégé contre l'action de la DNase I. En effet, ce dernier montre un certain degré de compétition avec les oligonucléotides Sp1, NF1 et CCAAT (figure 9c). La protéine se fixant au niveau de ce site ne peut donc être identifiée mais la comparaison de séquence suggère qu'il est peu probable que le site C soit un site de fixation pour Sp1.

Les résultats obtenus au niveau du promoteur *Ha-ras* de souris ont donc permis de confirmer qu'il fixe essentiellement des facteurs de transcription de la famille Sp1, comme dans le cas du promoteur humain. Il est donc probable que ce promoteur soit responsable d'une activité basale d'initiation de la transcription.

Une analyse approfondie de la séquence de la région 5' du gène *Ha-ras* a permis de mettre en évidence une région d'homologie de 272 pb, dans le premier intron, conservée à 76% chez l'homme (Brown *et al.*, 1988) (figures 11 et 12). La conservation de cette séquence au cours de l'évolution peut laisser supposer un rôle important de celle-ci dans la régulation de l'expression du gène *Ha-ras*. Cette hypothèse est confortée par les travaux de Hashimoto-Gotoh et ses collaborateurs (1988) qui ont mis en évidence des éléments de régulation positive et négative au niveau du premier intron du gène *Ha-ras* humain.

Figure 12 : Séquence nucléotidique de la région 5' du gène *Ha-ras* de souris (d'après Brown *et al.*, 1988), contenant la région promotrice, l'exon -1 non codant et les deux premiers exons codant. La numérotation se réfère au premier site d'initiation de la transcription. Les séquences exoniques (Exons -1, 1 et 2) sont surlignées d'un trait en pointillés. L'ATG d'initiation de la traduction est souligné. P1, P2 et P3 représentent les trois sites d'initiation de la transcription mis en évidence par Brown et ses collaborateurs (1988). La région d'homologie de séquence (76%) entre l'homme et la souris est surlignée d'un trait plein (voir figure 11).

CTGCAGGGTGGAGGCTCTGTAGTAGGTCCTCAACGCAACCCGAGCGTGCACCAGTTTCTCTCCGAGAAATCCCGGGCTCGTAAGCACGGTCTCGGTCTG
 -320 -300 -280 -260 -240
 TCTCTTCTGCACCTAGGCACTAGACATCACTGTTGAGTGCAGGACCAAGTTCCGGCACTGCCTTCCCGCGGCTCCAGGAAGCCCGCCAGCTTCGGC
 -220 -200 -180 -160 -140
 TTCTGACGGATGGGTTGCTCAGCCAACCAACAGGTGCGGGTGCAGGAGGTTGACCAATCACGGGGCCGCTCGAGTTGACGGACGGGCGTGGGGCGG
 -120 P1 P2 -80 P3 -60 -40
 AGCGGGCGGGGCGAGCGCGGGCCCGGCAAGTCCCGCGGTCCGCTCCCGCGCGCCGACGCGGAGCGGAGCTCATGCGGGG
 -20 0 20 40 60
 CCCAGCCGGCGCCCGTCCCGCGCCCGCCCTGCCCGCGCCCGCGCCCGGGGGCAGTCCGCGCCAGCAAGCGTGAGTGCGGGCACGGGGTGGGG
 80 100 120 140 160
 CGCGGGGCGCAGGTGATCGGTGCTTCTTGTCTCTCTCGGCCCGGCAGCGTGCTTAGCGTCCGGCTGCCCGCCTCTGGCCCGACTCGCTCTGCCTGTGG
 180 200 220 240 260
 CCGTCTCCAGCGAGGCGCGCCCGGGGCTCCGGAGACTCTGCGCCCGCGCCATCAAGCTCCGGGCTCGGGGCAACAAGGACACCGCGGTTGGGCCCC
 280 300 320 340 360
 AACCAGGGCCTTCTGCTCCAGCCATCCCTCGCGTTCTGTAGTCACTGCTTCCACACCCCTCAGCGGTTTTTCCCGCCCTCTGTGAAGCTCCCTGGC
 380 400 420 440 460
 CCCTTGTGAAGGTTGTCTTAGTGGAGGGCAGGGTCTTCTCCAGCAACCTCCCGCCGCTGCCGGGACCGCGCCTGGCATGCAGTAGGGCGCTCAGTAA
 480 500 520 540 560
 ATAGTTGTAGGTTGCACCCACATGCCGGCGGGCCAGAGCGGTTGTAGGCTGGCATTGGCTGCCCTGGGCACGCGAGGCCCGTGGCAGACCTGTTT
 580 600 620 640 660
 TTTGGGGGGTGGCCTCAGCCCTCAGGCGCCTCCAGTTGAGGGTTTCTGCCTACCTAGCGACTTCTAATTTGGTGCCTGGTGGGAGAAGCTCTCAGCTG
 680 700 720 740 760
 TCAGCCCTGCCCTGGGGGCTCTCCCTGCTTCTCACACAGCCATTAAGTGTGTTTGGAGAGGTTGGGGGGTGGGGTGGGGTCTCCCTTTTCAAGCT
 780 800 820 840 860
 GAAGGTGCCACAGGTGATCAACTGGGCCACTGGCAGGCCTGCCTCTCAATGCTGGAGAGGGCCCTTGGGTGAGGCATCTATTAGCCGCTCTCAAGTGGCAA
 880 900 920 940 960
 GGGCCTGGCTAAGTGTGCTTCTCATTGGCAGGTGGGGCAGGAGCTCCTGGATTGGCAGCGCTGTAGAAGCTATGACAGAAATACAAGCTTGTGGTGGTG
 980 1000 1020 1040 1060
 GCGCTGGAGGCGTGGAAAGAGTGCCCTGACCATCCAGCTGATCCAGAACCCTTTGTGGACGAGTATGATCCACTATAGAGGTGAGCTCTGCCTACC
 1080 1100 1120 1140 1160
 TGCCAGAGGTGGGCTGTGGCAGTGGTCATGGGTAAATGACCAAACAGCCAGGTCTTGTAGGTGTTATGGGGTATGATCCATCAGGGTATCAGAGGTGCA
 1180 1200 1220 1240 1260
 AGGTTGTAGGCTGGTTCTGTGATTCTCTGGTCTGAGGAGAGGTGAGACCCACCCCAACCCCACTAAGCCTGTTGTTTTGCAGGACTCCTA
 1280 1300 1320 1340 1360
 CCGAAACAGGTGGTCATTGATGGGAGACATGTCTACTGGACATCTTAGACACAGCAGGTCAAGAAGAGTATAGTGCCATGCGGGACCACTACATGCGC
 1380 1400 1420 1440 1460
 ACAGGGGAGGGCTTCCCTCTGTATTGCCATCAACAACACCAAGTCTCTGAGGACATCCATCAGTACAGGTGAGCCACCTATGGCTAGCCCGTGGCC
 1480 1500 1520 1540 1560
 CTGGCACAGTGGAGGAGGTTCCGTGTGCACACTGAGGCTTTATGTCTTTTTTGAATGTCTGGACACAGTCATGCCTGCAG
 1580 1600 1620 1640

II. Analyse fonctionnelle du premier intron par délétions dans la partie 3' de celui-ci.

Nous avons entrepris une approche fonctionnelle CAT (Chloramphénicol-Acétyl-Transférase), du rôle potentiel de l'intron 0 dans la régulation transcriptionnelle du gène *Ha-ras*, en utilisant des fragments de la région 5' du gène *Ha-ras* de souris comme promoteur. Ces fragments comportent différentes délétions dans la partie 3' de l'intron 0.

II.1 Construction des vecteurs pPras, pSras, pHras, pAras et pMras.

Initialement, quatre constructions : pSras, pHras, pAras et pMras, ont été réalisées afin d'analyser le rôle fonctionnel du premier intron (figure 13). Toutes les constructions utilisées pour les analyses fonctionnelles CAT dérivent du vecteur pB9, contenant le gène CAT sans séquences promotrices. Le plasmide pB9 dérive du plasmide pLW2 (Gaffney *et al.*, 1985), en enlevant de celui-ci le promoteur de HSV-2 par digestion avec *BamH* I. Différents fragments de la région 5' du gène *Ha-ras*, provenant du plasmide pUC.NPR (ce plasmide contient 1983 pb de la région 5' du gène *Ha-ras* de souris ; Brown *et al.*, 1988), contenant le promoteur, l'exon -1 et une partie de l'intron 0, ont été clonés juste en amont du gène CAT dans le vecteur pB9. L'orientation de tous les fragments clonés dans ce vecteur a été déterminée par la stratégie de clonage utilisant un site *Hind* III en 5' des inserts et une extrémité 3' franche. Les différents fragments provenant du plasmide pUC.NPR, pour les constructions pSras, pHras, pAras et pMras, ont été obtenus en digérant en 3', respectivement par les enzymes de restriction : *Sau*3A, *Sph* I, *Sau* I et *Sau*3A, les extrémités étant rendues franches si l'enzyme utilisé donne une extrémité cohésive (figure 13). Le fragment du gène *Ha-ras* utilisé comme promoteur dans la construction pSras contient 328 pb de la région 5' en amont du premier site d'initiation de la transcription (contenant le promoteur de ce gène), l'exon -1 (148 pb en partant du premier site d'initiation de la transcription) et 37 pb de l'intron 0. Les constructions pHras, pAras et pMras contiennent respectivement 365 pb, 510 pb et 701 pb de l'intron 0, en plus de la construction pSras.

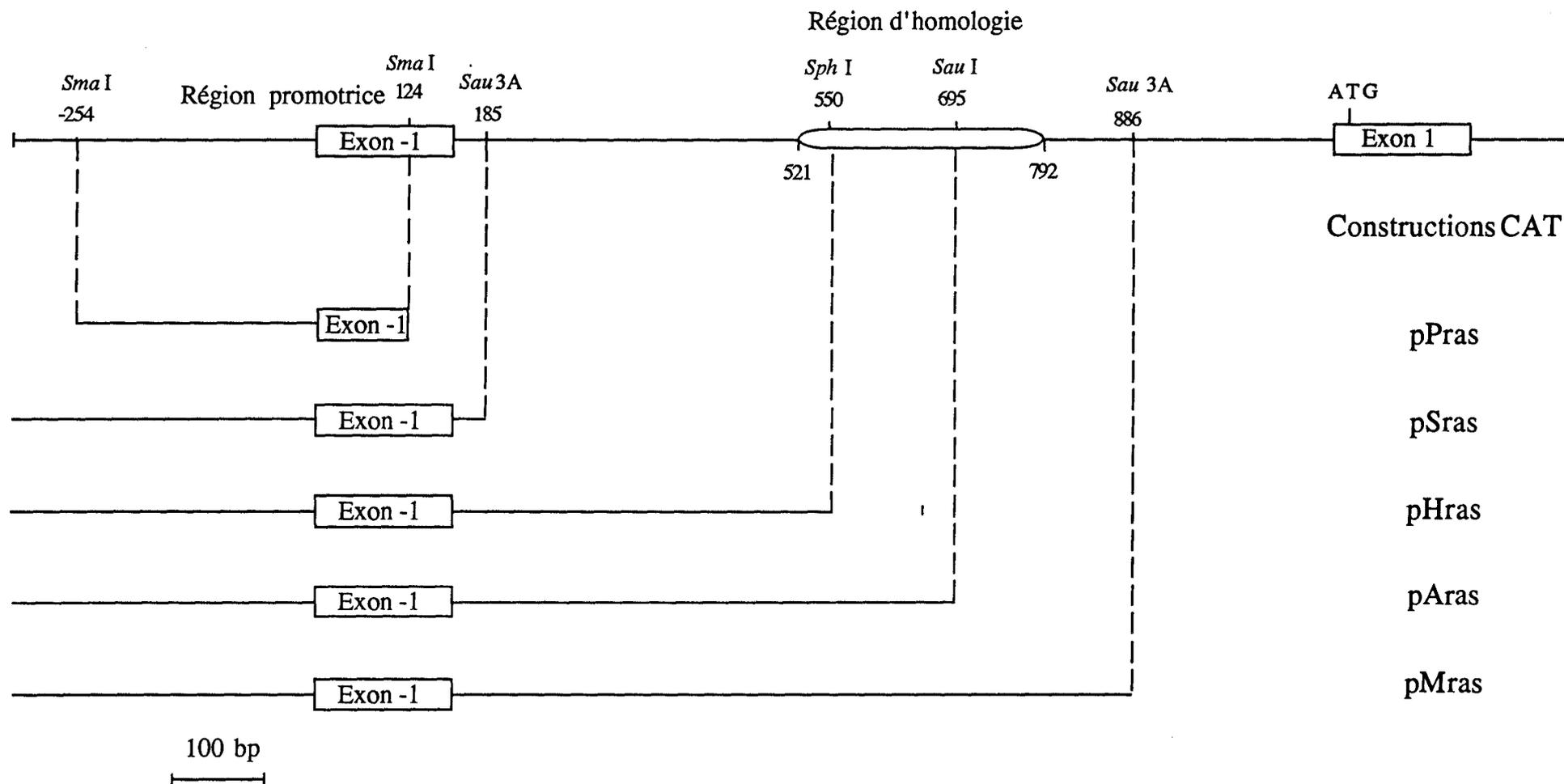


Figure 13 : Schéma des différents fragments de la région 5' du gène Ha-*ras* de souris utilisés pour réaliser les constructions plasmidiques, contenant le gène de la chloramphénicol-acétyl-transférase (CAT) comme reporteur de l'activité promotrice de ces fragments nucléotidiques. Ces fragments ont été obtenus à partir du plasmide pUC.NPR (ligne du dessus), contenant 1983 pb de la région 5' du gène Ha-*ras* de souris. Les positions des sites de restriction sont relatives au premier site d'initiation de la transcription.

Une cinquième construction pPras a été réalisée pour vérifier si l'activité promotrice dans la construction pSras n'est pas modulée par la présence du site d'épissage donneur de l'exon -1. Un fragment de restriction *Sma* I de 380 pb de la région 5' du gène *Ha-ras*, comprenant 251 pb en amont de l'exon -1 et 125 pb de l'exon -1 (figure 10), a été cloné dans le site *Hinc* II du plasmide pUC.18, puis un fragment *Hind* III - *Bam*H I provenant de ce plasmide a été cloné dans le plasmide pB9 en amont du gène CAT.

II.2 Etude fonctionnelle des différentes constructions plasmidiques dans les lignées cellulaires NIH 3T3, C5N, Car B, 3TDM1, et 17-S1-T984.

L'étude fonctionnelle des constructions CAT a été réalisée dans différents types de lignées cellulaires murines (voir matériels et méthodes) ; les NIH 3T3 (fibroblastes), les C5N (kératinocytes normaux), les Car B (kératinocytes transformés), les 3TDM1 (trophoblastes différenciés) et les 17-S1-T984 (myoblastes squelettiques différenciés). L'utilisation de différents types de lignées cellulaires a pour but de savoir s'il existe une spécificité tissulaire dans la régulation du gène *Ha-ras*, notamment au niveau épithélial. Chaque plasmide étudié a fait l'objet d'au moins deux préparations de plasmides indépendantes sauf pour le plasmide pPras pour lequel une seule préparation a été réalisée. Pour chaque expérience, 10 μ g de plasmide CAT étaient cotransfectés avec 8 μ g de plasmide pCH110 (Hall *et al.*, 1983). Ce plasmide pCH110 contient le gène codant pour la β -galactosidase bactérienne dont l'expression est placée sous la dépendance du promoteur de SV 40. Le test enzymatique de la β -galactosidase permet de mesurer l'efficacité de transfection des plasmides d'une boîte de cellules à l'autre. Les volumes de lysat utilisés pour les essais fonctionnels CAT sont corrigés en fonction de l'efficacité de transfection.

II.2.1 Etude fonctionnelle dans les cellules NIH 3T3.

Les résultats des essais fonctionnels CAT présentés dans ce paragraphe proviennent de la moyenne de huit expériences indépendantes (figure 14). L'écart type d'une expérience à l'autre est faible et le profil en histogrammes des activités CAT des différentes constructions est le même pour toutes les expériences effectuées. L'activité CAT de la construction pSras est prise comme référence pour la comparaison avec les activités CAT des autres constructions. L'activité CAT de la construction pHras est en moyenne 5,3 fois supérieure à celle de pSras. Ce résultat laisse supposer l'existence d'un élément régulant de façon positive (de type «*enhancer*») l'expression du gène *Ha-ras*, localisé dans la région intronique +185 à +550, comprise entre pSras et pHras. D'un autre côté, la construction pAras possède une activité CAT égale à celle de pSras, qui est donc 5,3 fois inférieure à celle de pHras. Ce résultat, à l'opposé de pHras, laisse supposer l'existence d'un élément régulant de façon négative (de type «*silencer*») l'expression du gène *Ha-ras*, localisé dans la région intronique +550 à +695, comprise entre pHras et pAras. La construction pMras, quant à elle, donne une activité CAT 3,7 fois inférieure à celle de pSras ce qui laisse également supposer l'existence d'un élément régulant de façon négative l'expression du gène *Ha-ras*, localisé dans la région intronique +695 à +886, entre pAras et pMras.

II.2.2 Etude fonctionnelle dans des cellules C5N.

Les résultats des essais fonctionnels CAT présentés dans ce paragraphe correspondent à trois expériences indépendantes (figure 15). Les résultats obtenus pour toutes les constructions dans les cellules C5N sont comparables à ceux obtenus dans les cellules NIH 3T3. En effet, l'activité CAT de la construction pHras est en moyenne 4,1 fois supérieure à celle de pSras. Celle de la construction pAras est elle 1,9 fois inférieure à celle de pSras, soit 7,8 fois inférieure à celle de pHras. Finalement, la construction pMras possède une activité CAT, 3 fois inférieure à celle de pSras et 1,6 fois inférieure à celle de pAras. Mis à part l'amplitude des différences d'activités CAT entre les constructions pSras, pHras pAras

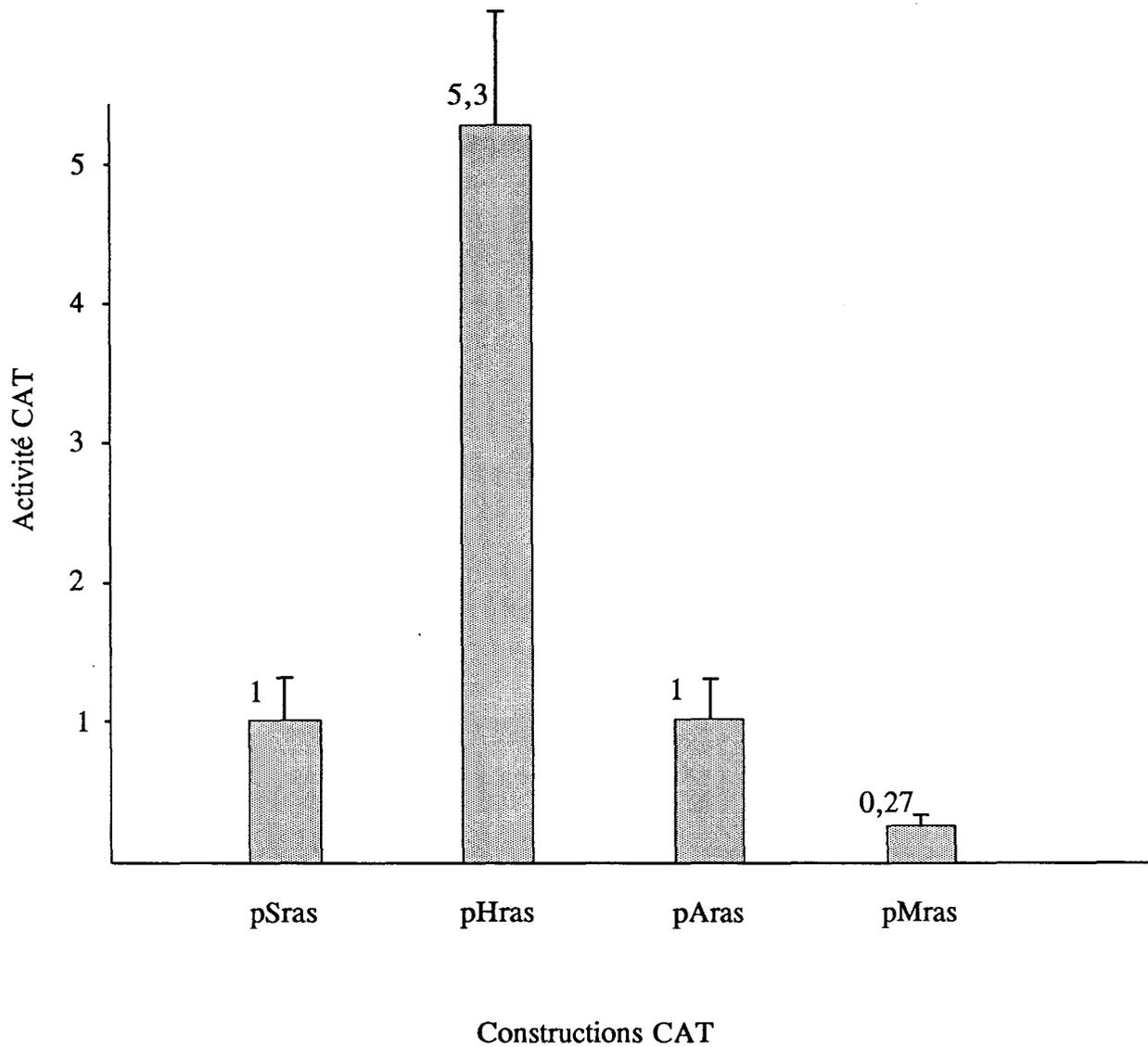


Figure 14 : Histogramme des valeurs CAT obtenues pour les différentes constructions plasmidiques transfectées dans des cellules NIH 3T3. Les volumes de lysats utilisés pour les essais fonctionnels CAT ont été corrigés par rapport à l'efficacité de transfection, mesurée par test enzymatique de la β -galactosidase. Le pourcentage d'acétylation obtenu à partir de la construction pSras est utilisé comme référence, égale à 1, pour la comparaison avec les activités obtenues à partir des autres constructions.

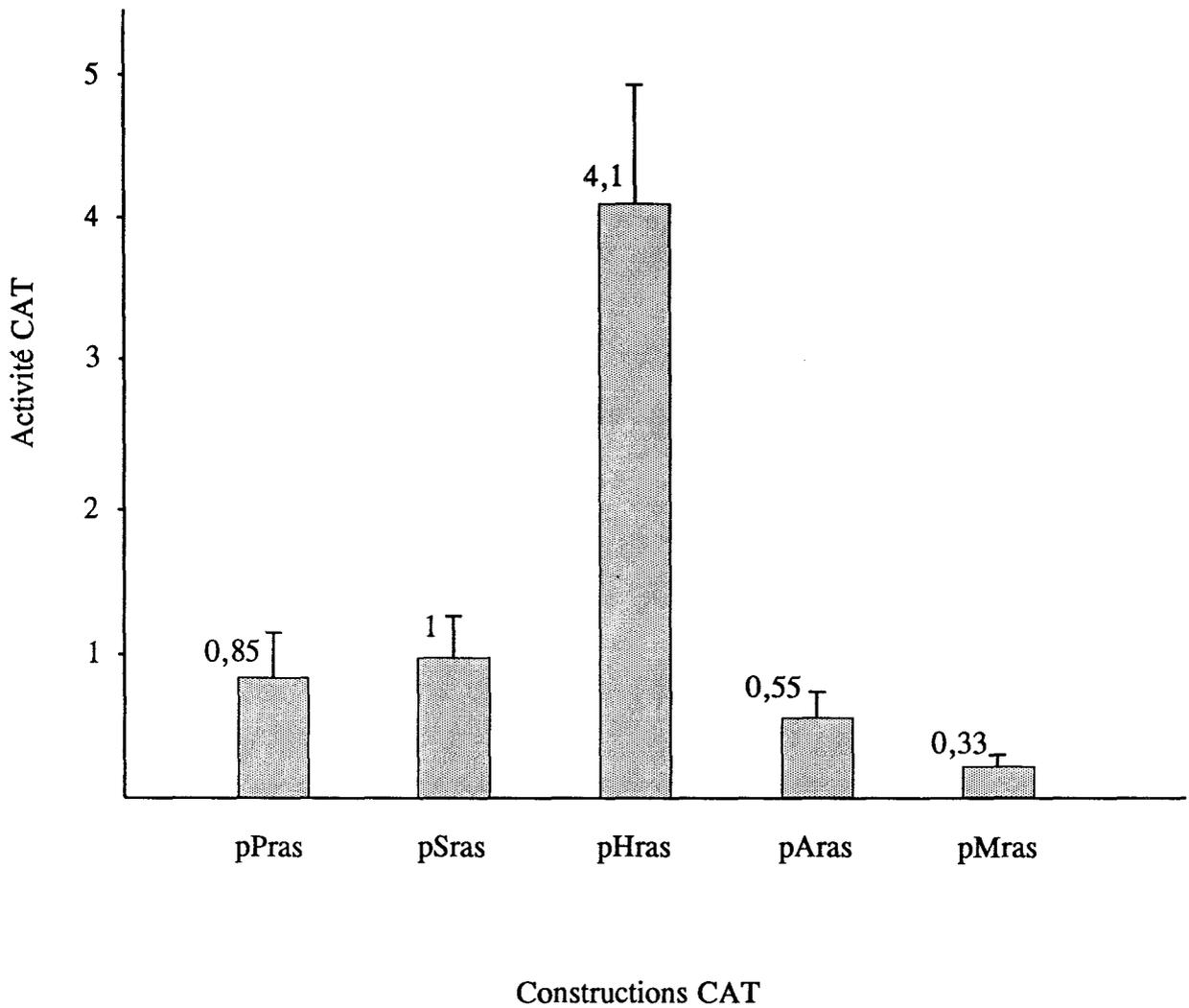


Figure 15 : Histogramme des valeurs CAT obtenues pour les différentes constructions plasmidiques transfectées dans des cellules C5N. Les volumes de lysats utilisés pour les essais fonctionnels CAT ont été corrigés par rapport à l'efficacité de transfection, mesurée par test enzymatique de la β -galactosidase. Le pourcentage d'acétylation obtenu à partir de la construction pSras est utilisé comme référence, égale à 1, pour la comparaison avec les activités obtenues à partir des autres constructions.

et pMras, nous pouvons remarquer que l'on retrouve les mêmes effets de types «*enhancer*» et «*silencer*», dans des fibroblastes ou dans des kératinocytes.

La construction pPras possède une activité de 0,85 par comparaison à celle de pSras. Cette différence d'activité est faible et permet donc de montrer que le site d'épissage donneur de cet exon ne semble pas avoir d'influence sur l'activité promotrice de la région 5' du gène *Ha-ras*, mise en évidence avec la construction pSras.

II.2.3 Etude fonctionnelle dans des cellules Car B.

Les résultats des essais fonctionnels CAT présentés dans ce paragraphe proviennent de la moyenne de deux expériences indépendantes (figure 16). Les effets fonctionnels obtenus pour les constructions pSras, pHras, pAras et pMras, dans cette lignée cellulaire sont comparables à ceux obtenus avec les lignées NIH 3T3 et C5N. En effet, la construction pHras possède une activité CAT 4,5 fois supérieure à celle de pSras, ceci laisse supposer l'existence d'un élément régulant de façon positive l'expression du gène *Ha-ras*, localisé dans la région intronique comprise entre pSras et pHras. La construction pAras, quant à elle, donne une activité CAT 1,7 fois inférieure à celle de pSras, soit 7,5 fois inférieure à celle de pHras, ce qui une fois de plus laisse supposer l'existence d'un élément régulant de façon négative l'expression du gène *Ha-ras*, localisé dans la région intronique comprise entre pHras et pAras. Finalement, l'activité CAT de la construction pMras est 8 fois inférieure à celle de pSras, soit 5 fois inférieure à celle de pAras, ce qui laisse supposer également, l'existence d'un élément régulant de façon négative l'expression du gène *Ha-ras*, localisé dans la région intronique comprise entre pAras et pMras.

II.2.4 Etude fonctionnelle dans des cellules 3TDM1 et 17-S1-T984.

Les résultats obtenus dans les fibroblastes, les kératinocytes normaux et les kératinocytes transformés étant similaires, nous avons entrepris de tester ces différentes constructions dans

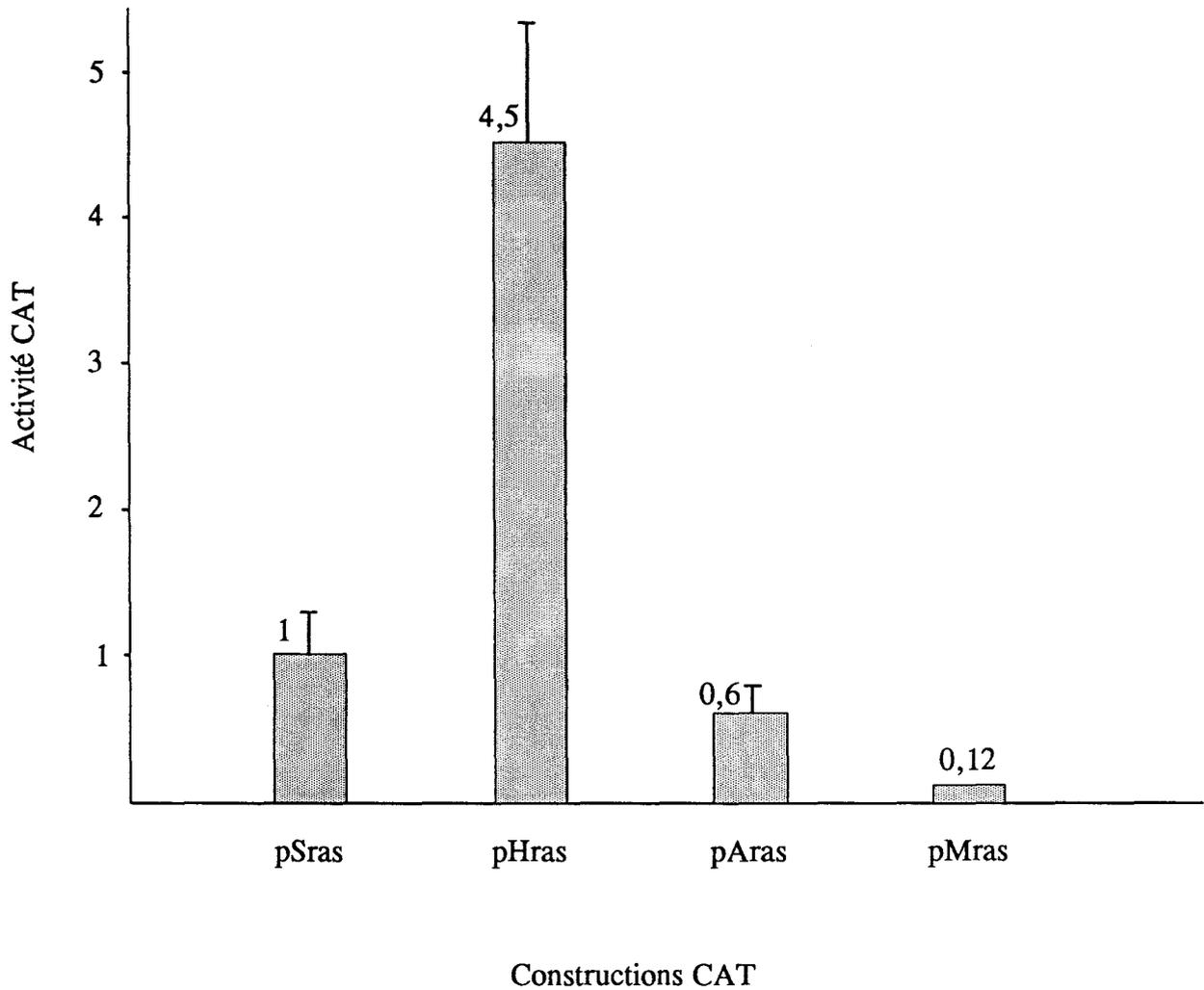


Figure 16 : Histogramme des valeurs CAT obtenues pour les différentes constructions plasmidiques transfectées dans des cellules Car B. Les volumes de lysats utilisés pour les essais fonctionnels CAT ont été corrigés par rapport à l'efficacité de transfection, mesurée par test enzymatique de la β -galactosidase. Le pourcentage d'acétylation obtenu à partir de la construction pSras est utilisé comme référence, égale à 1, pour la comparaison avec les activités obtenues à partir des autres constructions.

d'autres lignées cellulaires d'origines différentes afin de vérifier si les résultats sont comparables dans ces autres lignées cellulaires. Deux lignées cellulaires murines d'origines différentes ont été utilisées : la lignée 3TDM1 (trophoblastes) et la lignée 17-S1-T984 (myoblastes). Deux séries de transfections ont été réalisées dans les myoblastes (résultats non représentés). L'activité CAT de la construction pHras se révèle 3,6 fois supérieure à celle de pSras, ce qui amène à faire la même hypothèse que précédemment concernant l'existence d'un élément de type «*enhancer*». De même, l'activité de la construction pAras s'avère être 1,8 fois inférieure à celle de pSras, soit 6,5 fois inférieure à celle de pHras, ce qui une fois de plus amène à faire la même hypothèse que précédemment concernant l'existence d'un élément de type «*silencer*». Finalement, en ce qui concerne la construction pMras, son activité CAT est de 3 fois inférieure à celle de pSras, soit 1,6 fois inférieure à celle de pAras, en accord avec les résultats précédents.

Une série de transfections a été réalisée dans les trophoblastes et les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus avec toutes les autres lignées cellulaires. L'activité CAT de la construction pHras est de 4 fois supérieure à celle de pSras, celle de pAras étant 1,5 fois inférieure à celle de pSras. Finalement, l'activité CAT obtenue avec pMras est de 4,2 fois inférieure à celle obtenue avec pSras.

En conclusion, cette approche fonctionnelle du rôle de l'intron 0 dans la régulation transcriptionnelle du gène *Ha-ras* de souris, a permis de mettre en évidence l'existence d'éléments régulant de façon positive et négative l'activité du promoteur dans tous les types de tissus étudiés. En effet, la région intronique comprise entre les constructions pSras et pAras, contenant un élément de type «*enhancer*» et un élément de type «*silencer*», montre une activité globale de type «*silencer*». Cette activité «*silencer*» est encore plus forte lorsque l'on considère la région intronique comprise entre pSras et pMras. Ainsi, ces expériences montrent que l'effet global de l'intron sur l'activité du promoteur est de type négatif, bien qu'il existe des éléments positifs et négatifs dans cet intron.

Cette approche ayant mis en évidence des éléments fonctionnels dans le premier intron,

nous avons voulu vérifier que cette région ne possède pas d'activité promotrice qui pourrait interférer avec celle du promoteur.

II.3 La région d'homologie ne possède pas d'activité promotrice.

Un fragment de 472 pb *Hph* I - *Sau* 3A a été sous-cloné dans le site *Sma* I du plasmide pIC-20H, puis cloné en amont du gène CAT, dans le site *Hind* III du plasmide pB9. La construction plasmidique ainsi créée s'appelle pH472CAT. L'activité CAT obtenue avec la construction pH472CAT à partir de lysats de cellules NIH 3T3, est très faible et du même ordre de grandeur que celle obtenue avec le plasmide pB9 qui ne possède pas de promoteur (résultats non montrés). Ce fragment de 472 pb ne possède donc pas d'activité promotrice. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Honkawa et ses collaborateurs (1987), qui ont montré que le premier intron du gène *Ha-ras* humain ne présente pas d'activité promotrice.

II.4 Influence de la région d'homologie sur l'activité d'un promoteur hétérologue: le promoteur TK.

Le but de cette étude est de vérifier si la région d'homologie influence positivement ou négativement, l'initiation de la transcription à partir d'un promoteur hétérologue, en l'occurrence le promoteur du gène de la thymidine kinase (TK). Le fragment de 472 pb décrit dans le paragraphe précédent a donc été cloné en amont et en aval du promoteur TK, dans les deux orientations possibles (figure 17). Les différentes constructions pTHV, pTHVI, pTHP et pTHPI ainsi créées permettent d'analyser l'influence de la position et de l'orientation de la séquence de l'intron du gène *Ha-ras* sur l'activité du promoteur TK. Le H rappelle la présence de la région d'homologie dans la séquence intronique étudiée, le V et le P donnent la position du fragment placé avant et après le promoteur TK. Le I signifie que le fragment de 472 pb a été inséré en sens inverse du sens génomique.

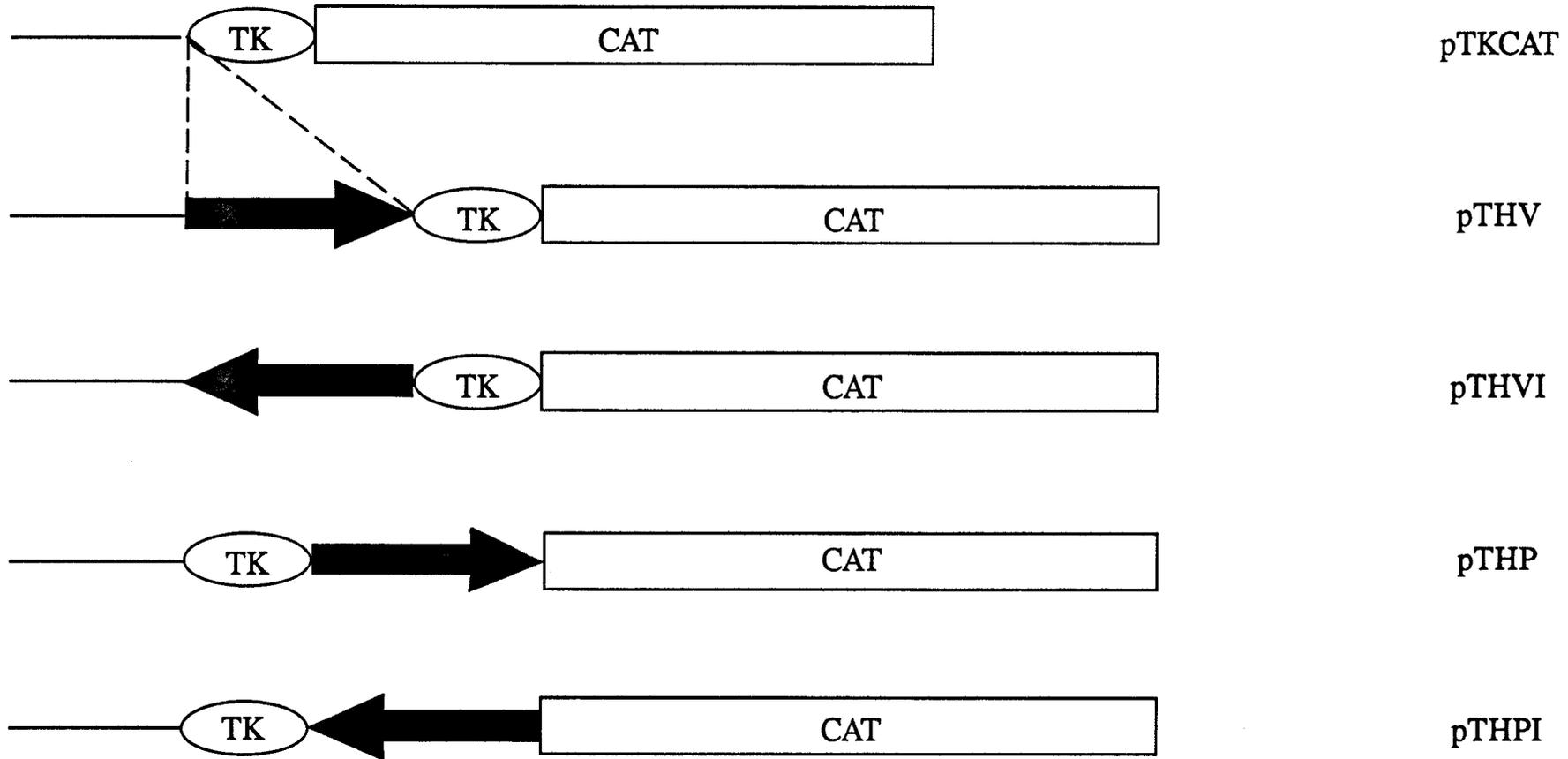


Figure 17 : Schéma des constructions réalisées par clonage du fragment de 472 pb de l'intron 0 du gène *Ha-ras* de souris, en amont ou en aval du promoteur TK. Dans la nomenclature des constructions, H rappelle la présence de la région d'homologie, V et P indiquent que le fragment est cloné avant ou après le promoteur TK. I indique que le fragment est cloné en sens inverse par rapport au sens génomique. Le fragment de l'intron 0 et son orientation sont représentés par des flèches noires.

Les activités CAT des constructions sont comparées à celle de pTKCAT qui est utilisée comme référence pour cette étude. Cette approche fonctionnelle a été effectuée au début de nos études en utilisant les lignées cellulaires NIH 3T3 et HeLa. Cette dernière est une lignée de cellules épithéliales humaines.

II.4.1 Etude fonctionnelle dans les cellules NIH 3T3.

Les activités CAT obtenues avec les constructions pTHV, pTHVI, pTHP et pTHPI sont toutes inférieures à celle de pTKCAT ; de 4,5 fois pour pTHV, de 1,6 fois pour pTHVI, de 2,1 fois pour pTHP et de 22 fois pour pTHPI (figure 18). Ces résultats montrent que quelles que soient l'orientation et la position, le fragment de 472 pb de l'intron 0 a pour effet de diminuer l'activité du promoteur TK avec des efficacités différentes selon les constructions.

II.4.2 Etude fonctionnelle dans les cellules HeLa.

Les mêmes types d'interprétations peuvent être faits avec les cellules HeLa qu'avec les cellules NIH 3T3 (figure 19). En effet, les activités CAT obtenues avec les constructions pTHV, pTHP et pTHPI sont inférieures à celle de pTKCAT ; de 2,2 fois pour pTHV, de 16,7 fois pour pTHP et de 33 fois pour pTHPI. L'activité obtenue avec la construction pTHVI est, quant à elle, égale à celle de pTKCAT.

Ces résultats montrent que la région intronique de 472 pb de l'intron 0, contenant la région d'homologie, semble influencer de façon négative l'activité du promoteur TK avec des efficacités différentes selon la position et l'orientation de l'insert. La diminution de l'activité du promoteur TK est plus forte lorsque le fragment est placé entre celui-ci et le gène CAT, sauf dans le cas de la construction pTHP dans les cellules HeLa. Finalement, cette diminution est maximale lorsque le fragment est placé après le promoteur et en sens inverse par rapport au sens génomique. Il est intéressant de remarquer que les rapports d'activités de la construction pTHPI sur celle de la construction pTKCAT, dans les cellules NIH 3T3

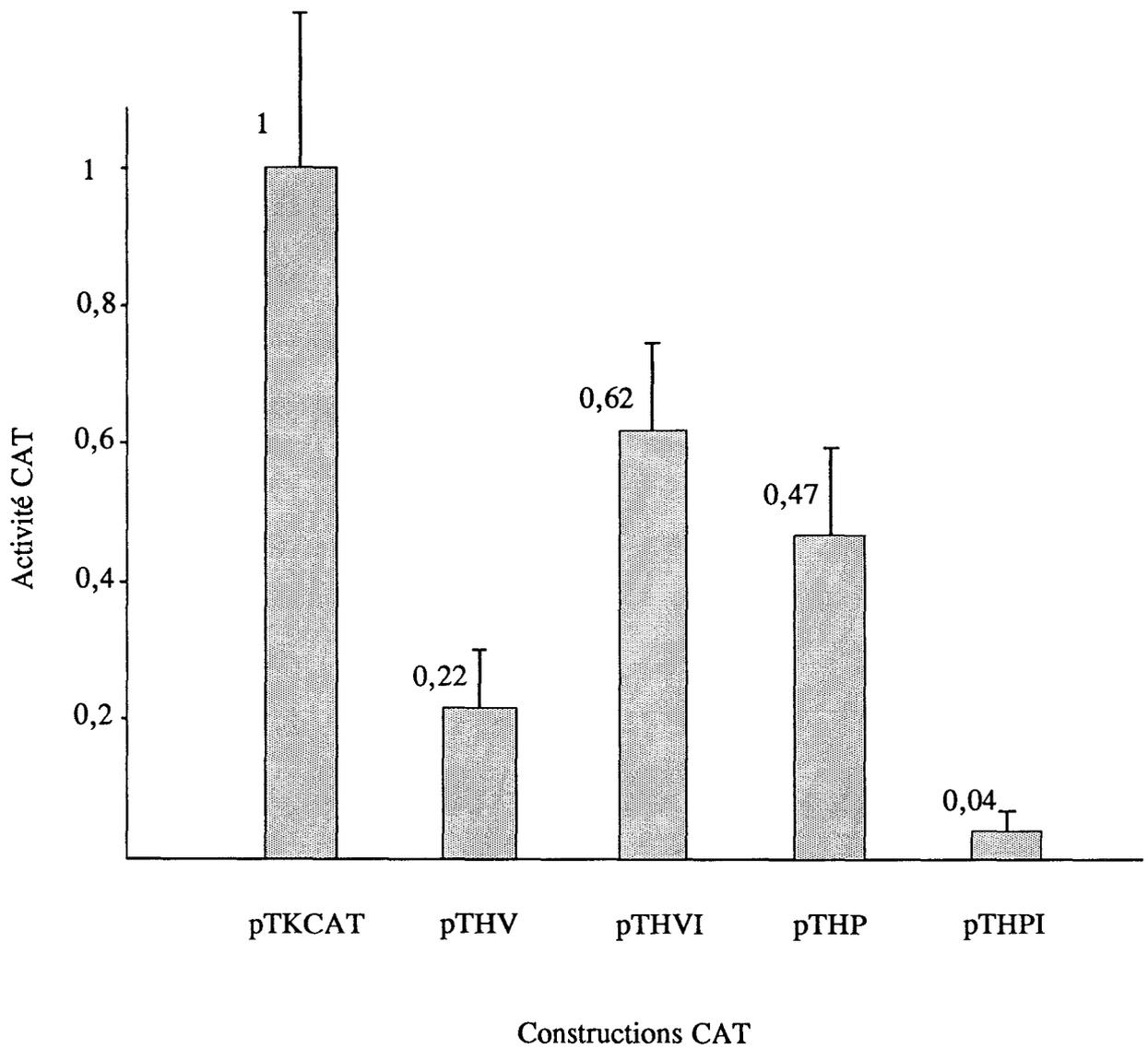


Figure 18 : Histogramme des activités CAT obtenues à partir de lysats de cellules NIH 3T3 transfectées avec les constructions plasmidiques dérivant du plasmide pTKCAT. L'activité CAT obtenue pour le plasmide pTKCAT est utilisée comme référence pour la comparaison avec les activités obtenues avec les autres constructions.

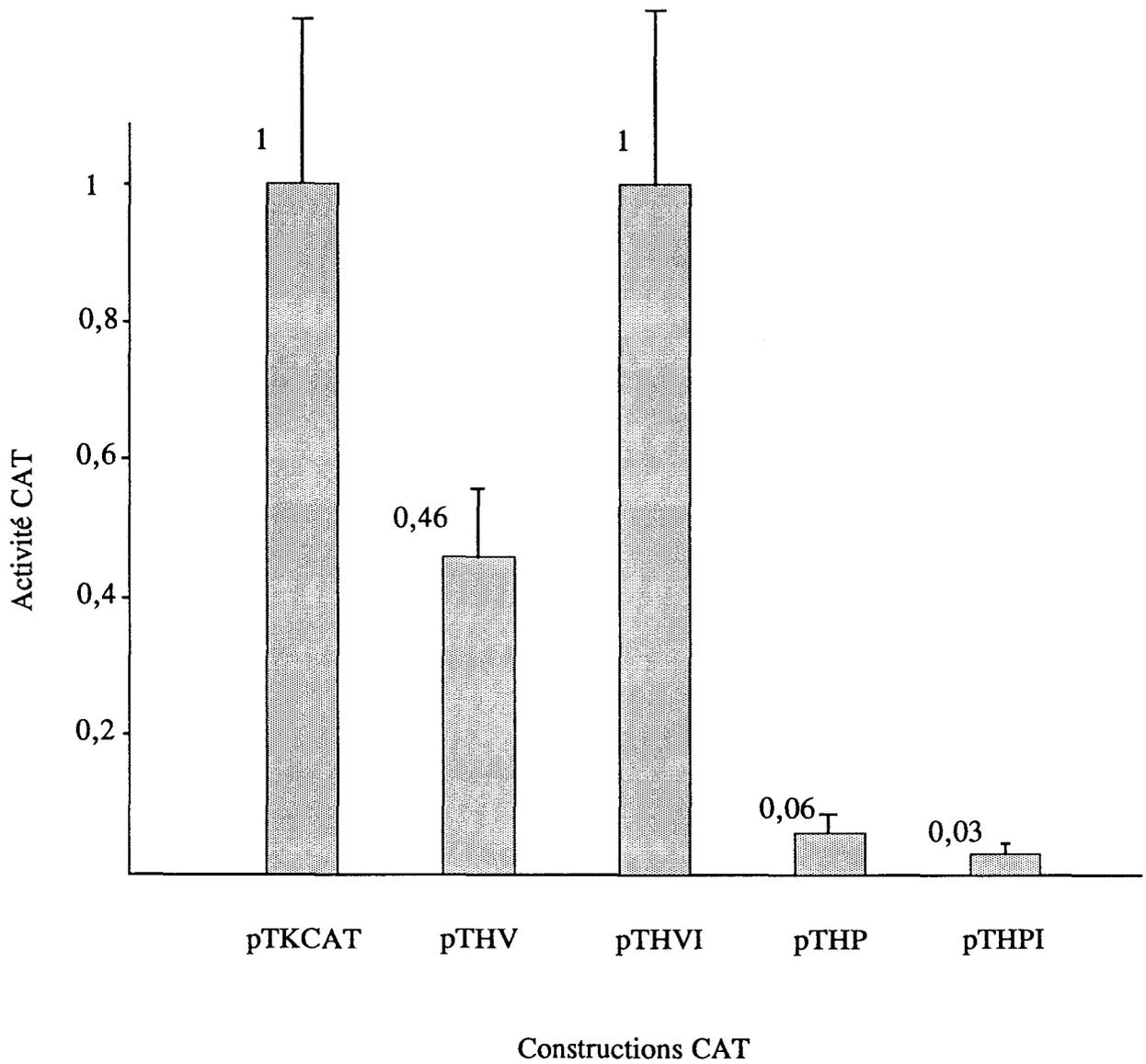


Figure 19 : Histogramme des activités CAT obtenues à partir de lysats de cellules Hela transfectées avec les constructions plasmidiques dérivant du plasmide pTKCAT. L'activité CAT obtenue pour le plasmide pTKCAT est utilisée comme référence pour la comparaison avec les activités obtenues avec les autres constructions.

et HeLa, sont similaires. D'un autre côté, ces rapports concernant les constructions pTHV, pTHVI et pTHP, dans les cellules NIH 3T3 et dans les cellules HeLa, sont différents, surtout dans le cas de la construction pTHP. Il est possible que ces différences reflètent les origines différentes de ces deux lignées cellulaires.

Par ailleurs, il est à remarquer que ce fragment de 472 pb et la région intronique comprise entre les constructions pSras et pHras, où il a été mis en évidence un élément de type «*enhancer*», se chevauchent sur 115 pb. Par contre, la région intronique comprise entre les constructions pHras et pMras où il a été mis en évidence deux éléments de type «*silencer*» se retrouve dans sa totalité dans ce fragment de 472 pb. Ces résultats suggèrent que les effets négatifs de ce fragment sur l'activité du promoteur TK puissent s'expliquer par la présence des éléments de type «*silencer*» et l'absence d'une partie de la séquence où il a été mis en évidence un élément de type «*enhancer*».

II.5 Analyse fonctionnelle du 1er intron, en utilisant le gène de l'hormone de croissance humaine comme gène reporteur.

Les résultats fonctionnels décrits dans le paragraphe précédent, sont basés sur l'activité enzymatique CAT, qui correspond à une activité en bout la chaîne des processus biologiques de transcription, maturation des ARNm et traduction de ceux-ci en protéines enzymatiques fonctionnelles. Nous nous sommes retrouvés devant un certain nombre de problèmes techniques pour confirmer les valeurs des essais fonctionnels CAT par une quantification de l'activité des constructions plasmidiques au niveau de l'ARNm. Le but de cette approche était également de vérifier que les sites de l'initiation de la transcription des constructions plasmidiques sont les mêmes que dans le gène *Ha-ras*. Il est difficile d'étudier les transcrits obtenus à partir du gène CAT, du fait de leur grande instabilité dans la cellule eucaryote (à l'opposé de la protéine CAT qui est très stable). Nous avons donc décidé de réaliser l'équivalent des constructions pSras pHras et pAras, à partir d'un plasmide ayant le gène de l'hormone de croissance humaine hGH (*human Growth Hormone*) comme gène reporteur de

l'activité transcriptionnelle des différents fragments de la région 5' du gène *Ha-ras* étudiés. Ces constructions offrent l'avantage de pouvoir être aisément analysés par dosage de l'enzyme secrétée dans le milieu de culture. De plus les ARNm produits à partir de ce gène sont très stables dans la cellule, ce qui facilite l'étude au niveau de l'ARN.

II.5.1 Construction des vecteurs pSGH, pHGH et pAGH.

Les constructions pSGH, pHGH et pAGH sont équivalentes aux constructions pSras, pHras et pAras (voir paragraphe II.1). Elles ont été réalisées en clonant les mêmes fragments de la région 5' du gène *Ha-ras* de souris en amont du gène de l'hormone de croissance dans le plasmide pØGH (Selden et al., 1986). Ces fragments provenant du plasmide pUC.NPR, ont été clonés dans les sites *Hind* III - *Bam* HI du plasmide pØGH.

II.5.2 Etude fonctionnelle des constructions pSGH, pHGH et pAGH dans les cellules C5N.

Quatre expériences de transfections indépendantes ont été réalisées dans les cellules C5N. De même que pour les constructions CAT, la quantité d'enzyme produite à partir du plasmide pSGH est utilisée comme référence, égale à 1, par rapport aux quantités obtenues à partir des autres plasmides pHGH et pAGH. Dans ces expériences, l'activité de la construction pHGH est en moyenne 3,3 fois supérieure à celle de la construction pSGH. Ce résultat, comme dans le cas des essais fonctionnels CAT, laisse supposer l'existence d'un élément de type «*enhancer*» dans la région intronique comprise entre pSGH et pHGH. D'un autre côté, la quantité d'enzyme hGH produite à partir de la construction pAGH est du même ordre de grandeur que celle obtenue avec pSGH. Ce résultat, comme dans le cas des essais fonctionnels CAT, laisse supposer l'existence d'un élément de régulation négative dans la région intronique comprise entre pHGH et pAGH (résultats non montrés).

II.5.3 Analyse des ARNm produits à partir des constructions pSGH, pHGH et pAGH.

Les buts de cette étude est : (i) de confirmer au niveau de l'ARNm que l'initiation de la transcription se fait bien au niveau des mêmes sites que dans le gène *Ha-ras* endogène, (ii) de quantifier les transcrits de chacune des constructions. La quantification de ces transcrits devaient permettre de corrélérer les activités enzymatiques avec le taux d'ARNm.

Pour cette approche, trois sondes correspondant à pSGH, pHGH et pAGH ont été réalisées. Pour ce faire, un fragment *Pst* I des plasmides pSGH, pHGH et pAGH, comprenant la région 5' du gène *Ha-ras* et une partie du gène hGH, ont été clonés dans le site *Pst* I du vecteur M13mp19. L'orientation de l'insertion ont été déterminées par une digestion *Sac* I. Les sondes ont été réalisées à partir d'une amorce dans le gène hGH des trois constructions M13mp19 simple brin.

Les premières expériences de protection contre l'action de la nucléase S1 ont permis de visualiser des bandes qui se sont avérées après contrôle, correspondre à une protection avec les plasmides qui contaminaient la préparation d'ARN (figure 20). L'ARN a été préparé dans un premier temps par la technique de purification par le RNazol ; nous avons donc utilisé une autre technique de purification sur gradient en chlorure de césium, afin de supprimer les contaminations de l'ARN par du plasmide. Finalement, les mêmes bandes correspondant à une hybridation entre la sonde et les plasmides ont été visualisées avec une intensité toutefois beaucoup plus faible, signifiant que malgré tout, il y a toujours une contamination de l'ARN par du plasmide. Par ailleurs, nous savons d'après le test hGH que les constructions pSGH, pHGH et pAGH sont correctement exprimées. Il est donc possible que cette technique ne soit pas adaptée pour notre étude, peut-être du fait que la région étudiée est riche en bases G et C ou pour d'autres raisons qui restent non élucidées. En effet, nous avons appris que lors de la caractérisation du promoteur, K. Brown n'a pas pu mettre en évidence les sites d'initiation de la transcription, du gène *Ha-ras* de souris, par la technique de protection contre l'action de la nucléase S1 (communication personnelle).

La technique d'extension d'amorce qui a permis de localiser les sites d'initiation de la



Figure 20 : Autoradiographie d'une expérience de cartographie à la nucléase S1. La piste 1 correspond au marqueur de tailles. Les pistes 2 à 4 correspondent respectivement, aux incubations de la sonde, préparée à partir de pSGH, avec les ARN préparés à partir des cellules C5N préalablement transfectées avec les constructions pSGH, pAGH et pHGH. Les pistes 5 et 6 correspondent aux contrôles, où les plasmides pSGH et pHGH ont été incubés, avec la sonde de pSGH, avant digestion par la nucléase S1. La piste 7 correspond à la digestion de la sonde de pSGH et la piste 8 à la sonde intacte.

On remarque que les profils au niveau des pistes 2 et 5 ainsi que 3 et 6 sont identiques. Ceci indique que les protections visualisées au niveau des pistes 2 à 4 correspondent probablement à l'hybridation de la sonde avec le plasmide et non avec l'ARNm, comme attendu.

transcription du gène *Ha-ras* de souris (Brown *et al.*, 1988), serait également adaptée pour localiser les sites d'initiation de la transcription dans nos constructions plasmidiques, et pour quantifier les transcrits avec une précision toutefois plus faible.

Finalement, bien que nous n'ayons pas encore pu corrélérer les activités enzymatiques avec le taux d'ARNm, les résultats obtenus à partir des constructions hGH permettent de confirmer les résultats obtenus avec les constructions CAT ; les comparaisons des activités des constructions pSras avec pHras et pSGH avec pHGH, mettent en évidence l'existence d'un élément de type «*enhancer*» dans la région intronique comprise entre pSras et pHras ou pSGH et pHGH. De même, les comparaisons des activités des constructions pHras et pAras ainsi que pHGH et pAGH, mettent en évidence l'existence d'un élément de type «*silencer*».

III. Identification de séquences dans l'intron 0 fixant des facteurs nucléaires.

Les analyses fonctionnelles, réalisées avec les constructions dérivant d'un vecteur CAT ou d'un vecteur hGH, ont permis de mettre en évidence l'influence, soit positive, soit négative de séquences introniques sur l'activité promotrice (voir paragraphe II). L'approche fonctionnelle, réalisée à partir de constructions dérivant du vecteur pTKCAT, confirme le fait que le premier intron, et plus particulièrement la région d'homologie, semble influencer l'activité promotrice à partir du promoteur hétérologue TK (voir paragraphe II.4). Afin de mieux comprendre ces effets fonctionnels, nous avons entrepris de caractériser les séquences introniques fixant des facteurs nucléaires, qui doivent probablement médier les effets observés.

Deux fragments de l'intron 0 ont été utilisés comme sondes pour des expériences de protection contre l'action de la DNase I : le fragment de restriction *Sau* 3A - *Sph* I de 369 pb, et le fragment *Hph* I - *Sau* 3A de 472 pb (figure 21). Ces deux fragments se chevauchent sur 137 pb permettant ainsi de couvrir 704 pb de l'intron 0.

Les expériences de protection contre l'action de la DNase I ont été réalisées à partir d'extraits de protéines nucléaires provenant de cellules épithéliales (C5N, SN161, PDV et

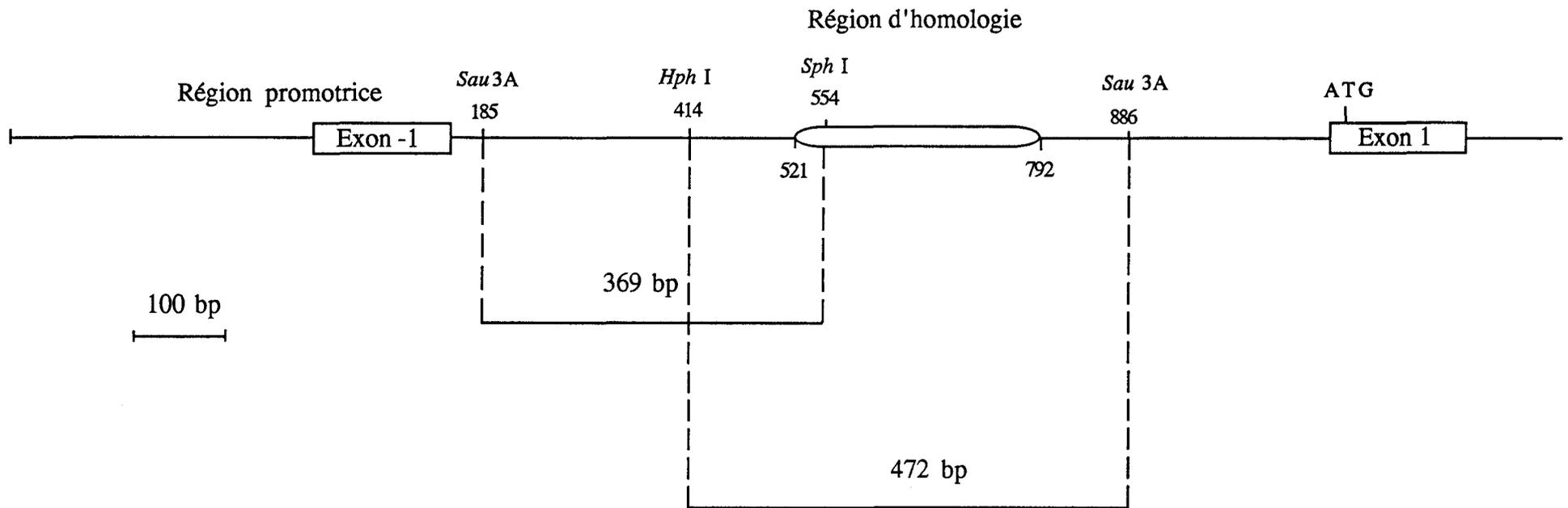


Figure 21 : Localisation par rapport à la séquence génomique, des deux séquences de 369 pb et 472 pb de l'intron 0 du gène *Ha-ras* de souris, utilisées comme sondes pour les expériences de protection contre l'action de la DNase I.

PDVC57), de fibroblastes (STO), de cellules érythroleucémiques (M707/T) et de macrophages (RAW). Toutes ces lignées cellulaires sont d'origine murine. L'utilisation de ces lignées cellulaires d'origines tissulaires différentes a pour but de mettre en évidence s'il existe des différences dans le profil de fixation des facteurs nucléaires au niveau de l'intron 0 d'un type tissulaire à un autre.

Ces expériences ont permis, à partir d'extraits de cellules C5N, de visualiser 11 séquences protégées contre l'action de la DNase I, numérotées de F1 à F11. Le fragment de 369 pb permet de mettre en évidence les séquences F1 à F4 (figure 22). Ce fragment a également été utilisé pour visualiser la fixation de facteurs nucléaires à partir d'extrait de cellules RAW. Le fragment de 472 pb permet, quant à lui, de mettre en évidence les séquences F4 à F11 à partir des extraits C5N, SN161, PDV, PDVC57, STO, M707/T (figures 23 et 24). Toutes ces protections ont pu être visualisées sur les deux brins de l'ADN. La taille de ces séquences varie de 15 pb, pour F9, à 56 pb pour F8 et elles peuvent correspondre à la fixation d'une ou de plusieurs protéines nucléaires. L'analyse de ces séquences n'a pas permis d'identifier de séquences consensus fixant des facteurs de transcription déjà caractérisés. Les séquences F1 à F5 se trouvent dans la région intronique comprise entre les constructions plasmidiques pSras et pHras, qui correspond à un élément de régulation positive. Les séquences de F6 à F11 se trouvent dans la région intronique comprise entre pHras et pMras, qui contiennent des éléments de régulation négative.

Ces séquences protégées contre l'action de la DNase I n'ont pas toutes été analysées en détail. Les séquences F2 à F8 ont été analysées par la technique de retard sur gel. Les séquences F7 et F8 étant relativement grandes, elles ont été divisées en deux oligonucléotides chacune (F7-1 et F7-2, ainsi que F8-1 et F8-2) pour les études de retard sur gel. Les résultats obtenus par protection contre l'action de la DNase I et de retard sur gel sont présentés dans les paragraphes suivants. Les séquences F2, F4 et F5 qui ont été analysées plus en détail, notamment au niveau fonctionnel, font l'objet de paragraphes distincts.

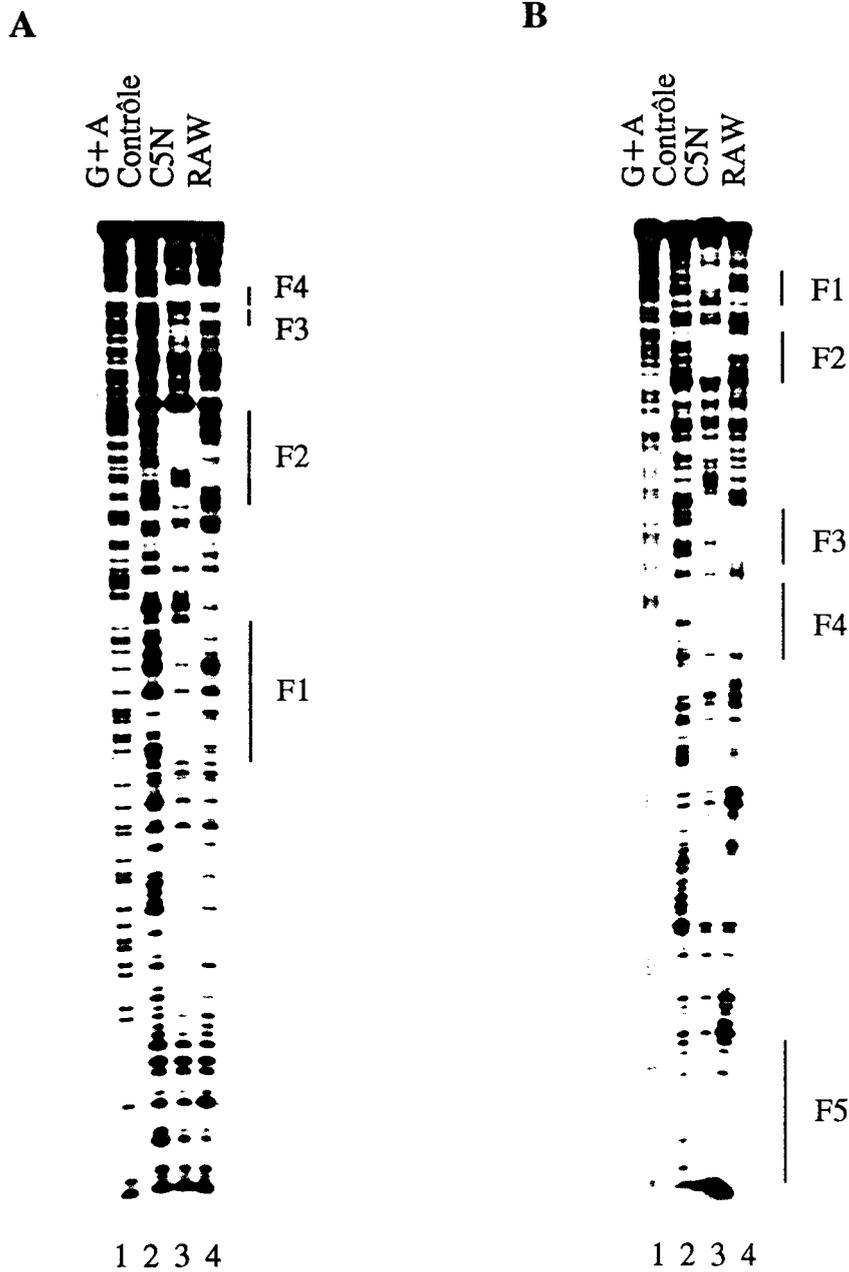


Figure 22 : Analyse par empreinte à la DNase I de la fixation des facteurs nucléaires au niveau de l'intron 0 du gène *Ha-ras* de souris. Le fragment de restriction *Sau* 3A- *Sph* I de 369 pb a été marqué en 5' sur le brin codant (A) ou le brin antisens (B). La sonde (2 ng) a été incubée avec 0 μ l (contrôle), ou 80 μ l d'extrait de protéines nucléaires C5N ou RAW, en présence de 1 μ g de poly(dI-dC). Les marqueurs de poids moléculaires ont été obtenus par une réaction de séquençage chimique G+A sur les mêmes sondes. Les cinq principales séquences protégées contre l'action de la DNase I sont dénommées F1, F2, F3, F4 et F5.

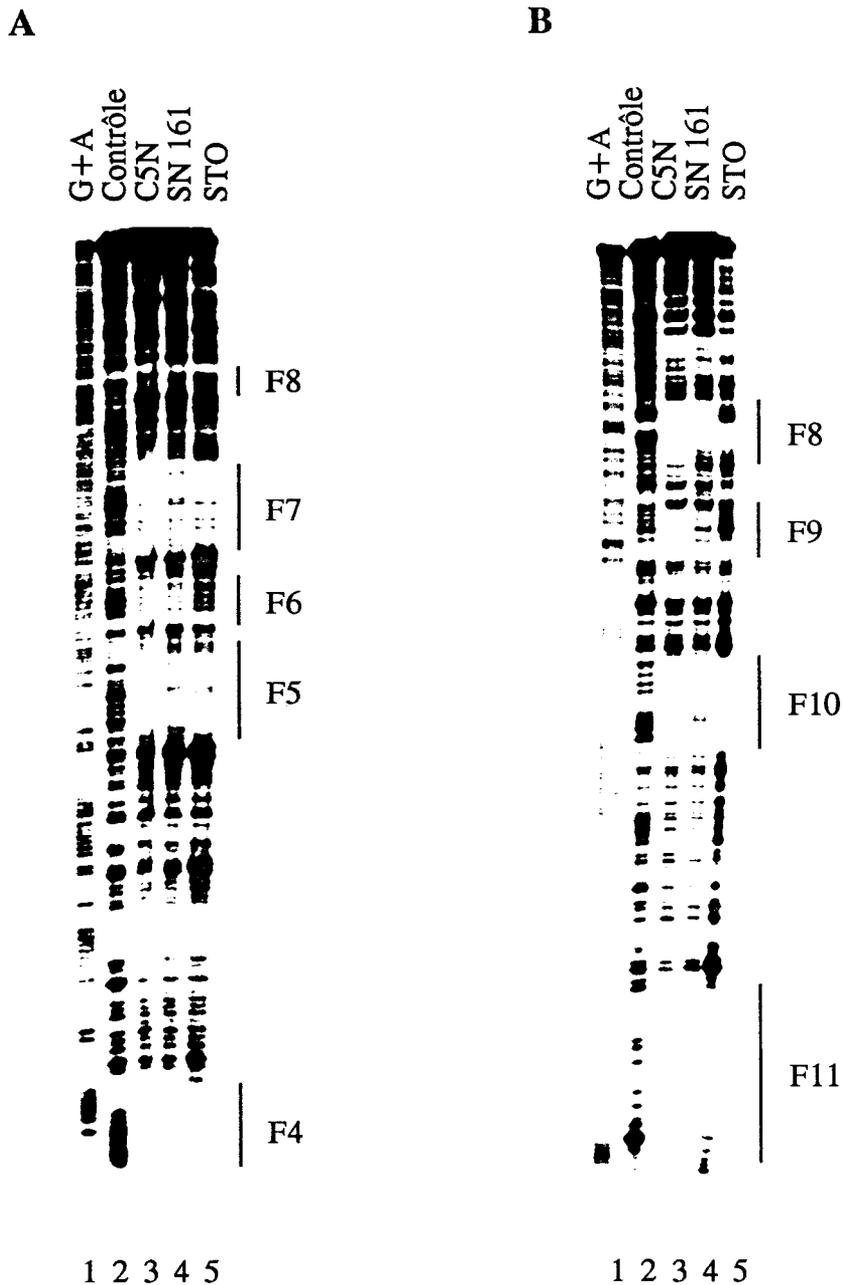


Figure 23 : Analyse par empreinte à la DNase I de la fixation des facteurs nucléaires au niveau de l'intron 0 du gène *Ha-ras* de souris. Le fragment de restriction *Hph* I-*Sau* 3A de 472 pb a été marqué en 5' sur le brin codant (A) ou le brin antisens (B). La sonde (2 ng) a été incubée avec 0 μ l (contrôle), ou 80 μ l d'extrait de protéines nucléaires C5N ou SN 161 ou STO, en présence de 1 μ g de poly(dI-dC). Les marqueurs de poids moléculaires ont été obtenus par une réaction de séquençage chimique G+A sur les mêmes sondes. Les huit principales séquences protégées contre l'action de la DNase I sont dénommées F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10 et F11.

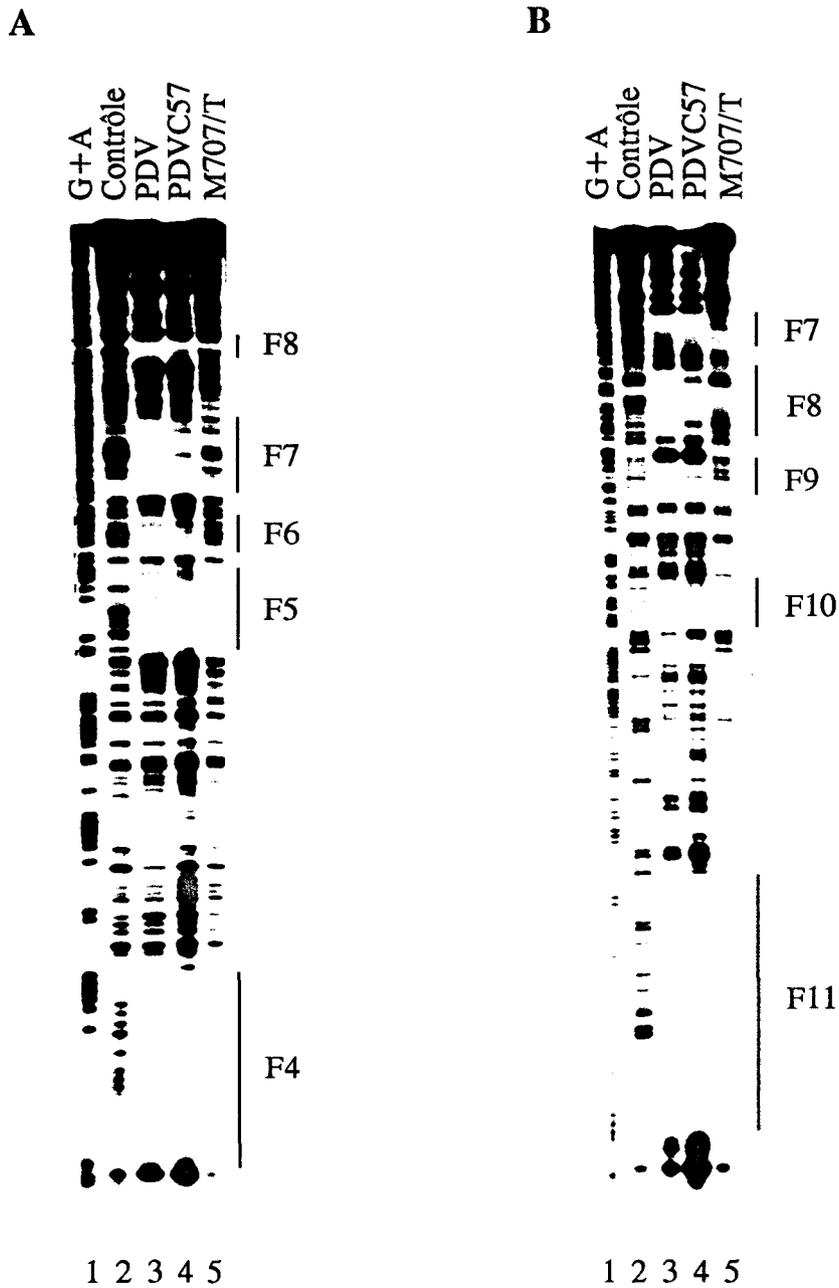


Figure 24 : Analyse par empreinte à la DNase I de la fixation des facteurs nucléaires au niveau de l'intron 0 du gène *Ha-ras* de souris. Le fragment de restriction *Hph* I-*Sau* 3A de 472 pb a été marqué en 5' sur le brin codant (A) ou le brin antisens (B). La sonde (2 ng) a été incubée avec 0 μ l (contrôle), ou 80 μ l d'extrait de protéines nucléaires PDV, PDVC57 OU M707/T, en présence de 1 μ g de poly(dI-dC). Les marqueurs de poids moléculaires ont été obtenus par une réaction de séquençage chimique G+A sur les mêmes sondes. Les huit principales séquences protégées contre l'action de la DNase I sont dénommées F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10 et F11.

III.1 Analyse des séquences F1, F3, F6, F7, F8, F9, F10 et F11.

La séquence F1 protégée contre l'action de la DNase I couvre 28 pb, des positions 247 à 274 après le premier site d'initiation de la transcription (figure 25). La protection obtenue avec l'extrait de protéines nucléaires de cellules épithéliales C5N est différente de celle obtenue avec l'extrait macrophagique RAW (figure 22). En effet, la séquence protégée à partir de l'extrait C5N est plus marquée qu'avec l'extrait RAW. D'un autre côté, la partie 5' de la séquence protégée avec l'extrait C5N, ne l'est pas avec l'extrait RAW. Inversement, la partie 3' de la région protégée avec l'extrait RAW ne l'est pas avec l'extrait C5N.

La séquence F3 couvre 20 pb, des positions 411 à 430 (figure 25). Il est intéressant de remarquer que cette séquence est conservée à 94% chez l'homme (une seule délétion est observée dans la séquence humaine comparée à la séquence de souris), alors que les séquences avoisinantes ne sont pas conservées. Le profil en retard sur gel de l'oligonucléotide F3 permet de visualiser, à partir d'extraits de protéines nucléaires C5N, un complexe de faible mobilité correspondant à une protéine ou un complexe de protéines (figure 26). La fixation de ce complexe est spécifique car les oligonucléotides des séquences F4 et F5, non marqués et en excès (1000 fois), ne sont pas en compétition pour la fixation du complexe visualisé avec l'oligonucléotide F3. Par contre, l'oligonucléotide F6 est en compétition avec l'oligonucléotide F3 pour la fixation de ce complexe. La comparaison des séquences des deux oligonucléotides F3 et F6 révèle un motif nucléotidique commun ; la séquence CCTG. Il est possible que ces homologues de séquences puissent expliquer cette compétition, bien que l'oligonucléotide F6 ne permette pas de visualiser ce complexe en retard sur gel (figure 27).

L'analyse en retard sur gel de la séquence F6 est à rapprocher de celle de la séquence F8-1 car le profil en retard sur gel est identique pour ces deux séquences avec l'extrait C5N. De plus, elles possèdent toutes les deux la séquence CNTGGCANG (figure 27). Pour les expériences de retard sur gel, la séquence F8 a été divisée en deux oligonucléotides F8-1 pour la partie 5' et F8-2 pour la partie 3' (figures 27 et 30). L'analyse de cette dernière sera décrite avec celle de la séquence F2. La séquence F6 couvre 17 pb, des positions 545 à 561. Elle

Sau 3A

GATCGGTGCTTCCTTGCTCCTCTCGGCCCGGCAGCGTGCCTAGCGTCCGGCTGCCCGCCTCTCGCG

186

F1

CCGGACTCGCTCTGCCTGTGGCCGTCCTCCCAGCGAGGCGCCGCCCGGGCCTCCGGAGACTCTGC

F2

GCCCCGCGGCCATCACGCTCGGGCCTCGGGGCACAAGGACACCCGCGTTGGGCCCAACCAGGGC

F3

CTTCTGCTCCCAGCCATCCCTCGCGTTCCTGTAGTCACCTGCTTCCCACACCCTCAGCCGTTTTT

F4

CCCCCCTCTGTGAAAGCTCCCTGGCCCCCTTGTGGAAGGTTTGTCTTAGTGGAGGGCAGGGTCTCT

F5

F6

TCTCCAGCCACCCTCCCCCGCTGCCGGGACCGCGCCTGGCATGCAGTAGGCGCTCAGGTAAATAG

Sph I

F7

TTGTAGGTTGCACCCACATGCCGGCGGGCCAGAGCCGGTTGTAGGCTGGCATTGGCCTGCCTGGG

F8

CACGCCGAGGCCGCCGTGGCAGGACCTGTTTTTTGGGGGGTGGCCTCAGCCCTCAGGCGCCTCCA

Sau I

F9

GTTGAGGGTTTCTGCCTACCTAGCGACTTCTAATTTGGGTGCGTGGTTGGGAGAAGCTCTCAGCT

F10

GTCAGCCCTGCCTTGGGGGCCTCTCCTGCTTCCTCACACAGCCATTAAGTGCTGTTTGAGGAGG

F11

TTGGGGGGTGGGGGTGGGGTCTCCCTTTTCAAGCTGAAGGTGCCACAGGTGATC

Sau 3A

890

Figure 25 : Séquence nucléotidique du fragment de restriction *Sau* 3A de l'intron 0 du gène *Ha-ras* de souris. Les séquences protégées contre l'action de la DNase I détectées à partir d'extraits de protéines nucléaires de kératinocytes de souris, sont encadrées et numérotées de F1 à F11. La numérotation est relative au premier site d'initiation de la transcription. Les sites *Sau* 3A ont été utilisés pour réaliser les constructions pSras et pMras, le site *Sph* I pour la construction pHras et le site *Sau* I pour la construction pAras.

Oligonucléotide F3 : GATCCTGTAGTCACCTGCTTCCCACACCCA°°°°
 °°°°GACATCAGTGGACGAAGGGTGTGGGTTCGA

	1	2	3	4	5	6	7
Compétiteur		F3	F3	F3	F4	F5	F6
ng		0,5	10	100	100	100	100

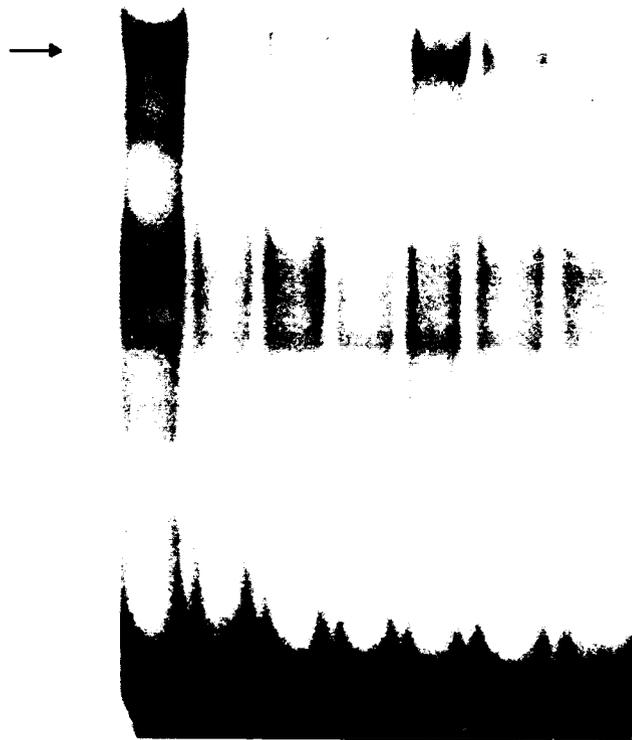


Figure 26 : Analyse par retard sur gel de l'oligonucléotide de la séquence F3. L'oligonucléotide marqué a été incubé avec de l'extrait de protéines nucléaires C5N, en présence de 3 μ g de poly(dIdC) et en présence ou en absence d'oligonucléotide compétiteur.

Oligonucléotide F6 : GATCCTGGCATGCAGTA°°°°
 °°°°GACCGTACGTCATTCTGA

Oligonucléotide F8-1 : GATCCAGGCCGCGTGGCAGGACCTGTA°°°°
 °°°°GTCCGGCGGCACCGTCCCTGGACATTCTGA

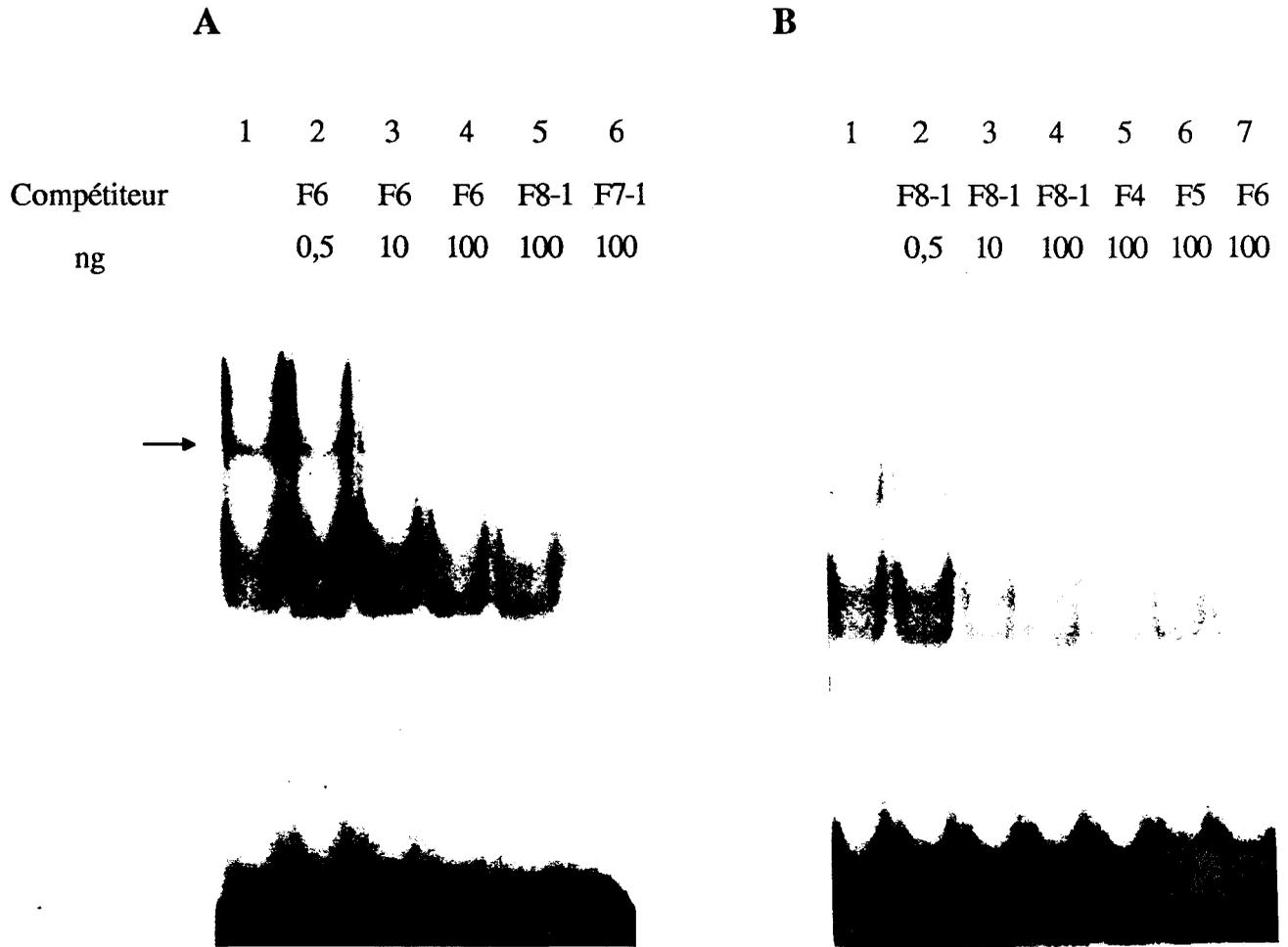


Figure 27 : Analyse par retard sur gel des oligonucléotides des séquences F6 (A) et F8-1 (B). Les oligonucléotides marqués ont été incubés avec de l'extrait de protéines nucléaires C5N, en présence de 3 μ g de poly(dIdC) et en présence ou en absence d'oligonucléotide compétiteur. Les homologies de séquence entre ces deux séquences protégées contre l'action de la DNase I sont encadrées.

possède un site de restriction *Sph* I utilisé pour le clonage du fragment du gène *Ha-ras* dans la construction p*Hras*. La séquence F8 couvre 56 pb, des positions 653 à 708 et possède un site de restriction *Sau* I utilisé pour la construction p*Aras* (figure 25). Les protections des séquences F6 et F8 sont observées avec tous les extraits de protéines nucléaires des lignées d'origine épithéliales (C5N, SN161, PDV et PDVC57). Cependant, on remarque des protections différentes aussi bien pour F6 que pour F8 avec des extraits fibroblastique (STO) et érythroleucémique (M707/T). En effet, la séquence F6 ne semble pas être protégée avec ces extraits et la protection de la séquence F8-1 avec ces deux extraits est différente. La protection de la séquence F8 étant large, on peut penser qu'elle corresponde à la fixation de plusieurs facteurs nucléaires dans les cellules épithéliales et que la partie 5' de cette séquence doit fixer un facteur que l'on ne retrouve pas dans les extraits STO et M707/T. Toutefois, Il semblerait que la fixation de ce complexe ne soit pas spécifique car les oligonucléotides F4, F5 et F8-2, sont en compétition avec les oligonucléotides F6 et F8-1 marqués, pour la fixation de ce complexe, bien que les séquences de ces oligonucléotides compétiteurs ne soient pas apparentées à celles de F6 et F8-2 et qu'elles donnent des profils différents en retard sur gel.

La séquence F7 couvre 42 pb, des positions 568 à 609 (figure 25). Cette région protégée contre l'action de la DNase I correspond probablement à la fixation de plusieurs facteurs nucléaires. Pour l'étude en retard sur gel, nous avons choisi de diviser cette séquence en deux oligonucléotides F7-1 et F7-2. Il n'a pas été possible de visualiser la fixation de facteurs nucléaires dans les conditions expérimentales utilisées sur l'oligonucléotides F7-1, alors que, à partir de l'oligonucléotide F7-2, quatre complexes numérotés de 1 à 4 ont été mis en évidence (figure 28). Les complexes 1 et 3 semblent spécifiques de la séquence F7-2, car il n'y a pas de phénomène de compétition avec les oligonucléotides F4, F5 et F6 qui ont des séquences différentes, non apparentées à celle de F7-2. Par contre, les complexes 2 et 4 ne semblent pas spécifiques de cette séquence, car il y a compétition avec tous les oligonucléotides (F4, F7-1 et F8-1) utilisés comme compétiteur.

Oligonucléotide F7-1 : GATCCAGTAAATAGTTGTAGGTTGCA ° ° ° °
 ° ° ° ° GTCATTTATCAACATCCAACGTTCGA

Oligonucléotide F7-2 : GATCCACCCACATGCCGGCGGGCCAGAGCCA ° ° ° °
 ° ° ° ° GTGGGTGTACGGCCGCCCGGTCTCGGTTCGA

	1	2	3	4	5	6	7
Compétiteur		F7-2	F7-2	F7-2	F4	F5	F6
ng		0,5	10	100	100	100	100

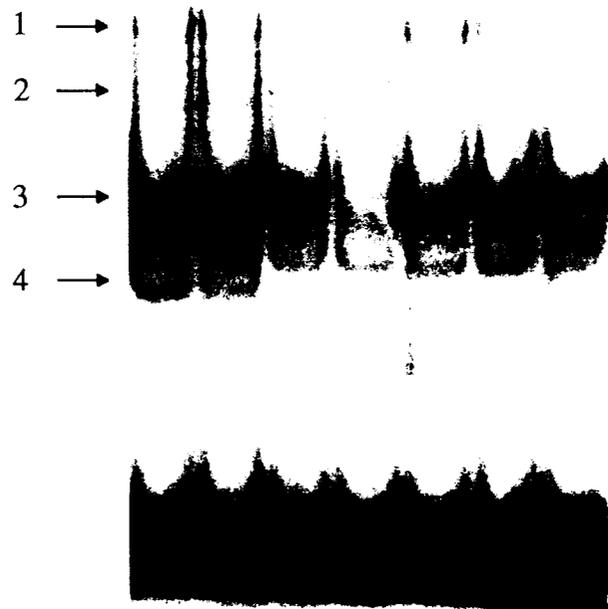


Figure 28 : Analyse par retard sur gel de l'oligonucléotide de la séquence F7-2. L'oligonucléotide marqué a été incubé avec de l'extrait de protéines nucléaires C5N, en présence de 3 μ g de poly(dIdC) et en présence ou en absence d'oligonucléotide compétiteur. L'analyse par retard sur gel de la séquence F7-1 n'a pas permis de visualiser la fixation de facteurs nucléaires dans les conditions expérimentales utilisées.

La séquence F9 couvre 15 pb des positions 719 à 723. Cette séquence n'est protégée contre l'action de la DNase I qu'avec les extraits de protéines nucléaires d'origine épithéliale ; en particulier, elle ne l'est ni avec les fibroblastes (STO), ni avec les cellules érythroleucémiques (M707/T) (figures 23, 24 et 25).

Les séquences F10 et F11 couvrent respectivement 27 pb des positions 767 à 793 et 33 pb des positions 831 à 863. Ces trois dernières séquences F9, F10 et F11 n'ont pas été étudiées en retard sur gel.

III.2 Analyse de la séquence F2

La séquence F2 couvre 44 pb, des positions 311 à 353 avec l'extrait de protéines nucléaires C5N et correspond probablement à la fixation de plusieurs facteurs nucléaires (figure 25). Le profil de protection de cette séquence F2 est différent avec l'extrait de protéines nucléaires RAW. En effet, la séquence protégée contre l'action de la DNase I avec l'extrait de protéines nucléaires RAW, est plus restreinte qu'avec l'extrait C5N (voir la figure 22). Ce résultat reflète probablement une différence d'expression dans les cellules C5N et RAW, des facteurs nucléaires se fixant sur F2. Il semblerait donc que l'un au moins des facteurs se fixant à la séquence F2 dans les cellules C5N est absent ou présent en plus faible quantité dans les cellules RAW. Cette séquence est peu conservée chez l'homme, sauf la séquence CATCAC correspondant à la partie centrale de la région protégée contre l'action de la DNase I. On peut également noter la présence de sept séquences CpG, qui peuvent être la cible de méthylations, pouvant jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle (Knust *et al.*, 1989).

Le profil en retard sur gel de cet oligonucléotide permet de visualiser, à partir d'extrait de protéines nucléaires C5N, deux complexes de mobilités différentes (figure 29). Il est intéressant de remarquer au niveau de la piste 2 de la figure 29, que l'oligonucléotide F2 n'est pas en compétition avec lui-même pour la fixation du complexe 1. Dans cette expérience, l'oligonucléotide F2 marqué fait 45 pb (en double brin sur toute la longueur), alors que

l'oligonucléotide compétiteur, qui résulte de l'appariement des deux oligonucléotides de synthèse possède 10 nucléotides non appariés de chaque côté. La piste 14 de la figure 29 montre la même expérience de compétition avec l'oligonucléotide compétiteur qui a été rendu double brin sur toute la longueur (réaction à l'enzyme de Klenow), de façon à rendre les deux oligonucléotides marqué et compétiteur identiques. Dans ce cas on remarque que la compétition est bien effective pour les deux complexes. Il semblerait d'après ces résultats, que la fixation du complexe 1 nécessite la présence des 10 pb de chaque côté des 25 pb centrales, alors que le complexe 2 ne nécessite que les 25 pb centrales. La fixation de ces complexes est spécifique, car les oligonucléotides des séquences F3, F4, F5, F6, F7-1, F8-1, α P2A et Sp1, non marqués et en excès (1000 fois), ne sont pas en compétition pour la fixation des complexes visualisés avec l'oligonucléotide F2 (figure 29). D'un autre côté, l'oligonucléotide F8-2 est en compétition avec la séquence F2 pour la fixation du complexe 1. D'ailleurs, le retard sur gel de l'oligonucléotide F8-2 permet de visualiser un complexe de mobilité identique au complexe 1 visualisé avec l'oligonucléotide F2 (figure 30). La séquence F8, possède une séquence répétée $\%_{\text{CCTCAG}}$ suivie d'une séquence GCGCCTCCAG. Ces expériences de compétitions suggèrent donc, qu'il s'agit du même complexe ou tout du moins de facteurs protéiques de la même famille. La comparaison entre les séquences F6 et F8-2 montre qu'il existe une séquence GCCTC que l'on retrouve dans les deux cas dans la partie 3' de la séquence protégée contre l'action de la DNase I. Par ailleurs, on remarque que l'oligonucléotide F7-2 est en compétition pour la fixation du complexe 1 au niveau des oligonucléotides F2 et F8-2 (figures 29 et 30). Les comparaisons des séquences F7-2 avec F2 et avec F8-2 ne montrent pas d'homologie de plus de quatre paires de bases dans les deux cas ; il est donc difficile d'expliquer ces phénomènes de compétition par des homologies de séquence entre ces oligonucléotides.

Oligonucléotide F8-2 : GATCCGGGTGGCCTCAGCCCTCAGGCGCCTCCAGTTA°°°°
 °°°°GCCACCGGCGTCGGGAGTCCGCGGAGGTCAATTCGA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Compétiteur		F2	F3	F4	F5	F6	F7-1	F7-2	F8-1	F8-2	αP2A	Sp1
ng										100		

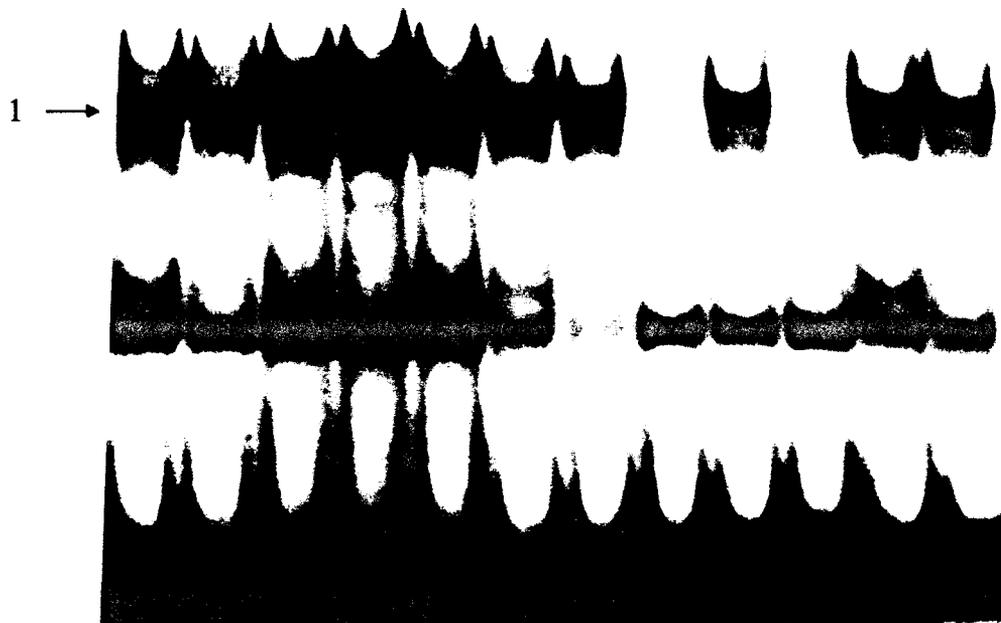


Figure 30 : Analyse par retard sur gel de l'oligonucléotide de la séquence F8-2. L'oligonucléotide marqué a été incubé avec de l'extrait de protéines nucléaires C5N, en présence de 3 μ g de poly(dIdC) et en présence ou en absence d'oligonucléotide compétiteur.

III.3 Analyse de la séquence F4.

La séquence F4 couvre 19 pb, des positions 440 à 458 (figure 25) et se trouve 60 pb, environ, en amont de la région d'homologie de séquence nucléotidique entre l'homme et la souris. La comparaison de séquence avec l'homme montre néanmoins, la présence du motif CCTCTGT conservé, alors que les séquences avoisinantes ne le sont pas. Cette séquence n'a pas pu être rapprochée à aucun site de fixation à un facteur de transcription déjà décrit dans la littérature.

Le profil en retard sur gel de l'oligonucléotide F4, permet de visualiser un complexe retardé de mobilité relativement élevée (figure 31). La fixation de ce complexe est spécifique car il n'y a pas de compétition avec les oligonucléotides F7-1, F7-2, PEA3, AP1 et Sp1 utilisés en excès, comme compétiteurs (figure 32). Par contre, l'oligonucléotide de la séquence F5 entre en compétition avec l'oligonucléotide F4 pour la fixation de ce complexe ; l'affinité semble toutefois supérieure pour l'oligonucléotide F4, comme le montre les expériences de compétition suivantes : 10 ng de l'oligonucléotide F4 sont suffisants pour abolir toute fixation du complexe au niveau de l'oligonucléotide marqué, alors que 50 ng de l'oligonucléotide F5 sont nécessaires pour obtenir le même résultat (figure 31). De plus, on peut remarquer que les deux séquences protégées contre l'action de la DNase I font toutes les deux 19 pb. L'analyse des séquences F4 et F5 montre que toutes les deux présentent une séquence polypyrimidique de 15 bases pour F4 et de 10 bases pour F5, avec notamment la conservation du motif CCCCCG/TCTG. Cette séquence polypyrimidique pourrait donc jouer un rôle dans la fixation du complexe que l'on retrouve au niveau des expériences de retard sur gel avec chacun des oligonucléotides F4 et F5.

Des oligonucléotides mutés de la séquence F4 ont été synthétisés afin de mieux caractériser les nucléotides impliqués dans la fixation du complexe.

Un oligonucléotide comportant cinq mutations, créant un site de restriction *Sac* II a été synthétisé (figure 31). Les mutations ont été choisies afin d'introduire des purines dans la séquence polypyrimidique, laquelle pourrait jouer un rôle dans la fixation du complexe

Oligonucléotide F4 : GATCCGCCGTTTTTTCCCCCCTCTGTGAA°°°°
°°°°GCGGCAAAAAGGGGGGAGACACTTTCTGA

Sac II

Oligonucléotide F4Sac : GATCCGCCGTTTTT**GCCCCGCGGAG**TGAA°°°°
°°°°GCGGCAAAAACGGGGG**CGCCT**CACTTTCTGA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Sonde	F4*										F4Sac*		
Compétiteur	F4				F5				F4Sac	F4	F4Sac		
ng	0,5	10	50	100	0,5	10	50	100	100		100	100	

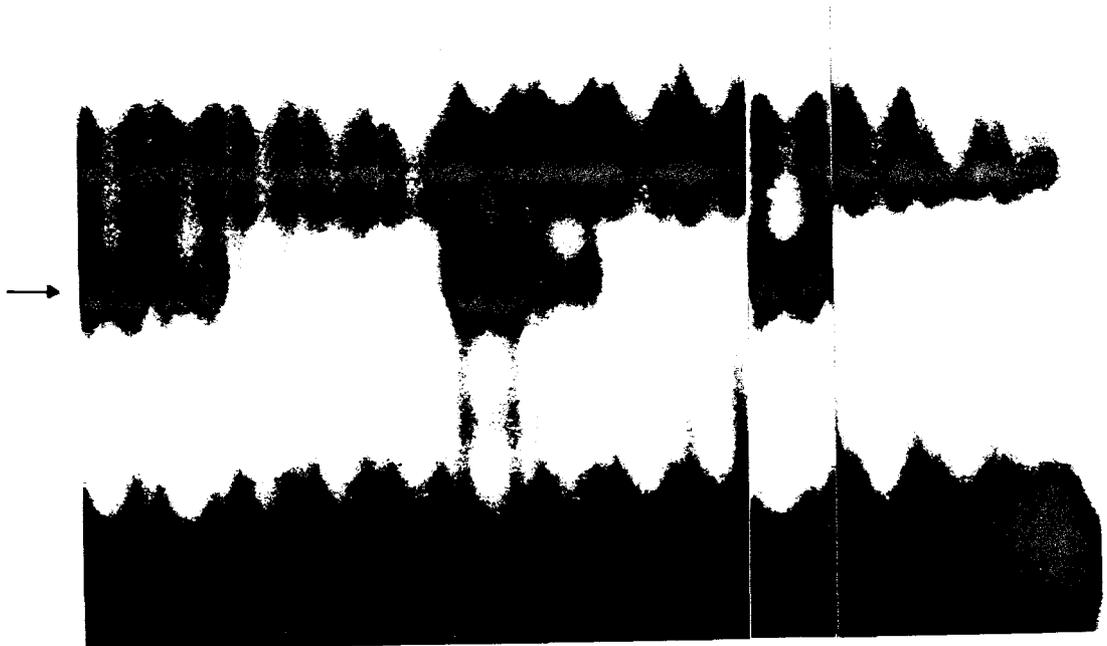


Figure 31 : Analyse par retard sur gel de l'oligonucléotide de la séquence F4 et de l'oligonucléotide muté F4Sac. Les oligonucléotides marqués ont été incubés avec de l'extrait de protéines nucléaires C5N, en présence de 3 μ g de poly(dIdC) et en présence ou en absence d'oligonucléotide compétiteur. Les mutations introduites dans la séquence F4 sont notées en gras. Le site de restriction créé dans l'oligonucléotide F4Sac est surligné.

Oligonucléotide F4 : GATCCGCCGTTTTTCCCCCCTCTGTGAA ° ° ° °
 ° ° ° ° GCGGCAAAAAGGGGGGAGACACTTTCGA

Xba I

Oligonucléotide F4Xba : GATCCGCCGTTTTTCCCCCCTCTAGATGAA ° ° ° °
 ° ° ° ° GCGGCAAAAAGGGGGGAGATCTACTTTCGA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sonde	F4*						F4Xba*					
Compétiteur	PEA3	AP1	Sp1		F7-1	F7-2	F4Xba			F4		
ng	100	100	100		100	100	0,5	10	100	0,5	10	



Figure 32 : Analyse par retard sur gel de l'oligonucléotide de la séquence F4 et de l'oligonucléotide muté F4Xba. Les oligonucléotides marqués ont été incubés avec de l'extrait de protéines nucléaires C5N, en présence de 3 μ g de poly(dIdC) et en présence ou en absence d'oligonucléotide compétiteur. Les mutations introduites dans la séquence F4 sont notées en gras. Le site de restriction créé dans l'oligonucléotide F4Xba est surligné. La bande visualisée correspond au même complexe protéique visualisé avec les oligonucléotides F4 et F4Xba. La différence apparente dans la position de la bande retardée par rapport à la sonde libre est due à des temps de migration différents pour les trois gels présentés sur cette figure.

protéique. L'oligonucléotide F4Sac ainsi créé perd toute aptitude à se fixer au complexe protéique, ainsi qu'à entrer en compétition avec l'oligonucléotide F4 pour la fixation du complexe sur la séquence sauvage (figure 31). Ces expériences semblent donc confirmer le rôle de la séquence polypyrimidique dans la fixation du complexe protéique visualisé avec l'oligonucléotide F4.

Un autre oligonucléotide comportant quatre mutations a été réalisé en introduisant un site de restriction *Xba* I dans la séquence F4 (figure 32). Le profil en retard sur gel de cet oligonucleotide appelé F4Xba montre que le complexe est toujours capable de se fixer sur cette séquence avec toutefois une affinité diminuée par rapport à la séquence sauvage. On peut remarquer que dans cet oligonucléotide F4Xba, il subsiste une séquence polypyrimidique de 13 bases. Ces résultats sont en accord avec le rôle que pourrait jouer la séquence polymiridique dans la fixation du complexe protéique nucléaire.

III.4 Analyse de la séquence F5.

La séquence F5 couvre 19 pb des positions 516 à 534 (figure 25). Cette séquence est localisée dans la partie 5' de la région d'homologie de séquence entre l'homme et la souris. Nous pouvons remarquer qu'on y retrouve une séquence polypyrimidique de 10 bases chez la souris et de 14 bases chez l'homme.

Les résultats obtenus en retard sur gel avec l'oligonucléotide F5 permettent de visualiser trois bandes numérotées de 1 à 3, correspondant à trois complexes protéiques. La fixation de ces trois complexes est spécifique. En effet, les oligonucléotides F7-1, F7-2, PEA3 et AP1 utilisés en excès, n'entrent pas en compétition pour la fixation de ces trois complexes (figure 33).

La mobilité du complexe correspondant à la bande 3 est identique à celle observée pour le complexe visualisé avec l'oligonucléotide F4. Il n'est pas étonnant de retrouver le même complexe se fixant au niveau des séquences F4 et F5 car nous avons déjà montré que l'oligonucléotide F5 est en compétition avec l'oligonucléotide F4 pour la fixation de ce

Oligonucléotide F5 : GATCCAGCCACCCTCCCCCGCTGCCA°°°°
 °°°°GTCGGTGGGAGGGGGGCGACGGTTCGA

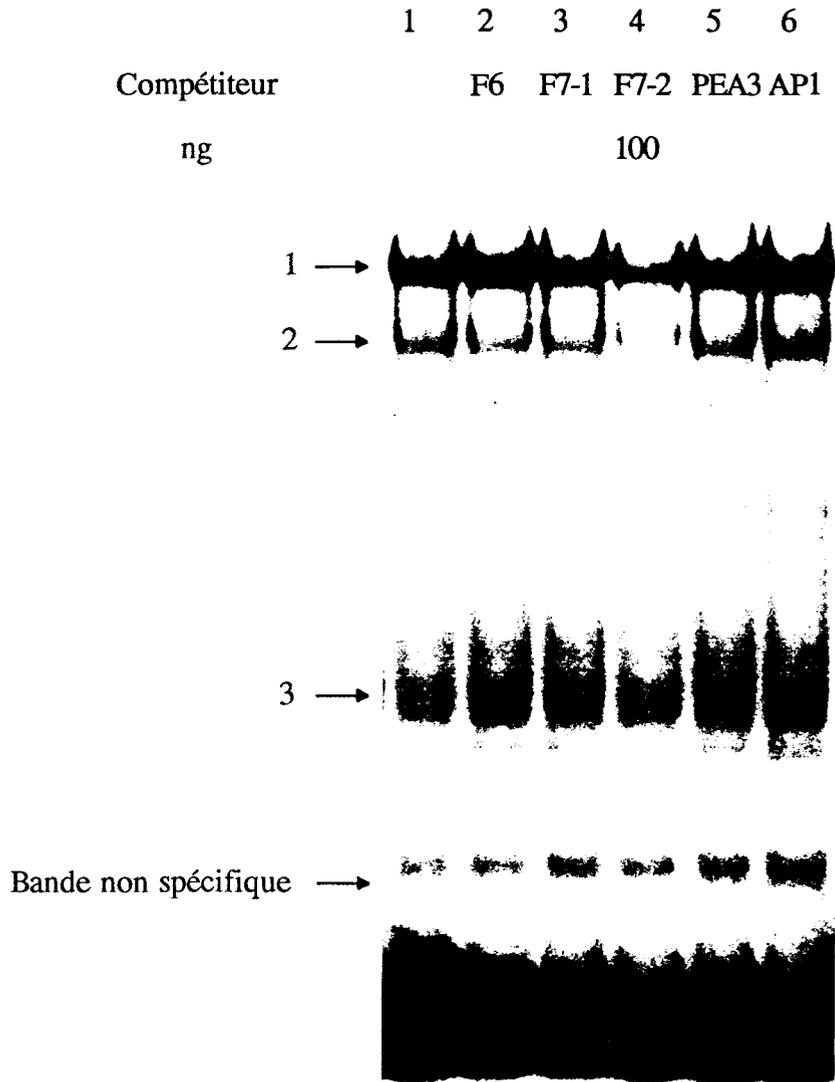


Figure 33 : Analyse par retard sur gel de l'oligonucléotide de la séquence F5. L'oligonucléotide marqué a été incubé avec de l'extrait de protéines nucléaires C5N, en présence de 3 μ g de poly(dIdC) et en présence ou en absence d'oligonucléotide compétiteur. Les trois complexes obtenus sont numérotés de 1 à 3, le complexe 1 ayant la plus faible mobilité dans le gel d'acrylamide et le 3 ayant la mobilité la plus grande.

complexe. La réciproque est également vraie puisque l'oligonucléotide F4 est en compétition pour la fixation du complexe 3 sur l'oligonucléotide F5 (figure 34). Ces expériences de compétition confirment ce qui a été observé précédemment, à savoir que l'affinité du complexe est plus grande pour F4 que pour F5 (figures 34) : en effet, 10 ng d'oligonucléotide F4 comme compétiteur sont suffisants pour empêcher toute fixation du complexe 3 sur l'oligonucléotide F5 marqué, alors que 50 ng de l'oligonucléotide F5 sont nécessaires pour obtenir le même résultat.

Les bandes 1 et 2 correspondent à des complexes de plus faible mobilité que le complexe de la bande 3. Les expériences de compétition ont révélé qu'un oligonucléotide d'une séquence de haute affinité pour la fixation du facteur de transcription Sp1 (Kadonaga et al., 1986) entre en compétition avec l'oligonucléotide F5 marqué pour la fixation de ces deux complexes. D'un autre côté, le retard sur gel de cet oligonucléotide Sp1 permet également de visualiser ces deux complexes (mais pas le complexe 3) (figure 35). On peut également remarquer que la séquence F4 n'est pas en compétition pour la fixation de ces deux complexes, montrant ainsi que la séquence de reconnaissance pour les complexes 1 et 2 est différente de celle pour le complexe 3.

Des oligonucléotides mutés de la séquence F5 ont été synthétisés, afin de déterminer quels sont les nucléotides importants pour la fixation des complexes. Cinq mutations ont été introduites dans la séquence de l'oligonucléotide F5Sac détruisant la séquence polypyrimidique (figure 34), ainsi que la séquence ayant la plus grande homologie avec les sites de fixation pour les facteurs de transcription Sp1 ou de la famille Sp1. Par ailleurs, les mutations ont été choisies de façon à créer un site de restriction *Sac* II. Les expériences de retard sur gel révèlent que l'oligonucléotide F5Sac a perdu toute aptitude à fixer les trois complexes étudiés et n'entre pas en compétition avec l'oligonucléotide F5 pour la fixation de ces complexes (résultats non montrés).

Les résultats décrits dans ce paragraphe mettent en évidence, à l'aide des techniques de protection contre l'action de la DNase I et de retard sur gel, l'existence de nombreux éléments dans le premier intron qui fixent des facteurs nucléaires ; en particulier, les

Oligonucléotide F5 : GATCCAGCCACCCTCCCCCGCTGCCA°°°°
 °°°°GTCGGTGGGAGGGGGGCGACGGTTCGA

Sac II

Oligonucléotide F5Sac : GATCCAGCCACC**CGCGGCCCGG**AGCCA°°°°
 °°°°GTCGGTGG**GGCGCCGGGCCT**CGGTTCGA

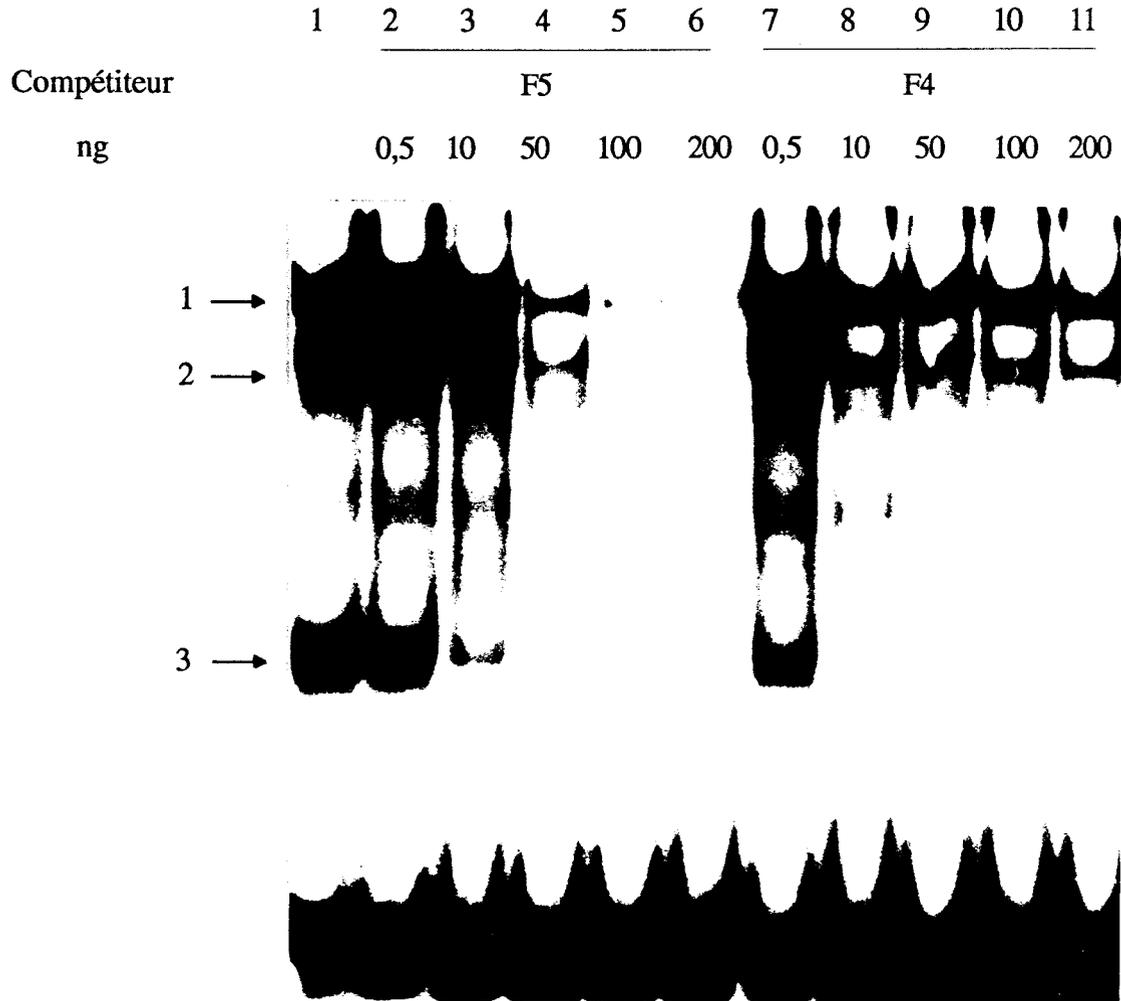


Figure 34 : Analyse par retard sur gel de l'oligonucléotide de la séquence F5. L'oligonucléotide marqué a été incubé avec de l'extrait de protéines nucléaires C5N, en présence de 3 μ g de poly(dIdC) et en présence ou en absence d'oligonucléotide compétiteur. Les trois complexes obtenus sont numérotés de 1 à 3, le complexe 1 ayant la plus faible mobilité dans le gel d'acrylamide et le 3 ayant la mobilité la plus grande. L'oligonucléotide muté F5Sac a perdu toute aptitude à fixer les trois complexes. Les mutations introduites dans la séquence F5 sont notées en gras et le site de restriction *Sac II* est surligné.

Oligonucléotide F5 : GATCCAGCCACCCTCCCCCGCTGCCA°°°°
 °°°°GTCGGTGGGAGGGGGGCGACGGTTCGA

Oligonucléotide Sp1 : GATCCGGGGCGGGGC°°°°°
 °°°°°CCCCGCCCGTCTAG

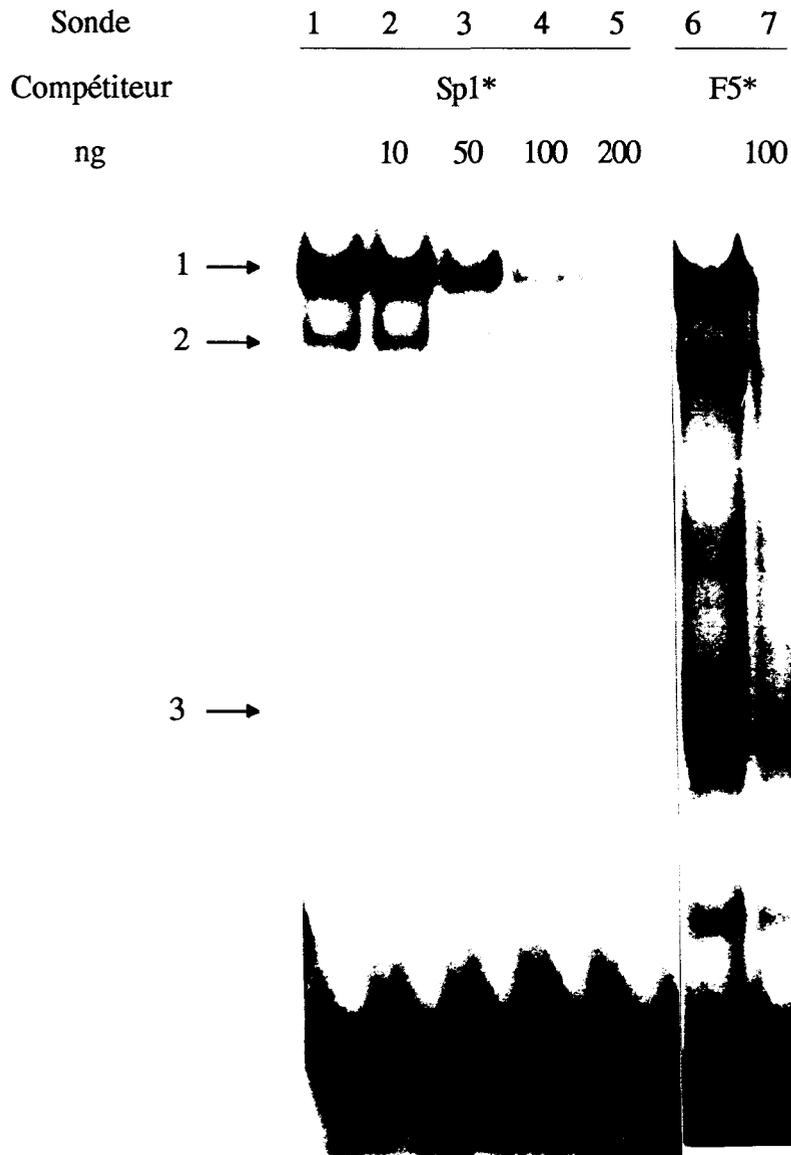


Figure 35 : Analyse par retard sur gel de l'oligonucléotide Sp1 et de l'oligonucléotide F5. Les oligonucléotides marqués ont été incubés avec de l'extrait de protéines nucléaires C5N, en présence de 3 μ g de poly(dIdC) et en présence ou en absence d'oligonucléotide compétiteur.

séquences F2, F4 et F5 localisées dans la partie 3' de la région intronique comprise entre les constructions pSras et pHras qui correspond à un élément de régulation positive.

Le but des expériences décrites dans le paragraphe suivant est de mettre en évidence le rôle de ces séquences, dans les effets fonctionnels observés.

IV. Analyse fonctionnelle des séquences F2, F4, F5 et F7.

Nous avons entrepris de muter les sites F4 et F5 par la technique de mutagenèse dirigée afin d'élucider leur rôle potentiel dans l'effet de type «*enhancer*» initialement observés avec la construction pHras. Pour obtenir des constructions mutées au niveau de ces sites, nous avons choisi d'utiliser la technique de PCR (voir matériels & méthodes). Cette technique présente plusieurs avantages. (i) L'obtention des mutants est plus rapide qu'avec les techniques classiques de mutagenèse dirigée. (ii) L'efficacité des mutations introduites dans les séquences F4 et F5 a pu être vérifiée en retard sur gel avec les oligonucléotides F4Sac et F5Sac (voir chapitre III). (iii) Une simple digestion par l'enzyme de restriction coupant dans le site *Sac* II permet de contrôler que les mutations choisies se retrouvent bien dans la séquence des constructions mutantes.

IV.1 Etude des séquences F4 et F5 par mutagenèse dirigée.

Les plasmides mutants de la construction pHras ont été analysés dans les mêmes lignées cellulaires que précédemment. Les résultats proviennent d'au moins trois expériences indépendantes et chaque plasmide mutant a fait l'objet de deux préparations indépendantes. Les valeurs obtenues dans les essais fonctionnels CAT ont été normalisées par rapport à l'efficacité de transfection, qui était déterminée par le test enzymatique de la β -Galactosidase.

La construction mutante pHM1 a été réalisée en introduisant les cinq mutations de l'oligonucléotide F4Sac, abolissant ainsi la fixation du complexe protéique initialement caractérisé (voir paragraphe III.3). L'activité CAT obtenue à partir de cette construction

pHM1, dans les lignées NIH 3T3 et C5N est 1,4 fois supérieure à celle de pHras (figures 36 et 37). Des résultats similaires ont été obtenus dans les autres lignées cellulaires utilisés : CarB, 3TDM1 et 17-S1-T984 (résultats non montrés). Nous savons qu'il existe un élément de type «*enhancer*» en amont du site *Sph* I dans la région intronique comprise entre pSras et pHras. Ces résultats montrent donc que la séquence F4 n'est pas responsable de l'effet de type «*enhancer*», car l'inactivation de la séquence F4 ne s'accompagne pas d'une perte de l'effet de type «*enhancer*», mais au contraire d'une légère augmentation de l'activité de la construction mutante.

La construction mutante pHM2 a été réalisée en introduisant les mutations de l'oligonucléotide F5Sac, abolissant ainsi la fixation des trois complexes protéiques initialement caractérisés (voir paragraphe III.4). L'activité CAT obtenue à partir de cette construction pHM2 est 20 fois inférieure à celle de pHras dans la lignée NIH 3T3 et 25 fois inférieure à celle de pHras dans la lignée C5N (figures 36 et 37). Des résultats similaires ont été obtenus dans les autres lignées cellulaires étudiées : Car B, 3TDM1 et 17-S1-T984 (résultats non montrés). Ces résultats montrent que la séquence F5 semble jouer un rôle dans l'effet de type «*enhancer*» mis en évidence au niveau de la construction pHras. En effet, l'activité de type «*enhancer*» est complètement abolie au niveau du mutant pHM2. L'activité CAT obtenue avec pHM2 est même inférieure, d'environ 4 fois, à l'activité obtenue avec la construction pSras. Nous reviendrons plus en détail sur cette observation ultérieurement.

La construction mutante pHM1-2 a été réalisée en combinant les mutations des constructions pHM1 et pHM2, au niveau des séquences F4 et F5. L'analyse fonctionnelle de ce double mutant, révèle une activité CAT 1,6 fois supérieure à celle de pHras, dans la lignée NIH 3T3 et 1,75 fois supérieure à celle de pHras dans la lignée C5N (figures 36 et 37). Des résultats similaires ont également été obtenus à partir des autres lignées cellulaires étudiées : Car B, 3TDM1 et 17-S1-T984 (résultats non montrés).

Ces résultats amènent certains commentaires.

Le double mutant pHM1-2 présente une activité supérieure à celle de la construction pSras et également supérieure à celle de la construction initiale pHras. Ces résultats révèlent

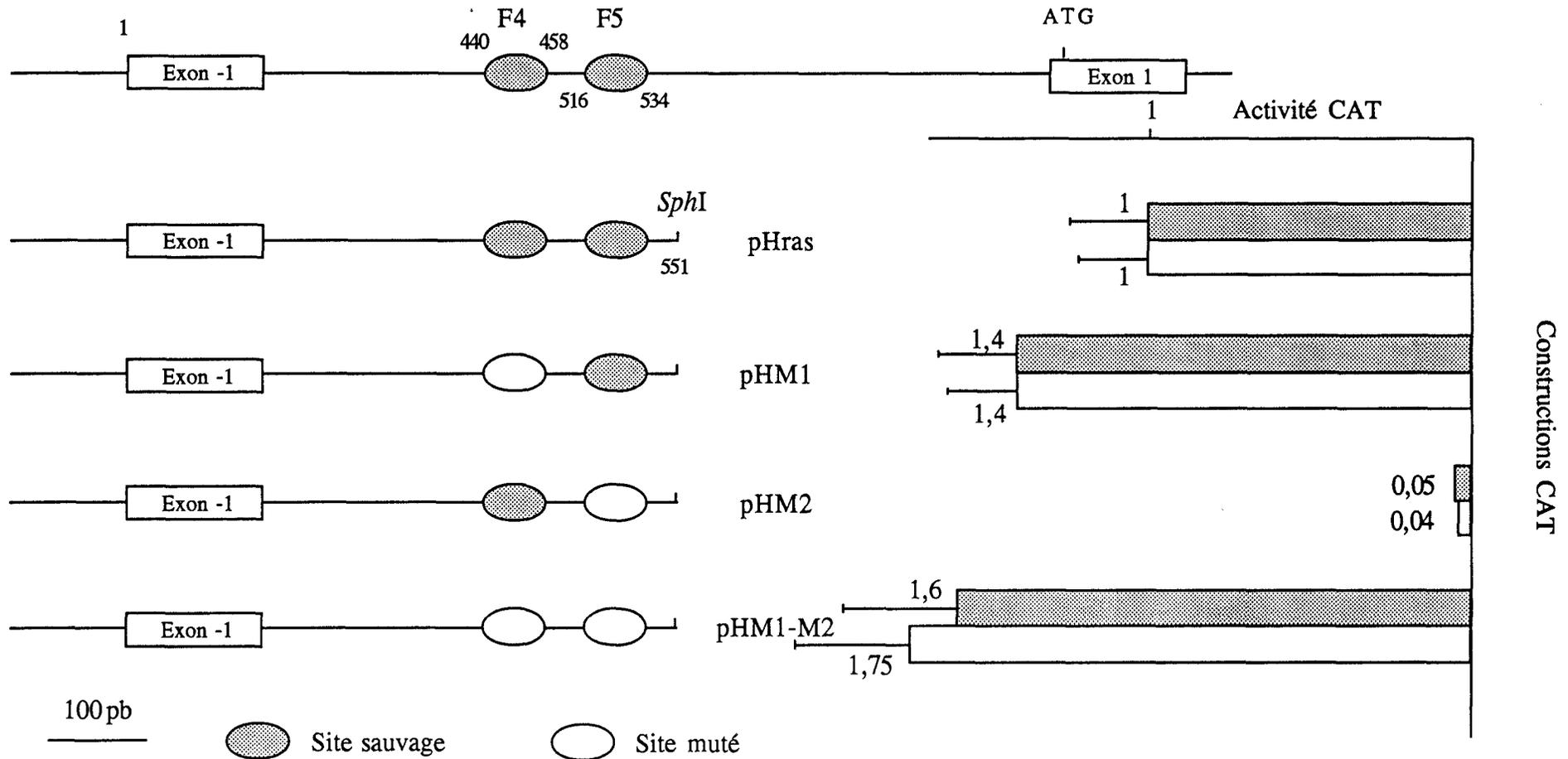


Figure 36 : Constructions mutantes de pHras et essais fonctionnels CAT. Ces constructions plasmidiques ont été analysées par essais fonctionnels CAT dans les cellules NIH 3T3 (surfaces grises) et dans les cellules C5N (surfaces blanches). Le pourcentage d'acétylation obtenu à partir de la construction pHras est utilisé comme référence, égale à 1, pour la comparaison avec les activités CAT obtenues à partir des constructions mutantes. Ces activités CAT sont comparées à l'intérieure d'une lignée cellulaire et la valeur CAT de pHras n'est pas la même dans la lignée NIH 3T3 que dans la lignée C5N.

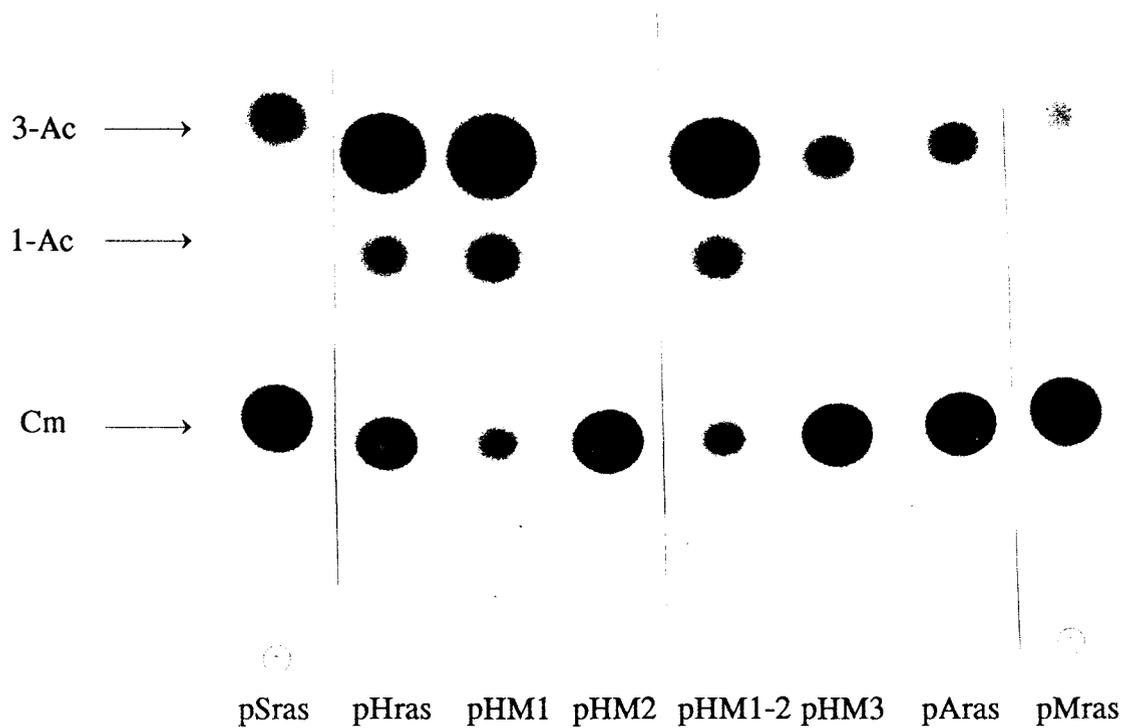


Figure 37 : Autoradiographie d'un essai fonctionnel CAT réalisé à partir de lysats de cellules NIH 3T3 préalablement transfectées avec les différentes constructions plasmidiques testées. Signification des abréviations : Cm, chloramphénicol (sous forme libre) ; 1-Ac, chloramphénicol acétylé sur le carbone 1 ; 3-Ac, chloramphénicol acétylé sur le carbone 3. Les deux formes acétylées du chloramphénicol ont des propriétés de migration différentes par rapport à la forme non acétylée ainsi qu'entre-elles, d'où la séparation de ces trois formes lors de la chromatographie. Il peut également apparaître dans certains cas une quatrième forme ayant une mobilité supérieure, correspondant à l'acétylation sur les carbones 1 et 3 du chloramphénicol. Cette forme n'est pas visualisée dans cette expérience.

donc l'existence d'une activité de type «*enhancer*» dans la séquence intronique comprise entre pSras et pHras, indépendante des deux sites F4 et F5 qui sont inactivés. D'après l'étude de protection contre l'action de la DNase I, il existe trois sites potentiels; F1, F2 et F3, localisés en amont de F4 et F5 qui pourraient être responsables de cette activité de type «*enhancer*». De plus, cette comparaison montre que l'effet résultant de l'action des séquences F4 et F5 est de type «*silencer*».

D'autre part, les résultats obtenus avec les mutants pHM2 et pHM1-2 montrent que la mutation de la séquence F4 s'accompagne d'une augmentation de l'activité d'un facteur 32 dans les cellules NIH 3T3 et d'un facteur 44 dans les cellules C5N (figures 36 et 37). Ces résultats montrent que la séquence F4 semble avoir une fonction de type «*silencer*» puissante qui est mise en évidence lorsque le site F5 est muté. Ces observations sont en accord avec le fait que la mutation du site F4 dans le mutant pHM1 s'accompagne d'une légère augmentation d'activité par rapport à la construction pHras. De plus, l'activité du mutant pHM2 est inférieure à celle de pSras (4 fois), montrant que l'activité de type «*silencer*» attribuée à la séquence F4 est prédominante lorsque la séquence F5 est mutée. La séquence F5 semble donc contrôler ou inhiber l'activité de la séquence F4.

IV.2 Etude de la séquence F2 par délétion.

Les essais fonctionnels réalisés à partir de la construction pHM3, où la séquence F2 est délétée, dans les cellules NIH 3T3, montrent que l'activité CAT est 5,3 fois inférieure à celle obtenue à partir de la construction initiale pHras, et égale à celle obtenue à partir de la construction pSras (figure 38). Dans la lignée C5N, le mutant pHM3 montre une activité CAT 6,2 fois inférieure à celle de pHras, ce qui correspond à une activité de 0,85 comparée à celle de pSras (figure 38). Des résultats similaires ont été obtenus dans les autres lignées cellulaires étudiées (résultats non montrés).

Ces résultats montrent que le site F2 est nécessaire pour l'effet de type «*enhancer*» mis en évidence avec la construction pHras. Par ailleurs, les séquences F4 et F5 ne semblent pas

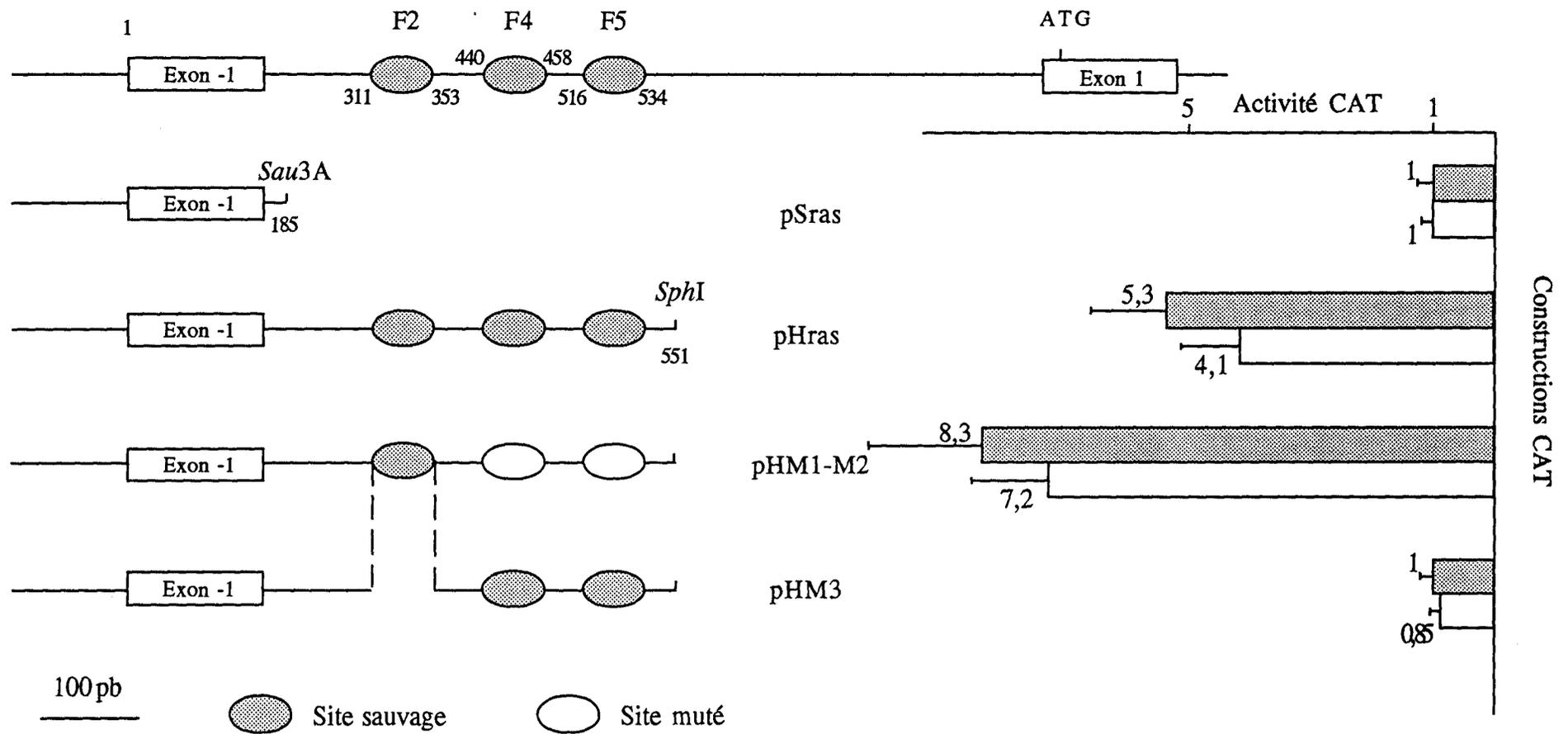


Figure 38 : Analyse fonctionnelle CAT des constructions pSras, pHras et des deux mutants pHM1-2 et pHM3 dans les cellules NIH 3T3 (surfaces grises) et dans les cellules C5N (surfaces blanches). Le pourcentage d'acétylation obtenu à partir de la construction pSras est utilisé comme référence, égale à 1, pour la comparaison avec les activités CAT obtenues à partir des autres constructions. Ces activités CAT sont comparées à l'intérieure d'une lignée cellulaire et la valeur CAT de pSras n'est pas la même dans la lignée NIH 3T3 que dans la lignée C5N.

avoir d'influence sur l'activité de la construction pHM3, dont l'activité est du même ordre de grandeur que celle de pSras. Il semblerait donc que les séquences F4 et F5 ont des activités régulatrices antagonistes et qu'il existe une activité de type «*enhancer*» impliquant la séquence F2, indépendante des séquences F4 et F5.

IV.3 Analyse de la séquence F7 dans la construction pAras.

La construction pAras a permis de mettre en évidence un élément de régulation négative dans la région intronique comprise entre pHras et pAras (voir paragraphe II.2). Il existe trois séquences protégées contre l'action de la DNase I, qui pourraient être impliquées dans cet effet ; les séquences F6, F7 et la partie 5' de F8. Nous avons choisi dans un premier temps d'étudier la séquence F7. La construction mutante pAM4 a donc été réalisée en délétant le site F7 dans le plasmide pAras grâce à la technique de PCR. L'activité CAT obtenue à partir de ce plasmide est d'environ 50% inférieure à celle de la construction pAras, dans toutes les expériences effectuées et dans toutes les lignées cellulaires utilisées (résultats non représentés). Ces résultats montrent que la séquence F7 n'est pas impliquée dans une fonction de régulation négative, puisque l'inactivation de ce site s'accompagne d'une diminution d'activité. La séquence F7 semble donc plutôt être un élément de régulation positive. Néanmoins, nous pouvons penser que la séquence F6 ou la partie 5' de la séquence F8, sont responsables de l'effet de type «*silencer*» observé entre pHras et pAras.

DISCUSSION

I. Rôle du promoteur dans la régulation transcriptionnelle du gène *Ha-ras* de souris.

Une des approches que nous avons effectuée pour étudier la régulation transcriptionnelle du gène *Ha-ras* de souris consiste en la caractérisation des séquences promotrices interagissant avec des facteurs protéiques nucléaires. Dans la discussion suivante, nous comparerons nos résultats avec ceux obtenus pour le promoteur du gène *Ha-ras* humain.

Dans ce travail mené en collaboration avec le groupe d'A. Balmain et de M. Plumb, nous avons mis en évidence l'existence d'un site d'hypersensibilité aux DNases au niveau du promoteur du gène *Ha-ras* de souris montrant que celui-ci adopte une conformation accessible aux facteurs de transcription dans les noyaux des cellules de tous les tissus étudiés (Plumb *et al.*, 1991). Ces résultats sont en accord avec les observations montrant que le gène *Ha-ras* est transcrit dans pratiquement tous les tissus étudiés de la souris et au cours de tous les stades du développement (Muller R. *et al.*, 1983). Par ailleurs, la richesse du promoteur en bases G et C, en dinucléotides CpG et GpC, ainsi que l'existence de plusieurs sites de fixation pour le facteur de transcription Sp1 suggère que le promoteur du gène *Ha-ras* de souris est situé au niveau d'un «îlot HTF» (HTF signifiant *Hpa II tiny fragment*) (Bird, 1986), comme les promoteurs des gènes *Ha-ras* chez l'homme et le rat (Damante *et al.*, 1987 ; Ishii *et al.*, 1985). Ces îlots HTF sont également appelés «îlots CpG» car la fréquence en dinucléotides CpG, dans ces séquences, correspond ou est supérieure à la fréquence attendue d'après la composition en base de la séquence. Les îlots HTF/CpG, identifiés selon ces critères, sont associés à des gènes et en particulier aux régions où démarre la transcription.

L'analyse de 350 pb environ (250 pb en amont du premier site d'initiation de la transcription et 100 pb en aval) de la région promotrice du gène *Ha-ras* de souris a permis de mettre en évidence cinq sites de fixation à des facteurs nucléaires, notés A, B, C, D et E (figure 9). Quatre d'entre-eux (sites A, B, D et E), sont riches en bases G et C, et deux (sites B et D) possèdent la séquence consensus GGGCGGG, de fixation au facteur de transcription Sp1. De plus, le site D possède également une séquence GGGCGTGGG en 5' qui semble également fixer un facteur Sp1 ou de la famille Sp1 *in vitro*. Les protéines se fixant sur ces

quatre sites A, B, D et E entrent en compétition avec un oligonucléotide contenant une séquence de haute affinité pour la fixation de Sp1, suggérant que ces facteurs sont en fait Sp1 ou de la famille Sp1 (figure 9). Des résultats similaires ont été obtenus avec le promoteur du gène *Ha-ras* humain où six sites de fixation au facteur Sp1 ont été identifiés (Ishii *et al.*, 1986). Il existe des variations de séquence dans les sites de fixation au facteur Sp1 dans le promoteur du gène *Ha-ras* mais ils sont tous très proches de la séquence consensus décanucléotidique de fixation à Sp1 : G/T G/A GGCG G/T G/A G/A C/T (Briggs *et al.*, 1986).

Il existe un doute en ce qui concerne le site principal d'initiation de la transcription au niveau du gène *Ha-ras* humain, car Ishii et ses collaborateurs (1986) ainsi que Honkawa et ses collaborateurs (1987) ne trouvent pas les sites d'initiation de la transcription aux mêmes positions. En effet, le premier site d'initiation de la transcription décrit par Ishii et ses collaborateurs (1986) se trouve 241 pb en aval de celui décrit par Honkawa et ses collaborateurs (1987). Les expériences de protection contre l'action de la DNase I réalisées par Ishii et ses collaborateurs (1986) ont permis de mettre en évidence six sites interagissant avec le facteur de transcription Sp1. La comparaison des positions de ces sites avec ceux que nous avons obtenu au niveau du gène *Ha-ras* de souris (figure 39) montre qu'il existe une divergence quant au nombre et à la position de ces sites par rapport aux premiers sites d'initiation de la transcription respectifs (celui décrit par Ishii dans le cas du gène humain).

Les promoteurs des gènes *Ha-ras* humain (Lowndes *et al.*, 1989 ; Ishii *et al.*, 1986) et de souris (Brown *et al.*, 1988) possèdent un motif CCAAT, mais pas de motif TATA. Dans nos expériences, il n'a pas été possible de visualiser de façon reproductible une protection contre l'action de la DNase I au niveau du motif CCAAT, bien que les extraits utilisés aient permis de visualiser la fixation du facteur CTF/NF1 sur le motif CCAAT du gène de l' α -globine de souris (résultats non montrés). Toutefois, nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité que le facteur CTF/NF1 purifié puisse fixer le motif CCAAT du gène *Ha-ras* de souris car Jones et ses collaborateurs (1987) ont pu montrer la fixation du facteur CTF/NF1, en le purifiant, au niveau du motif CCAAT du gène *Ha-ras* chez l'homme. Par ailleurs, si l'on considère la position des motifs CAAT par rapport au premier site d'initiation de la

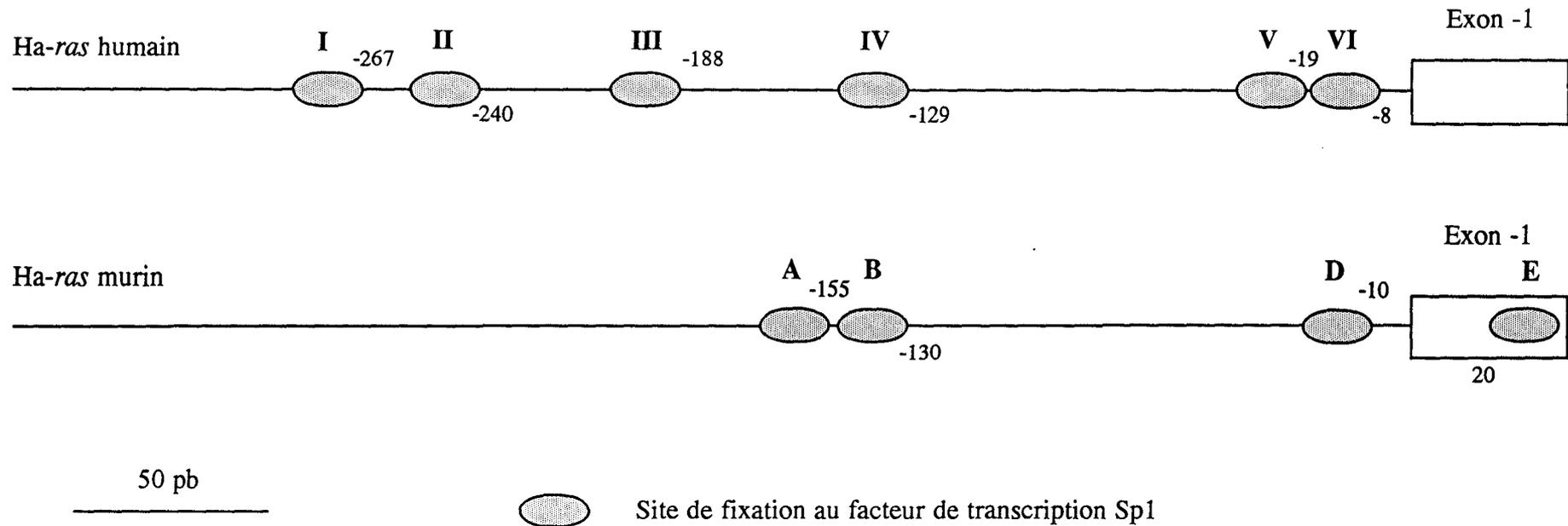


Figure 39 : Positions des sites fixant le facteur de transcription Sp1 déterminés par des expériences de protection contre l'action de la DNase I, au niveau des promoteurs Ha-*ras* humain (Ishii *et al.*, 1986) et murin (Plumb *et al.*, 1991). Dans les deux cas, les positions de ces sites sont données par rapport au premier site d'initiation de la transcription.

transcription, on peut remarquer qu'il est localisé à environ -70 pb chez la souris et à environ -170 pb chez l'homme. Or, la distance d'une boîte CAAT fonctionnelle est généralement 70 à 90 pb en amont du site d'initiation de la transcription (Efstratiadis *et al.*, 1980). D'après ce critère, le motif CAAT est à une position favorable pour qu'il soit fonctionnel chez la souris mais pas chez l'homme.

Des études récentes ont montré que la surexpression du gène *Ha-ras* est associée au développement de certaines tumeurs, suggérant qu'en plus des mutations dans les séquences codantes, la dérégulation de l'expression de *Ha-ras* semble être un facteur important dans le développement de certains cancers. La plupart de ces études ont été effectuées par des techniques histochimiques pour estimer le taux d'expression des protéines Ras dans des tissus normaux ou malins (Slamon *et al.*, 1984 ; Gallick *et al.*, 1985 ; DeBiasi *et al.*, 1989). Quoi qu'il en soit, il existe également des évidences pour une altération de l'expression au niveau des ARNm soit de la forme normale, soit de la forme mutée des gènes *ras*. Par exemple, Capon et ses collaborateurs (1983b) ont montré au niveau d'une lignée cellulaire d'un carcinome du colon ayant une mutation hétérozygote dans le gène *Ki-ras*, que l'allèle muté est surexprimé par rapport à l'allèle normal. D'une manière similaire, les papillomes de la peau de souris montrent fréquemment une expression élevée des ARNm correspondant à l'allèle muté par rapport à celle correspondant à l'allèle normal dans l'épiderme normal (Balmain *et al.*, 1984 ; Pelling *et al.*, 1986). Des résultats plus récents obtenus dans le laboratoire d'Allan Balmain, indiquent que la surexpression des allèles mutés augmente lors de la progression des tumeurs bénignes vers les carcinomes malins. De plus, les changements dans le taux d'expression des gènes *Ha-ras* ne peuvent s'expliquer uniquement par une augmentation dans le nombre de copies du gène *Ha-ras* dans ces tumeurs (Bremmer & Balmain, 1990). L'ensemble de ces résultats indique que des changements dans le contrôle de l'expression des allèles *ras* normal ou muté peuvent jouer un rôle important dans la progression maligne.

Une analyse préliminaire de la région 5' du gène *Ha-ras* de souris par Brown et ses Collaborateurs (1988) a permis de mettre en évidence la présence d'une région de forte

homologie, entre l'homme et la souris, localisée dans le premier intron ou intron 0. En effet, il existe une séquence de 272 pb conservée à 76% entre ces deux espèces. La conservation de cette séquence, au cours de l'évolution, peut laisser supposer un rôle important de celle-ci dans la régulation de l'expression du gène *Ha-ras*. D'autre part, une étude de l'activité promotrice de la région 5' du gène *Ha-ras* humain a permis de mettre en évidence des éléments de régulation positifs et négatifs au niveau du premier intron (Honkawa *et al.*, 1987). Ces différentes observations, nous ont amené par différentes approches à étudier le rôle potentiel de l'intron 0 dans la régulation transcriptionnelle du gène *Ha-ras* de souris.

II. Rôle de l'intron 0 dans la régulation transcriptionnelle du gène *Ha-ras* de souris.

Afin de mettre en évidence l'existence d'éléments de régulation transcriptionnelle au niveau du premier intron, des constructions ont été réalisées avec différents fragments de la région 5' du gène *Ha-ras* contrôlant l'expression du gène reporteur CAT. Les fragments du gène *Ha-ras* utilisés possèdent tous la même extrémité 5', contenant le promoteur, mais présentent différentes délétions de la partie 3' de l'intron 0 de ce gène. Les essais fonctionnels en expression transitoire, réalisés à partir de ces constructions, ont permis de mettre en évidence des éléments influençant de façon positive ou négative l'activité du promoteur. En effet, la comparaison des activités CAT des différentes constructions met en évidence d'une part, une activité de type «*enhancer*» dans la partie 5' du premier intron, entre les positions +185 et +550, et d'autre part, la présence de deux éléments de type «*silencer*», localisés dans la région intronique comprise entre +550 et +695, ainsi que dans la région intronique comprise entre +695 et +886 (figure 40).

Une autre approche fonctionnelle, à partir de vecteurs dérivant du plasmide pTK a été réalisée afin de mettre en évidence l'influence de l'intron 0 et plus particulièrement de la région d'homologie, sur l'activité promotrice d'un promoteur hétérologue (en l'occurrence celui du gène de la thymidine kinase (TK)). Nous avons pu montrer qu'une séquence de 472 pb de l'intron 0, contenant la région d'homologie, clonée à proximité du promoteur TK, a

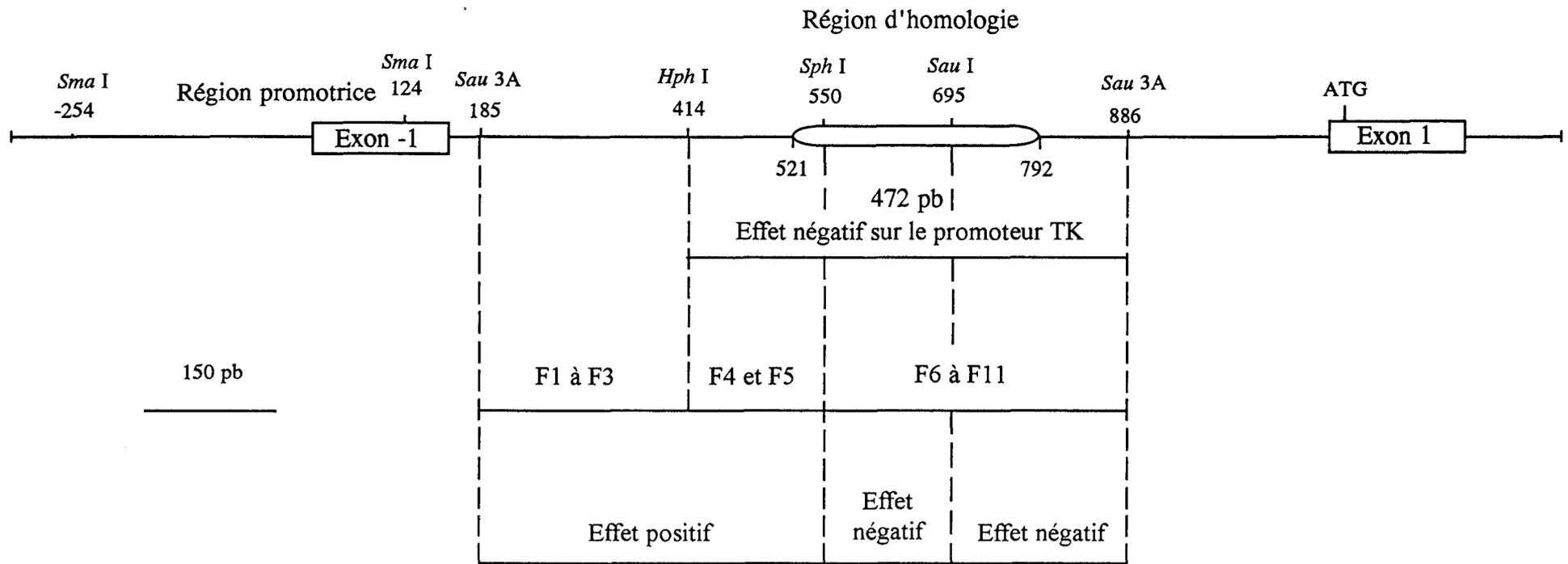


Figure 40 : Schéma récapitulatif positionnant les régions de l'intron 0 du gène Ha-*ras* de souris ayant des effets positifs ou négatifs sur l'activité du promoteur Ha-*ras* ou TK, ainsi que les séquences (F1 à F11) interagissant avec des facteurs protéiques nucléaires mises en évidence par la technique de protection contre l'action de la DNase I.

pour effet de diminuer l'activité de ce promoteur. Il est à remarquer que ce fragment de 472 pb contient la totalité de la région intronique où il a été mis en évidence l'existence d'éléments de type «*silencer*». De plus, ce fragment ne possède qu'une partie de la région intronique où a été mis en évidence l'existence d'un élément de type «*enhancer*» et surtout, il ne contient pas le site F2 qui semble être essentiel pour cette activité de type «*enhancer*». Il est donc possible que ce fragment ne contienne pas l'élément responsable de l'activité de type «*enhancer*» alors qu'il contient ceux de type «*silencer*» (figure 40). Ceci pourrait expliquer son influence négative sur l'activité du promoteur TK.

Les résultats des essais fonctionnels obtenus à partir de ces approches, caractérisant le rôle de l'intron 0 dans la régulation transcriptionnelle, amènent certains commentaires.

- Ces essais fonctionnels confirment l'hypothèse initiale quant au rôle de l'intron 0 sur l'activité du promoteur du gène *Ha-ras* de souris.
- La régulation au niveau de cet intron présente une certaine complexité. En effet, bien que l'effet global de l'intron 0 soit de type «*silencer*», nous avons pu mettre en évidence trois éléments distincts influençant l'activité promotrice de façon positive pour l'un et de façon négative pour les deux autres. Ainsi, l'influence de l'intron 0 sur la transcription du promoteur *Ha-ras* correspond à la somme des effets de plusieurs éléments : un élément de type «*enhancer*», dont l'action semble être inhibée par deux éléments de type «*silencer*», localisés en aval de celui-ci (figure 40).

Des éléments introniques de ce type régulant le taux d'expression ont déjà été mis en évidence au niveau du premier intron d'autres gènes. Ainsi, Bornstein et ses collaborateurs (1987) ont mis en évidence des éléments régulant positivement et négativement la transcription du gène de l' $\alpha 1(I)$ collagène humain par les mêmes techniques que celles que nous avons employées. De la même manière, l'existence d'un élément positif ayant une spécificité tissulaire a été mis en évidence dans le premier intron du gène du PDGF- β humain (Franklin *et al.*, 1991). des éléments régulant la transcription de façon positive et négative, localisés dans le premier intron du gène de la $\beta 3$ tubuline ont également été découverts (Bruhat *et al.*, 1990). Ces auteurs ont montré que les éléments négatifs répriment la transcription en

absence de l'hormone stéroïde 20-hydroxyecdysone. Le dernier exemple que je citerai est celui du gène de la chaîne lourde 4F2 qui contient un élément *enhancer* dans le premier intron qui interagit avec deux facteurs nucléaires (Karpinski *et al.*, 1989).

Par ailleurs, des éléments de type «*silencer*» réduisant l'activité promotrice ont déjà été décrits dans certains gènes de levure (Brand *et al.*, 1985) ou de mammifères, comme les gènes du lysozyme de poulet (Baniahmad *et al.*, 1987), de l'albumine de souris (Herbst *et al.*, 1990), de l' α -foetoprotéine de rat (Muglia & Rothman-Denes, 1986), de *c-myc* (Remmers *et al.*, 1986), de la transferrine (Schaeffer *et al.*, 1989) et du récepteur α T (Winoto & Baltimore, 1989).

Afin de conforter nos résultats, nous avons entrepris de caractériser les séquences fixant des facteurs nucléaires responsables des différents effets fonctionnels observés.

III. L'intron 0 possède des séquences, fixant des facteurs nucléaires, impliquées dans la régulation transcriptionnelle du gène *Ha-ras* de souris.

L'analyse de l'intron 0 par la technique de protection contre l'action de la DNase I, à partir d'extraits de protéines nucléaires de lignées épithéliales (C5N, PDV, PDVC57, SN161), d'une lignée fibroblastique (STO), de macrophages (RAW) et d'une lignée érythroleucémique (M707/T), a permis de mettre en évidence 11 séquences fixant des facteurs protéiques nucléaires, notées de F1 à F11. En effet, les deux sondes utilisées couvrent la presque totalité de l'intron 0, et permettent de visualiser la fixation de facteurs nucléaires le long d'une séquence de 701 pb des 855 pb que comporte l'intron 0, ces sondes ne couvrant pas les 37 pb en amont et les 117 pb en aval. Les quatre séquences, F1, F2, F3 et F4, ainsi que la séquence F11 sont localisées respectivement en amont et en aval de la région d'homologie de séquence, entre l'homme et la souris, décrite par Brown et ses collaborateurs (1988). Les séquences de F5 à F10 sont localisées dans la région d'homologie. Cette classification des séquences protégées contre l'action de la DNase I, en fonction de leur localisation par rapport à la région d'homologie, ne semble pas être l'observation la plus

la transcription du gène *N-myc* de poulet. En effet, Lobanenkov et ses collaborateurs (1990) ont mis en évidence l'existence d'une séquence, contenant trois motifs CCCTC espacés par 7 et 8 nucléotides, qui fixe le facteur de transcription Sp1 ainsi qu'un autre facteur nommé CTCF. Ces auteurs ont montré que lorsqu'ils retirent un fragment de 110 pb contenant la séquence interagissant avec CTCF et Sp1 il y a une augmentation de 4 à 8 fois de la transcription, montrant que cette région contient un élément de régulation négative. Ces auteurs n'ont pas encore montré si le facteur CTCF est bien responsable de l'effet négatif. Pour ce faire, il faudrait dans leur cas, comme dans le notre, pouvoir distinguer quelles sont les bases requises pour la fixation des différents facteurs au niveau d'une même séquence, afin de pouvoir réaliser des expériences de mutagenèse dirigée qui permettent d'abolir de façon spécifique la fixation d'un seul facteur à la fois et de voir quelle est la répercussion au niveau fonctionnel de cette perte de reconnaissance.

La délétion de la séquence F2 au niveau du mutant pHM3 a pour effet d'abolir l'effet de type «*enhancer*» au niveau de la construction pHRas. Ce résultat montre que la séquence F2 est nécessaire pour cette activité de type «*enhancer*». D'après les résultats obtenus précédemment, il semblerait donc que l'activité de F2 puisse être inhibée ou compensée par la séquence F4 au niveau du mutant pHM2, par un mécanisme qui n'est pas connu.

Ayant obtenu ces résultats, il est intéressant de les comparer avec ceux obtenus par Honkawa et ses collaborateurs (1987), au niveau du premier intron du gène *Ha-ras* humain. En effet, ces auteurs ont montré par des délétions dans la région 3' du premier intron qu'il existe des éléments dans cet intron ayant des effets positifs ou négatifs sur l'effet transformant de l'oncogène *Ha-ras* (figure 41). Leurs expériences montrent que l'effet positif ou négatif observé semble résulter de l'action prédominante de l'élément localisé le plus en aval dans la construction. Or, les résultats que nous avons obtenu semblent en accord avec ces observations. En effet, les constructions pH et pHM1-2 qui montrent des activités élevées, possèdent un élément positif le plus en aval dans l'intron, alors que la construction pHM1 qui possède un élément de régulation négative le plus en aval, montre une activité beaucoup plus faible.

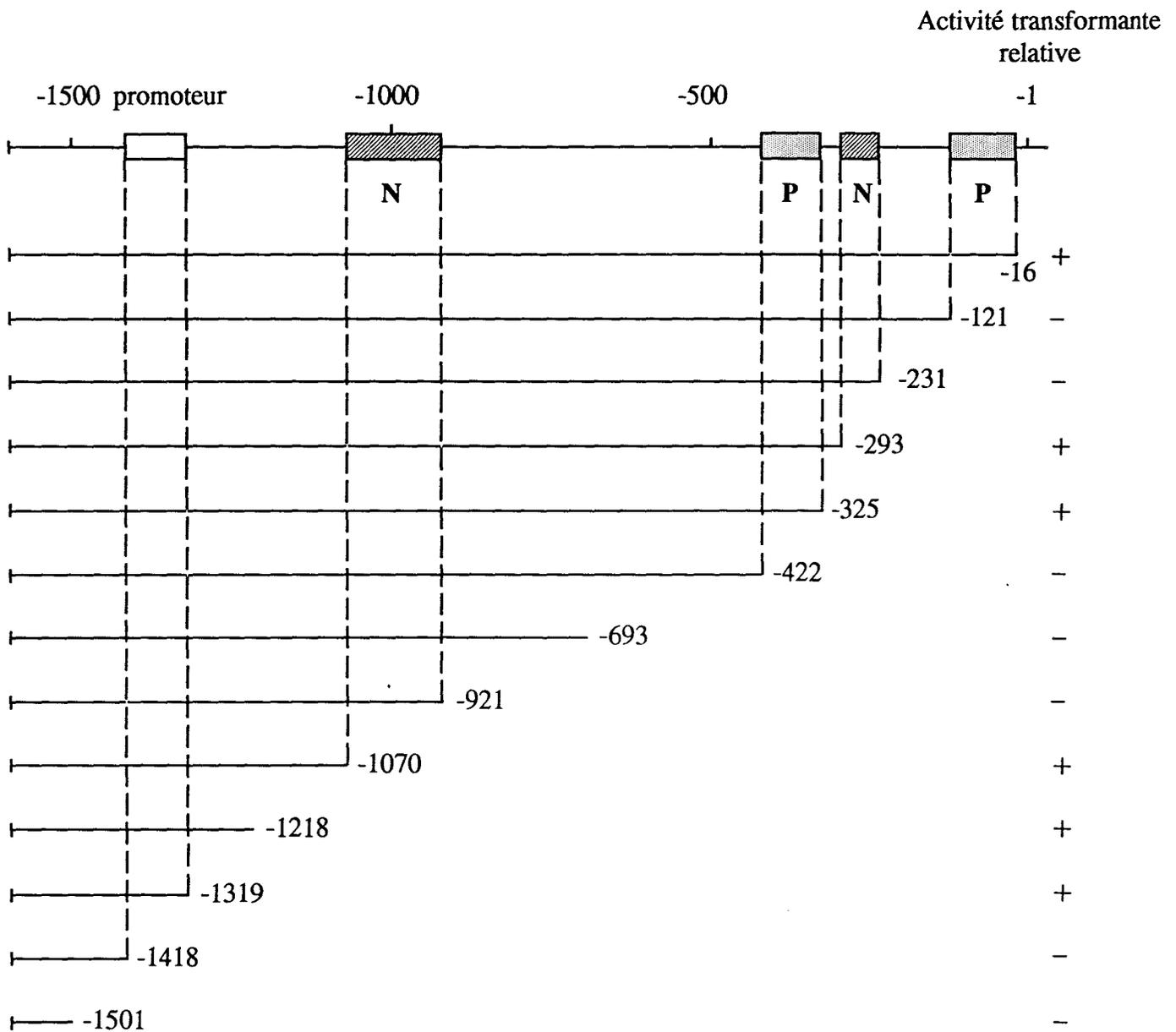


Figure 41 : Structures et activités transformantes des vecteurs d'expression de la protéine Ha-Ras humaine comportant des délétions dans la région 3' du premier intron du gène (d'après Honkawa *et al.*, 1987). L'activité transformante des différentes constructions a été déterminée par rapport au nombre de foyers apparaissant dans des boîtes de cellules NIH 3T3 transfectées avec ces constructions. **N** : région négative, **P** : région positive. La numérotation est relative à l'ATG d'initiation de la traduction.

Nous avons remarquer que la séquence F2, responsable d'une activité de type «*enhancer*», présente certaines homologies en retard sur gel avec la séquence F8-2. En effet, les séquences F2 et F8-2 semblent fixer un complexe protéique identique ou tout du moins de la même famille (figures 29 et 30). De plus, ces deux séquences possèdent le motif GCCTC dans la partie 3' de la séquence protégée contre l'action de la DNase I. Il est intéressant de remarquer qu'il existe dans la partie 3' du deuxième élément positif décrit par Honkawa et ses collaborateurs (1987) une séquence qui se rapproche de la séquence F8-2 murine. La comparaison montre une homologie sur 13 pb avec seulement deux bases délétées dans la séquence humaine. Il serait donc intéressant de vérifier si la séquence F8-2 est également responsable d'une régulation de type positive chez la souris. Une comparaison plus poussée entre les résultats obtenus par Honkawa et ses collaborateurs (1987) et les nôtres est assez difficile. En effet, ces auteurs n'ont pas effectués d'expériences de protection contre la DNase I et ils n'ont pas mis en évidence de séquences potentielles pour la fixation de facteurs de transcription connus.

Les résultats obtenus avec ces approches fonctionnelles amènent à se poser des questions quant au(x) rôle(s) biologique(s) que pourraient avoir ces séquences. En effet, il est possible qu'une modulation de l'expression ou de l'activité des facteurs nucléaires impliqués au niveau des séquences F2, F4 et F5 puisse moduler le taux de transcription du gène *Ha-ras*. Les autres séquences interagissant avec des facteurs nucléaires dans l'intron pourraient aussi être impliquées dans ce type de régulation. Une telle hypothèse pourrait expliquer l'implication particulière du gène *Ha-ras* et non pas des autres gènes *ras* dans les tumeurs de la peau de souris. Elle pourrait également expliquer une expression de ce gène en fonction du cycle cellulaire comme cela a été décrit par Ikeda et ses collaborateurs (1989). En effet, ces auteurs ont montré que le gène *Ha-ras* est exprimé en fin de phase G1 et début de phase S dans les hépatocytes de rat, lors de la régénération du foie.

Il existe un autre mécanisme de contrôle de l'expression des gènes intervenant non pas au niveau de l'initiation mais au niveau de l'élongation du produit par l'ARN polymérase.

Ainsi, il a pu être mis en évidence l'existence d'une séquence au début du premier intron de *myc* responsable d'un blocage d'élongation lors de la différenciation de cellules humaines promyélocytiques en granulocytes (Bentley & Groudine, 1986, 1988 ; Eick & Bornkamm, 1986). Bien que nous n'ayons pas encore pu obtenir la preuve directe montrant que les effets fonctionnels observés sont le résultat d'une augmentation de l'initiation de la transcription, il est peu probable qu'un mécanisme d'atténuation de l'élongation puisse être impliqué. En effet, l'existence de deux types de régulation positive et négative est en faveur d'une régulation transcriptionnelle parce qu'un blocage d'élongation ne peut induire qu'un effet de type négatif. De plus, le facteur Sp1 ou de la famille Sp1 semble être impliqué dans la régulation au niveau de la séquence F5 dans l'intron et Sp1 est connu comme étant un facteur de transcription. Finalement, nous avons pu montrer que l'intron 0 influence l'activité du promoteur hétérologue TK lorsqu'il est placé avant celui-ci. Ce résultat ne peut donc pas s'expliquer par un mécanisme de blocage d'élongation mais plutôt par une modification de l'initiation de la transcription.

Lowndes et ses collaborateurs (1990), ont mis en évidence une séquence courte au niveau du premier intron du gène *Ha-ras* humain qui est hautement répétée dans le génome. Ils ont montré que cet élément est capable de bloquer la transcription à partir du promoteur viral IE (*Immediate Early*) du virus de l'Herpès par un mécanisme de blocage d'élongation. Par contre, cet élément ne semble pas interférer avec la transcription initiée à partir du promoteur du gène *Ha-ras*. Cette séquence de moins de 130 pb correspond en localisation avec un des éléments de régulation négative décrite par Honkawa et ses collaborateurs (1987), mais il semblerait que la séquence intronique murine ne possède pas d'élément répété. En effet, les sondes utilisées pour la mise en évidence du site d'hypersensibilité aux DNases, au niveau du promoteur, couvrent tout l'intron et ont permis de visualiser uniquement les bandes attendues.

IV. Intron 0 et spécificité tissulaire de l'expression.

Le modèle de la cancérogénèse de la peau de souris a permis de montrer que la mutation du gène *Ha-ras* est un événement concomittant à l'initiation par le cancérogène chimique (Balmain *et al.*, 1983, 1984). Par ailleurs, il a pu être montré que la mutation de ce gène n'est pas suffisante pour induire l'apparition d'une tumeur, mais il y a d'autres événements lors de la progression maligne qui est induite par un agent promoteur de tumeur comme le TPA. Il a pu notamment être montré que dans les papillomes, puis les carcinomes, apparaissant à la suite du traitement de la peau de souris par le TPA, il y a surexpression du gène *Ha-ras*. Par ailleurs, les gènes *Ki-ras* et *N-ras* ne sont jamais impliqués dans ces tumeurs, bien qu'ils sont soumis de la même manière que le locus *Ha-ras* à l'action mutagène du cancérogène utilisé. Il est donc possible qu'une expression spécifique tissulaire du gène *Ha-ras* soit responsable de l'implication spécifique de celui-ci au niveau des tumeurs de la peau de souris.

Les approches que nous avons utilisées ne nous ont pas permis de mettre en évidence des éléments dans l'intron 0, qui puissent expliquer une expression spécifique du gène *Ha-ras* au niveau du tissu épithélial. En effet, l'approche fonctionnelle par des délétions de la partie 3' de l'intron 0, montre que les effets fonctionnels positif ou négatif, observés à partir des différentes constructions (pSras, pHras, pAras et pMras) sont similaires dans les lignées épithéliales et dans les lignées fibroblastique, myéloblastique et trophoblastique. Cette observation est également vraie pour les études par mutagenèse des éléments F2, F4, F5 et F7, qui ont montré que les effets induits par les différentes mutations sont les mêmes dans toutes les lignées cellulaires utilisées.

Il est intéressant de noter que les deux séquences F8-1 et F9 protégées contre l'action de la DNase I, ne le sont qu'avec les extraits nucléaires épithéliaux (C5N, PDV, PDVC57, SN161), mais n'apparaissent pas avec les extraits de fibroblastes (STO) et de cellules érythroleucémiques (M707/T). La séquence F8-1 est localisée environ 30 pb en amont de l'extrémité 3' du fragment du gène *Ha-ras* de la construction pAras. La séquence F9 est localisée dans la région intronique comprise entre les constructions pAras et pMras. On peut

toutefois noter que l'on retrouve la séquence ACCT au niveau de ces deux séquences, bien que l'on ne sache pas si cette séquence est importante pour la reconnaissance de ces deux sites par le ou les facteurs nucléaires épithéliaux. Une étude plus approfondie de cette observation serait intéressante.

V. Intron 0 et progression maligne.

A l'origine de notre travail, nous pensions que l'étude des mécanismes de régulation de l'expression de *Ha-ras* aurait pu permettre d'expliquer la surexpression fréquente de ce gène dans certaines pathologies, comme les tumeurs de la peau de souris. Les analyses structurales et fonctionnelles du premier intron ont montré que les séquences F2, F4, F5 et F7 ne semblent pas être impliquées dans la progression maligne lors de la tumorigenèse de la peau de souris. En effet, les études de protection contre l'action de la DNase I, ainsi que les études en retard sur gel n'ont pas montré de différences significatives entre une lignée de kératinocytes normaux et des lignées de carcinomes plus ou moins avancés dans la progression maligne. De plus, toutes les constructions mutantes au niveau de ces sites montrent les mêmes effets fonctionnels aussi bien dans les kératinocytes normaux (C5N) que dans les carcinomes à cellules en fuseau (Car B). Autrement dit, les facteurs nucléaires impliqués dans les effets fonctionnels observés à partir de ces séquences ne semblent pas être la cible d'une dérégulation, lors de la progression maligne.

Cependant, nous pouvons imaginer qu'une mutation dans la séquence d'un de ces éléments et en particulier de l'élément F4 qui est un élément de régulation négative, puisse avoir un effet important sur l'expression du gène *Ha-ras in vivo*. Nous n'avons pas encore pu vérifier une telle hypothèse qui nécessiterait d'abord de caractériser tous les éléments de régulation dans le premier intron.

CONCLUSIONS
&
PERSPECTIVES

Jusqu'à présent il n'a pas été montré que le promoteur joue un rôle qui puisse expliquer une modulation de l'expression du gène *Ha-ras* en fonction du cycle cellulaire, de la spécificité tissulaire, ou du stade du développement. En effet, nous avons montré que le promoteur du gène *Ha-ras* de souris est la cible, essentiellement de facteurs de transcription Sp1 ou de la famille Sp1, et se trouve classé dans les promoteurs de type *housekeeping*. Les mêmes observations ont été faites au niveau du gène humain. Il est donc probable que le promoteur du gène *Ha-ras* soit responsable d'une activité basale du taux de transcription et que d'autres éléments dans le locus puissent moduler cette expression. Ceci pourrait expliquer la surexpression fréquente du gène *Ha-ras* dans certaines pathologies cancéreuses.

L'étude du premier intron du gène *Ha-ras* de souris a révélé l'existence de onze séquences interagissant avec des facteurs protéiques nucléaires, localisées dans celui-ci. Les analyses fonctionnelles par mutagenèse dirigée et délétion de séquences ont permis de montrer le rôle joué par certaines de ces séquences dans la régulation transcriptionnelle de ce gène. Nous avons notamment montré que la séquence F2 agirait en stimulant l'activité du promoteur du gène *Ha-ras* et que la séquence F4 serait responsable d'une activité inhibitrice qui pourrait être compensée ou inhibée par les facteurs se fixant sur la séquence F5. Deux complexes se fixant sur la séquence F5 ont pu être identifiés comme étant le facteur de transcription Sp1 ou de la famille Sp1. De plus, il existe un troisième complexe protéique nucléaire capable de reconnaître la séquence F5 ainsi que la séquence F4. Toutes les autres séquences n'ont pu être rapprochées d'éléments de régulation transcriptionnelle déjà décrits dans la littérature. Une étude détaillée de ces séquences devrait donc être poursuivie. Maintenant que nous avons caractérisé certains de ces éléments, il serait intéressant d'étudier quelle est leur influence sur l'activité de promoteurs hétérologues. Une telle étude permettrait de mieux les caractériser et notamment de savoir s'ils ont les propriétés des éléments *enhancer*, à savoir qu'ils agissent vis à vis d'un promoteur hétérologue, indépendamment de leur position et de leur orientation. De plus, il serait intéressant de savoir si les complexes protéiques, se fixant sur des séquences de l'intron 0 chez la souris, sont retrouvés chez l'homme et s'ils sont responsables des mêmes

effets fonctionnels positifs et négatifs également observés au niveau du premier intron chez l'homme.

Nos résultats confortent l'hypothèse concernant le rôle que pourrait jouer la régulation transcriptionnelle, dans l'expression du gène *Ha-ras*, notamment dans certaines pathologies cancéreuses. Le gène *Ha-ras*, muté ou non, est fréquemment surexprimé dans certaines pathologies cancéreuses, comme dans la cancérogénèse en plusieurs étapes de la peau de souris. Il est probable qu'un événement participe à la dérégulation transcriptionnelle du gène *Ha-ras*. C'est pourquoi, il serait intéressant de connaître quels seraient les effets de mutations au niveau des séquences introniques que nous avons montré comme étant fonctionnelles, sur le pouvoir transformant du gène *Ha-ras in vivo*. En effet, une mutation au niveau de l'un des éléments ayant une fonction de régulation négative, ou une diminution ou une perte d'un facteur interagissant sur un de ces éléments négatifs sont des événements génétiques possibles et il est permis de penser que l'inactivation d'un site ayant une fonction de régulation négative, comme nous l'avons mis en évidence, puisse induire une augmentation de l'expression du gène *Ha-ras*. Dans le cas de l'inactivation ou de la perte d'un facteur nucléaire ayant une fonction de régulation négative, celui-ci pourrait être considéré comme un gène suppresseur de tumeur.

MATERIELS
&
METHODES

I. TECHNIQUES COURANTES DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE.

I.1 Techniques électrophorétiques.

I.1.1 Electrophorèse en gel d'agarose.

Le gel d'agarose est utilisé pour la séparation des fragments d'ADN. Sa concentration varie de 0,6% à 2,5% en fonction de la taille des fragments à séparer ou à purifier. La migration a lieu dans du tampon TBE (Tris-HCl 0,9 M (pH 7,8), Acide borique 0,9M, Na₂EDTA.2H₂O 2,5 mM). L'ADN est mélangé v/v avec une solution de bleu de bromophénol (BBO) à 0,05%, avant d'être déposé. La migration est effectuée à 60V pendant 2 à 4 h. L'ADN est visualisé sur rampe UV grâce au bromure d'éthydiu contenu dans le gel (8 µg/ml).

La purification des fragments d'ADN pour clonage a été effectuée en gel d'agarose LMP (*Low Melting Point*) et en tampon TAE (Tris-Acide acétique (pH 7,8) 0,4 M, Acétate de sodium 50 mM, EDTA 10 mM) sous faible voltage (10 à 20V) pendant 15 h.

I.1.2 Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

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

I.2 Digestion enzymatique des plasmides.

L'ADN plasmidique a été digéré avec 1-5 unités d'enzyme/µg d'ADN pendant 2 à 3 h par l'enzyme de restriction dans les conditions spécifiées par le fabricant de l'enzyme utilisée.

I.3 Purification des fragments d'ADN.

Les blocs d'agarose LMP contenant les fragments d'ADN sont dissous dans 1 ml de LSB (*Low Salt Buffer* : NaCl 0,2 mM, Tris-HCl (pH 7,4) 20 mM, EDTA 1 mM) pendant 10 minutes à 65°C. 4 à 8 ml de LSB sont ajoutés, homogénéisés, et incubés à 42°C pendant 10 minutes. La solution est passée dans une colonne Elutip-D après équilibrage de celle-ci avec du HSB (*High Salt Buffer* : NaCl 1 mM, Tris-HCl (pH 7,4) 20 mM, EDTA 1 mM) et rinçage avec 5 ml de LSB à 42°C. La colonne est ensuite lavée avec 5 ml de LSB à 42°C, puis l'ADN est élué avec 0,6 ml de HSB et précipité avec de l'éthanol absolu.

I.4 Sous-clonage des fragments d'ADN.

La ligation des fragments d'ADN dans les différents vecteurs utilisés s'est faite : (i) soit par ligation dans un site de restriction complémentaire avec des extrémités 5' sortantes ou cohésives, (ii) soit par ligation d'extrémités franches. Ces dernières sont obtenues soit en utilisant des enzymes de restriction générant des bouts francs soit en incubant les fragments d'ADN à extrémités cohésives, pendant 30 minutes à température ambiante, avec le fragment de Klenow de la DNA-polymérase T4 en présence de déoxyribonucléotides 0,2 mM, de tampon T4 1x. La réaction est stoppée en amenant la solution à 70°C pendant 5 minutes. Si nécessaire, les vecteurs digérés ont été traités à la phosphatase intestinale de veau

Les réactions de ligations ont été effectuées dans un volume de 20 µl avec 200 ng d'insert et 200 ng de vecteur en présence de tampon de ligation 1x et une unité de ligase T4. 5 unités de ligase ont été utilisées pour les ligations à bouts francs. Les réactions ont été effectuées pendant 15 à 30 h à 14°C.

I.5 Marquage au ^{32}P des sondes d'ADN.

I.5.1 Marquage en 5' des oligonucléotides double-brins.

Les oligonucléotides simple-brins complémentaires ont été appariés à la concentration de 0,1 mg/ml dans du tampon TE (Tris-HCl (pH7,8) 10 mM, EDTA 1 mM) NaCl 0,1 M, en amenant le mélange réactionnel à ébullition puis en le laissant refroidir doucement à température ambiante. Les réactions de marquage ont été effectuées comme suit :

1- La réaction est effectuée dans un volume de 10 μl avec : 2 μl d'oligonucléotide double-brins (200 ng), 1 μl de tampon kinase 10x, 1 μl de DTT 50 mM, 1 μl de spermidine 20 mM, 2 μl d'ATP [γ - ^{32}P] (370 MBq/ml), 2 μl d'eau et 1 μl de polynucléotide kinase T4.

2- Le mélange de réaction est incubé à 37°C pendant 30 minutes, puis à 70°C pendant 5 minutes.

3- L'extrémité des oligonucléotides double-brins utilisés en retard sur gel sont rendus francs par traitement par l'enzyme de Klenow dans un volume de 20 μl obtenu à partir des 10 μl de milieu de marquage précédents à qui ont été ajouté : 1 μl de tampon klenow 10x, 4 μl de déoxyribonucléotides 5 mM, 2 unités de Klenow et 4 μl d'eau. Le mélange est incubé dans la glace pendant 30 minutes.

4- Les fragments d'ADN marqués en 5' sont purifiés en gel de polyacrylamide à 8%, TBE 1x. Leur élution se fait dans du TE 1x à 37°C pendant une nuit.

I.5.2 Marquage en 5' des fragments de restriction.

50 μg de plasmides sont coupés avec l'enzyme de restriction appropriée afin d'obtenir une extrémité 5' sortante. Ce fragment est extrait, précipité et remis en suspension dans une proportion de 1 μg par μl . Le plasmide est traité avec 0,5 unité de phosphatase intestinale de veau dans le tampon approprié dans un volume de 50 μl et incubé à 37°C pendant 30 minutes. Une extraction (phénol/chloroforme 2x, chloroforme 1x) et une double précipita-

tion sont ensuite effectuées. La réaction de marquage s'effectue dans un volume de 50 μl avec 10 μg de plasmide, 7 μl d'ATP[γ - ^{32}P] (370 MBq/ml), 5 μl de tampon kinase 10x, 2,5 μl de spermidine 20 mM, 2,5 μl de DTT 100 mM, 3 μl de T4 kinase (1 unité/ μl) et 20 μl d'eau. Cette solution est incubée à 37°C pendant 30 minutes et la réaction est stoppée par une extraction (phénol/chloroforme 2x, chloroforme 1x). L'ADN est précipité dans de l'éthanol, une fois avec NaCl 0,4 M puis une fois avec KCH_3CO_2 0,1 M. Le culot est resuspendu dans 35 μl d'eau, 5 μl de BSA (10 mg/ml), 5 μl de tampon 10x de l'enzyme appropriée et 5 μl de l'enzyme (5 unités/ μl) et incubé à 37°C pendant 3 h.

Le fragment marqué en 5' est purifié par électrophorèse en gel d'agarose LMP à 1,5%. Les fragments sont visualisés par autoradiographie et purifiés de l'agarose en utilisant les colonnes Elutip-D. Les sondes ainsi obtenues ont une activité spécifique de $2\text{-}8 \times 10^6$ cpm/ μg .

I.5.3 Synthèse d'une sonde à partir d'ADN simple brin.

Les sondes réalisées par ce procédé ont été utilisées pour les expériences de cartographie à la nucléase S1 des ARNm du gène de l'hormone de croissance humaine (hGH) (voir paragraphe III-F).

La sonde synthétisée est complémentaire de l'ARNm. La matrice est donc le brin codant. L'amorce de synthèse se trouve dans le gène hGH et est complémentaire au brin codant ('CTGTAGCCATTGCAGCT'). L'hybridation de l'amorce avec la matrice est réalisée dans un volume de 10 μl contenant 1,5 μl d'amorce (25 ng/ μl), 5 μl d'ADN simple brin, 1 μl de tampon klenow 10x, 2,5 μl d'eau. Le mélange est incubé 3 minutes à 75°C puis laissé 30 minutes à température ambiante. Sont ajoutés : 1 μl de tampon klenow 10x, 1 μl de dATP 1 mM, 1 μl de dTTP 1 mM, 1 μl de dGTP 1 mM, 5 μl de dCTP α - ^{32}P (370 MBq/ml) et 1 μl de klenow (5u/ μl). Ce mélange est incubé 15 minutes à température ambiante, on y ajoute alors 1 μl de dCTP 1 mM et l'incubation est prolongée de 5 minutes supplémentaires à température ambiante. La klenow est inactivée 5 minutes à 60°C. L'ADN double brin est coupé avec un enzyme de restriction approprié afin de déterminer l'extrémité

3' de la sonde qui correspond à la partie 5' de l'ARNm. Les protéines sont extraites par une extraction phénol/chloroforme et une extraction chloroforme. L'ADN est précipité avec 100 μl d'acétate d'ammonium 5M, 1 μl d'ARNt de levure à 10 mg/ml et 400 μl d'éthanol. Le culot est repris après centrifugation dans 6 μl de tampon de séquence (formamide déionisé 95% (v/v), cyanol de xylène 0,1% (p/v), bleu de bromophénol 0,1% (p/v)). La sonde est dénaturée 2 minutes à 90°C puis placée dans la glace avant d'être soumise à une purification par électrophorèse en gel d'acrylamide dénaturant à 5% avec une migration de 2 h à 1300 V. La sonde est éluée de la bande de gel dans 750 μl de tampon d'éluion (Acétate d'ammonium 0,5 M, MgCl_2 10 mM, EDTA 1 mM, 0,1% SDS) après une nuit d'incubation à 37°C.

I.6 Séquençage de l'ADN.

La séquence des mutants réalisés par mutagenèse dirigée et par délétion de séquence (voir paragraphe I-G) à été vérifiée en utilisant la technique avec le kit séquenase version 2.0 de chez USB (United States Biochemical). Une amorce appropriée est hybridée avec la matrice plasmidique dans les conditions suivantes : 3 μl de plasmide à séquencer (3 μg), 4 μl d'eau, 2 μl de tampon de séquence et 1 μl d'amorce sont mélangés et incubés 2 minutes à 65°C, puis refroidis lentement jusqu'à 35°C. Pendant que les réactions d'hybridations refroidissent, 2,5 μl de mélange pour chacune des quatre terminaisons G, A, T, C, sont placés dans quatre tubes qui sont placés dans un bain-marie à 37°C. Parallèlement, la *sequanase* est diluée à raison de 0,5 μl pour 3,5 μl de tampon de dilution de l'enzyme. La réaction de marquage est effectuée en mélangeant les 10 μl de mélange d'hybridation avec 1 μl de DTT 0,1 M, 2 μl de tampon de marquage, 0,5 μl de [³⁵S] dATP et 2 μl de séquenase diluée. Après une incubation de 5 minutes, 3,5 μl de réaction de marquage est transférée dans chacun des quatre tubes de terminaison G, A, T et C. L'incubation est prolongée de 5 minutes à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 4 μl de tampon dans chaque tube. Les échantillons sont chauffés 2 minutes à 90°C puis placés dans la glace, avant d'être chargé sur un gel de séquence dénaturant.

I.7 Techniques de mutagénèse.

I.7.1 Mutagénèse dirigée par PCR.

L'utilisation de la PCR pour obtenir des mutations spécifiques, dans des gènes, a été initialement décrit par Higuchi et ses collaborateurs (1988) puis par Vallette et ses collaborateurs (1989). Dans cette étude, la technique a été modifiée sur un certain nombre de points afin d'optimiser le taux et la fidélité des produits d'amplification spécifiquement mutés. Trois séries de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sont utilisées pour produire des mutants au niveau de séquences caractérisées dans les expériences de protection contre l'action de la DNase I. Cette technique a été utilisée pour muter les séquences F4 et F5 (voir résultats).

Principe de la mutagénèse dirigée par PCR.

Le principe de cette technique est schématisé figure 42. Un jeu d'amorces a été choisi pour encadrer la région à amplifier de façon à ce qu'il y ait deux sites de restrictions internes (en l'occurrence *Dra* III et *Eco* RI) qui permettent, après PCR, le sous-clonage du fragment amplifié, contenant les mutations, à la place de la séquence équivalente dans la construction sauvage. Dans notre étude la séquence de l'amorce 1 : 5'AGTCGCGCCAGCAAGCGGTGA^{3'} se trouve au début de l'intron 0 juste en amont du site *Dra* III. La séquence de l'amorce 4 : 5'GCTCACCGTCTTTCATTGCCATA^{3'} se trouve dans le gène CAT juste en aval du site *Eco* RI. Un autre jeu d'amorces complémentaires a été conçu de façon à introduire cinq mutations dans les séquences F4 et F5. Les amorces 2 et 3 sont, selon les différentes constructions, les oligonucléotides mutés avec un site de restriction *Sac* II, utilisés pour les études en retard sur gel des séquences F4 et F5 .

Le séquençage des constructions mutantes a confirmé qu'il n'apparaît aucune mutation due à une erreur de l'ADN-polymérase de *Thermus aquaticus* dans ces constructions (résultats

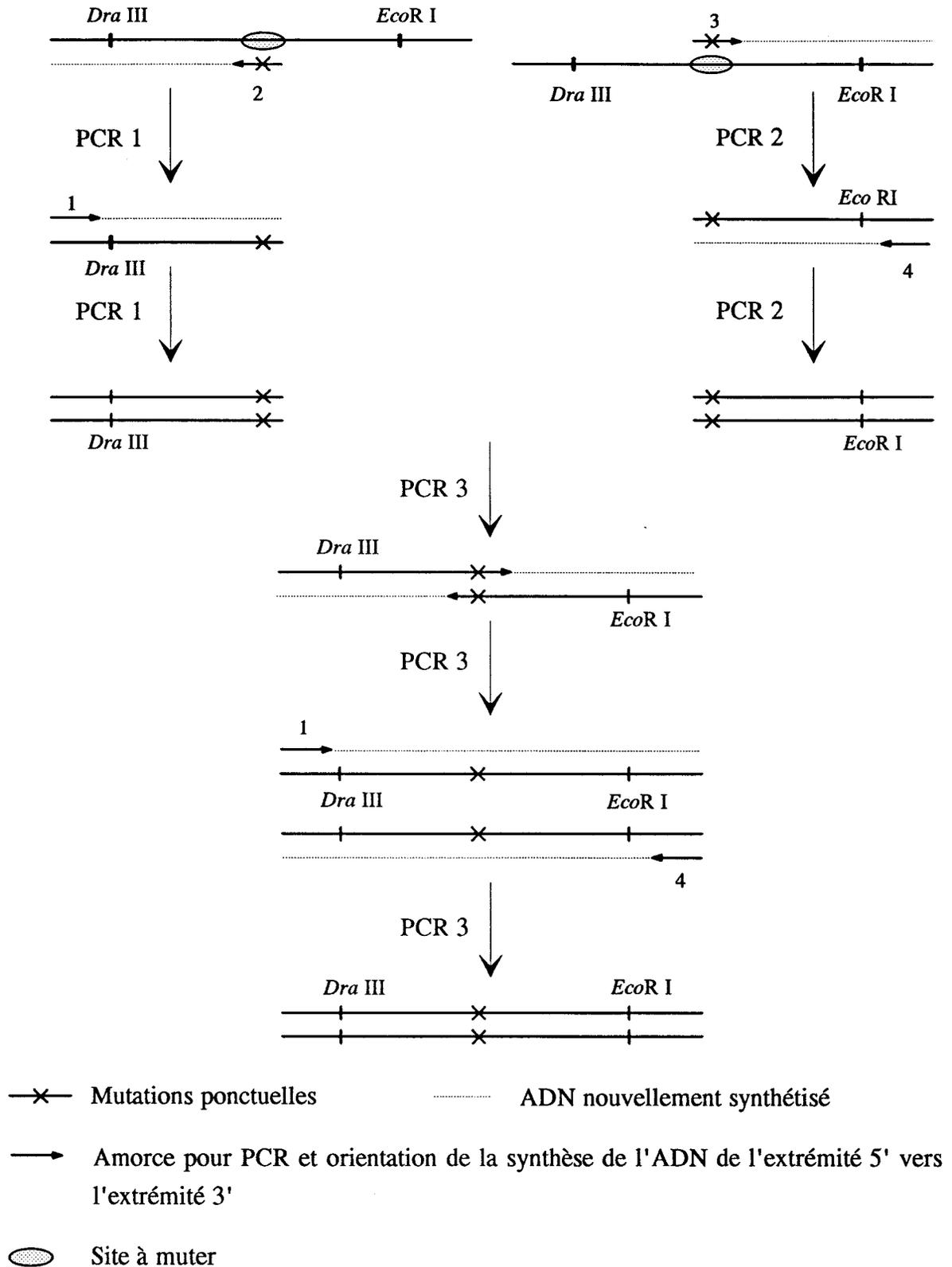


Figure 42 : Schéma de la technique de PCR utilisée pour la mutagenèse dirigée des séquences protégées contre l'action de la DNase I (F4 et F5).

non montrés). Par contre, les mutations introduites grâce aux amorces de PCR ont pu être correctement visualisées au niveau des différentes séquences.

Réactions de PCR 1 et 2.

0,3 μg d'amorce mutée 1 ou 2 (amorces intérieures complémentaires)

0,3 μg d'amorce 3 ou 4 (amorces extérieures)

10 ng de plasmide comme matrice

10 μl de tampon 10x pour la Taq polymérase

4 μl d'un mélange des 4 dNTP 100 mM au total

H₂O qsp 100 μl

2 unités de Taq polymérase.

Deux gouttes d'huile minérale sont ajoutées sur la surface du mélange de réaction. Le premier cycle comporte les trois étapes suivantes : dénaturation à 94°C pendant 4 minutes, hybridation à 54°C pendant 2 minutes, élongation à 72°C pendant 2 minutes, suivi de 29 cycles dans les conditions identiques : le temps de dénaturation à 94°C étant ramené à 2 minutes. Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose, à bas point de fusion, à 1,7%, puis purifiés sur colonne Elutip-D. Ces ampligènes sont ensuite utilisés dans une troisième réaction de PCR, décrite ci-après.

Réaction de PCR 3.

5 μg de produit de la réaction de PCR 1

5 μg de produit de la réaction de PCR 2

0,3 μg d'amorce 3

0,3 μg d'amorce 4

10 μl de tampon 10x pour la Taq polymérase

4 μl d'un mélange des 4 dNTP 100 mM au total.

H₂O qsp 100 μl

2 unités de Taq polymérase

30 cycles de PCR sont réalisés dans les mêmes conditions que pour les réaction 1 et 2 sauf que la première étape de dénaturation se fait pendant 2 minutes comme pour les 29 autres cycles. Les produits d'amplifications sont purifiés en gel d'agarose, à bas point de fusion, à 1,7% et en colonne Elutip-D. Les fragments de PCR sont sous-clonés dans les vecteurs désirés et les recombinants positifs sont contrôlés par digestion avec l'enzyme de restriction correspondant au site créé par les mutations ; leur séquençage permet de confirmer ou non l'intégrité de la séquence amplifiée.

I.7.2 Délétion de séquence par PCR.

La technique de PCR a également été utilisée pour créer des mutants de délétion des séquences F2 et F7, mises en évidence lors des expériences de protection contre l'action de la DNase I. Deux réactions de PCR sont utilisées avec deux jeux d'amorces.

Principe de la délétion de séquence par PCR

La technique de PCR a été utilisée pour créer des mutants des séquences F2 et F7. Ces séquences protégées contre l'action de la DNase I couvrent respectivement 44 et 42 pb et pour être sûr de détruire toute fixation de facteurs nucléaires sur cette séquence, nous avons utilisé la technique de délétion. La délétion du site F2 au niveau de la construction pHras a permis de créer la construction mutante pHM3 et la délétion du site F7 au niveau de la construction pAras crée le mutant pAM4. Pour réaliser ces mutants, deux réactions de PCR sont utilisées avec deux jeux d'amorces (le principe de la technique est schématisé dans la figure 43). Le jeu d'amorces extérieures est le même que celui utilisé pour la mutagénèse dirigée des séquences F4 et F5. Deux amorces internes, de part et d'autre des séquences F2 et F7, ont été synthétisées avec introduction d'un site *Bam* HI, afin de pouvoir relier les deux ampligènes après la PCR ; amorce en 3' de la séquence F2 : 5' CAAGGATCCCCGCGTTGGGCCCAA3',

amorce en 5' de la séquence F2 : 5'TGGCCGCGGGGCGCAGAGGATCCGGA^{3'}, amorce en 3' de la séquence F7 : 5'GCCGGATCCGGTTGTAGGCTGGCTGGCATTGGCCT^{3'}, amorce en 5' de la séquence F7 : 5'TTAGGATCCGCCTACTGCATGCCAGGCGCGGT^{3'}.

Réaction de PCR 1.

0,3 µg d'amorce 1 (amorce extérieure côté 5')

0,3 µg d'amorce 2 (amorce interne avec site *Bam* HI)

10 ng de plasmide comme matrice

10 µl de tampon 10x pour la Taq polymérase

4 µl d'un mélange des 4 dNTP 100 mM au total.

H₂O qsp 100 µl

2 unités de Taq polymérase

Les conditions des cycles de réaction sont les mêmes que pour les réactions de PCR 1 et 2 utilisées pour la mutagénèse dirigée. Les conditions de la réaction de PCR 2 sont identiques à celles utilisées pour la PCR 1, mais en utilisant le jeu d'amorces 3 et 4.

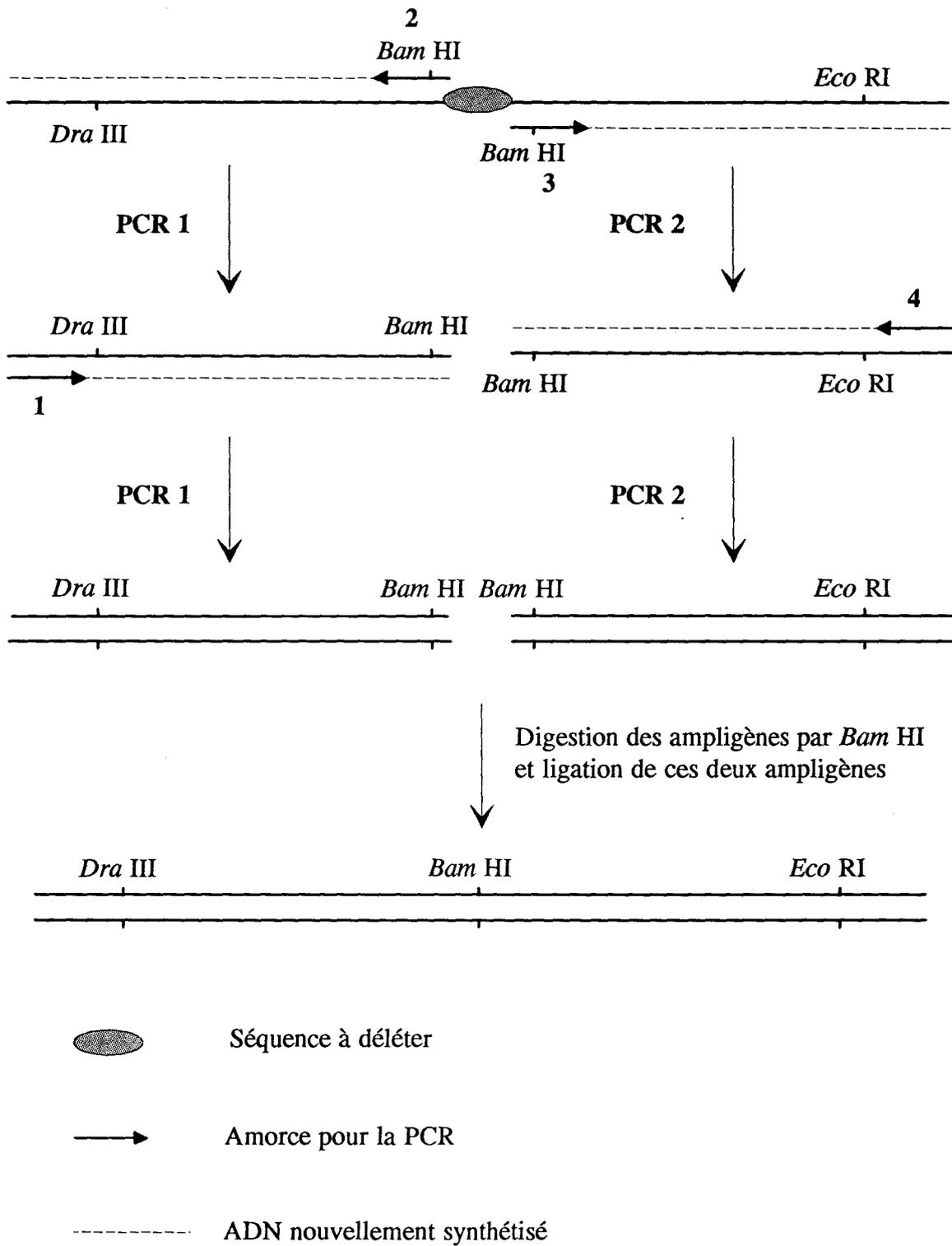


Figure 43: Schéma de la technique de PCR utilisée pour déléter les séquences F2 et F7 protégées contre l'action de la DNase I.

I.8 Transformation bactérienne.

I.8.1 Transformation de la souche JM 83.

La méthode utilisée pour rendre les bactéries JM 83 «compétentes» à la transformation avec les plasmides est celle au CaCl_2 .

Les bactéries sont cultivées à 37°C sous agitation dans du milieu LB. Quand la DO_{580} du milieu de culture atteint 0,3 à 0,6 (en 1 à 2 h), il est centrifugé à 6000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le culot de bactérie est repris dans la moitié du volume original contenant du CaCl_2 à 50 mM ; il est gardé dans la glace pendant 30 minutes à 1 h. Les bactéries sont alors centrifugées une dernière fois à 2500 rpm pendant 5 minutes. Le culot bactérien est repris dans 1/20 du volume original est laissé dans la glace de 30 minutes à 24 h avant la transformation.

Une certaine quantité de plasmide (de 10 ng à 100 ng) dans 50 μl de TE est mélangée avec 50 μl de bactéries compétentes. Après 30 minutes dans la glace, des chocs thermiques sont effectués en plaçant alternativement les bactéries pendant 2 minutes dans un bain-marie à 42°C et durant le même temps dans la glace. Neuf cents μl de 2xTY (1,6% p/v bacto-tryptone, 1% p/v extrait de levure, 0,5% p/v agar) sont ajoutés et la suspension est agitée pendant 1 h à 37°C. 50 à 800 μl sont étalés sur des boîtes de pétri contenant du LB gélosé contenant de l'ampicilline à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Les boîtes sont incubées 18 h à 37°C et les clones résistants sont isolés. Les boîtes de LB-Amp peuvent être complétées avec 40 μl de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside) à 2% dans le diméthylformamide pour pouvoir sélectionner les recombinants positifs de coloration blanche par rapport au non-recombinants de coloration bleue qui peuvent soit correspondre à du vecteur non digéré initialement soit du vecteur reliqué sur lui-même, selon la stratégie de clonage utilisée.

I.8.2 Transformation de la souche JM 101.

La souche bactérienne JM 101 a été utilisée pour être transformée avec des vecteurs dérivant du plasmide M13mp19 afin de produire du bactériophage M13 et de l'ADN simple brin (voir paragraphe I.11) pour les analyses des ARNm par cartographie à la nucléase S1 (voir paragraphe III.6).

Les bactéries JM 101 sont transformées avec les constructions dérivant du M13mp19 par la méthode au CaCl_2 de la même manière qu'avec les JM 83. Le protocole est le même jusqu'à l'étape des chocs thermiques. Pendant que les bactéries subissent le choc thermique un solution comprenant 5/6 (v/v) de culture de JM 101 fraîche et 1/6 (v/v) de X-Gal à 2% dans le diméthylformamide est préparée. 270 μl de la solution JM 101/X-Gal est ajoutée dans chaque tube ayant subi les chocs thermiques. Trois ml de top-agar gardé à 42°C sont ajoutés et le contenu de chaque tube est versé sur une boîte LB préchauffée à 37°C. Une fois que le top-agar est figé, les boîtes de pétri sont incubées une nuit à 37°C. Après une nuit apparaissent des plaques bleues ou blanches correspondant à des clones négatifs ou positifs exprimant le bactériophage d'où une inhibition de la croissance des bactéries au niveau des plaques.

I.9 Préparation rapide de plasmides.

1,5 ml de culture de plasmides sont inoculés avec la bactérie contenant le plasmide à amplifier et incubé la nuit à 37°C. 1ml de cette culture est centrifugé et le culot est remis en suspension dans 1 ml de solution 1 (Glucose 50 mM, Tris-HCl (pH7,8) 25 mM, EDTA 1 mM, lysozyme à 5 mg/ml) et incubé à température ambiante pendant 5 minutes. Deux cents μl de solution 2 (NaOH 0,2 M, SDS 1%) sont ajoutés et incubés dans la glace pendant 10 minutes, puis 150 μl de NaAc (pH5,2) 3 M sont ajoutés, homogénéisés puis incubés dans la glace pendant 10 minutes, puis centrifugés en centrifugeuse Eppendorf pendant 5 minutes. Quatre cents μl de surnageant sont transférés dans un nouveau tube et soumis à deux extractions phénol/chloroforme et un extraction chloroforme. L'ADN est précipité avec 800

μl d'éthanol puis centrifugé à 10 000rpm pendant 5 minutes. Le culot est remis en suspension dans 50 μl d'eau avec 1 μl de RNaseA à 10 mg/ml.

I.10 Purification de plasmides en gradient de chlorure de césium.

Les plasmides sont amplifiés dans la souche *Escherichia coli* JM 83. Un clone provenant d'une boîte L-agar-Amp (milieu LB avec 1% p/v agar, ampicilline 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) est incubé dans 5 ml de LB-Amp (*Luria Broth* : 1% p/v bacto-tryptone, 0,5% p/v extrait de levure, 1% p/v NaCl, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ampicilline), à 37°C pendant une nuit. Ces 5 ml sont dilués dans 500 ml du même milieu et la solution est incubée à 37°C pendant une nuit. Les bactéries sont centrifugées 10 minutes à 6000 rpm à 4°C dans un rotor JM 14 de Beckman. Le culot est remis en suspension dans 9 ml de GTE (glucose 50 mM, Tris-HCL 25 mM (pH 8), EDTA 0,5 M), puis 1 ml de lysozyme (10 mg/ml) est ajouté et la solution est incubée 10 minutes à 4°C. La lyse est complétée par ajout de 20 ml de NaOH 0,2 M, SDS 1% et incubation pendant 4 minutes à 4°C. Ensuite, 10 ml de KAC (acétate de potassium 5 M 60% (v/v) acide acétique 11,5% (v/v)) sont ajoutés et la solution est incubée 10 minutes à 4°C. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation pendant 5 minutes à 7000 rpm dans un rotor JM 14 de Beckman, puis filtration sur laine de verre siliconée dans une seringue de 50 ml. Les 40 ml de surnageant sont précipités par 25 ml d'isopropanol et centrifugés pendant 5 minutes à 7000 rpm dans un rotor JM 14 de Beckman. Le culot est ensuite redissout dans 3,5 ml de TE et 100 μl de Tris 3 M ainsi que 100 μL de BrEt (Bromure d'éthidium) à 5 mg/ml, et 5,2 g de CsCl sont ajoutés. La centrifugation 4,5 h à 16°C à 68 000 rpm en VTI 80 Beckman permet d'obtenir une bande d'ADN plasmidique visualisée par le BrEt.

La bande d'ADN ponctionnée à travers le tube par une seringue est amenée à 4 ml avec du TE, puis 100 μl de Tris 3 M ainsi que 100 μL de BrEt à 5 mg/ml, et 4,2 g de CsCl sont ajoutés. Une deuxième purification par centrifugation dans les mêmes conditions en gradient de césium est effectuée. Les plasmides sont ensuite dialysés contre du TE pendant quelques heures. La mesure de la densité optique à 260 nm permet d'évaluer la concentration en ADN.

I.11 Préparation d'ADN plasmidique simple brin.

L'ADN simple brin a été préparé à partir du vecteur M13mp19 dans la souche bactérienne JM 101 pour pouvoir fabriquer une sonde pour les analyses de l'ARNm par cartographie à la nucléase S1.

Cent millilitres de milieu 2 xTY sont inoculés avec 1 ml de JM 101 en fin de phase exponentielle de croissance. Des aliquotes de 1,5 ml de ce milieu inoculé sont placés dans des tubes de 10 ml. Chaque tube est inoculé avec une plaque blanche provenant d'une boîte de JM 101 infectée avec le bactériophage M13 (voir paragraphe I.8.2). Les tubes sont incubés sous agitation à 37°C pendant 5 h, puis centrifugés 5 minutes en centrifugeuse Eppendorf après transfert dans le tube approprié. 800 μ l surnageant contenant le bactériophage sont transférés dans des tubes propres pour une seconde centrifugation (le reste du surnageant peut être gardé comme stock à 4°C pendant quelques jours). Après transfert du surnageant dans d'autres tubes propres, 200 μ l de PEG/NaCl sont ajoutés pour précipiter le bactériophage. Les tubes sont agités vigoureusement et laissés à température ambiante pendant 15 minutes. Ils sont ensuite centrifugés pendant 5 minutes et le surnageant est éliminé. Le reste du surnageant est retiré à l'aide d'une pipette pasteur afin d'éliminer le mieux possible le PEG. Le culot de phage est remis en suspension dans 110 μ l de TE (dont 10 μ l seront gardés comme stock de phage). 50 μ l de phénol sont ajoutés et les tubes sont laissés à température ambiante pendant 15 minutes après les avoir bien agités. Ils sont ensuite centrifugés pendant 3 minutes et la phase aqueuse contenant l'ADN simple brin est récupérée et précipitée par addition de 10 μ l d'acétate de sodium et de 250 μ l d'éthanol. Après centrifugation, le culot est redissous dans 20 μ l de TE et est utilisé le jour même pour la préparation de la sonde (voir paragraphe I.5.3).

I.12 Purification des ARN par le RNazol.

La technique de préparation des ARN totaux par le RNazol a été mise au point dans les

laboratoires CINNA/BIOTECX et permet la purification des ARN en une seule étape (Chomczynski & Sacchi, 1987). Les cellules cultivées en boîte de pétri sont rincées avec du PBS. Le RNazol (Biogenesis) est ajouté directement dans la boîte à raison de 0,2 ml pour 10⁶ cellules. L'ARN est solubilisé par passage du lysat dans une pipette plusieurs fois. Du chloroforme est ajouté à raison de 0,2 ml pour 2 ml d'homogénat, agité vigoureusement pendant 15 secondes puis laissé dans la glace pendant 5 minutes. La suspension est centrifugée à 12 000 g (4°C) pendant 15 minutes. Après addition du chloroforme et centrifugation, l'homogénat présente deux phases : la phase inférieure, bleue qui est du phénol/chloroforme, et la phase supérieure incolore qui est la phase aqueuse. Les ARN se trouvent dans cette phase aqueuse, alors que l'ADN se trouve dans la phase organique et les protéines dans l'interphase et la phase organique. La phase aqueuse est transférée dans un tube propre et l'ARN précipité par addition d'un volume égal d'isopropanol. Après 15 minutes dans la glace, le tube est centrifugé pendant 15 minutes à 12 000 g. L'ARN précipité sous forme d'un culot blanc au fond du tube est lavé avec de l'éthanol à 75%.

I.13 Extraction des ARN totaux par la méthode à l'isothiocyanate de guanidium.

Les cellules sont rincées avec du PBS, puis lysées dans la boîte de culture par 6 ml de tampon GT (Isothiocyanate de guanidium 4 M, acétate de sodium (pH5,2) 20 mM, dithiothréitol 0,1 mM, N-lauryl sarcosine 0,5%). L'ADN cellulaire est fragmenté après passage de la solution contenant les cellules lysées au travers d'une aiguille 21-G. Le lysat est déposé sur cousin de césium (3,2 ml de CsCl 5,7 M, EDTA 0,1 M) dans un tube pour rotor Beckman SW41 ayant été siliconé. La centrifugation se fait à 32 000rpm à 4°C pendant 16 h.

Le surnageant est éliminé à l'aide d'une pompe à vide. Le culot d'ARN est remis en suspension dans 360 µl de TES (Tris-HCl (pH7,4) 10 mM, EDTA 5 mM, dodécyl sulfate de sodium 1%). Les protéines sont éliminées par une extraction avec un volume équivalent de Chloroforme/Butanol (4/1). Après agitation et centrifugation, la phase aqueuse est

recupérée et l'ARN en est précipité par l'éthanol. L'ARN est remis en suspension dans 100 μ l d'eau traitée au DEPC. La concentration en ARN est estimée par mesure de la densité optique 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 correspond à 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 (peu contaminée par des protéines).

II. CULTURE CELLULAIRE.

Toutes les lignées cellulaires présentées ci-après sont d'origine murine.

Lignée cellulaire Caractéristiques, origine

C5N	Kératinocytes immortalisés mais non tumorigènes dérivant de l'épiderme de souris nouveau-né (Quintanilla <i>et al.</i> , 1991).
PDV	Kératinocytes transformés dérivant de cellules de l'épidermes de souris nouveau-né en culture, traitées par le DMBA et le TPA (Fusening <i>et al.</i> , 1973, 1978).
PDV C57	Kératinocytes transformés dérivant d'un carcinome obtenu après transplantation de cellules PDV dans des souris C57B1. (Quintanilla <i>et al.</i> , 1991)
SN161	Kératinocytes immortalisés et transformés dérivant d'un carcinome squameux métastatique portant une mutation homozygote au niveau du gène Ha- <i>ras</i> (traitement DMBA/TPA) (Quintanilla <i>et al.</i> , 1991)
CarB	Kératinocytes immortalisés et transformés dérivant d'un carcinome métastatique portant une mutation homozygote au niveau du gène Ha- <i>ras</i> (traitement DMBA/TPA). Cellules ayant une forme de fuseau (Buchman <i>et al.</i> , 1991)

NIH 3T3	Fibroblastes non tumorigènes dérivant d'embryons de souris NIH Swiss (Anderson <i>et al.</i> , 1979)
STO	Fibroblastes embryonnaires dérivant d'un tératocarcinome (Martin & Evans, 1975)
RAW	Macrophages dérivant d'une tumeur induite chez une souris femelle BALB/c*BALB.B par inoculation de cellules BALB/c de rate infectées <i>in vitro</i> par le virus leucémogène Abelson (A-MuLV)
M707/T	Lignée cellulaire dérivant d'une érythroleucémie murine induite par le complexe du virus de Friend (Harrison <i>et al.</i> , 1978)
17-S1-T984	Myoblastes squelettiques différenciés dérivant d'un carcinome embryonnaire (tératocarcinome) (Paulin <i>et al.</i> , 1982)
3TDM1	Trophoblastes différenciés dérivant d'un carcinome embryonnaire (tératocarcinome) (Paulin <i>et al.</i> , 1982)

Les lignées NIH 3T3, STO ont été cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*), complété avec 10% de sérum de veau nouveau-né, décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes et de la glutamine à une concentration de 4 mM. Les lignées C5N, PDV, PDVC57, SN161 et Car B ont été cultivée dans du milieu SLM (*Special Liquid Medium*, qui est du milieu DMEM avec une concentration double en acides aminés), complété avec 10% de sérum de veau fœtal de la marque GIBCO/BRL et de la glutamine à une concentration de 4 mM. Toutes ces lignées ont été cultivées en étuve humide à 37°C et à 5% de CO₂.

III. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES.

III.1 Préparation de lysats cellulaires.

Les lysats cellulaires sont effectués pour les essais fonctionnels CAT et β -galactosidase. Quarante heures après transfection, les cellules sont lavées au PBS puis décollées des boîtes dans du CAT-TEN (Tris-HCl (pH7,4) 40 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM). Elles sont ensuite centrifugées 25 secondes à 10 000rpm. Le culot est remis en suspension dans 100 μ l de Tris HCl 0,25M pH7,8 et les cellules sont lysées par chocs thermiques (10 minutes à -80°C - 10 minutes à 37°C ; 3 cycles). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 10 minutes à 10 000 rpm en centrifugeuse «Eppendorf».

III.2 Transfection des plasmides dans les cellules de souris.

La transfection s'effectue dans des cellules de 60 à 70% de confluence. La méthode, dérivée de celle décrite par Graham et Van der Eb (1973), consiste en une précipitation de l'ADN avec du phosphate de calcium.

10 à 20 μ g d'ADN sont mis dans 400 μ l d'H₂O, auxquels on ajoute 100 μ l de CaCl₂ 2,5 M. Cette solution est versée sous agitation dans 500 μ l d'HBS 2x (NaCl 280 mM, 50 mM Hépès, 1,5 mM Na₂HPO₄.2H₂O pH 7,12). Après 15 à 30 minutes à température ambiante, le précipité est versé directement dans le milieu de culture et les cellules sont incubées à 37°C avec 5% de CO₂.

Le milieu de culture est renouvelé au bout de 16 h et les cellules sont incubées pendant 24 h avant d'être lysées soit pour les études enzymatiques soit pour récupérer les ARN.

III.3 Dosage de l'activité β -galactosidase.

L'activité enzymatique de la β -galactosidase est mesurée à partir des surnageants de

lysats de cellules préalablement transfectées avec le plasmide pCH110 et le plasmide CAT étudié. Le plasmide pCH110 contient le gène de la β -galactosidase dont l'expression est placée sous la dépendance du promoteur de SV 40 (Hall *et al.*, 1983).

Classiquement, 40 μ l de surnageant de lysat cellulaire sont incubés avec 1 ml de solution A (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 50 mM β -mercaptoéthanol) et 200 μ l de solution B (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 2 mg/ml o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)) à 37°C pendant 1 à 4 h. La réaction est arrêtée avec 0,5 ml de solution C (1 M Na_2CO_3). L'activité de la β -galactosidase est évaluée par mesure de la densité optique à 420 nm.

III.4 Dosage de l'activité chloramphénicol acétyl-transférase.

Un volume compris entre 0 et 30 μ l de surnageant de lysat cellulaire (après correction en fonction de l'efficacité de transfection, déterminée par le test enzymatique de la β -galactosidase) est incubé de 30 minutes à 2 heures à 37°C, avec 5 μ l d'acétyl coenzyme A 4 mM, dans du Tris-HCl 0,25 M pH7,8, 1 μ l de ^{14}C -dichloroacétyl 1,2 chloramphénicol à 0,05 mCi/0,5 ml, dans 20 μ l de Tris-HCl 0,25 M pH7,8, le volume étant porté à 55 μ l avec du Tris-HCl 0,25 M pH7,8 si nécessaire. La réaction est arrêtée par l'addition de 0,6 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange homogénéisé est centrifugé 5 minutes à 10 000 rpm en centrifugeuse «Eppendorf». La phase organique est prélevée et séchée sous vide.

Le culot est remis en suspension dans 20 μ l d'acétate d'éthyle et chromatographié sur couche mince de gel de silice (20 x 20 cm de la marque Polygramm). La séparation des formes acétylées du substrat initial est réalisée par migration pendant 45 minutes en tampon chloroforme/méthanol (95/5).

Les couches minces sont alors mises en autoradiographie et le film est révélé après 24 h. Le pourcentage d'acétylation est déterminé grâce à la radioactivité qui est estimée par le comptage en scintillation liquide des tâches de chloramphénicol découpées à partir du gel de silice (Gorman *et al.*, 1982).

III.5 Dosage de l'hormone de croissance humaine (hGH).

Cette technique a été initialement décrite par Selden et ses collaborateurs (1986). Le gène de l'hormone de croissance humaine est utilisée comme gène reporteur de l'activité promotrice ou *enhancer* des séquences étudiées. Quand un vecteur d'expression de cette hormone est transfectée de façon stable ou transitoire dans des cellules en culture, l'hormone de croissance exprimée est secrétée par les cellules et le milieu de culture est directement utilisé pour l'activité de cette hormone. L'essai radioimmunologique est effectué selon les spécifications du fabricant du kit de dosage (Biogenesis). La hGH (*human growth hormone*) dans le milieu de culture est incubée avec un anticorps monoclonal murin anti-hGH marqué à [¹²⁵I]. Un second anticorps monoclonal fixé à de la biotine et dirigé contre un autre épitope de hGH est également incubé avec le milieu de culture. La hGH prise entre ces deux anticorps et récupérée du milieu grâce à des billes de verre recouvertes d'avidine après 4 h d'incubation à température ambiante. Les billes fixent la biotine couplée au premier anticorps anti-hGH et après les avoir lavées de l'anticorps non fixé, la quantité de [¹²⁵I] est directement mesurée en compteur à émission γ .

III.6 Analyse des ARNm par cartographie à la nucléase S1.

La sonde est préalablement précipitée avec l'ARN dans les conditions suivantes : 5 à 10 x 10⁴ cpm de sondes sont mélangés avec 10 à 20 μ g d'ARN , 10 μ g d'ARNt, 0,1 volume d'acétate de sodium (pH5,5) 3 M, 2,5 volume d'éthanol, et al solution est gardée 1 h à -80°C. Après centrifugation pendant 10 minutes à 4°C en centrifugeuse Eppendorf, le culot est séché et remis en suspension dans 10 μ l de tampon d'hybridation (PIPES (pH6,4) 40 mM, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, formamide 80%). Ces 10 μ l sont incubés à 90°C pendant 2 minutes et ramené à 40°C lentement pendant une nuit.

La digestion est effectuée dans du tampon de digestion (NaCl 250 mM, acétate de sodium 30 mM, sulfate de zinc 1 mM, ADN de sperme de saumon 200 μ g/ml). Ce tampon

est refroidi dans la glace. 235 μ l de tampon de digestion froid est ajouté au mélange d'hybridation et le tube est placé dans la glace. 3000 unités de nucléase S1 sont ajoutées et la solution est incubée à 37°C pendant 1 h. Les protéines sont extraites par une extraction phénol/chloroforme puis la sonde est précipitée avec de l'acétate de sodium 0,2 M, 10 μ g d'ARNt et 2 volume d'éthanol, pendant 30 minutes à -80°C. Après centrifugation, le culot est redissout dans 8 μ l de tampon de séquence. Les échantillons sont chargés sur gel d'acrylamide dénaturant à 7%. Après électrophorèse à 1300 V, le gel est séché et autoradiographié au moins une nuit à -80°C.

IV. INTERACTIONS ADN-PROTEINES.

IV.1 Préparation d'extrait de protéines nucléaires.

Les extraits de protéines nucléaires ont été obtenus à partir de culture de lignées cellulaires par une méthode modifiée d'après le procédé initialement décrit par Emerson et ses collaborateurs (1982). Toutes les solutions utilisées dans cette préparation sont gardées à 4°C et contiennent les inhibiteurs de protéases suivants : PMSF 0,5 mM, EGTA 0,1 mM, butyrate de sodium 1M, β -glycérophosphate 1M, benzamidine 50 mM, bestatine (1 mg/ml), leupeptine (1 mg/ml), pepstatin (1 mg/ml).

10¹⁰ cellules sont récupérées dans du PBS et centrifugées à 2000rpm à 4°C pendant 20 minutes. Le culot de cellule est lavé avec 200 ml de TMS (sucrose 0,25 M, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl (pH 7,9) 10 mM), et centrifugé dans les mêmes conditions. La même procédure est répétée avec 200 ml de TMS/0,25% triton X-100. Les noyaux sont rincés deux fois avec 200 ml de TMS puis une fois avec 100 ml de TMS. Avant la centrifugation avec les 100 ml de TMS, 100 μ l sont prélevés et mélangés dans 900 μ l d'eau, puis 9 ml de NaOH 1M sont ajoutés. Après sonication de ces 10 ml, la concentration en acides nucléiques est déterminée par dosage spectrophotométrique à 260 nm. Cette mesure indirecte permet d'évaluer la quantité de noyaux présents dans la préparation. Après le troisième lavage au TMS, les noyaux sont remis

en suspension dans du TMS à une concentration d'acides nucléiques de 5-10 mg/ml. 1/10 du volume de NaCl 4M est ajouté goutte à goutte sous agitation magnétique et dans la glace afin d'extraire les protéines non-histones des noyaux. Après 10 minutes, le surnageant est clarifié par centrifugation à 15 000 g pendant 15 minutes, puis à 100 000 g pendant 1 h à 4°C. Du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est ajouté à la solution à raison de 0,35 mg/ml et mis sous agitation dans la glace pendant 20 minutes. Les protéines ainsi précipitées sont centrifugées à 10 000 g à 4°C pendant 30 minutes. Le culot de protéines est ensuite resuspendu dans du tampon E_{50} ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50 mM, Hépès 20 mM, MgCl_2 5 mM, EDTA 0,1 mM, 1 mM dithiothréitol, 20% (v/v) glycérol, 0,1% Brij 35, (pH 7,9)), et dialysé une nuit à 4°C contre du SB (*Storage buffer* : NaCl 50 mM, Hépès (pH 7,9) 20 mM, MgCl_2 5 mM, EDTA 0,1 mM, 20% (v/v) glycérol, dithiothréitol 1 mM). Les protéines nucléaires sont ensuite clarifiées par centrifugation à 100 000 g à 4°C pendant 1 h. Le surnageant est aliquoté et stocké à -80°C.

IV.2 Retard sur gel.

Cette technique a été utilisée pour caractériser les protéines se fixant sur les séquences désoxyribonucléiques mises en évidence dans les expériences de protection contre l'action de la DNase I. La technique utilisée est une version modifiée de celle initialement décrite par Garner et Revzin (1981).

Le volume total de réaction est de 20 μl avec 1 μl d'oligonucléotide double brin marqué en 5' au ^{32}P (100 pg), 2 μl de poly(dI)(dC) (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 1 μl d'oligonucléotide compétiteur à 100 ng/ μl , si nécessaire, et 14 μl de SB à la concentration final en NaCl de 50 ou 150 mM. Le mélange de réaction est incubé dans la glace pendant 30 minutes à 1 h. Les complexes ADN protéines sont séparés de la sonde libre par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 5%, TBE 0,2x, pendant 2 h sous 150 V. Le gel est préalablement équilibré pendant 90 minutes à 150 V. Il est ensuite séché sous vide à 80°C et autoradiographié.

IV.3 Empreinte à la DNase I.

Cette technique a été utilisée pour identifier des sites de fixation de protéines nucléaires sur l'ADN d'après la méthode de Plumb et Goodwin (1988).

La sonde (moins de 20 ng) marquée en 5' au ^{32}P (paragraphe I.5.2) est incubée dans du SB (*Storage Buffer*) dans la glace avec 1 μg de poly (dI)(dC) comme compétiteur non spécifique pour la fixation de protéines sur la sonde, et 0 à 800 μg d'extrait de protéines nucléaires, dans un volume final de 100 μl . Un oligonucléotide compétiteur pour une séquence spécifique de l'ADN est ajoutée si nécessaire dans un excès 250 M. Le mélange est incubé dans la glace pendant 60 minutes avant d'ajouter la DNase I à la concentration appropriée. La concentration de DNase ajoutée dépend de la concentration de l'extrait de protéines nucléaires et de l'ADN compétiteur, et est déterminé par des essais de digestion préalables avec différentes concentrations en DNase I (de 1 à 10 μl d'une gamme de dilution de DNase I dans du SB/ CaCl_2 0,1 mM). La concentration en DNase I est choisie de façon à ce que statistiquement, une seule coupure par molécule de sonde ait lieu. Après 30 secondes, la réaction de digestion est arrêtée par addition de 100 μl de tampon stop (Tris (pH8) 100mM, EDTA 10mM, SDS 0,5%, protéinase K 0,4 mg/ml, ARNt 0,1 mg/ml, NaCl 0,1 mM) et incubation, d'abord pendant 30 minutes à 37°C, puis 2 minutes à 90°C. La sonde d'ADN est extraite par des extractions à l'aide d'un mélange phénol/chloroforme et de chloroforme suivies d'une précipitation avec 600 μl d'éthanol absolu et 5 μl de LiCl 5 M, dans la carboglace pendant 15 minutes. Le tube est centrifugé et le culot d'ADN est lavé avec 1 ml d'éthanol puis séché sous vide et remis en suspension dans 8 μl de tampon de séquence (formamide déionisé 95% (v/v), cyanol de xylène 0,1% (p/v), bleu de bromophénol 0,1% (p/v)). Les échantillons sont dénaturé à 90°C pendant 2 minutes et chargés sur gel d'acrylamide dénaturant à 6%. L'électrophorèse se fait pendant 90 à 180 minutes selon la région de la sonde que l'on désire visualiser. Une réaction de séquence Maxam-Gilbert G+A réalisée sur la même sonde est mise à migrer en même temps que les autres réactions de protection contre l'action de la DNase I. Le gel est ensuite séché sous vide et mis à autoradiographier dans une cassette avec écran, pendant une nuit à -80°C.

BIBLIOGRAPHIE

Adari H., Lowy D.R., Willumsen B.M., Der C.J. & McCormick F. (1988). Guanine triphosphate activating protein (GAP) interacts with the p21*ras* effector binding domain. *Science* 240 : 518-521.

Albino A.P., Le Strange R., Oliff A.I., Furth M.E. & Old L.J. (1984). Transforming *ras* genes from human melanoma: a manifestation of tumor heterogeneity. *Nature* 308 : 69-72.

Almoguera C., Shibata D., Forrester K., Martin J., Arnheim N. & Perucho M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant *c-K-ras* Genes. *Cell* 53 : 549-554.

Anderson D., Koch C.A., Grey L., Ellis C., Moran M.F. & Pawson T. (1990). Binding of SH2 domains of phospholipase C γ 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science* 250 : 979-982.

Anderson P., Goldfarb M.P. & Weinberg R.A. (1979). A defined subgenomic fragment of *in vitro* synthesised Moloney sarcoma virus DNA can induce cell transformation upon transfection. *Cell* 16 : 63-75.

Anderson W.F., Ohlendorf D.H., Takeda Y. & Matthews B.W. (1981). Structure of the *cro* repressor from bacteriophage λ and its interactions with DNA. *Nature* 290 : 754-758.

Bailleul B., Surani M.A., White S., Barton S.C., Brown K., Blessing M., Jorcano J. & Balmain A. (1990). Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a *ras* oncogene from a suprabasal keratin promoter. *Cell* 62 : 697-708.

Ballester R., Marchuk D., Boguski M., Saulino A., Letcher R., Wigler M. & Collins F. (1990). The *NF1* locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast *IRA* proteins. *Cell* 63 : 851-859.

Balmain A., Pragnell I.B. (1983). Mouse skin carcinomas induced *in vivo* by chemical carcinogens have a transforming Harvey-*ras* oncogene. *Nature* 303 : 72-74.

Balmain A., Ramsden M., Bowden G.T. & Smith J. (1984). Activation of the mouse cellular Harvey-*ras* gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature* 307 : 658-660.

Baniahmad A., Muller M., Steiner C. & Renkawitz R. (1987). Activity of two different silencer elements of the chicken lysozyme can be compensated by enhancer elements. *EMBO J.* 6 : 2297-2303.

Barbacid M. (1987). *Ras* genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 779-827.

Bar-Sagi D. & Feramisco J.R. (1985). Microinjection of the *ras* oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell* 42 : 841-848.

Bar-Sagi D. & Feramisco J.R. (1986). Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by *ras* proteins. *Science* 233 : 1061-1068.

Bar-Sagi D., Suhan J.P., McCormick F. & Feramisco J.R. (1988). Localization of PLA₂ in normal and *ras*-transformed cells. *J. Cell. Biol.* 106 : 1649-1658.

Basu T.N., Gutmann D.H., Fletcher J.A., Glover T.W., Collins F.S. & Downward J. (1992). Abberant regulation of Ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature* 356 : 713-715.

Beckner S.K., Hattori S. & Shih T.Y. (1985). The *ras* oncogene product p21 is not a regulatory component of adenylate cyclase. *Nature* 317 : 71-72.

Bell R.M. (1986). Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* 45 : 631-632.

Benezra R., Davis R.L., Lockson D., Turner D.L. & Weintraub H. (1990). The protein Id : a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61 : 49-59.

Bentley D.L. & Groudine M. (1986). A block of elongation is largely responsible for decreased transcription of *c-myc* in differentiated HL60 cells. *Nature* 321 : 702-706.

Bentley D.L. & Groudine M. (1988). Sequence requirement for premature termination of transcription in the human *c-myc* gene. *Cell* 53 : 245-256.

Berg J.M. (1986). Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science* 232 : 485-487.

Bhave M.R., Wilson M.J. & Poirier L.A. (1988). c-H-*ras* and c-K-*ras* gene hypomethylation in the livers and hepatomas of rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 9 : 343-348.

Bianchi A.B., Aldaz C.M. & Conti J.C. (1990). Non-random duplication of the chromosome bearing a mutated Ha-*ras*-1 allele in mouse skin tumours. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 6902-6906.

Binétry B., Smeal T. & Karin M. (1991). Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* 351 : 122-127.

Birchmeier C., Broek D. & Wigler M. (1985). *RAS* proteins can induce meiosis in *xenopus* oocytes. *Cell* 43 : 615-621.

Bird A., Taggart M., Frommer M., Miller O.J. & Macleod D. (1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 40 : 91-99.

Bird A.P. (1984). DNA-methylation: how important in gene control? *Nature* 307 : 503-504.

Bird A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321 : 209-213.

Bizub D., Wood A.W. & Skala A.M. (1986). Mutagenesis of the Ha-*ras* oncogene in mouse skin tumors induced by polycyclic aromatic hydrocabons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 6048-6052.

Blackwell T.K., Kretzner E.M., Blackwood E.M., Eisenman R.N. & Weintraub H. (1990). Sequence-specific DNA-binding by the c-Myc protein. *Science* 250 : 1149-1151.

Blackwood E.M. & Eisenman R.N. (1991). Max : A helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA binding complex with Myc. *Science* 251 : 1211-1217.

Bollag G. & McCormick F. (1991). Regulators and effectors of Ras proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7 : 601-632.

Bonifati L., Karlowich C.A., Dasgupta C. & Barnejee U. (1992). The *Son of sevenless* gene product : a putative activator of Ras. *Science* 255 : 603-606.

Bornstein P., McKay J., Morishima J.K., Devarayalu S. & Gelinas R.E. (1987). Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human $\alpha 1(I)$ collagen gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 8869-8873.

Borrello M.G., Pierotti M.A., Bongarzone I., Donghi R., Mondellini P. & Della Porta G. (1987). DNA methylation affecting the transforming activity of the human Ha-*ras* oncogene. *Cancer Res.* 47 : 75-79.

Borrello M.G., Pierotti M.A., Donghi R., Bongarzone I., Cattadori M.R., Traversari C., Mondellini P. & Della Porta G. (1988). Modulation of the human Harvey-*RAS* oncogene expression by DNA methylation. *Oncogene Res.* 2 : 197-203.

Bos J.L. (1989). *ras* oncogenes in human cancer : a review. *Cancer Res.* 49 : 4682-4689.

Bos J.L., Fearon E.R., Hamilton S.R., Verlaan-de Vries M., van Boom J.H., van der Eb A.J. & Vogelstein B. (1987). Prevalence of *ras* gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327 : 293-297.

Bos J.L., Toksoz D., Marshall C.J., Verlaan-de Vries M., Veeneman G.H., van der Eb A., van Boom J.H., Janssen J.W.G. & Steenvoorden A.C.M. (1985). Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-*ras* oncogene in human acute myeloid leukaemia. *Nature* 315 : 726-730.

Brand A.H., Breeden L., Abraham J., Sternglanz R. & Nasmyth K. (1985). Characterization of a silencer in yeasts : a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell.* 41 : 41-48.

Bremmer R. & Balmain A. (1990). Genetic changes in skin tumor progression: correlation between presence of a mutant *ras* gene and loss of heterozygosity on mouse chromosome 7. *Cell* 61 : 407-417.

Briggs M.R., Kadonaga J.T., Bell S.P. & Tjian R. (1986). Purification and biochemical characterisation of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* 234 : 47-52.

Cantley L.C., Auger K.R., Carpenter C., Duckworth B., Graziani A., Kapeller R. & Soltoff S. (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64 : 281-302.

Capon D.J., Chen E. Y., Levinson A.D., Seeburg P.H. & Goeddel D.V. (1983a). Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 302 : 33-37.

Capon D.J., Seeburg P.H., McGrath J.P., Hayflick J.S., Edman U., Levinson A.D. & Goeddel D.V. (1983b). Activation of *Ki-ras 2* gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature* 304 : 507-513.

Carbone A., Gusella G.L., Radzioch D. & Varesio L. (1991). Human Harvey-*ras* is biochemically different from Kirsten- or N-*ras*. *Oncogene* 6 : 731-737.

Carthew R.W. & Rubin G.M. (1990). *seven in absentia*, a gen required for specification of R7 cell fate in the Drosophila eye. *Cell* 63 : 561-577.

Casey P.J., Solski P.A., Der C.J. & Buss J.E., (1989). p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc.Natl. Acad. Sci USA* 86 : 8323-8327.

Cawthon R.M., Weiss R., Xu G., Viskochil D., Culver M., Stevens J., Robertson M., Dunn D., Gesteland R., O'Connell P. & White R. (1990). A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* 62 : 193-201.

Chang E.H., Furth M.E., Scolnick E.M. & Lowy D.R. (1982). Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 297 : 479-483.

Chomczynski P. & Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156-159.

Clerc R.G., Corcoran L.M., LeBowitz J.H., Baltimore D. & Sharp P.A. (1988). The B-cell specific Oct-2 protein contains POU box- and homeo-box type domains. *Genes Dev.* 2 : 1570-1581.

Cohen J.B., Broz S.D. & Levinson A.D. (1989). Expression of the H-*ras* proto-oncogene is controlled by alternative splicing. *Cell* 58 : 461-472.

Cohen J.B. & Levinson A.D. (1988). A point mutation in the last intron responsible for increased expression and transforming activity of the c-Ha-*ras* oncogene. *Nature* 334 : 119-124.

Corominas M., Kamino H., Leon J. & Pellicer A. (1989). Oncogene activation in human benign tumors of the skin (keratoacanthomas): Is *HRAS* involved in differentiation as well as proliferation? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 6372-6376.

Courey A.J. & Tjian R. (1988). Analysis of Sp1 *in vivo* reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* 55 : 887-898.

Damante G., Filetti S. & Rapoport B. (1987). Nucleotide sequence and characterization of the 5'-flanking region of the rat Ha-*ras* proto-oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 774-778.

Damante G. & Rapoport B. (1988). A suppressor of transcriptional activity is present upstream from the rat c-Ha-*ras* promoter. *J. Mol. Biol.* 200 : 213-216.

Dandekar S., Sukumar S., Zarbl H., Young L.J. & Cardiff R.D. (1986). Specific activation of the cellular Harvey-*ras* oncogene in dimethylbenzanthracene-induced mouse mammary tumors. *Mol. Cell. Biol.* 6 : 4104-4108.

Davis R.L., Cheng P.F., Lassar A.B. & Weintraub H. (1990). The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 60 : 733-746.

DeBiasi F., Del Sal G. & Horan H.P. (1989). Evidence of enhancement of the *ras* oncogene protein product (p21) in a spectrum of human tumours. *Int. J. Cancer* 43 : 431-435.

DeClue J.E., Papageorge A.G., Fletcher J.A., Diehl S.R., Ratner N., Vass W.C. & Lowy D.R. (1992). Abnormal regulation of mammalian p21^{ras} contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (Type 1) neurofibromatosis. *Cell* 69 : 265-273.

DeFeo-Jones D., Gonda M.A., Young H.A., Chang E.H. & Lowy D.R. (1981). Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proc. Acad. Sci. USA* 78 : 3328-3352.

DeFeo-Jones D., Scolnick E.M., Koller R. & Dahr R. (1983). *ras*-Related gene sequences identified and isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 306 : 707-709.

Der C.J., Krontiris T.G. & Cooper G.M. (1982). Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 3637-3640.

Deshpande A.K. & Kung H.F. (1987). Insulin induction of *Xenopus laevis* oocyte maturation is inhibited by monoclonal antibody against p21 *ras* proteins. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 1285-1288.

De Vos A.M., Tong L., Milburn M.V., Matias P.M., Jancarick J., Noguchi S., Nishimura S., Miura K., Ohtsuka E. & Kim S.H. (1988). Three-dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c-H-*ras* p21. *Science* 239 :888-893.

Diaz-Guerra M., Haddow S., Bauluz C., Jorcano J.L., Cano A., Balmain A. & Quintanilla M. (1992). Expression of simple epithelial cytokeratins in mouse epidermal keratinocytes harboring Harvey-*ras* gene alterations. *Cancer Res.* 52 : 680-687.

Dilworth S.M. & Dingwall C. (1988). Chromatin assembly *in vitro* and *in vivo*. *Bioessay* 9 : 44-49.

Dinarello C.A., Marnoy S.O & Rosenwasser L.J. (1983). Role of arachidonate metabolism in the immunoregulatory function of human leukocytic pyrogen/lymphocyte-activating factor/interleukin 1. *J. Immunol.* 130 : 890-894.

Dominguez I., Marshall M.S., Gibbs J.B., de Herreros A.G., Cornet M.E., Graziani G., Diaz-Meco M.T., Johansen T, McCormick F. & Moscat J. (1991). Role of GTPase activating protein in mitogenic signalling through phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C. *EMBO J.* 10 : 3215-3220.

Downward J. (1990). The *ras* superfamily of small GTP-binding proteins. *TIBS* 15: 469-472.

Downward J. (1992). Regulatory mechanisms for Ras proteins. *BioEssays* 14 : 177-184.

Downward J, Graves J.D., Warne P.H., Rayter S. & Cantrell D.A. (1990). Stimulation of p21^{ras} upon T-cell activation. *Nature* 346 : 719-723.

Downward J., Riehl R., Wu L. & Weinberg R.A. (1990). Identification of a nucleotide exchange-promoting activity for p21^{ras}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 5998-6002.

Dynan W.S. & Tjian R. (1983). Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognised by RNA polymerase II. *Cell* 32 : 669-680.

Efstratiadis A., Posakony J.W., Maniatis T., Lawn R.M., O'Connell C., Spritz R.A., DeRiel J.K., Forget B.G., Weissman S.M., Slightom J.L., Blechl A.E., Smithies O., Baralle F.E., Shoulders C.C. & Proudfoot N.J. (1980). The structure and evolution of the human β -globin gene family. *Cell* 21 : 653-668.

Eick D. & Bornkamm G. (1986). Transcriptional arrest with the first exon is a fast control mechanism in *c-myc* gene expression. *Nucl. Acids Res.* 14 : 8331-8346.

Eissenberg J.C., Cartwright I.L., Thomas G.H. & Elgin S.C.R. (1985). Selected topics in chromatin structure. *Ann. Rev. Biochem.* 19 : 485-536.

Eliyahu D., Raz A., Gruss P., Givol D. & Oren M. (1984). Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312 : 646-649.

Ellis C., Moran M., McCormick F. & Pawson T. (1990). Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* 343 : 377-380.

Ellis R.N., Defeo D., Shih T.Y., Gonda M.A. & Young H.A. (1981). The p21^{src} genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature* 292 : 506-511.

Eva A. & Aaronson S.T. (1983). Frequent activation of *c-kis* as a transforming gene in fibrosarcomas induced by methylcholanthrene. *Science* 220 : 955-956.

Eva A. & Trimmer R.W. (1986). High frequency of *c-K-ras* activation in 3-methylcholanthrene-induced mouse thymomas. *Carcinogenesis* 7 : 1931-1933.

Eva A., Tronick S.R., Gol R.A., Pierce J.H. & Aaronson S.A. (1983). Transforming genes of human hematopoietic tumors: Frequent detection of *ras*-related oncogenes whose activation appears to be independent of tumor phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 4926-4930.

Evans R.M. & Hollenberg S.M. (1988). Zinc fingers: Gilt by Association. *Cell* 52 : 1-3.

Farnsworth C. L., Marshall M.S., Gibbs J.B., Stacey D.W. & Feig L.A.. (1991). Preferential inhibition of the oncogenic form of Ras^H by mutations in the GAP binding/»effector« domain. *Cell* 64 : 625-633.

Farr C.J., Saiki R.K., Erlich H.A., McCormick F. & Marshall C.J. (1988). Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 1629-1633.

Feig L. & Cooper G. M. (1988). Relationship among guanine nucleotide exchange, GTP hydrolysis, and transforming potential of mutated *ras* proteins. *Mol. Cell. Biol.* 8 : 2472-2478.

Felsenfeld G. (1992). Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 355 : 219-224.

Feramisco J.R., Fernandez-Solt A. & Bar-Sagi D. (1988). Induction of cell proliferation by the *ras* oncogene protein in fibroblasts chronically treated with phorbol ester. *Mechanism of control of Gene Expression* (Allan R. Liss). p.p. 333-337.

Feramisco J.R., Gross M., Kamata T., Rosenberg M. & Sweet R.W. (1984). Microinjection of the oncogene form of the human H-*ras* (T24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells. *Cell* 38 : 109-117.

Fleischman L.F., Chahwala S.B. & Cantley L. (1986). *Ras*-transformed cells : altered levels of phosphatidylinositol 4,5 biphosphate and catabolites. *Science* 231 : 407-410.

Forrester K., Almoguera C., Han K., Grizzle W.E. & Perrucho M. (1987). Detection of high incidence of K-*ras* oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 327 : 298-303.

Fradin A., Manley J.L. & Prives C.L. (1982). Methylation of simian virus 40 *Hpa* II site affects late, but not early viral gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 5142-5146.

Franklin G.C., Donovan M., Adam G.I.R., Holmgren L., Pfeifer-Ohlsson S. & Ohlsson R. (1991). Expression of the human PDGF- β gene is regulated by both positively and negatively acting cell type-specific regulatory elements located in the first intron. *EMBO J.* 10 : 1365-1373.

Frech M., John J., Pizon V., Chardin P., Tavitian A., Clark R., McCormick F. & Wittinghofer A. (1990). Inhibition of GTPase activating protein stimulation of Ras-p21 GTPase by the K-*rev-1* gene product. *Science* 249 : 169-171.

Fortini M.E., Simon M.A. & Rubin G.M. (1992). Signalling by the *sevenless* protein tyrosine kinase is mimicked by Ras 1 activation. *Nature* 355 : 559-561.

Fukui Y., Kozasa T., Kaziro Y., Takeda T. & Yamamoto M. (1986). Role of a *ras* homolog in the life cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell* 44 : 329-336.

Furth M.E., Aldrich T.H. & Cordon-Cardo C. (1987). Expression of *ras* proto-oncogene proteins in normal human tissues. *Oncogene* 1 : 47-58.

Fusening N.E., Samsel W., Thon W. & Worst P.K.M. (1973). Malignant transformation of epidermal cells in culture by DMBA. *Inserm* 19 : 219-228.

Fusening N.E., Amer S.M., Boukamp P. & Worst P.K.M. (1978). Characteristics of chemically transformed mouse epidermal cells *in vitro* and *in vivo*. *Bull. Cancer* 65 : 271-279.

Gaffney D.F., McLauchlan J., Whitton J.L. & Clements J.B. (1985). A modular system for assay of transcription regulatory signals : the sequence TAATGARAT is required for herpes simplex virus immediate early gene activation. *Nucl. Acids Res.* 13 : 7847-7863.

Gallick G.E., Kurzrock R., Kloetzler W.S., Arlinghaus R.B. & Gutterman J.U. (1985). Expression of p21 ras in fresh primary and metastatic human colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 1795-1799.

Garner M.M. & Revzin A. (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions : applications to components of the *Escherichia coli* lactose operon system. *Nucl. Acids Res.* 9 : 4047-3060.

Gibbs J.B. (1991). Ras C-terminal processing enzymes-New drug targets? *Cell* 65 : 1-4.

Gibbs J.B., Sigal I.S., Poe M. & Scolnick E.M. (1984). Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic *ras* p21 molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 5704-5708.

Gibbs J.B., Schaber M.D., Schofield T.L., Scolnick E.M. & Sigal I. (1989). *Xenopus* oocyte germinal-vesicle breakdown induced by [Val¹²]Ras is inhibited by a cytosol-localized Ras mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 6630-6634.

Gidoni D., Kadonaga J.T., Barrera-Saldana H., Takahashi K., Chambon P. & Tjian R. (1985). Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions. *Science* 230 : 511-517.

Glomset J.A., Gelb M.H. & Farnsworth C.C. (1990). Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *TIBS*. 15 : 139-142.

Goldfarb M., Shimizu K., Perucho M. & Wigler M. (1982). Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* 296 : 404-409.

Gorman C.M., Moffart L.F. & Howard B.H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl-transferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2 : 1044-1051.

Grand R.J.A. & Owen D. (1991). The biochemistry of *ras* p21. *Biochem. J.* 279 : 609-631.

Grosschedl R. & Baltimore D. (1985). Cell-type specificity of immunoglobulin gene expression is regulated by at least three DNA sequence elements. *Cell* 41 : 885-897.

Guerrero I., Calzada P., Mayer A. & Pellicer A. (1984). A molecular approach to leukemogenesis: mouse lymphomas contain an activated *c-ras* oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 202-205.

Guerrero I., Villasante A., Corces V. & Pellicer A. (1985). Loss of the normal *N-ras* allele in a mouse thymic lymphoma induced by a chemical carcinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 7810-7814.

Hafen E., Basler K., Edtroem J.E. & Rubin G.M. (1987). *sevenless*, a cell specific homeotic gene of *Drosophila*, encodes a putative transmembrane receptor with tyrosine kinase domain. *Science* 236 : 55-63.

Hagag N., Halegoua S. & Viola M. (1986). Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to *ras* p21. *Nature* 319 : 680-682.

Hai T., Liu F., Coukos W.J. & Green M.R. (1989). Transcription factor ATF cDNA clones : an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev.* 3 : 2083-2090.

Hall A. (1992). Signal transduction through small GTPase : a tale of two GAPs. *Cell* 69 : 389-391.

Hall A. & Brown R. (1985). Human N-*ras* cloning and gene structure. *Nucl. Acids Res.* 13 : 5255-5268.

Hall C.V., Jacob P.E., Ringold G.M. & Lee F. (1983). Expression and regulation of *Escherichia Coli lac Z* gene fusions in mammalian cells. *J. Mol. Appl Genet* 2 : 101-109.

Han K., Levine M.S. & Manley J.L. (1989). Synergistic activation and repression of transcription by *drosophila* homeobox proteins. *Cell* 56 : 573-583.

Hancock J.F., Cadwallader K. & Marshall C.J. (1991). Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21^{k-ras(B)}. *EMBO J.* 10 : 641-646.

Hancock J.F., Magee A.I., Childs J.E. & Marshall C.J. (1989). All *ras* proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 57 : 1167-1177.

Hancock J.F., Paterson H. & Marshall C.J. (1990). A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAT motif to localize p21^{ras} to the plasma membrane. *Cell* 63 : 133-139.

Harrison P.R., Rutherford T., Conkie D., Affara N., Sommerville J., Hissey P. & Paul J. (1978). Analysis of erythroid differentiation in Friend cells using non-inducible variants. *Cell* 14 : 61-70.

Harvey J.J. (1964). An identified virus which causes the rapid production of tumour in mice. *Nature* 204 : 1104-1109.

Hashimoto-Gotoh T., Kikuno R., Takahashi M. & Honkawa H. (1988). Possible role of the first intron of c-H-*ras* in gene expression : anti-cancer elements in oncogenes. *Anticancer Research* 8 : 851-860.

Herbst R.S., Boezko E.M., Darnell J.E. & Babiss L.E. (1990). The mouse albumin enhancer contains a negative regulatory element that interacts with a novel DNA binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 3896-3905.

Higuchi R., Krummel B. & Saiki R.K. (1988). A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments : study of protein and DNA interactions. *Nucl. Acids Res.* 16 : 7357-7373.

Hoeffler W.K., Kovelman R. & Roeder R.G. (1988). Activation of transcription factor III C by the adenovirus E1A protein *Cell* 53 : 907-920.

Hoffman E.K., Trusko S.P., Freeman N.A. & George D.L. (1987). Structural and functional characterisation of the promoter region of the mouse c-Ki-ras gene. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 2592-2596.

Hollenberg S.M. & Evans R.M. (1988). Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 55 : 899-906.

Honkawa H., Masahashi W., Hashimoto S. & Hashimoto-Gotoh T. (1987). Identification of the principal promoter sequence of the c-H-ras transforming oncogene : deletion analysis of the 5'-flanking region by focus formation assay. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 2933-2940.

Hope I.A., Mahadevan S. & Struhl K. (1988). Structural and functional characterisation of the short acidic transcriptional activation region of yeast GCN4 protein. *Nature* 333 : 635-640.

Hope I.A. & Struhl K. (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* 46 : 885-894.

Huang A.L., Ostrowski M.C., Berard D. & Hager G.L. (1981). Glucocorticoid regulation of the Ha-MuSV p21 gene conferred by sequences from mouse mammary tumor virus. *Cell* 27 : 245-255.

Huang Y.K., Kung H.F. & Kamata T. (1990). Purification of a factor capable of stimulating the guanine nucleotide exchange reaction of ras proteins and its effect on ras-related small molecular mass G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 8008-8012.

Ikeda T., Sawada N., Fujinaga K., Minase T. & Mori M. (1989). c-H-*ras* gene is expressed at the G1 phase in primary cultures of hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 185 : 292-296.

Ishii S., Kadonaga J.T., Tjian R., Brady J.N., Merlino G.T. & Pastan I. (1986). Binding of the Sp1 transcription factor by the human Harvey *ras1* proto-oncogene promoter. *Science* 232 : 1410-1413.

Ishii S., Merlino G.T. & Pastan I. (1985). Promoter region of the human Harvey *ras* proto-oncogene : similarity to the EGF receptor proto-oncogene promoter. *Science* 230 : 1378-1381.

Jackson S.P. & Tjian R. (1988). O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* 55 : 125-133.

Jeffers M., Paciucci R. & Pellicer A. (1990). Characterization of *unr* ; a gene closely linked to N-*ras*. *Nucleic Acids Res.* 18 : 4891-4899.

Jeffers M. & Pellicer A. (1992). Multiple intragenic elements regulate the expression of the mirine N-*ras* gene. *Oncogene* 7 : 2115-2123.

Jones P.A. (1985). Altering gene expression with 5-azacytidine. *Cell* 40 : 485-486.

Jones K.A., Kadonaga J.T., Rosenfeld P.J., Kelly T.J. & Tjian R. (1987). A cellular DNA-binding protein that activates eucaryotic transcription and DNA replication. *Cell* 48 : 79-89.

Jones N.C., Rigby P.W.J. & Ziff E.B. (1988). Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription : lessons from studies on DNA tumor viruses. *Genes Dev.* 2 : 267-281.

Jones K.A. & Tjian R. (1985). Sp1 binds to promoter sequences and activates Herpes simplex virus «immediate-early» gene transcription *in vitro*. *Nature* 317 : 179-182.

Jones N. (1990). Transcriptional regulation by dimerization : Two sides to an incestuous relationship. *cell* 61 : 9-11.

Jones S., Vignais M.L. & Broach J.R. (1991). The *CDC25* Protein of *Saccharomyces cerevisiae* promotes exchange of guanine nucleotides bound to Ras. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 2641-2646.

Jordano J. & Perucho M. (1988). Initial characterisation of a potential transcriptional enhancer for the human c-K-ras gene. *Oncogene* 2 : 359-366.

Kadonaga J.T., Carner K.R., Masiarz F.R. & Tjian R. (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51 : 1079-1090.

Kadonaga J.T., Jones K.A. & Tjian R. (1986). Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1. *TIBS* 11 : 20-23.

Kaplan D.R., Morrison D.K., Wong G., McCormick F. & Williams L.T. (1990). PDGF β -receptor stimulates tyrosine phosphorylation of GAP and association of GAP with a signaling complex. *Cell* 61 : 125-133.

Karpinski B.A., Yang L.-H., Cacheris P., Morle G.D. & Leiden J.M. (1989). The first intron of the 4F2 heavy-chain gene contains a transcriptional enhancer element that binds multiple nuclear proteins. *Mol. Cell. Biol.* 9 : 2588-2597.

Kataoka T., Powers S., McGill C., Fasano O., Strathern J., Broach J. & Wigler M. (1984). Genetic analysis of yeast *RAS1* and *RAS2* genes. *Cell* 37 : 437-445.

Kataoka T., Powers S., Cameron S., Fasano O., Goldfarb M., Broach J. & Wigler M. (1985). Functional homology of mammalian and yeast *RAS* genes. *Cell* 40 : 19-26.

Kazlauskas A., Ellis C., Pawson C., & Cooper J.A. (1990). Binding of GAP to activated PDGF receptors. *Science* 247 : 1578-1581.

Kitayama H., Sugimoto Y., Matsuzaki T., Ikawa Y. & Noda M. (1989). A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56 : 77-84.

Kirsten W.H. & Mayer L.A. (1967). Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 39 : 311-335.

Knezetic J.A., Jacob G.A. & Luse D.S. (1988). Assembly of RNA polymerase II preinitiation complexes before assembly of nucleosomes allows efficient initiation of transcription on nucleosomal templates. *Mol. Cell. Biol.* 8 : 3114-3121.

Knezetic J.A. & Luse D.S. (1986). The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II *in vitro*. *Cell* 45 : 95-104.

Knust B., Brüggemann U. & Doerfler W. (1989). Reactivation of a methylation-silenced gene in adenovirus-transformed cells by 5-azacytidine or by E1A *trans* activation. *J. Virol.* 63 : 3519-3524.

Korn L.J., Siebel C.W., McCormick F. & Roth R.A. (1987). *Ras* p21 as a potential mediator of insulin action in *Xenopus* oocytes. *Science* 236 : 840-843.

Kouzarides T. & Ziff E. (1988). The role of the leucine zipper in the Fos-Jun interaction. *Nature* 336 : 646-651.

Krämer H., Cagan R.L. & Zipursky S.L. (1991). Interaction of *bride of sevenless* membrane bound ligand and the *sevenless* tyrosine-kinase receptor. *Nature* 352 : 207-212.

Lacal J.C., De La Pena P., Moscat J., Garcia-Barreno P., Anderson P.S. & Aaronson S.A. (1987a). Rapid stimulation of diacylglycerol production in *Xenopus* oocytes by microinjection of H-*ras* p21. *Science* 238 : 533-536.

Lacal J.C., Moscat J. & Aaronson S.A. (1987b). Novel source of 1,2-diacylglycerol elevated in cells transformed by Ha-*ras* oncogene. *Nature* 330 : 269-272.

Lacal J.C., Fleming T.P., Warren B.S., Blumberg P.M. & Aaronson S.A. (1987c). Involvement of functional protein kinase C in the mitogenic response to the H-*ras* oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 4146-4149.

Lacal J.C. (1990). Diacylglycerol production in *Xenopus laevis* oocytes after microinjection of p21^{ras} proteins is a consequence of activation of phosphatidylcholine metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 333-340.

Land H., Parada L.F. & Weinberg R.A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblast requires at least two cooperating oncogenes *Nature* 304 : 596-602.

Landschulz W.H., Jonhson P.F. & McKnight S.L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240 : 1759-1764.

Laughon A. & Scott M.P. (1984). Sequence of a *drosophila* segmentation gene: protein structure homology with DNA-binding proteins. *Nature* 310 : 25-31.

Lee W. & Keller E.B. (1991). Regulatory elements mediating transcription of the human Ha-ras gene. *J. Mol. Biol.* 220 : 599-611.

Lemoine N.R., Mayall E.S., Wyllie F.S., Williams E.D., Goyns M., Stringer B. & Thomas D.W. (1989). High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene* 4 : 159-164.

Leon J., Guerrero I. & Pellicer A. (1987). Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 1535-1540.

Levine M. & Hoey T. (1988). Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* 55 : 537-540.

Li B-Q, Kaplan D., Kung H-F & Kamata T. (1992). Nerve growth factor stimulation of the Ras-guanine nucleotide exchange factor and GAP activities. *Science* 256 : 1456-1459.

Lobanenkov V.V., Nicolas R.H., Adler V.V., Paterson H., Klenova E.M., Polotskaja A.V. & Goodwin G.H. (1990). A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regulatory spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene* 5 : 1743-1753.

Lorch Y., Lapointe J.W. & Kornberg R.D. (1987). Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 49 : 203-210.

Lowndes N.F., Bushel P., Mendelsohn L., Wu J., Yen M.-Y. & Allan M. (1990). A short, highly repetitive element in intron -1 of the human c-Ha-ras gene acts as a block to transcriptional readthrough by a viral promoter. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 4990-4995.

Lowndes N.F., Paul J., Wu J. & Allan M. (1989). c-Ha-ras gene bidirectional promoter expressed *in vitro* : Location and regulation. *Mol. Cell. Biol.* 9 : 3758-3770.

Lowy D.R., Zhang K., DeClue J.F. & Willumsen B.M. (1991). Regulation of p21^{ras} activity. *TIG* 7 : 346-351.

- Ma J. & Ptashne M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* 51 : 113-119.
- Maniatis T., Goodbourn S. & Fisher J.A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 236 : 1237-1245.
- March P.E., Lerner C.G., Ahnn J., Cui X & Inouye M. (1988). The *Escherichia coli* Ras-like protein (Era) has GTPase activity and is essential for cell growth. *Oncogene* 2 : 539-544.
- Martin D.I.K. & Evans M.J. (1975). Differential of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 : 1441-1445.
- Martin G.A., Viskochill D., Bollag G., McCabe P.C., Crosier W.J., Haubruck H., Conroy L., Clark R., O'Connell P., Cawthon R.M., Innis M.A. & McCormick F. (1990). The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with *ras* p21. *Cell* 63 : 843-849.
- Martin G.A., Yatani A., Clark R., Conroy L., Polakis P., Brown A.M. & McCormick F. (1992). GAP domains responsible for Ras p21-dependent inhibition of muscarinic atrial K⁺ channel currents. *Science* 255 : 192-194.
- Matsui T. (1987). Transcription of adenovirus 2 major late and peptide IX genes under conditions of *in vitro* nucleosome assembly. *Mol. Cel. Biol.* 7 : 1401-1408.
- McCormick F. (1989). *ras* GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell* 56 : 5-8.
- McCormick F. (1989). *ras* oncogenes. In : *Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer*. Chap. 5 : 125-145. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- McCormick F. (1990). The world according to GAP. *Oncogene* 5 : 1281-1283.
- McGrath J.P., Capon D.J., Goeddel D.V. & Levinson A.D. (1984). Comparative biochemical properties of normal and activated human *ras* p21 protein. *Nature* 310 : 644-649.

McGrath J.P., Capon D.J., Smith D.J., Chen E.Y., Seeburg P.H. Goeddel D.V. & Levinson A.D. (1983). Structure and organisation of the human *Ki-ras* proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 304 : 501-506.

McKay I.A., Marshall C.J., Cales C. & Hall A. (1986). Transformation and stimulation of DNA synthesis in NIH-3T3 cells are a titratable function of normal p21^{N-ras} expression. *EMBO J.* 5 : 2617-2621.

Medema R.H., Wubbolts R & Bos J.L. (1991). Two dominant inhibitory mutants of p21^{ras} interfere with insulin-induced gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 5963-5967.

Mermod N., O'Neill E.A., Kelly T.J. & Tjian R. (1989). The proline rich transcriptional activator of CTF/NF-1 is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* 58 : 741-753.

Metter J. & Cho C. (1989). Tissue-specific hypomethylation of the human c-K-ras gene. *Nucl. Acids Res.* 17 : 7089-7099.

Milburn M.V., Tong L., DeVos A.M., Brünger A., Yamaizumi Z., Nishimura S. & Kim S.H. (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic *ras* proteins. *Science* 247 : 939-945.

Miller J., McLachlan A.D. & Klug A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4 : 1609-1614.

Molloy C.J., Bottaro D.P., Fleming T.P., Marshall M.S., Gibbs J.B. & Aaronson S.A. (1989). PDGF induction of tyrosine phosphorylation of a GTPase activating protein. *Nature* 342 : 711-714.

Montminy M.R. & Bilezikjian L.M. (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328 : 175-178.

Moolenaar W.H., Tsien R.Y., van der Saag P.T. & DeLaat S. (1983). Na⁺/H⁺ exchange and cytoplasmic pH in the action of growth factors in human fibroblasts. *Nature* 304 : 645-648.

Moran M. F., Polakis P., McCormick F., Pawson T. & Ellis C. (1991). Protein-tyrosine kinases regulate the phosphorylation, protein interactions, subcellular distribution, and activity of p21^{ras} GTPase-activating protein. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 1804-1812.

Muglia A. & Rothman-Denes L.B. (1986). Cell type-specific negative regulatory element in the control region of the rat α -fetoprotein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 7653-7657.

Mulcahy L., Smith M.R. & Stacey D.W. (1985). Requirement for *ras* proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature* 313 : 241-243.

Muller J.L. & Koontz J.W. (1981). A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin. *Dev. Biol.* 85 : 309-316.

Muller J.L. (1983). Interaction of steroids with cyclic nucleotide system in amphibian oocytes. In : *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, 13 : 295-336. Eds: P; greengard & G.R. Robinson (Raven press, New York).

Muller R., Slamon D.J., Adamson E.D., Tremblay J.M., Muller D. & Cline M.J. (1983). Transcription of *c-onc* genes *c-ras* Ki and *c-fms* during mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 3 : 1062-1068.

Mullins L.J., Veres G., Caskey C.T. & Chapman V. (1987). Differential methylation of the ornithine carbamoyl transferase gene on active and inactive mouse X chromosomes. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 3916-3922.

Murroya K., Hattori S. & Nakamura S. (1992). Nerve growth factor induces rapid accumulation of the GTP-bound form of p21^{ras} in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Oncogene* 7 : 277-281.

Murray M.J., Cunningham J.M., Parada L.F., Dautry F., Lebowitz P. & Weinberg R.A. (1983). The HL-60 transforming sequence: A *ras* oncogene coexisting with altered *myc* genes in hematopoietic tumors. *Cell* 33 : 749-757.

Neades R., Betz N.A. Sheng X. & Pelling J.C. (1991). Transient expression of the cloned mouse c-Ha-*ras* 5' upstream region in transfected primary SENCAR mouse keratinocytes demonstrates its power as a promoter element. *Mol. Carcinog.* 4 : 369-375.

Neri A., Knowles D.M., Greco A., McCormick F. & Dalla-Favera R. (1988). Analysis of *RAS* oncogene mutations in human lymphoid malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 9268-9272.

Nicolaiew N., Triqueneaux G. & Dautry F. (1991). Organization of the human *N-ras* locus: characterization of a gene located immediately upstream of *N-ras*. *Oncogene* 6 : 721-730.

Noda M., Ko M., Ogura A., Liu D.-G., Amno T., Takano T. & Ikawa Y. (1985). Sarcoma viruses carrying *ras* oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. *Nature* 318 : 73-75.

Norman C., Runswick M., Pollock R. & Treisman R. (1988). Isolation and properties of c-DNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the *c-fos* serum response element. *Cell* 55 : 989-1003.

Nshizuka Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308 : 693-698.

Ondek B., Gloss L. & Herr W. (1988). The SV40 enhancer contains two distinct levels of organisation. *Nature* 333 : 40-45.

Pabo C.O. & Lewis M. (1982). The operator-binding domain of λ repressor: structure and DNA recognition. *Nature* 298 : 443-447.

Pabo C.O. & Sauer R.T. (1984). Protein-DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 293-321.

Paciucci R. & Pellicer A. (1991). Dissection of the mouse *N-ras* gene upstream regulatory sequences and identification of the promoter and a negative regulatory element. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 1334-1343.

Paï E.F., Krenzel U., Petsko G.A., Goody R.S., Kabsch W. & Wittinghofer A. (1991). Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-*ras* p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* 9 : 2351-2359.

Parada L.F., Land H., Weinberg R.A., Wolf D. & Rotter V. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and *ras* in cellular transformation. *nature* 312 : 649-651.

Parada L.F., Tabin C.J., Shih C. & Weinberg R.A. (1982). human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene. *Nature* 297 : 474-478.

Parsons J.T. (1990). Closing GAP in a signal transduction pathway. *T.I.G.* 6 : 169-171.

Paulin D., Jakob H., Jacob F., Weber K. & Osborn M. (1982). *In vitro* differentiation of mouse teratocarcinoma cells monitored by intermediate filament expression. *Differentiation* 22 : 90-99.

Pederson D.S., Thoma F. & Simpson R.T. (1986). Core particle, fiber, and transcriptionally active chromatin structure. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 2 : 117-147.

Pelham H.R.B. (1982). A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila Hsp 70* heat shock gene. *Cell* 30 : 517-528.

Pelling J.C., Ernst S.M., Strawhecker J.M., Johnson J.A., Nairn R.S. & Slaga T.J. (1986). Elevated expression of Ha-*ras* is an early event in two-stage skin carcinogenesis in SENCAR mice. *Carcinogenesis* 7 : 1599-1602.

Pelling J.C., Fischer S.M., Neades R, Strawhecker J.M. & Schweickert L. (1987). Elevated expression and point mutation of the Ha-*ras* proto-oncogene in mouse skin tumors promoted by benzoyl peroxide and other promoting agents. *Carcinogenesis* 10 : 1481-1484.

Plumb M.A. & Goodwin G.H. (1988). Detection of sequence specific protein DNA interactions by the DNA-footprinting technique. Chapter 12 in *Methods in Molecular Biology*, volume 4. Edited by J.M. Wlkae. Published by Humana Press, New Jersey

Plumb M., Telliez J.-B., Fee F., Daubersies P., Bailleul B. & Balmain A. (1991). Structural analysis of the mouse c-Ha-*ras* gene promoter. *Mol. Carcinog.* 4 : 103-111.

Powers S., Katakoa T., Fasano O., Goldfarb M., Strathern J., Broach J. & Wigler M. (1984). Genes in *S. cerevisiae* encoding proteins with domains homologous to the mammalian *ras* proteins. *Cell* 36 : 607-612.

Prendergast G.C., Lawe D. & Ziff E.B. (1991). Association of Myn, the murine homolog of Max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and Ras cotransformation. *Cell* 65 : 395-407.

Ptashne M. (1988). How eucaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335 : 683-689.

Pulciani S., Santos E., Lauver A.V., Long L.K., Robbins K.C. & Barbacid M. (1982). Oncogenes in human tumor cell lines : molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 2845-2849.

Pulciani S., Santos E., Long L.K., Sorrentino V. & Barbacid M. (1985). *ras* gene amplification and malignant transformation. *Mol. Cell. Biol.* 5 : 2836-2841.

Quintanilla M., Brown K, Ramsden M. & Balmain A. (1986). Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-*ras* during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322 : 78-80.

Quintanilla M., Haddow S., Jonas D., Jaffe D., Bowden G.T. & Balmain A. (1991). Comparison of *ras* activation during epidermal carcinogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis* 12 : 1875-1881.

Rachal M.J., Yoo H., Becker F.F. & Lapeyre J.N. (1989). *In vitro* DNA cytosine methylation of *cis*-regulatory elements modulates c-Ha-*ras* promoter activity *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* 17 : 5135-5147.

Ramsden M., Cole G., Smith J. & Balmain A. (1985). Differential methylation of the c-Ha-*ras* gene in normal mouse cells and during skin tumour progression. *EMBO J.* 4 : 1449-1454.

Ransone L.J. & Verma I.M. (1990). Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6 : 539-557.

Rassoulzadegan M., Cowie A., Carr A., Glaichenhaus N., Kamen R. & Cuzin F. (1983). The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* 300 : 713-718

Reedijk M., Liu X. & Pawson T. (1990). Interactions of phosphatidylinositol kinase, GTPase-activating protein (GAP), and GAP-associated proteins with the colony-stimulating factor 1 receptor. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 5601-5608.

Reddy E.P. (1983). Nucleotide sequence analysis of the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Science* 220 : 1061- 1063.

Reddy E.P., Reynolds R.K., Santos E. & Barbacid M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300 : 149-152.

Reinke R. & Zipursky S.L. (1988). Cell-cell interaction in the Drosophila retina : the *bride of sevenless* gene is required in photoreceptor cell R8 for R7 cell development. *Cell* 55 : 321-330.

Reiss Y., Goldstein J.L., Seabra M.C., Casey p.J. & Brown M.S. (1990). Inhibition of purified p21^{ras}farnesyl : protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *Cell* 62 : 81-88.

Remmers E.F., Yang J.Q. & Marcu K.B. (1986). A negative transcriptional control element located upstream of the murine *c-myc* gene. *EMBO J.* 5 : 899-904.

Reynolds S.H., Stowers S.J., Patterson R.M., Maronpot R.R., Aaronson S.A. & Anderson M.W. (1987). Activated oncogenes in B6C3F1 mouse liver tumors: implications for risk assessment. *Science* 237 : 1309-1316.

Rodenhuis S., Slebos R.J.C., Boot A.J.M., Evers S.G., Mooi W.J., Wagenaar S.S., Van Bodegom P.C. & Bos J.L. (1988). *K-ras* oncogene activation in adenocarcinoma of the lung : incidence and possible clinical significance. *Cancer Res.* 48 : 5738-5741.

Rodrigues-Pena A. & Rozengurt E. (1984). Disappearance of Ca²⁺-sensitive, phospholipid-dependent protein kinase activity in phorbol ester-treated 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120 : 1053-1059.

Ruley H.E. (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 304 : 602-606.

Sadowski I., Ma J., Triezenberg S. & Ptashne M. (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335 : 563-564.

Santos E., Martin-Zanca D., Reddy E.P., Pierotti M.A., Della Porta G. & Barbacid M. (1984). Malignant activation of a *K-ras* oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. *Science* 223 : 661-664.

Santos E., Tronick S.R., Aaronson S.A., Pulciani S. & Barbacid M. (1982). T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB-and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 298 : 343-347.

Sassone-Corsi P., Der C.J. & Verma I. M. (1989). *ras*-induced neuronal differentiation of PC12 cells: possible involvement of *fos* and *jun*. *Mol. Cell. Biol.* 9 : 3174-3183.

Schaeffer E.F., Boissier F., Py M.D., Cohen G.N. & Zakin M.M. (1989). Cell type-specific expression of the human transferrin gene. *J.Biol. Chem.* 264 : 7153-7160.

Schwab M., Varmus H.E. & Bishop J.M. (1985). human N-*myc* gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. *Nature* 316 : 160-162.

Schlichting I., Almo S.C., Rapp G., Wilson K., Petratos K., Lentfer A., Wittinghofer A., Kabsch W., Paï E.F., Petsko G.A. & Goody R. (1990). Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature* 345 : 309-315.

Seeburg P.H., Colby W.W., Capon D.J., Goeddel D.V. & Levinson A.D. (1984). Biological properties of human c-Ha-*ras1* genes mutated at codon 12. *Nature* 312 : 71-75.

Selden R.F., Howie K.B., Rowe M.E., Goodman H.M. & Moore D.D. (1986). human growth hormon as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 6 : 3173-3179.

Serfling E., Jasin M. & Schaffner W. (1985). Enhancers and eukaryotic gene transcription. *TIG* 1 : 224-230.

Serth J., Lautwein A., Frech M., Wittinghofer A. & Pingoud A. (1991). The inhibition of the GTPase activating protein-Ha-ras interaction by acidic lipids is due to physical association of the C-terminal of the GTPase activating protein with micellar structures. *EMBO J.* 10 : 1325-1330.

Settleman J., Narasimhan V., Foster L.C. & Weinberg R.A. (1992). Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190 : implications for signaling pathway from Ras to the nucleus. *Cell* 69 : 539-549.

Shen W.P.V., Aldrich T.H., Venta-Perez G., Franza Jr. & Furth M.E. (1987). Expression of normal and mutant *ras* proteins in human acute leukemia. *Oncogene* 1 : 157-165.

Shepherd J.C.W., McGinnis W., Carrasco A.E., de Robertis E.M. & Gehring W. (1984). Fly and Frog homeo domains show homologies with yeast mating type regulatory proteins. *Nature* 310 : 70-71.

Shier W.T. & Durkin J.P. (1982). Role of stimulation of arachidonic acid release in proliferative response of 3T3 mouse fibroblasts to platelet-derived growth factor. *J. Cell. Physiol.* 112 : 171-181.

Shih C. & Weinberg R.A. (1982). Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* 29 : 161-169.

Shih T.Y., Papageorge A.G., Stokes P.E., Weeks M.O. & Scolnick E.M. (1980). Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p21^{src} protein of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 287 : 686-691.

Shih T.Y., Weeks M.O., Young H.A., & Scolnick E.M. (1979a). Identification of a sarcoma virus-code phosphoprotein in nonproducer cells transformed by Kirsten or Harvey Murine sarcoma virus. *Virology* 96 : 64-79.

Shih T.Y., Weeks M.O., Young H.A., & Scolnick E.M. (1979b). p21 of Kirsten Murine sarcoma virus is thermolabile in a viral mutant temperature sensitive for the maintenance of transformation. *J. Virol.* 31 : 546-556.

Shimizu K., Goldfarb M., Perucho M. & Wigler M. (1983). Isolation and preliminary characterisation of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 383-387.

Shou C., Farnsworth C.L., Neel B.G. & Feig L.A. (1992). Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine nucleotide-releasing factor for Ras p21. *Nature* 358 : 351-354.

Sigal I.S., Gibbs J.B., D'Alonzo J.S. & Scolnick E.M. (1986). Identification of effector and neutralizing epitope of Ha-*ras*-encoded p21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 4725-4729.

Simon M.A., Bowtell D.B.L., Dodson G.S., Lavery T.R. & Rubin G.M. (1991). Ras 1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the *Sevenless* protein tyrosine kinase. *Cell* 67 : 701-716.

Simpson R.T. & Stafford D.W. (1983). Structural features of a phased nucleosome core particle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 51-55.

Singer B. & Kusmierek J.T. (1982). Chemical mutagenesis. *Ann. Rev. Biochem.* 51 : 655-693.

Slamon D.J. & Cline M. (1984). Expression of cellular oncogenes during embryonic and fetal development of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 7141-7145.

Slamon D.J., deKernion J.B., Verma I.M. & Cline M.J. (1984). Expression of cellular oncogenes in human malignancies. *Science* 224 : 256-262.

Smit V.T.H.B.M., Boot A.J.M., Smits A.M.M., Fleuren G.J., Cornelisse C.J. & Bos J.L. (1988). KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucl. Acids Res.* 16 : 7773-7782.

Stacey D.W. & Kung H.F. (1984). Transformation of NIH3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein. *Nature* 310 : 503-511.

Stacey D.W., Watson T., Kung H.F. & Curran T. (1987). Microinjection of transforming ras protein induces c-fos expression. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 523-527.

Stein R., Razin A. & Cedar H. (1982). *In vitro* methylation of the hamster adenine phosphoribosyl-transferase gene inhibits its expression in mouse L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 3418-3422.

Strawhecker J.M., Betz N.A., Neades R.Y., Houser W. & Pelling J.C. (1989). Binding of the 97kDa glucocorticoid receptor to the 5' upstream flanking region of the mouse c-Ha-ras oncogene. *Oncogene* 4 : 1317-1322.

Struhl K. (1987). The DNA-binding domains of the Jun oncoprotein and the yeast GCN4 transcriptional activator protein are functionally homologous. *Cell* 50 : 841-846.

Sturm R.A., Das G. & Herr W. (1988). The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev.* 2 : 1582-1599.

Suarez H.G., Daya-Grosjean L., Schaifer D., Nardeux P., Renault G., Bos J.L. & Sarasin A. (1989). Activated oncogenes in human skin tumors from repair-deficient syndrome, Xeroderma pigmentosum. *Cancer Res.* 49 : 1223-1228.

Suarez H.G., du Villard J.A., Severino M., Caillou B., Schlumberger M., Tubiana M., Parmentier C. & Monier R. (1990). Presence of mutations in all three ras genes in human thyroid tumors. *Oncogene* 5 : 565-570.

Sukumar S., Notario V., Martin-Zanca D. & Barbacid M. (1983). Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature* 306 : 658-661.

Sukumar S., Terantoni A., Reed C., Rice J.M. & Wenk M.L. (1986). Activated K-*ras* and N-*ras* oncogenes in primary renal mesenchymal tumors induced in F344 Rats by methyl(methoxymethyl)nitrosamine. *Mol. Cell. Biol.* 6 : 2716-2720.

Swanson M.E., Eltse A.M., Greenberg S.M., Schwartz J.H., Aldrich T.H. & Furth M.E. (1986). Abundant expression of Ras proteins in Aplysia neurons. *J. Biol. Chem.* 103 : 485-492.

Sweet R.W., Yokoyama S., Kamata T., Feramisco J.R., Rosenberg M. & Gross M. (1984). The product of *ras* is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature* 311 : 273-275.

Szeberenyi J., Cai H. & Cooper G.M. (1990). Effect of a dominant inhibitory Ha-*ras* mutation on neuronal differentiation of PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 5324-5332.

Tabin C.J., Bradley S.M., Bargmann C.I., Weinberg R.A., Papageorge A.G., Scolnick E.M., Dhar R., Lowy D.R. & Chang E.H. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300 : 143-149.

Tainski M.A., Cooper C.S., Giovanella B.C. & Vande Woude G.F. (1984). An activated *ras*^N gene: detected in late but not early passage human PA1 teratocarcinoma cells. *Science* 225 : 643-645.

Tanaka K., Nakafuku M., Satoh T., Marshall M., Gibbs J., Matsumoto K., Kaziro Y. & Toh-e A. (1990). *S. cerevisiae* genes *IRA1* and *IRA2* encode proteins that may be functionally equivalent to mammalian *ras* CTPase activating protein. *Cell* 60 : 803-807.

Tanaka T., Slamon D.J., Battifora H. & Cline M.J. (1986). Expression of p21 *ras* oncoproteins in human cancers. *Cancer Res.* 46 : 1465-1470.

Tatchell K., Chaleff D.T., DeFeo J.D. & Scolnick E.M. (1984). Requirement of either of a pair of *ras*-related genes of *Saccharomyces cerevisiae* for spore viability. *Nature* 309 : 523-527.

Tatchell K., Robinson L.C. & Breitenbach M. (1985). *RAS2* of *Saccharomyces cerevisiae* is required for gluconeogenic growth and proper response to nutrient limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82 : 3785-3789.

Temeles G.L., Gibbs J.B., D'Alonzo J.S., Sigal I.S. & Scolnick E.M. (1985). Yeast and mammalian *ras* proteins have conserved biochemical properties. *Nature* 313 : 700-703.

Thomas, S. M., DeMarco M., D'Arcangelo G., Halegoua S. & Brugge J. S. (1992). Ras is essential for nerve growth factor and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell* 68 : 1031-1040.

Thomson T.M., Green S.H., Trotta R.J., Burstein D.E. & Pellicer A. (1990). Oncogene N-*ras* mediates selective inhibition of *c-fos* induction by nerve growth factor and basic fibroblast growth factor in PC12 cell line. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 1556-1563.

Thorn J.T., Todd A.V., Warrilow D., Watt F., Molloy P.L. & Iland H.J. (1991). Characterisation of the human N-*ras* promoter region. *Oncogene* 6 : 1843-1850.

Toda T., Uno I., Ishikawa T., Powers S., Kataoka T., Broek D., Cameron S., Broach J., Matsumoto K. & Wigler M. (1985). In yeast, *RAS* proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40 : 27-36.

Tomlinson A., Bowtell D.D.L., Hafen E. & Rubin G.M. (1987). Localization of the *sevenless* protein, a putative receptor for positional information, in the eye imaginal disc of *Drosophila*. *Cell* 51 : 143-150.

Tomlinson A. & Ready D.F. (1986). *Sevenless*: a cell-specific homeotic mutation of the *Drosophila* eye. *Science* 231 : 400-402.

Tong L., deVos A.M., Milburn M.V. & Kim S.-H. (1991). Crystal structure at 2.2 Å resolution of the catalytic domains of Ras protein and an oncogenic mutant complexed with GDP. *J. Mol. Biol.* 217 : 503-516.

Tora L., White J., Brou C., Tasset D., Webster N., Scheer E. & Chambon P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59 : 477-487.

Trahey M. & McCormick F. (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-*ras* p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238 : 542-54.

Trahey M., Wong G., Halenbeck R., Rubinfeld B., Martin G.A., Ladner M., Long C.M., Crosier W.J., Watt K., Kohts K. & McCormick F. (1988). Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta. *Science* 242 : 1697-1700.

Trimble W.S. & Hozumi N. (1987). Deletion analysis of the c-Ha-ras oncogene promoter. *FEBS* 219 : 70-74.

Tsaï M.H., Yu C.L., Wei F.S. & Stacey D.W. (1989). The effect of GTPase activating protein upon Ras is inhibited by mitogenically responsive lipids. *Science* 243 : 522-526.

Vallette F., Mege E., Reiss A & Adesnik M. (1989). Construction of mutant and chimeric genes using the polymerase chain reaction. *Nucl. Acids Res.* 17 : 723-733.

Vardimon L., Kressmann A., Cedar H. Maechler M. & Doerfler W. (1982). Expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by *in vitro* methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 1073-1077.

Vicentini L.M., Miller R.J. & Villereal M.L. (1984). Evidence for a role of phospholipase activity in the serum stimulation of Na⁺ influx in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 259 : 6912-6919.

Viskochil D., Buchberg A.M., Xu G., Cawthon R.M., Stevens J., Wolff R.K., Culver M., Carey J.C., Copeland N.G., Jenkins N.A., White R. & O'Connell P. (1990). Deletions and translocation Interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 62 : 187-192.

Vogel U.S., Dixon R.A., Schaber M.D., Diehl R.E., Marshall M.S., Scolnick E.M., Sigal I.S. & Gibbs J.B. (1988). Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras p21. *Nature* 335 : 90-93.

Wakelam M.J.O., Davies S.A., Housley M.D., McKay I., Marshall C.J. & Hall A. (1986). Normal p21^{N-ras} couples bombesin and other growth factor receptors to inositol phosphate production. *Nature* 323 : 173-176.

Wallace M.R., Marchuk D.A., Andersen L.B., Letcher R., Odeh H.M., Saulino A.M., Fountain J.W., Brereton A., Nicholson J., Mitchell A.L., Brownstein B.H. & Collins F.S. (1990). Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 249 : 181-186.

Weintraub H. & Groudine M. (1976). Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science* 193 : 848-856.

Weisbrod S. (1982). Active chromatin. *Nature* 297 : 289-295.

West M., Kung H.F. & Kamata T. (1990). A novel membrane factor stimulates guanine nucleotide exchange reaction of *ras* proteins. *FEBS* 259 : 245-248.

Westaway D., Papkoff J., Moscovici C. & Varmus H.E. (1986). Identification of a provirally activated c-Ha-*ras* oncogene in an avian nephroblastoma via a novel procedure: cDNA cloning of a chimaeric viral-host transcript. *EMBO J.* 5 : 301-309.

Wharton R.P. & Ptashne M. (1985). Changing the binding specificity of a repressor by redesigning an α -helix. *Nature* 316 : 601-605.

Williams T., Admon A., Luscher B. & Tjian R. (1988). Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev.* 2 : 1557-1569.

Willingham M.C., Pastan I., Shih T.Y. & Scolnick E.M. (1980). Localization of the *src* gene product of the Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell* 19 : 1005-1014.

Willumsen B.M., Christensen A., Hubbert N.L., Papageorge A.G. & Lowy D.R. (1984). The p21 *ras* C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* 310 : 583-586.

Willumsen B., Papageorge A.G., Kung H., Bekesi E., Robins T., Johnsen M., Vass W.C. & Lowy D.R. (1986). Mutational analysis of a *ras* catalytic domain. *Mol. Cell. Biol.* 6 : 2646-2654.

Winoto A. & Baltimore D. (1989). $\alpha\beta$ Lineage-specific expression of the α T receptor gene by nearby silencers. *Cell* 59 : 649-655.

Winter E. & Perucho M. (1986). Oncogene amplification during tumorigenesis of established rat fibroblasts reversibly transformed by activated human *ras* oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 6 : 2562-2570.

Wiseman R.W., Stowers S.J., Miller E.C., Anderson M.W. & Miller J.A. (1986). Activating mutations of c-Ha-*ras* protooncogene in chemically induced hepatomas of the male B6C3F₁ mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 5825-5829.

Wolfman A. & Macara I.G., (1987). Elevated levels of diacylglycerol and decreased phorbol ester sensitivity in *ras*-transformed fibroblasts. *Nature* 352 : 359-361.

Wolfman A. & Macara I.G., (1990). A cytosolic protein catalyses the release of GDP from p21^{ras}. *Science* 248 : 247-249.

Wong G., Müller O., Clark R., Conroy L., Moran M.F., Polakis P. & McCormick F. (1992). Molecular cloning and nucleic acid binding properties of the GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62. *Cell* 69 : 551-558.

Wood, K. W., Sarnecki C., Roberts T. M. & Blenis J.. (1992). *ras* mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell* 68 : 1041- 1050.

Xu G., O'Connell P., Viskochil D., Cawthon R., Robertson M., Culver M., Dunn D., Stevens J., Gesteland R., White R. & Weiss R. (1990a). The Neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 62 : 599-608.

Xu G., Lin B., Tanaka K., Dunn D., Wood D., Gesteland R., White R., Weiss R. & Tamanoi F. (1990b). The catalytic domain of the Neurofibromatosis type 1 gene product stimulates *ras* GTPase and complements *ira* mutants of *S. cerevisiae*. *Cell* 63 : 835-841.

Yamamoto F. & Perucho M. (1988). Characterisation of the human c-K-*ras* gene promoter. *Oncogene Res.* 3 : 125-138.

Yamamoto K.K., Gonzales G.A., Biggs W.H. & Montminy M.R. (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional regulation efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334 : 494-498.

Yatani A., Okabe K., Polaski P., Halenbeck R., McCormick F. & Brown A.M. (1990). *ras* p21 and GAP inhibit coupling of muscarinic receptors to atrial K⁺ channels. *Cell* 61 : 769-776.

Yu C.L., Tsai M.H. & Stacey D.W. (1990). Serum stimulation of NIH 3T3 cells induces the production of lipids able to inhibit GTPase activating protein activity. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 6683-6689.

Yu H., Porton B., Shen L. & Eckhardt L.A. (1989). Role of the octamer motif in hybrid cell extinction of the immunoglobulin gene expression: extinction is dominant in a two enhancer system. *Cell* 58 : 441-448.

Zarbl H., Sukumar S., Arthur A.V., Martin-Zanca D. & Barbacid M. (1985). Direct mutagenesis of Ha-*ras*-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in Rats. *Nature* 315 : 382-385.

Zhang K., DeClue J.E., Vass W.C., Papageoge A.G., McCormick F. & Lowy D.R. (1990). Suppression of c-*ras* transformation by GTPase-activating protein. *Nature* 346 : 754-756.

