

50376
1993
69

50376
1993
69

N° d'ordre : 1050

Université des Sciences et Techniques de Lille
Flandres-Artois

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de:

Docteur de l'Université des Sciences et Techniques de Lille

Sciences de la Vie et de la Santé

par

Valérie LECLERE

DOMAINES DE E1A IMPLIQUES DANS LE POUVOIR
TRANSFORMANT ET L'ONCOGENICITE DES ADENOVIRUS
HUMAINS



Soutenue le 19 Février 1995 devant la commission d'examen:

PRESIDENT	: Professeur A. VERBERT
RAPPORTEURS	: Docteur R. DRILLIEN
	: Docteur A. SERGEANT
EXAMINATEURS	: Professeur J. P. BOHIN
	: Professeur J. J. CURGY
	: Docteur J. C. D'HALLUIN

Messieurs, J. P. BOHIN, J. J. CURGY, R. DRILLIEN, A. SERGEANT et A. VERBERT ont accepté de juger ce travail, je les en remercie vivement.

Ce travail a été commencé au laboratoire de Virologie Moléculaire, INSERM U 233 à Lille, et continué depuis le 1^{er} Janvier 1992 au laboratoire d'Oncohématologie Moléculaire INSERM U 124.

Je tiens ici à remercier Jean-Claude D'HALLUIN de m'avoir confié ce sujet et de m'avoir soutenue, conseillée et encouragée pendant les phases les plus difficiles.

Je remercie Madame LOUCHEUX-LEFEBVRE de m'avoir accueillie dans son unité et de m'avoir permis de continuer à travailler sur l'adénovirus dans de très bonnes conditions.

Merci à tout le personnel de l'U 124 et de l'IRCL de m'avoir bien souvent facilité la tâche.

J'adresse tous mes remerciements à mes anciens collègues de l'U 233 et tout particulièrement Chantal COUSIN qui a participé activement à l'avancement de ces travaux.

J'adresse toute ma sympathie à "l'équipe JCD". Claudine BERNARD, Isabelle HUVENT, Malika HAMDANE, Joelle BROUTIN, Marie-Hélène CORDONNIER et François DEVIN ont gentiment subi mes rengaines et mes sauces aux odeurs tenaces.

Je remercie particulièrement Marie-Claire DUVIEUXBOURG pour tout le travail photographique et Nicole HELBECQUE qui a pris en charge le dichroïsme circulaire.

Enfin, je remercie le Ministère de la Recherche et des Technologies ainsi que le Rectorat de Lille de m'avoir sponsorisée pendant trois ans.

INTRODUCTION

GENERALITES

I- LES ADENOVIRUS	p19
I - 1 - Historique	p19
I - 2 - Classification	p19
I - 3 - La particule virale	p21
I-3-a- <i>La capside</i>	p21
I-3-b- <i>Le génome</i>	p21
I - 4 - Les cycles viraux	p21
I-4-a- <i>Le cycle lytique</i>	p24
I-4-b- <i>Le cycle abortif</i>	p24
I-4-c- <i>Le cycle transformant</i>	p26
1) La transformation cellulaire	p26
2) La région E1B	p26
3) Rôle des protéines précoces dans la transformation	p28
II- LA REGION E1A	p29
II-1- Organisation génomique	p29
II-1-a- <i>Les ARNm</i>	p29
II-1-b- <i>Régulation de la transcription</i>	p31
II-2- Les protéines	p33
II-2-a- <i>Structure</i>	p33
II-2-b- <i>Localisation</i>	p36
II-2-c- <i>Stabilité</i>	p36
II-2-d- <i>Synthèse de protéines recombinantes</i>	p36
III- LES FONCTIONS DE E1A	p37
III-1- La transactivation transcriptionnelle	p37
III-1-a- <i>Domaine responsable</i>	p38
III-1-b- <i>Mécanisme direct</i>	p40
III-1-c- <i>Mécanismes indirects</i>	p40
III-2- La répression de la transcription	p41
III-3- Interaction avec le cycle cellulaire	p43
III-3-a- <i>Stimulation de la synthèse d'ADN</i>	p43
III-3-b- <i>Liaison à la cycline A</i>	p44
III-4- Transformation cellulaire	p45

III-4-a- <i>Domaines nécessaires à la transformation</i>	p45
III-4-b- <i>Association à des anti-oncogènes</i>	p47
1) Les sites de liaison	p47
2) Le produit du gène RB1	p47
3) La protéine p107	p50
III-4-c- <i>Association à la p300</i>	p52
III-5- Oncogénicité	p52
III-5-a- <i>Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)</i>	p52
III-5-b- <i>Interactions Ad/CMH</i>	p54

RESULTATS

I- INFLUENCE DU TAUX D'EXPRESSION DE E1A SUR LA TRANSFORMATION	p60
I- 1- Régulation de E1A d'Ad 2.	p60
I- 1-a- <i>Délétions dans le promoteur.</i>	p60
I- 1-b- <i>Elément situé en 3'.</i>	p60
I-2- Régions E1A chimériques.	p63
I-3- Contrôle par un promoteur hétérologue.	p67
II- PRODUIT(S) RESPONSABLE(S) DE L'EFFICACITE DE TRANSFORMATION ET DE L'ONCOGENICITE.	p67
II-1- Mesure du taux de transformation.	p67
II-2- Inhibition des antigènes du CMH de classe I.	p71
III- DOMAINES DES PROTEINES IMPLIQUES DANS LES FONCTIONS DE TRANSFORMATION ET D'ONCOGENICITE.	p71
III-1- Construction d'hybrides.	p71
III-1-a- <i>Clonage dans un vecteur de mutagenèse.</i>	p73
III-1-b- <i>Création de sites.</i>	p73
III-1-c- <i>Construction des régions hybrides.</i>	p73
III-2- Taux de transformation.	p78
III-3- Morphologie des cellules transformées.	p78
III-4- Expression des antigènes de classe I.	p81
IV- EXPRESSION DE PROTEINES RECOMBINANTES.	p81
IV-1- Construction des vecteurs.	p84
IV-1-a- <i>E1A d'Ad12.</i>	p84

IV-1-b- E1A d'Ad2.	p84
IV-2- Purification des protéines.	p84
IV-3- Analyse par immunotransfert.	p88
IV-3-a-Préparation d'un sérum anti-Ad12.	p88
IV-3-b-Détection des protéines.	p92
V- INTERACTIONS E1A/PROTEINES CELLULAIRES.	p95
V - 1 - Immunoprécipitations.	p95
V - 2 - Chromatographie d'affinité.	p97
V - 3 - Interactions <i>in vitro</i> .	p97
V - 4 - Far-western blotting.	p99
V - 5 - Mise en évidence des interactions par <i>Overlay</i> .	p99
VI- ETUDE DE LA CONFORMATION DES PROTEINES GSTAd2 ET GSTAd12(13S).	p103

DISCUSSION

I - L'EFFICACITE DE TRANSFORMATION NE DEPEND PAS DU TAUX D'EXPRESSION DE E1A	p107
II - LE CR1 EST RESPONSABLE DE L'EFFICACITE DE TRANSFORMATION.	p108
III - MORPHOLOGIE DES CELLULES TRANSFORMEES.	p110
IV - Le Ct DU CR3 D'Ad12 INHIBE L'EXPRESSION DES Ag DE CLASSE I.	p111
V - LES INTERACTIONS E1A/PROTEINES CELLULAIRES SONT LES MEMES DANS LES CELLULES TRANSFORMEES PAR L'Ad2 OU PAR L'Ad12.	p112
VI - LES PROTEINES GSTAd2 ET GSTAd12 ONT UNE CONFORMATION DIFFERENTE	p114

CONCLUSION

MATERIELS ET METHODES

I- TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES	p118
I - 1 - Electrophorèse en gel d'agarose	p118
I - 2 - DEAE-élution	p118
I - 3 - Electrophorèses en gel de polyacrylamide	p118
I - 3 - a - Pour les acides nucléiques	p118
I - 3 - b - Pour les protéines	p118

II - CULTURE CELLULAIRE	p119
II - 1 - Cultures primaires	p119
II - 2 - Obtention des lignées	p119
II - 3 - Transfection	p120
II - 4 - Marquage des cellules	p120
II - 5 - Préparation d'extraits cellulaires totaux	p120
II - 6 - Dosage de l'activité Chloramphénicol Acétyl Transférase.	p121
II - 7 - Cellules résistantes à la généticine.	p121
III- TRANSFORMATION BACTERIENNE	p121
III - 1 - Souches et milieux de culture	p121
III - 2 - Vecteurs de clonage	p122
III - 3 - Clonage moléculaire	p125
III - 4 - Mutagénèse dirigée	p125
III-4-a- <i>Préparation de l'ADN simple brin</i>	p125
III-4-b- <i>Réaction de mutagénèse</i>	p125
III - 5 - Transformation	p126
III - 6 - Sélection des clones	p126
III-6-a- <i>Sélection des colonies blanches</i>	p126
III-6-b- <i>Minipréparation</i>	p126
III - 7 - Purification de plasmides	p127
IV- PREPARATION DE PROTEINES RECOMBINANTES	p127
IV - 1 - Production de protéines fusionnées	p127
IV - 2 - Production de protéines marquées	p128
IV - 3 - Purification sur colonnes	p128
V- PRODUCTION DE SERUM	p128
V - 1 - Immunisations	p128
V - 2 - Préparation du sérum	p128
V - 3 - Sérum anti-EIA d'Ad2 (Ab-I)	p129
VI- TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES	p129
VI - 1 - Immunotransfert ou Western blotting	p129
VI - 2 - Immunodiffusions	p129
VI - 3 - Dosage des antigènes cellulaires de surface	p130

VII- MISE EN EVIDENCE D'INTERACTIONS PROTEINES-PROTEINES	p130
VII-1 - Immunoprécipitations	p130
VII-2 - Technique d'<i>overlay</i>	p130
VII-3 - Far-Western blotting	p131
VII-4 - Chromatographie d'affinité	p131
VII-5 - Interactions <i>in vitro</i>.	p131
VIII- DICHROISME CIRCULAIRE	p132

BIBLIOGRAPHIE

INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES

GENERALITES

Tableau I : Classification des adénovirus humains.	p20
Figure G1 : Modèle structural schématique de l'Adénovirus type 2.	p22
Figure G2 : Structure du génome de l'Ad2.	p23
Figure G3 : Différentes interactions possibles adénovirus-cellules.	p25
Figure G4 : Structure et fonctions de la région transformante E1 d'Ad2.	p27
Figure G5 : Epissage alternatif de la région E1A.	p30
Figure G6 : Eléments de contrôle transcriptionnel de l'oncogène E1A.	p32
Figure G7 : Protéines majeures codées par E1A.	p35
Figure G8 : Division du CR3 en deux sous-domaines.	p39
Figure G9 : Modèles de transactivation par E1A.	p42
Figure G10 : Formation de complexes multiprotéiques en fonction du cycle cellulaire.	p46
Figure G11 : Comparaison des sites de liaison à p105 ^{RB} de quelques protéines virales.	p49
Figure G12 : Comparaison des protéines p105 ^{RB} et p107.	p51
Figure G13 : Liaison de la protéine p300 à l'ADN.	p53
Figure G14 : Les antigènes du CMH de classe I.	p55
Figure G15 : Domaines de E1A et leurs fonctions.	p57

RESULTATS

Figure R1 : Délétions dans le promoteur E1A d'Ad2.	p61
Tableau II : Influence de délétions dans le promoteur de E1A sur le taux de transformation.	p62
Tableau III : La région E1B active en cis la transcription à partir du promoteur E1A.	p64
Figure R2 : Représentation schématique de la région E1.	p65
Tableau IV : Localisation de la séquence <i>cis</i> -activatrice.	p66
Figure R3 : Régions E1A chimériques.	p68
Tableau V : Transformation de cellules BRK par les régions E1A chimériques ou contrôlées par un promoteur hétérologue.	p69
Tableau VI : Transformation de cellules BRK par des plasmides exprimant chacun des produits de E1A d'Ad2 et d'Ad12.	p70
Figure R4 : Expression des antigènes de classe I à la surface des cellules transformées par chacun des produits de E1A.	p72
Figure R5 : Comparaison des séquences nucléotidiques des régions E1A d'Ad5 et d'Ad12.	p74
Figure R6 : Clonage de E1A d'Ad2 et E1A d'Ad12 dans un vecteur de mutagenèse.	p75

Figure R7 : Oligonucléotides utilisés pour créer des sites de restriction par mutagenèse dirigée.	p76
Figure R8 : Sites de restriction créés par mutagenèse dirigée.	p77
Figure R9 : Régions E1A hybrides.	p79
Figure R10 : Cinétiques d'apparition des foyers après transformation par des régions E1A hybrides.	p80
Figure R11 : Morphologie des cellules BRK primaires et transformées.	p82
Figure R12 : Expression des antigènes du CMH de classe I à la surface des cellules transformées par les régions E1A hybrides.	p83
Figure R13 : Schéma de la fusion GST/E1A d'Ad12.	p85
Figure R14 : Schéma de la fusion GST/E1A d'Ad2.	p86
Figure R15 : Analyse des plasmides pGEXAd2, pGEXAd12(12S) et pGEXAd12(13S) par digestions enzymatiques.	p87
Figure R16 : Analyse en gel de polyacrylamide des protéines de fusion produites chez <i>E. coli</i> .	p89
Figure R17 : Courbes de croissance des bactéries cultivées en présence et en absence d'IPTG.	p90
Figure R18 : Analyse des deux sérums par immunodiffusion.	p91
Figure R19 : Prédiction de déterminants antigéniques sur les protéines E1A d'Ad2 et d'Ad12.	p93
Figure R20 : Détection des protéines de fusion par les deux sérums.	p94
Figure R21 : Immunoprécipitations dans les lignées BRK 249 et BRK 1201.	p96
Figure R22 : Protéines cellulaires retenues par les protéines recombinantes immobilisées sur colonnes.	p98
Figure R23 : Protéines cellulaires s'associant aux protéines recombinantes.	p100
Figure R24 : Purification de protéines de fusion marquées.	p101
Figure R25 : Associations E1A/protéines cellulaires après transfert sur membrane de nitrocellulose.	p102
Figure R26 : Mise en évidence des interactions E1A/protéines cellulaires par la technique d' <i>overlay</i> .	p104
Figure R27 : Spectres dichroïques des protéines GSTAd2 et GSTAd12.	p105

MATERIELS ET METHODES

Figure M1 : Plasmide pGEX-2T (Pharmacia).	p123
Figure M2 : Phagemide pSelect (Promega).	p124

LEXIQUE

1) Cellules.

BRK : Baby Rat Kidney, cellules primaires de rein de rat Wistar nouveau-né

HEK : Human Embryonary Kidney. Lignée établie de cellules embryonnaires de rein humain

HEK-293 : cellules transformées par les 11,5% gauches du génome de l'Ad5 (nt 270-4423)

HeLa : Lignée établie de cellules de carcinome du col utérin

NRK : Normal Rat Kidney

2) Virus et termes viraux.

Ad : adénovirus

HPV : Human Papilloma Virus

LTR : Long Terminal Repeat (longue répétition terminale)

MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus

SV40 : Simian Virus 40. Papovavirus dont l'hôte naturel est le singe

3) Gènes.

cat : gène codant pour la Chloramphénicol Acétyl Transférase

Ha-ras : oncogène du sarcome murin de Harvey

myc : oncogène de la leucémie myélo-monocytaire

néo : gène de résistance à la néomycine

RB1: gène du rétinoblastome

4) Réactifs.

BBØ : bleu de bromophénol

Bluo-Gal : indolyl- β -D-galactoside

BrEt : bromure d'éthidium

BSA : sérum-albumine bovine

CsCl : chlorure de césium

DM : dexaméthasone

EDTA : acide éthylène-dinitro-tétra acétique

EGTA : acide éthylène glycol bis (2-aminoéthylether)-N, N, N', N'-tétra acétique

G418 : généticine

Hépès : acide N-2-hydroxyethylpipérazine-N'-éthanesulfonique

IPTG : isopropyl- β -D galactopyranoside

NP40 : nonidet P40

PEG : polyéthylène glycol

PMSF : fluorure de méthyl phényl sulfonyl

SDS : dodécyl sulfate de sodium

TPCK : L-1-chloro-3-tosyl-amido-4-phényl-2-butanone

5) unités.

kDa : kilodalton

MM : masse moléculaire

nt : nucléotide

pb : paire de bases

pfu : plaque forming unit

tpm : tour par minute

S : coefficient de Svedberg

u. g. : unité génomique (1 u. g. = 360 pb)

V : Volt

vol : volume

6) Autres.

aa : acide aminé

Ag : antigène

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

E : early, précoce

GST : glutathion S transférase

L : late, tardif

NK: Natural Killer

PCNA: antigène nucléaire de prolifération cellulaire

R : résidu

INTRODUCTION

Les virus, de par leur structure simple et leur génome réduit sont des parasites dépendants des systèmes enzymatiques des cellules qu'ils infectent. La recherche fondamentale en virologie moléculaire peut donc conduire à la compréhension des mécanismes génétiques des cellules hôtes. L'adénovirus est particulièrement intéressant comme modèle pour l'étude de l'organisation et de l'expression des gènes eucaryotes, il a par exemple permis de démontrer le morcellement des gènes et l'épissage des ARN précurseurs.

En 1962, il fut montré que l'Ad12 était responsable de l'apparition de tumeurs malignes chez le hamster nouveau-né. C'était la première description d'un agent pathogène humain capable d'induire des tumeurs chez l'animal. Depuis la découverte du pouvoir transformant des Ad et la localisation des gènes impliqués dans la transformation de cellules primaires, l'étude de la région précoce E1 a été stimulée.

L'intérêt des adénovirus est qu'ils peuvent servir à la fois d'outil et de modèle : ils sont utilisés comme vecteurs dans la mise en place de thérapie génique et comme modèle de la tumorigénèse. La régulation de l'expression de la région E1A et l'action de ses produits représentent une grande partie des recherches actuelles sur l'adénovirus. Grâce à ce modèle ainsi qu'à d'autres modèles viraux (SV40 et papillomavirus), l'association d'oncogènes avec les antioncogènes p53 et p105^{RB} a été mise en évidence.

En 1983, une corrélation entre l'oncogénicité et l'inhibition des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I à la surface des cellules transformées par l'Ad12 a été démontrée, et depuis, cette propriété est utilisée comme moyen d'étude de l'oncogénèse.

Il nous a donc paru particulièrement intéressant de rechercher les domaines de E1A impliqués dans la transformation cellulaire et l'oncogénèse afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la progression tumorale.

Les résultats obtenus ont fait l'objet des publications et communications suivantes:

Publications.

D'HALLUIN, J. C. AND LECLERE, V.

The adenovirus E1A gene: immortalizing nuclear oncogene prototype. *Bull. Inst. Pasteur* (1992) 90, 45-65.

COUSIN, C., LECLERE, V., HUVENT, I. AND D'HALLUIN, J. C.

Down regulation of MHC Class I expression in Ad12 transformed cells is indirectly dependent on the E1A CR3. *Virology*. Soumis.

LECLERE, V., HUVENT, I., VERWAERDE, P., COUSIN, C. AND D'HALLUIN, J. C.

Comparison between E1A genes from oncogenic and non oncogenic adenoviruses in cellular transformation.

Arch. Virol. Soumis.

Communications orales.

VERWAERDE, P., COUSIN, C., LECLERE, V. and D'HALLUIN, J. C.

Adenovirus cis-acting elements involved in BRK cell transformation.

Tumor Virus Meeting on SV40, Polyoma and Adenovirus, Cambridge, 24-29 Juillet 1989.

LECLERE, V., COUSIN, C., HUVENT, I., HAMDANE, M. and D'HALLUIN, J. C.

Down regulation of MHC-class I gene expression in Ad12 transformed cells is indirectly dependent on the E1A CR3.

The Imperial Cancer Research Fund, Tumor Meeting en SV40, Polyoma and Adenoviruses, Cambridge, 29 Juillet-2 Août 1991.

Communications par affiches.

VERWAERDE, P., COUSIN, C., LEITE, J. P. G., LECLERE, V. et D'HALLUIN, J. C.

Éléments agissant en *cis* dans la transformation cellulaire par les adenovirus.

15ème réunion du groupe Développement, Multiplication, Différenciation et Transformation cellulaire, Paris, Institut Pasteur, Mai 1989.

LECLERE, V. et D'HALLUIN, J. C.

Cis activation de l'oncogène E1A par le promoteur de E1B au cours de la transformation cellulaire par les adenovirus humains.

XVII Forum des Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Biologique, Vileneuve d'Ascq, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandes-Artois, 3-6 Juillet 1990.

COUSIN, C., VERWAERDE, P., LECLERE, V. and D'HALLUIN, J. C.

The E1A CR3 of the oncogenic Ad12 is responsible for the negative regulation of MHC class I expression in transformed cell lines.

Tumor Virus Meeting on SV40, Polyoma and Adenoviruses, Cold Spring Harbor, New York, 15-19 Août 1990.

COUSIN, C., LECLERE, V., HUVENT, I. and D'HALLUIN, J. C.

The MHC-I gene expressio is regulated by the Ad12 E1A 13S mRNA product.

20th FEBS meeting, Budapest, Août 1990.

D'HALLUIN, J. C., COUSIN, C., LECLERE, V. and HUVENT, I.

The Ad12 E1A 13S mRNA product down regulates the MHC-I expression in transformed cell lines.

VIIIth International Congress of Virology, Berlin, 26-31 Août 1990.

COUSIN, C., HUVENT, I., LECLERE, V. and D'HALLUIN, J. C.

The C-terminal domain of E1A CR3 is responsible for the down regulation of MHC Class I gene expression in Ad12 transformed cells.

Frederick Summer Cancer Conferences, Frederick, Maryland, 23-27 Juin 1992.

LECLERE, V., COUSIN, C., HUVENT, I. and D'HALLUIN, J. C.

Ad12 CR3 is involved in the inhibition of expression of MHC-I antigens on the surface of transformed cells.

Small DNA tumor viruses: mechanism of malignant transformation and clinical significance, Tromso, 6-9 Juillet 1992.

HUVENT, I., LECLERE, V., COUSIN, C., KISS, A. and D'HALLUIN, J. C.

The C-terminal part of Ad12 CR3 is responsible for the inhibition of expression on MHC-class I antigens in Ad12 transformed cells.

Molecular Biology of SV40, Polyoma, and Adenoviruses, Cold Spring Harbor, New York, 12-16 Août 1992.

Autres travaux:

BAILLY, C., LECLERE, V., POMMERY, N., COLSON, P., HOUSIER, C., RIVALLE, C., BISAGNI, E. & HENICHART, J. P.

Binding to DNA, cellular uptake and biological activity of a distamycin-ellipticine hybrid molecule. *Anticancer Drug Design*. Soumis.

GENERALITES

I- LES ADENOVIRUS

I-1- Historique

Les adénovirus (Ad) humains ont été isolés pour la première fois à partir de tissus adénoïdes par ROWE *et al.* en 1953. Chez l'homme, ces virus sont les agents d'infections diverses touchant surtout les muqueuses oculaire et respiratoire. Ils sont responsables de conjonctivites, d'angines, de pneumonies et de bronchopneumonies.

Au fur et à mesure que de nouveaux sérotypes ont été identifiés, d'autres syndromes leur furent associés. Les sérotypes 40 et 41 (appelés fastidieux) provoquent par exemple des gastroentérites dans les pays en voie de développement.

En 1962, il fut démontré que l'adénovirus de type 12 (Ad12) était responsable de l'apparition de tumeurs malignes chez le hamster nouveau-né (TRENTIN *et al.*). C'était la première description d'un agent pathogène humain capable d'induire des tumeurs chez l'animal. Aujourd'hui, bien que les séquences transformantes des sérotypes les plus oncogènes aient été recherchées dans les cancers les plus variés, aucun adénovirus n'a pu être associé à une tumeur maligne humaine.

Ces virus sont un bon modèle d'étude de la progression tumorale et c'est essentiellement à ce titre qu'ils sont étudiés aujourd'hui.

I-2- Classification

Les adénovirus sont très répandus dans la nature : ils sont retrouvés chez les primates, les bovins, les ovins, les murins, les oiseaux et les amphibiens. Chez l'homme, 48 sérotypes différents ont été identifiés. D'abord classés selon des critères immunologiques (pouvoir d'hémagglutination d'hématies de rat et de singe Rhésus), ils sont actuellement répartis en 6 sous-groupes en fonction de critères biochimiques, biologiques et pathologiques (Tableau I). Les critères le plus souvent retenus sont:

- le pourcentage de GC du génome
- le degré d'homologie de l'ADN
- la longueur de la fibre
- le pouvoir oncogène chez le hamster nouveau-né

Si tous les adénovirus humains sont capables de transformer les cellules *in vitro*, seuls certains sérotypes peuvent induire des tumeurs *in vivo*. Ainsi les sérotypes du

Tableau I: Classification des adénovirus humains et leurs principales caractéristiques.

sous-groupes	quelques sérotypes	% d'homologie de l' ADN		teneur en bases G+C	longueur de la fibre (nm)	pouvoir transformant	oncogénicité chez le hamster nouveau-né
		intra sous-groupe	inter sous-groupe				
A	12 , 18, 31.	48-69	8-20	basse	28-31	élevé	haute
B	3, 7, 11...	89-94	9-20	moyenne	9-11	élevé	faible
C	1, 2 , 5, 6.	99-100	10-16	haute	23-31	très élevé	nulle
D	8, 9, 10, 13...	94-99	4-17	haute	12-13	moyen	nulle
E	4.		4-23	haute	17	moyen	nulle
F	40, 41.	62-69	15	moyenne	28-33	moyen	nulle

Les sérotypes utilisés au cours de cette étude sont indiqués en gras.

sous-groupe A sont caractérisés par un potentiel oncogénique très élevé, alors que les virus appartenant au sous-groupe B ne produisent des tumeurs que chez quelques animaux. Les adénovirus des autres sous-groupes ne sont pas oncogènes à l'exception de l'Ad9 (sous-groupe D).

Parmi les virus de ces sous-groupes, certains ont fait l'objet d'études particulièrement approfondies. Ainsi le prototype hautement oncogène est l'Ad12 et les prototypes des Ad transformants mais non oncogènes sont les types 2 et 5.

I-3- La particule virale

I-3-a- La capside

Les Ad sont des virus non enveloppés. Le virion renferme une dizaine de protéines dont 80% constituent la capside et 20% sont associés à l'ADN. Celle-ci a un diamètre de 65 à 80 nm selon les sérotypes (fig. G1): c'est un icosaèdre formé de 252 capsomères (ou unités structurales) comprenant 240 hexons qui déterminent les faces et les arêtes, et 12 pentons qui occupent les sommets. Chaque penton est composé d'une base et d'une projection appelée fibre, dont la longueur varie selon les sérotypes.

I-3-b- Le génome

Le génome des Ad est constitué d'un ADN linéaire double brin d'environ 36000 paires de bases (fig. G2). Cet ADN est protégé à chaque extrémité 5' par une protéine de 55 kDa (protéine terminale) codée par le virus, liée de façon covalente à un résidu dCMP. L'ADN est également associé à des protéines fortement basiques viro-codées. Ces protéines pV, pVII et μ permettent de structurer le core ou nucléoïde viral, équivalent du nucléosome des cellules eucaryotes.

Arbitrairement le génome a été divisé en 100 unités génomiques (u.g.).

I-4- Les cycles viraux

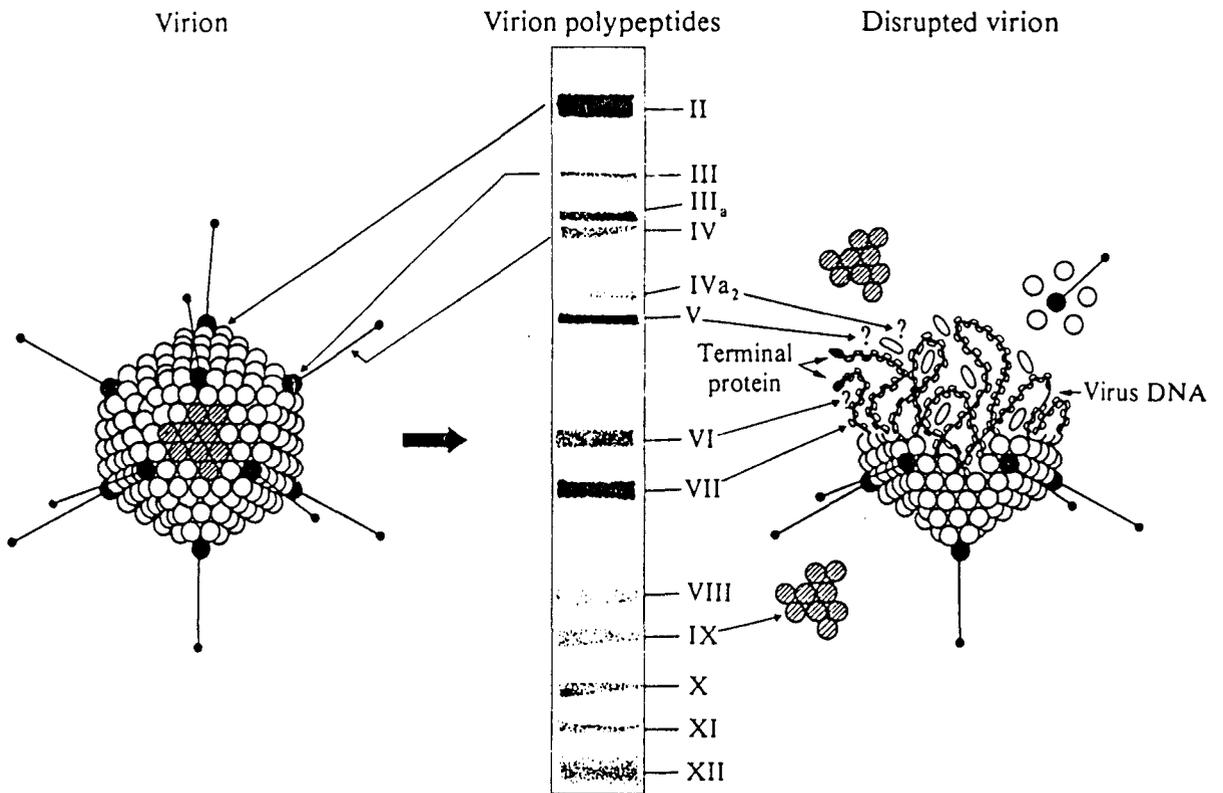


Figure G1 : Modèle structural schématique de l'adénovirus type 2 (RUSSELL and PRECIOUS, 1982).

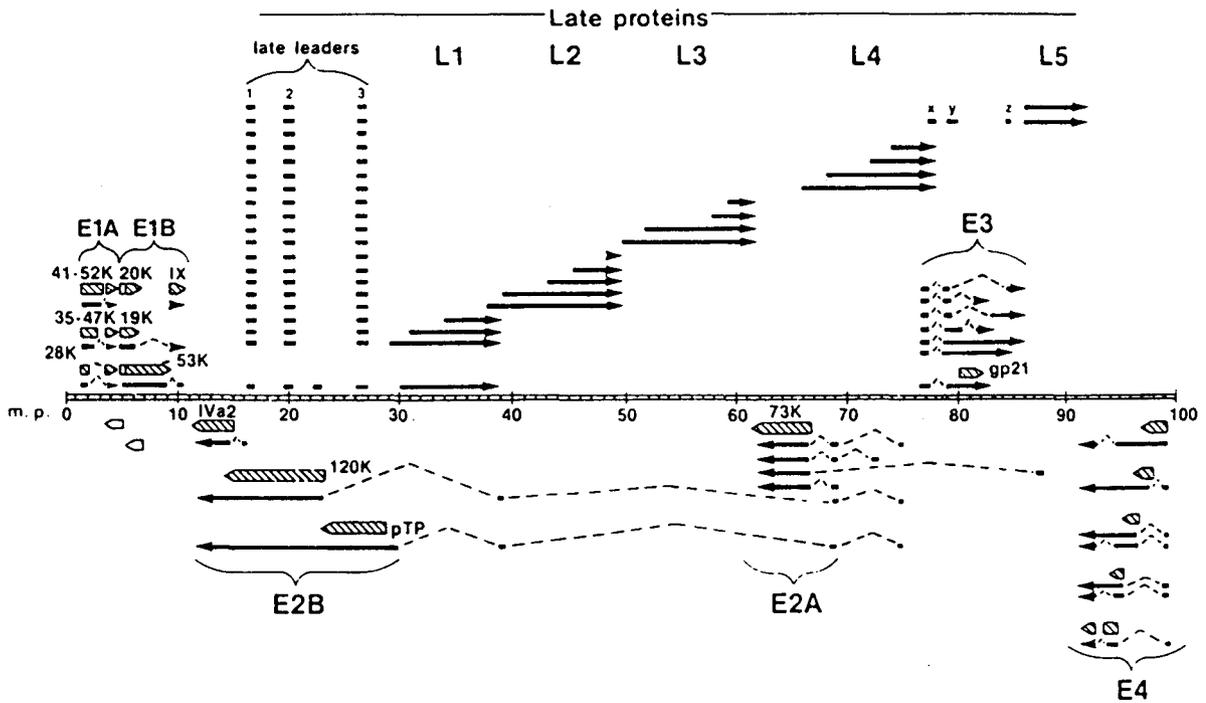


Figure G2 : Structure du génome de l'Ad2.

Les ARNm sont représentés par des flèches noires et les protéines précoces par des flèches hachurées (GREEN, 1986).

Parasites intracellulaires stricts, les virus ne se multiplient qu'au sein de cellules vivantes. Cependant en fonction des cellules et des sérotypes, il existe plusieurs types d'interactions virus-cellule hôte. Pour l'adénovirus, trois types sont observables: le cycle lytique, le cycle abortif et le cycle transformant (fig. G3). Ce dernier sur lequel portent les travaux présentés dans ce mémoire sera plus longuement développé.

1-4-a- *Le cycle lytique*

Ce cycle a lieu après infection de cellules permissives comme les cellules HeLa pour les Ad humains. Il débute par la fixation des virions sur les récepteurs membranaires par l'intermédiaire de la fibre, et s'achève par la libération d'une grande quantité de particules infectieuses nouvellement produites, après lyse des cellules infectées. Il peut être schématiquement divisé en trois phases:

- *la phase précoce* pendant laquelle sont synthétisées toutes les protéines de régulation de la transcription ainsi que les protéines nécessaires à la réplication de l'ADN viral. Les protéines précoces sont codées par les régions E1A, E1B et E3 du brin "r" (sens de transcription vers la droite) et les régions E2A, E2B et E4 du brin "l" (sens de transcription vers la gauche)(fig. G2). La phase précoce dure environ 6 h.

- *la phase intermédiaire* qui correspond au démarrage de la réplication de l'ADN viral, à la transcription de certains gènes comme le IVa2 et le IX, et à la diminution de la transcription de E1A.

- *la phase tardive* pendant laquelle se fait l'assemblage des nouvelles particules dans le noyau. Les protéines tardives sont essentiellement des protéines de structure de la capsid (regroupées en 5 familles L1 à L5) et des protéines d'échaffaudage.

1-4-b- *Le cycle abortif*

Dans certaines circonstances, l'infection d'une cellule par un virus n'aboutit pas à la production de nouveaux virions. L'interaction virus-cellule hôte est alors dite abortive. Dans ce cas, le virus n'exprime que partiellement son information génétique. C'est ce qui est observé lors de l'infection de cellules de singe CV1 par les adénovirus humains. Selon les sérotypes et les cellules utilisées, le blocage du développement peut avoir lieu à différents niveaux : transcription précoce dans des

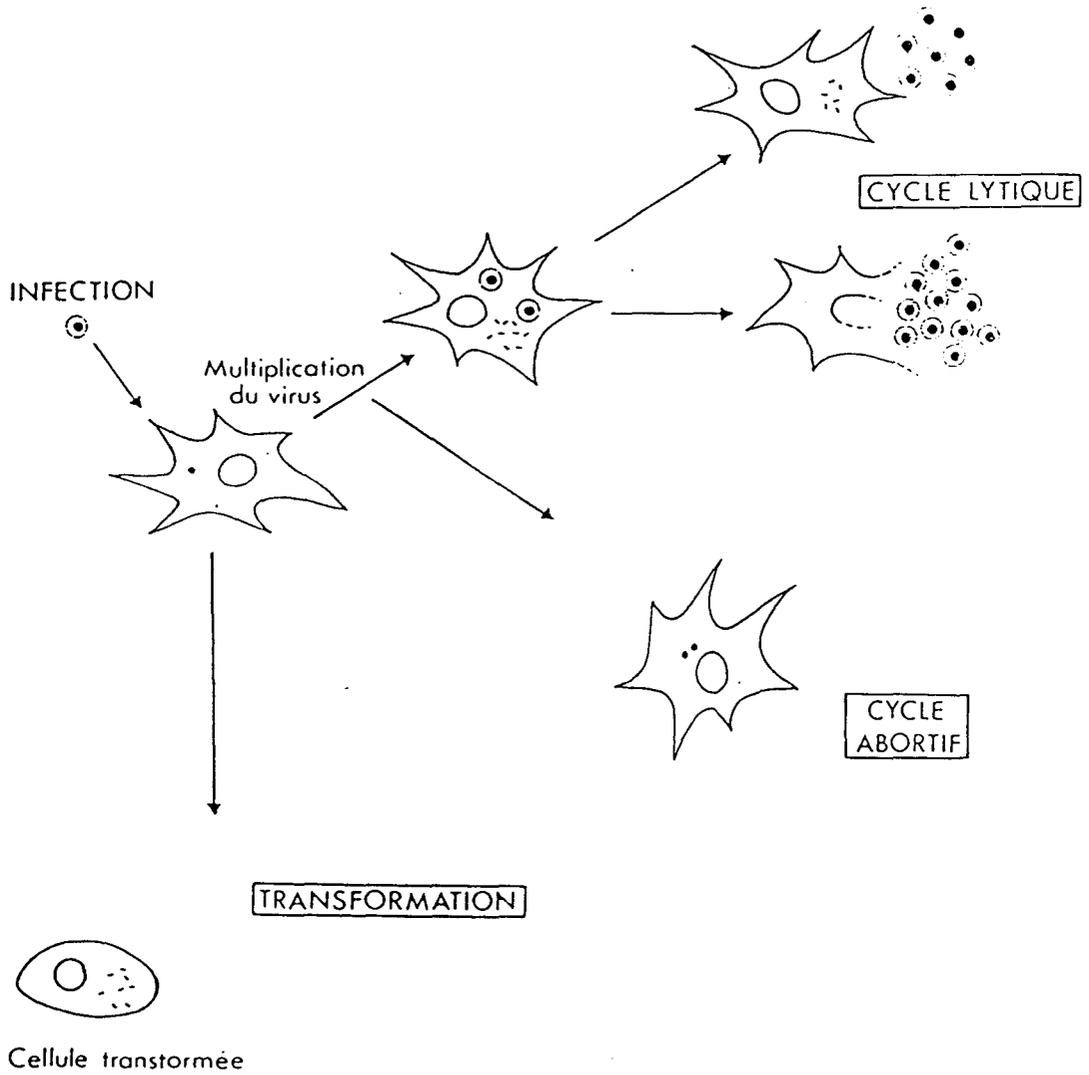


Figure G3 : Différentes interactions possibles adénovirus-cellules.

cellules non différenciées F9 (NELSON *et al.*, 1990), réplication, transcription ou maturation de messagers tardifs (JUTTERMAN *et al.*, 1989).

I-4-c- *Le cycle transformant*

1) La transformation cellulaire

Tous les adénovirus humains sont capables de produire ce cycle sur des cellules primaires de rein de rat ou de hamster nouveau-né (revues par BRANTON *et al.*, 1985; GRAHAM *et al.*, 1984). La transformation cellulaire *in vitro* se traduit par l'acquisition de propriétés nouvelles telles que la perte de l'inhibition de contact et la croissance désorganisée avec formation de foyers, la réduction du besoin en sérum, un changement dans la composition en glycoprotéines membranaires et des modifications du cytosquelette qui engendrent des changements morphologiques.

De plus, des fragments de l'ADN viral sont retrouvés intégrés dans le génome cellulaire (DOERFLER, 1968). Toute l'activité transformante des adénovirus humains est portée par les 11% de l'extrémité gauche de génome (ROWE *et al.*, 1984a). Cette partie couvre la région précoce E1 sous-divisée en deux unités transcriptionnelles (E1A et E1B) contrôlées par deux promoteurs indépendants (fig. G4). Les lignées cellulaires viro-transformées contiennent et expriment toujours les gènes E1A et E1B et certaines ne contiennent que ces régions (SHARP *et al.*, 1975; SAMBROOK *et al.*, 1975).

La transfection de cellules de rongeur *in vitro* a montré que des fragments d'ADN ne contenant que E1A et E1B sont suffisants pour conduire à la transformation (DIJKEMA *et al.*, 1979).

2) La région E1B

(la région E1A sera décrite de manière plus détaillée dans les paragraphes suivants).

Localisée entre 4,8 et 11,2 u. g., la région E1B code pour 3 ARNm de 22S, 13S et 9S (revue par STILLMAN, 1986). Les 2 premiers sont transcrits à partir du même promoteur dont la séquence de 68 paires de bases sépare E1A et E1B. Il comporte une séquence TATA à -30 nt du site de coiffe et un site de fixation du facteur de transcription SP1 à -48 nt (WU *et al.*, 1987). Les ARNm de 22S et 13S sont issus d'un

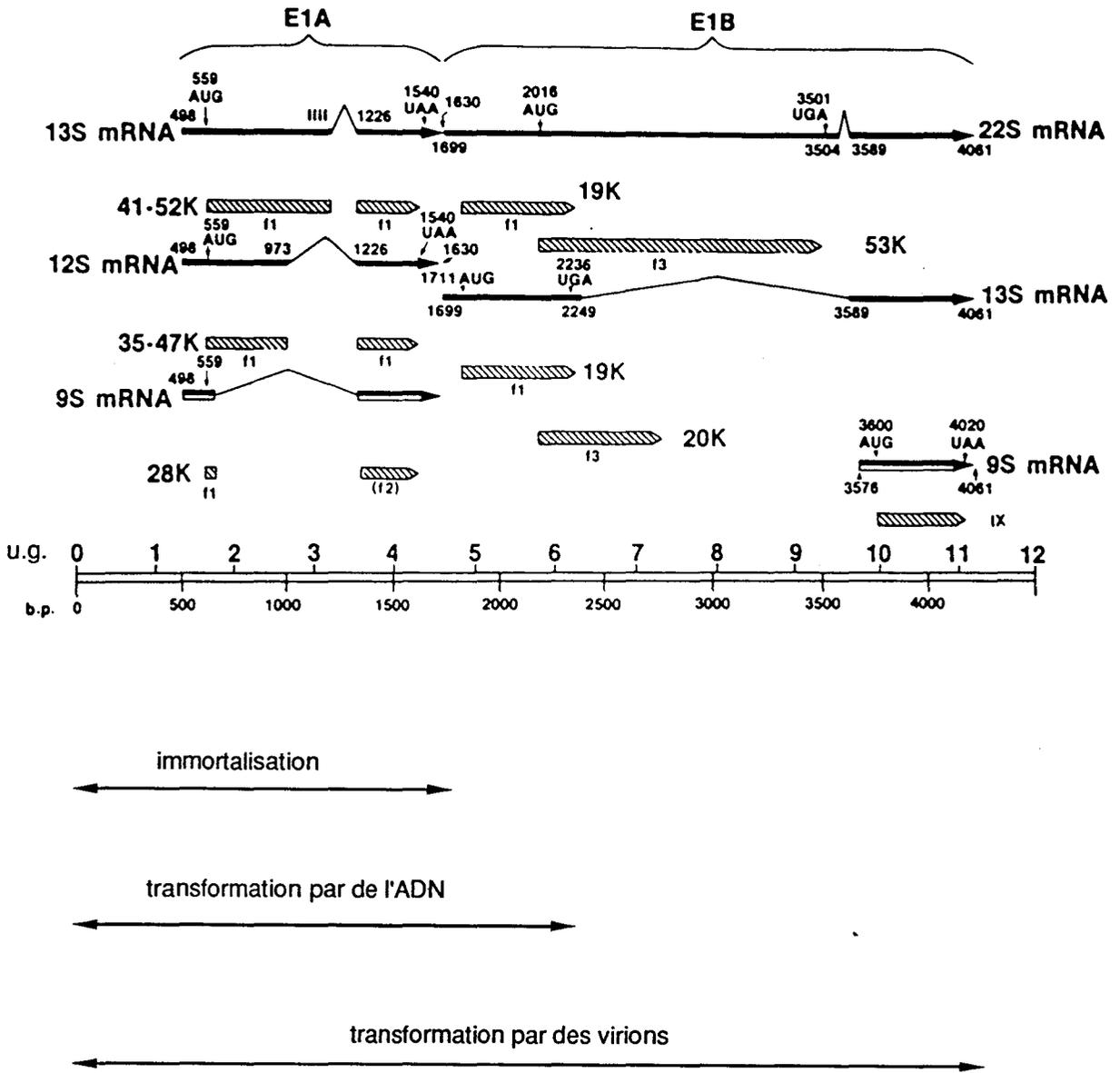


Figure G4.: Structure et fonctions de la région transformante E1 d'Ad2.

même transcrit primaire par épissage alternatif (fig. G4). Alors que pendant la phase précoce l'ARNm 22S est prépondérant, pendant la phase tardive, le taux de l'ARNm 13S est vingt fois plus important. Il ne s'agit pas d'une activation de la transcription mais d'une augmentation de la durée de demi-vie de l'ARNm dans le cytoplasme (WILSON and DARNELL, 1981). L'ARNm 9S possède son propre promoteur et code pour une protéine de structure : le polypeptide IX.

La traduction du 22S conduit à la synthèse de deux protéines. La première a une masse moléculaire apparente de 55 kDa pour 495 aa et la seconde une masse moléculaire apparente de 19 kDa pour 175 aa. Cette dernière peut également être traduite à partir de l'ARNm 13S.

La protéine de 495 aa est détectée 3 à 5 heures post-infection et s'accumule lors de la phase tardive (ROWE *et al.*, 1984b). Sa synthèse commence au deuxième ATG (nucléotide 2016). Essentiellement localisée dans le noyau des cellules infectées elle a aussi été décrite dans le cytoplasme et autour du noyau. Complexée à un produit de la région E4 (une protéine de 34 kDa), elle est impliquée dans des mécanismes importants tels que la maturation des ARNm tardifs, la baisse de la synthèse protéique de la cellule hôte et la réplication efficace de l'ADN viral (BABISS *et al.*, 1985). Elle est également capable de s'associer à la p53 qui est une protéine cellulaire impliquée dans l'entrée en phase G1 des cellules normales et dont le taux est élevé dans les cellules transformées par l'Ad (BRAITHWAITE and JENKINS, 1989).

La protéine de 175 aa, synthétisée à partir du premier ATG (nt 1711), est produite en grande quantité après la réplication de l'ADN. Elle est localisée au niveau des membranes nucléaire et cytoplasmique et permet le maintien de l'intégrité de l'ADN viral et cellulaire (revue par STILLMAN, 1986). L'expression de cette protéine de 19 kDa après infection, introduction de plasmides, ou dans les cellules transformées inhibe l'apoptose induite par E1A et la dégradation de l'ADN cellulaire induite par le TNF- α (Tumor Necrosis Factor). Par ce mécanisme, elle stimule l'activité transformante de E1A et permet au virus d'échapper à la surveillance immunitaire dépendante du TNF- α (WHITE *et al.*, 1992).

3) Rôle des protéines précoces dans la transformation

Dans les cellules transformées, les deux protéines majeures de E1A sont exprimées ainsi que celle de 175 aa codée par E1B. Par contre, la protéine de 495 aa de E1B ne l'est pas toujours. Cependant, elle peut induire une transformation (BARKER and

BERK., 1987), notamment lorsqu'elle est surexprimée (ZHANG *et al.*, 1991). Elle serait essentielle pour avoir une transformation cellulaire viro-induite mais elle ne le serait pas dans le cas d'une transformation réalisée à partir d'un plasmide. Il semble donc qu'elle ne soit pas directement impliquée mais peut-être intervient-elle dans l'intégration de l'ADN viral dans un chromosome cellulaire (ROWE *et al.*, 1984c). En effet, l'une des premières étapes nécessaires à l'obtention d'une transformation stable est l'intégration de l'ADN viral, ou de fragments de cet ADN dans le génome cellulaire, le mécanisme fait peut-être intervenir des molécules circulaires (GRAHAM *et al.*, 1984). L'intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire a été bien étudiée au cours du cycle abortif et de la transformation cellulaire (DOERFLER *et al.*, 1983; DOERFLER, 1991). La structure de 8 sites de jonction entre ADN cellulaire et viral a été déterminée mais aucune séquence spécifique n'a pu être mise en évidence. Cependant, l'adénovirus se recombine plus facilement avec des séquences qui ont une activité transcriptionnelle.

Le processus de transformation se déroule en deux étapes impliquant E1A dans l'immortalisation des cellules et leur transformation partielle (les cellules sont morphologiquement différentes mais elles ne poussent pas en agar mou et ne sont pas tumorigéniques *in vivo*); et E1B pour obtenir une transformation complète. Cette coopération est comparable à celle observée pour les oncogènes *c-myc* et *v-ras*. En effet, les protéines codées par E1A et *c-myc* ont quelques propriétés communes, notamment leur localisation nucléaire, des homologies de séquence et des profils d'hydrophilie comparables (RALSTON and BISHOP, 1983). E1A et *c-myc* peuvent être complétés par *Ha-ras* (RULEY, 1983) ou par E1B.

II- LA REGION E1A

II-1- Organisation génomique

II-1-a- Les ARNm

La région E1A est la première exprimée lors de l'infection. Elle est localisée entre 0 et 4,5 u.g. sur l'ADN viral (fig. G4). Le nombre et la structure des ARNm produits ont été étudiés par différentes techniques dont la microscopie électronique (CHOW *et al.*, 1979; KITCHINGMAN and WESTPHAL, 1980), la cartographie à la nucléase S1 (BERK and SHARP, 1978), le clonage d'ADN complémentaire (PERRICAUDET *et al.*, 1979) et plus récemment l'amplification par PCR (BROCKMANN *et al.*, 1990). La cartographie

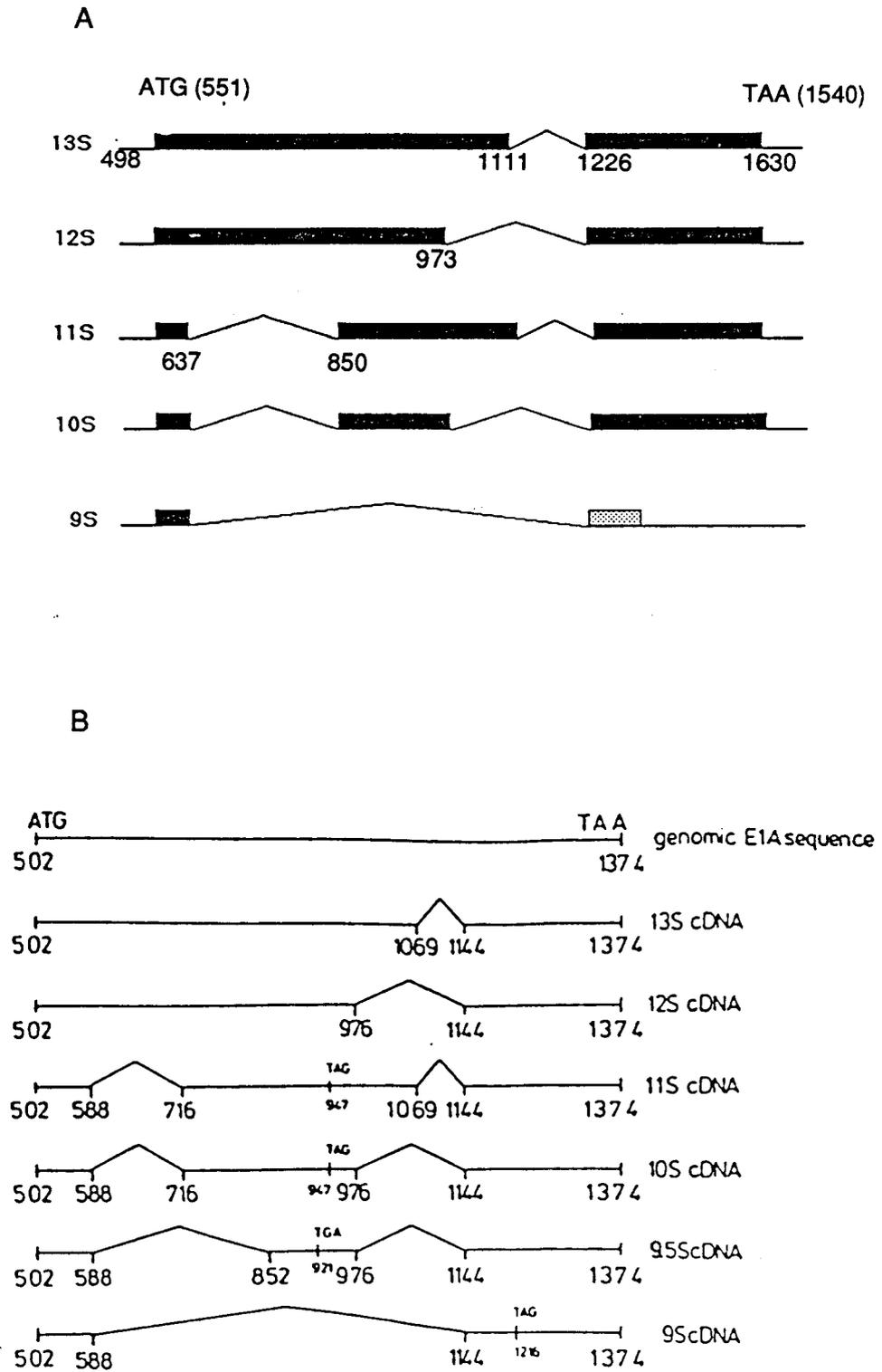


Figure G5 : Epissage alternatif de la région E1A

A : E1A d'Ad2. Les rectangles noirs représentent les parties codantes. Les chiffres indiquent les nucléotides (D'HALLUIN and LECLERE, 1992).

B : E1A d'Ad12 (BROCKMAN *et al.*, 1990)

de ces ARNm a déjà fait l'objet de plusieurs revues (TOOZE, 1981; VIRTANEN and PETTERSSON, 1983). Tous les ARNm mis en évidence proviennent d'un transcrit primaire unique par un mécanisme d'épissage alternatif.

Deux ARNm majeurs (12S et 13S) sont exprimés dans les cellules transformées et au cours de la phase précoce du cycle lytique. Après le démarrage de la réplication de l'ADN viral, un ARNm plus petit (9S) peut être détecté (VIRTANEN and PETTERSSON, 1983). Plus récemment, deux nouveaux ARNm (10S et 11S) ont pu être observés. Ils sont exprimés à très faible taux dans des cellules infectées par les sérotypes du sous-groupe C (STEPHENS and HARLOW, 1987; ULFENDHAL *et al.*, 1987) et du sous-groupe A (BROCKMANN *et al.*, 1990)(fig. G5).

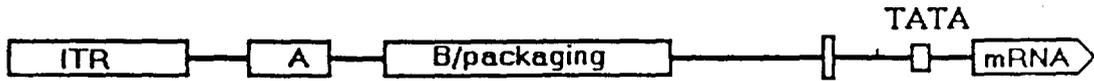
II-1-b- Régulation de la transcription

La transcription de la région E1A est contrôlée par un promoteur complexe. Il comporte une TATA *box* et une CAAT *box*, mais également des séquences activatrices qui ont été étudiées pour les sérotypes 2 et 5 (sous-groupe C) (fig. G6). 21 sites de liaison pour des protéines ont pu être observés par la technique de *DNA-footprinting* utilisant des extraits nucléaires de cellules HeLa (YOSHIDA *et al.*, 1989).

Deux *enhancers* ont été décrits. L'*enhancer* A a été le premier mis en évidence au cours d'études en expression transitoire dans des cellules HeLa (HEN *et al.*, 1983). Dans l'*enhancer* B, deux éléments fonctionnels (I et II) peuvent être distingués (HEARING and SHENK, 1983; 1985). L'élément I est présent en deux exemplaires entre les nt -202 et -192, et entre les nt -330 et -289 par rapport au site de coiffe. En fait, une seule copie est nécessaire pour maintenir un taux de transcription de E1A élevé (HEARING and SHENK, 1986). La plus en amont de ces deux copies semble interagir avec un facteur cellulaire appelé EF-1A (BRUDER and HEARING, 1989). La liaison de plusieurs facteurs EF-1A sur des sites adjacents permet une activation synergique de la transcription de E1A dans les cellules infectées (BRUDER and HEARING, 1991). La séquence nucléotidique de fixation du facteur EF-1A présente une homologie avec le site PEA3, qui est reconnu par l'oncogène cellulaire p68^{C-ets-1}(WASYLYK *et al.*, 1990). Ce site avait tout d'abord été identifié sur l'*enhancer* du virus du polyome (HERBOMEL *et al.*, 1984).

Un site de fixation du facteur E2F (nt -287 à -280), directement adjacent à cette séquence est également dupliqué entre les nt -224 et -217 (KOVESDI *et al.*, 1986). L'activité de liaison à l'ADN du facteur E2F est influencée par les produits des

A



B

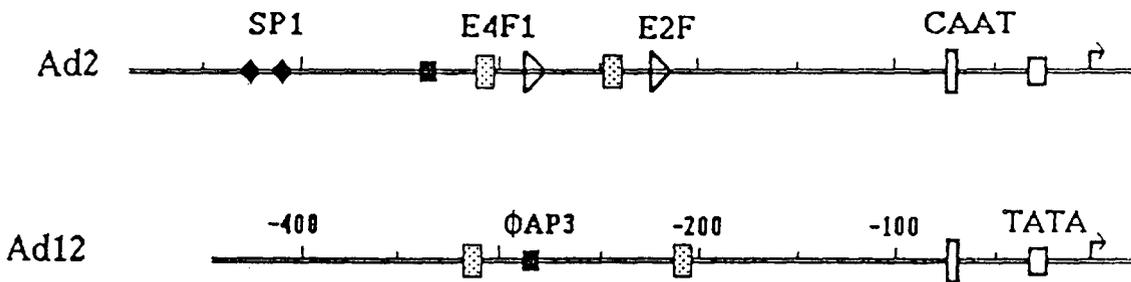


Figure G6 : Eléments de contrôle de la transcription de l'oncogène E1A.

A : Représentation schématique de la séquence en amont du site d'initiation de la transcription; les séquences décrites par HEN *et al.* (1983) (A) et par HEARING et SHENK (1983) (B) sont indiquées.

ITR : séquence répétée terminale inversée.

Packaging : séquence nécessaire à l'encapsidation du génome viral.

B : Sites de liaison de facteurs nucléaires impliqués dans la régulation de la transcription.

gènes viraux E1A et E4 (BABISS, 1989; NEILL *et al.*, 1990). E2F stimule la transcription des gènes E1A et E2A (KOVESDI *et al.*, 1986), mais aussi de gènes cellulaires comme *c-myc* (THALMEIER *et al.*, 1989). Le facteur E2F peut être activé par phosphorylation par une kinase cellulaire (BAGCHI *et al.*, 1989).

L'élément II de l'*enhancer* B, présent en 4 exemplaires augmente légèrement le taux de transcription contrôlé par le promoteur E1A (HEARING and SHENK, 1986).

Une autre séquence activatrice, située en amont de l'élément I, a été mise en évidence dans des expériences d'expression transitoire dans des cellules HeLa (HEN *et al.*, 1983). Cette région renferme un site consensus de liaison pour le facteur nucléaire AP3. Ce facteur est une protéine se liant à l'élément C de l'*enhancer* de SV40, et la liaison peut être induite en traitant les cellules par un ester de phorbol (BARRETT *et al.*, 1987; CHIU *et al.*, 1987). Cependant, ce site de liaison ne semble pas indispensable à l'expression de E1A après l'infection de cellules HeLa (HEARING and SHENK, 1983; 1986). Des études récentes ont montré que des virus ou des plasmides ne portant pas la région *enhancer* pouvaient transformer des cellules primaires BRK avec la même efficacité que E1A sauvage, voire de façon plus efficace (ADAMI and BABISS, 1990).

Deux séquences activatrices ont également été décrites dans la région 3': un élément entre les nt +390 et +399 dans le gène E1A (OSBORNE *et al.*, 1984) et une séquence présente dans la région E1B. Cette dernière peut *cis*-activer l'initiation de la transcription de E1A à la fois dans les cellules transformées (JOCHEMSEN *et al.*, 1987) et en expression transitoire.

Les produits de la région E1B peuvent également stimuler la transcription contrôlée par le promoteur de E1A en *trans*. La protéine de 19 kDa permet d'augmenter la stabilité de l'ADN dans les cellules transfectées et d'accumuler les ARNm dans le cytoplasme (HERRMANN and MATHEWS, 1989).

Tous ces éléments activateurs ont été décrits pour les sérotypes 2 ou 5 du sous-groupe C. L'analyse des séquences d'ADN montre qu'ils sont partiellement conservés pour les sérotypes des autres sous-groupes comme l'Ad3 (B) ou l'Ad12 (A). Cependant leur organisation est différente (LEITE and D'HALLUIN, 1988).

II-2- Les protéines

II-2-a- Structure

Les deux ARNm majeurs de 12S et 13S sont traduits en deux protéines qui ont respectivement 243 et 289 aa pour l'Ad2 (MM 32 kDa et 35 kDa) et 235 et 266 aa pour l'Ad12. Pour un sérotype donné, les deux protéines ont les mêmes extrémités N- et C-terminales et ne diffèrent que par une séquence interne. Cette séquence spécifique du produit de l'ARNm 13S est de 46 aa pour l'Ad2 et n'est que de 31 aa dans l'Ad12. En effet, pour ce dernier, le site accepteur d'épissage de l'ARNm 12S est situé plus loin que dans l'Ad2 (fig. G7).

Les protéines E1A sont particulièrement acides (leur pHi est de 5 pour la protéine de 289 aa et 4,5 pour celle de 243 aa), et riches en résidus prolines.

Elles sont phosphorylées sur de nombreux résidus sérines (TSUKAMOTO *et al.*, 1986a). Les protéines immunoprécipitées par des anticorps monoclonaux sont hétérogènes en taille et en charge, et représentent une soixantaine de formes séparables en gel bidimensionnel. Cette hétérogénéité est essentiellement due à des modifications post-traductionnelles multiples (YEE and BRANTON, 1985a; HARLOW *et al.*, 1985). La phosphorylation de la sérine 89 semble être la seule importante pour la fonction biologique (SMITH *et al.*, 1989). Cependant, ce résidu n'est pas conservé dans tous les sérotypes; en particulier dans l'Ad12, le résidu aligné est une thréonine. Il est toutefois intéressant de noter que les produits d'autres oncogènes nucléaires comme *c-myc*, *c-fos*, SV40-T, ou d'antioncogènes (p53) portent également des sérines phosphorylées entourées de nombreux résidus prolines.

Par des études immunologiques, un épitope dominant a été situé entre les aa 23 et 120, séquence codée par le premier exon (TSUKAMOTO *et al.*, 1986b).

La comparaison des séquences des différents sérotypes a permis de mettre en évidence trois domaines conservés (CR1, CR2 et CR3)(fig. G7). Ces domaines sont responsables des fonctions attribuées aux oncoprotéines E1A qui seront développées plus loin (revues par MORAN and MATHEWS, 1987; LILLIE *et al.*, 1987). Les CR1 et CR2 sont communs aux deux protéines alors que le CR3 est spécifique du produit de l'ARNm 13S. Ce domaine a une structure en doigt de zinc fonctionnelle, définie par 4 cystéines en positions 154, 157, 171 et 174 pour l'Ad2 (WEBSTER *et al.*, 1991).

En dehors des régions conservées qui présentent en moyenne 50% d'homologie, certaines différences sont à noter entre les sérotypes. La plus importante est sans doute la présence d'une séquence de 20 aa entre le CR2 et le CR3 d'Ad12; cette séquence particulièrement riche en alanines (8 résidus sur les 20) est absente dans les sérotypes 2 ou 5 pour lesquels le CR2 et le CR3 sont adjacents.

II-2-b- Localisation

Les oncoprotéines E1A sont nucléaires. Elles sont retrouvées dans le noyau des cellules transformées ou infectées (SHIROKI *et al.*, 1980; FELDMAN and NEVINS, 1983; GRAND and GALLIMORE, 1984). Pour chaque protéine, des séquences de localisation nucléaire sont situées dans la partie codée par le 2^{ème} exon (KRIPPL *et al.*, 1985). Le pentapeptide KRPRP permet l'entrée rapide de E1A dans le noyau (en 30 mn) (LYONS *et al.*, 1987).

Cette localisation nucléaire est indispensable à l'activité de régulation de la transcription. Les protéines E1A sont associées à la matrice nucléaire (FELDMAN and NEVINS, 1983) ou au nucléoplasme (ROWE *et al.*, 1983). En tout cas, elles ne sont pas directement liées à l'ADN (FERGUSON *et al.*, 1985). Une colocalisation avec la protéine de choc thermique HSP70 a également été rapportée (WHITE *et al.*, 1988).

II-2-c- Stabilité

Les oncoprotéines nucléaires sont en général des protéines rapidement dégradées; cette propriété leur permet de jouer un rôle de régulation. Ainsi E1A a une demi-vie très courte, de l'ordre de 30 à 120 mn. Plusieurs séquences impliquées dans sa dégradation ont été déterminées. Par exemple, le térapeptide amino-terminal Met-Arg-His-Ile est responsable de l'instabilité de E1A d'Ad2 (SIMON and RICHTER, 1990). La protéine contient aussi plusieurs régions "PEST", riches en prolines, acides glutamiques, sérines et thréonines. Le mécanisme par lequel ces séquences agissent est encore inconnu, mais elles sont souvent présentes dans des protéines dont la demi-vie est inférieure à 2 h (revue par REICHSTEINER *et al.*, 1987).

La dégradation de E1A *in vitro* peut passer par un processus d'ubiquitination, ou liaison covalente à une ou plusieurs molécules d'ubiquitine. Ce polypeptide de 76 aa oriente les protéines vers des systèmes de dégradation dépendants de l'ATP (CIECHANOVER *et al.*, 1991).

II-2-d- Synthèse de protéines recombinantes

Les protéines codées par l'ARNm 13S d'Ad2 ont été produites chez la levure (HANDA *et al.*, 1987). Elles sont phosphorylées et se présentent sous forme d'une famille

en gel de polyacrylamide-SDS. Ces bandes migrent de telle sorte que leur poids moléculaire apparent est plus important que celui attendu.

Les protéines E1A ont également été exprimées en grande quantité et de manière contrôlable chez *E.coli* (FERGUSON *et al.*, 1984). Dans ce système, les produits des ARNm 12S et 13S sont fonctionnels. Ils sont nucléaires après injection dans des cellules de mammifères et agissent pour activer la transcription des autres gènes viraux (FERGUSON *et al.*, 1985).

Plus récemment, l'activation de la transcription par des protéines recombinantes obtenues dans un système baculovirus a été observée (PATEL and JONES, 1990; PEEPER *et al.*, 1992).

III- LES FONCTIONS DE E1A

Les fonctions attribuées aux oncoprotéines E1A sont assez nombreuses et font régulièrement l'objet de revues générales (BERK, 1986; SHENK and FLINT, 1991; GRAND, 1987; BOULANGER and BLAIR, 1991; D'HALLUIN and LECLERE, 1992; GREEN, 1992).

En général, le mécanisme passe par l'association à une ou plusieurs protéines cellulaires. Ainsi, à partir de cellules infectées, des anticorps spécifiques de E1A peuvent coprécipiter des protéines de poids moléculaires de 65 kDa, 68 kDa, un doublet autour de 110 kDa (la p107 et le produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome RB1) et de 300 kDa (YEE and BRANTON, 1985b). Dans des cellules transformées HEK-293 exprimant constitutivement E1A, de nombreuses protéines de poids moléculaires compris entre 28 kDa et 300 kDa ont été mises en évidence par immunoprécipitation (HARLOW *et al.*, 1986). Parmi celles-ci certaines ont été plus étudiées: la p300, la p107, la p105^{RB} et la p60^{cyclineA} pour lesquelles les sites de liaison sur E1A ont été localisés (EGAN *et al.*, 1988).

E1A agit alors soit en libérant des protéines de complexes déjà existants (cas pour E2F) soit au contraire en piégeant les protéines et en les empêchant d'agir (c'est le cas pour la protéine p107). En conséquence, les fonctions de E1A dépendent essentiellement de l'activité des protéines impliquées dans la formation de complexes.

III-1- La transactivation transcriptionnelle

III-1-a- *Domaine responsable*

E1A est le premier gène viral exprimé lors de l'infection d'une cellule par les adénovirus (NEVINS *et al.*, 1979). Son rôle est alors d'activer sa propre transcription ainsi que celle des autres gènes précoces E1B, E2A-B, E3 et E4. C'est pourquoi des mutants dans la région E1A sont défectifs dans leur capacité à se répliquer dans des cellules permissives (HARRISON *et al.*, 1977; JONES and SHENK, 1979a). L'expression du gène E1A est nécessaire à l'accumulation des ARNm des autres unités virales précoces (JONES and SHENK, 1979b; BERK *et al.*, 1979). La protéine codée par l'ARNm 13S active la transcription alors que la protéine codée par l'ARNm 12S ne porte pas cette fonction (LILLIE *et al.*, 1986). Le domaine transactivateur est donc le CR3, seule portion de E1A indispensable pour la transactivation (GLENN and RICCIARDI, 1985; MORAN *et al.*, 1986). Un peptide de 49 résidus comprenant les 46 aa spécifiques du produit de l'ARNm 13S d'Ad2 est suffisant pour augmenter la transcription à partir des promoteurs précoces (LILLIE *et al.*, 1987).

Le CR3 peut en fait être divisé en deux sous-domaines (LILLIE and GREEN, 1989)(fig. G8). La partie amino-terminale contient une région qui active la transcription, analogue fonctionnel des activateurs cellulaires types (pour revues: PTASHNE, 1988; MITCHELL and TJIAN, 1989). La partie carboxy-terminale du CR3 permet de diriger E1A sur le promoteur cible. Les deux sous-domaines se chevauchent dans la structure en doigt de zinc (CULP *et al.*, 1988; LILLIE and GREEN, 1989).

E1A peut également stimuler la transcription de gènes cellulaires comme la β -globine (GREEN *et al.*, 1983; SVENSSON and AKUSJARVI, 1984), la préproinsuline I de rat (GAYNOR *et al.*, 1984) dans des expériences de transfection, mais aussi la HSP70 (KAO and NEVINS, 1983; WU *et al.*, 1986) ou la β -tubuline au cours du cycle infectieux (STEIN and ZIFF, 1984).

Plus récemment, des études ont montré que la protéine de 243 aa d'Ad2 pouvait aussi activer des promoteurs viraux d'une manière dépendante du facteur de transcription E2F (BAGCHI *et al.*, 1990). Les domaines CR1 et CR2 peuvent donc transactiver mais dans ce cas le mécanisme n'est pas direct. Certains gènes cellulaires comme celui codant pour PCNA et *c-jun* sont activés par le produit de l'ARNm 12S d'Ad5 ou d'Ad12 (ZERLER *et al.*, 1987; VAN DAM *et al.*, 1990) ainsi que l'ADN polymérase β de souris (YAMAGUCHI *et al.*, 1992).

C'est pourquoi la fonction de transactivation peut être étudiée en deux parties: un mécanisme direct impliquant le domaine CR3 et des mécanismes indirects faisant intervenir les domaines communs aux produits des ARNm 12S et 13S.

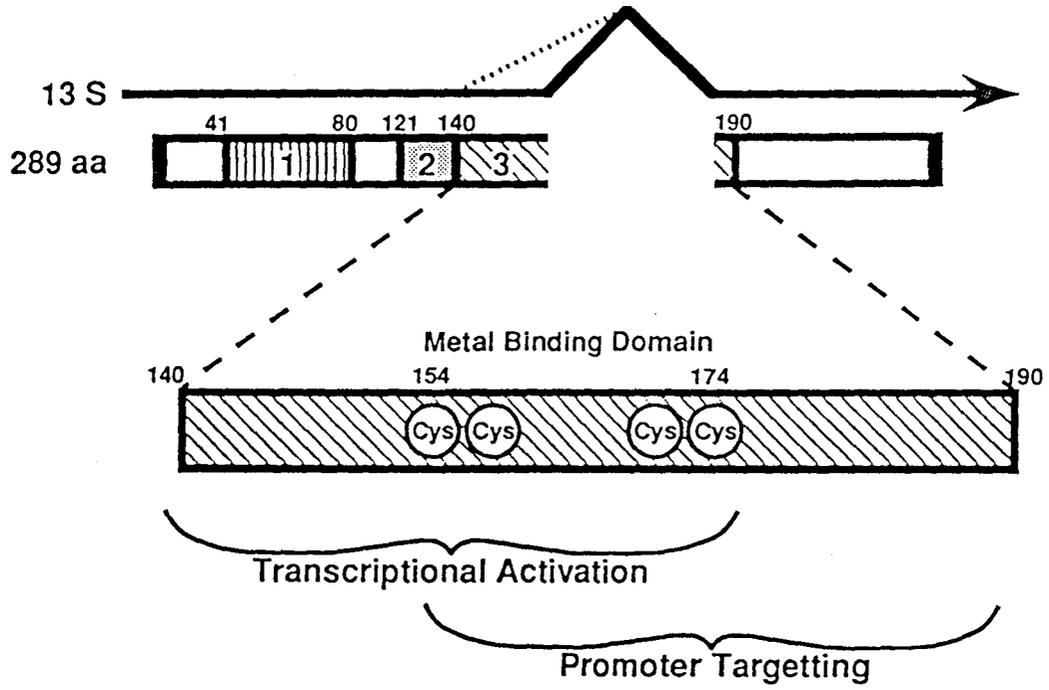


Figure G8 : Division du CR3 en deux sous-domaines.

Le premier porte la fonction de transactivation et le second dirige E1A sur les séquences cibles (LILLIE and GREEN, 1989).

III-1-b- Mécanisme direct

E1A ne se lie pas sur des séquences spécifiques d'ADN (FERGUSON *et al.*, 1985) mais reconnaît des protéines cellulaires déjà liées à un promoteur (fig. G9). Par exemple plusieurs promoteurs précoces d'Ad contiennent des sites de liaison pour ATF (famille de facteurs de transcription ayant des homologues de séquence dans les domaines de liaison à l'ADN). Un certain nombre d'études ont montré que ces sites sont nécessaires à la transactivation par E1A (GILARDI and PERRICAUDET, 1984; 1986; LILLIE *et al.*, 1987). Le produit de l'ARNm 13S reconnaît spécifiquement le facteur de transcription placé sur son site; ce modèle permet d'expliquer le bon positionnement du domaine activateur de E1A sur le promoteur cible sans qu'il y ait de liaison directe E1A/ADN. E1A nécessite en fait un adaptateur ADN/protéine pour interagir avec les promoteurs cibles (MARTIN *et al.*, 1990).

Un mécanisme semblable est proposé avec le facteur de transcription TFIID qui se lie spécifiquement aux séquences TATA. Une liaison directe de TFIID à E1A, accompagnée d'une augmentation du taux de transcription a été décrite (HORIKOSHI *et al.*, 1991; LEE *et al.*, 1991).

L'expression de la HSP70 régulée par E1A peut être dépendante de la séquence TATA (SIMON *et al.*, 1988) mais d'autres auteurs ont montré plus récemment qu'elle était plutôt dépendante de la séquence CAAT située à -70 nt par rapport au site de coiffe. Cette séquence est reconnue par un facteur appelé CBF (CAAT Binding Factor) qui est nécessaire pour la régulation par E1A. Les deux protéines peuvent d'ailleurs former des complexes *in vitro* (LUM *et al.*, 1992).

III-1-c- Mécanismes indirects

Les autres mécanismes proposés sont moins directs et impliquent l'intervention de protéines cellulaires ou virales supplémentaires. Le cas le plus étudié est celui de l'activation du promoteur précoce E2 qui contient deux sites de liaison pour le facteur de transcription E2F. Au cours de l'infection, une augmentation de l'activité de liaison de E2F est observée (REICHEL *et al.*, 1988). Cette augmentation est le résultat de la conversion d'une forme non coopérative vers une forme qui se lie de façon coopérative sur le promoteur E2 (HARDY and SHENK, 1989). Une telle conversion dépend de E1A mais

aussi d'un produit de la région E4, qui permet de maintenir associées deux molécules E2F formant un complexe se liant à l'ADN (RAYCHAUDHURI *et al.*, 1989)(fig. G9). De plus, E1A agit sur la transcription de E2 de manière très indirecte en augmentant la transcription de E4 (HARDY *et al.*, 1989; REICHEL *et al.*, 1989; NEILL *et al.*, 1990).

La présence de E1A peut changer la phosphorylation de facteurs de transcription dont E2F (BAGCHI *et al.*, 1989; RAYCHAUDHURI *et al.*, 1989). Une régulation de la phosphorylation peut entraîner une modulation de l'activité de ces facteurs.

Des observations plus récentes suggèrent que E1A peut libérer des facteurs de transcription comme E2F de complexes multiprotéiques (BAGCHI *et al.*, 1990). La libération de E2F de tels complexes ne dépend pas du domaine CR3. La forme libre de E2F est active alors que la forme complexée ne l'est pas bien qu'elle soit capable de se lier correctement à l'ADN (WEINTRAUB *et al.*, 1992).

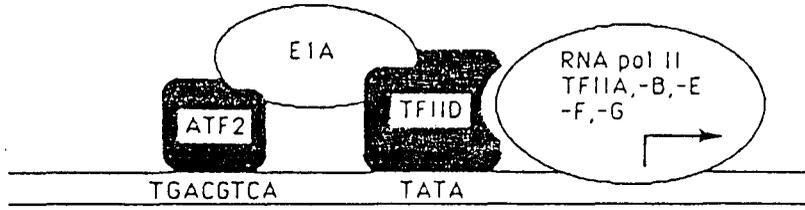
III-2-La répression de la transcription

Bien que fonctionnant avant tout comme un activateur de la transcription, E1A peut également réprimer l'activité d'un certain nombre de promoteurs. Cette activité a été découverte à l'origine dans des cotransfections dans lesquelles E1A réprime la transcription à partir de promoteurs viraux et cellulaires comme le promoteur de SV40 (VELCICH and ZIFF, 1985), l'*enhancer* du virus du polyome (BORRELLI *et al.*, 1984; VELCICH *et al.*, 1986), l'*enhancer* des chaînes lourdes des immunoglobulines (HEN *et al.*, 1985), l'*enhancer* de l'insuline (STEIN and ZIFF, 1987), et le promoteur du cytochrome P450 (SOGAWA *et al.*, 1989). En expression transitoire, le proto-oncogène *neu* est lui aussi inhibé par E1A (YU *et al.*, 1990).

Quelques gènes cellulaires sont inhibés par E1A comme *c-myc*, JE, la stromelysine (*smI*) dans toutes les cellules transformées par l'Ad2 (VAN DAM *et al.*, 1989) et les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I dans les cellules transformées par l'Ad12 (SCHRIER *et al.*, 1983). Plus récemment il a été montré que tous les *enhancers* pouvaient être la cible de la répression par E1A (ROCHETTE-EGLY *et al.*, 1990).

L'effet négatif de E1A sur la transcription semble dépendant du type cellulaire. Ainsi dans des cellules lymphoïdes, les protéines E1A répriment la transcription du gène IgH (HEN *et al.*, 1985) alors qu'introduit de façon stable dans des fibroblastes de souris, ce gène est activé par E1A (BORRELLI *et al.*, 1986).

A



B

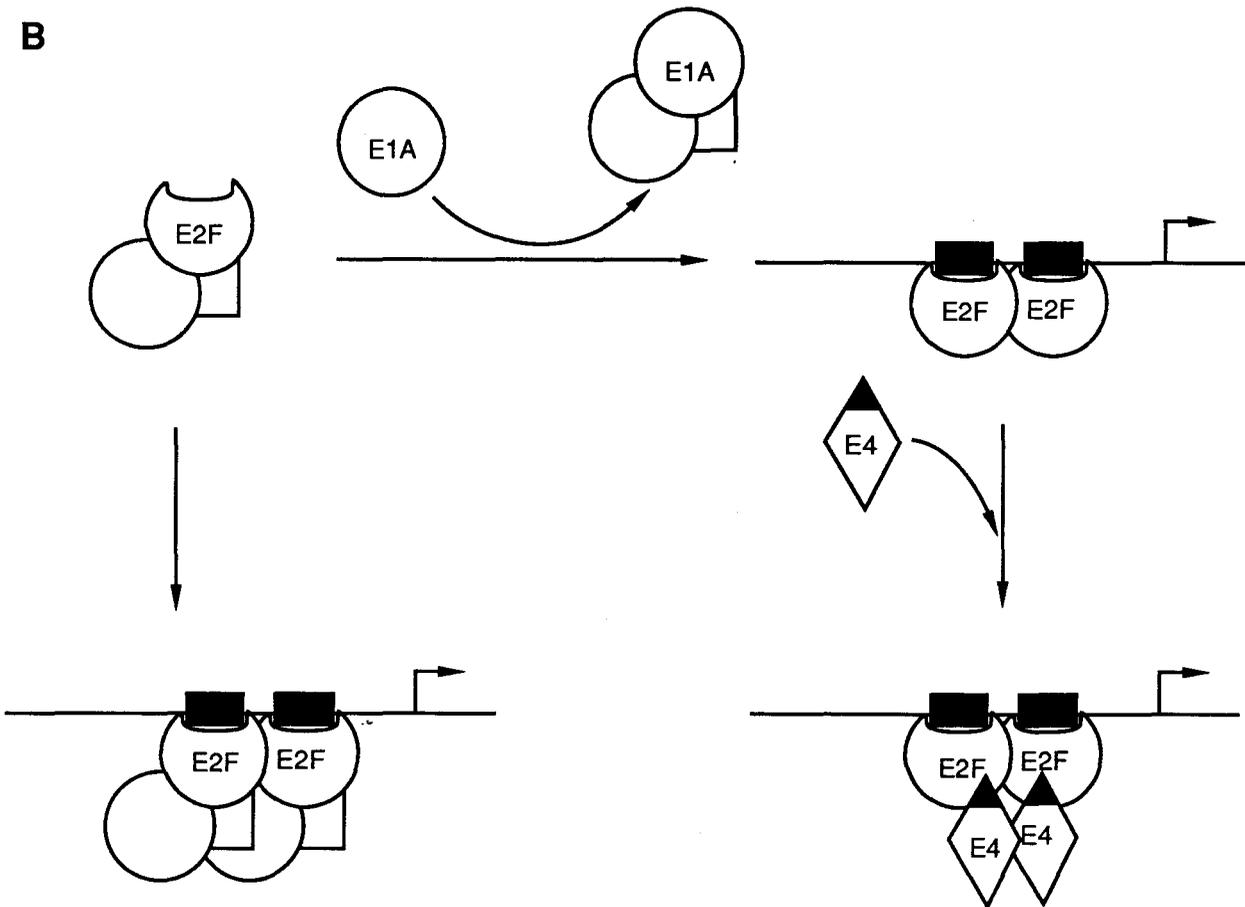


Figure G9 : Modèles de transactivation par E1A

A: Transactivation directe (d'après LEE *et al.*, 1991)

B: transactivation indirecte. E2F n'est actif que s'il est libéré des protéines cellulaires (par E1A). La forme coopérative plus active est obtenue grâce à un produit de la région E4.

En expression transitoire, ainsi que dans des cellules HeLa infectées, les protéines E1A des sérotypes oncogéniques (Ad3 et Ad12) peuvent réprimer la transcription de E1A des sérotypes non oncogéniques (LEITE *et al.*, 1988).

Les études pour localiser les régions de E1A impliquées dans la fonction de répression de la transcription ont abouti à des résultats contradictoires. En général, contrairement à ce qui se passe pour la transactivation, le produit de l'ARNm 12S est aussi efficace que le produit de l'ARNm 13S. En utilisant la mutagénèse dirigée, GREEN et ses collègues ont montré que le CR2 est essentiel à la répression (LILLIE *et al.*, 1986). Cependant, le CR1 semble responsable de l'inhibition des gènes *JE*, *sml* et *c-myc* dans les cellules transformées (VAN DAM *et al.*, 1989) et le CR3 est impliqué dans l'inhibition des antigènes du CMH de classe I comme nous le verrons plus loin. D'autres modèles ont montré que la répression dépend du CR1, du CR2, mais aussi de portions de E1A en dehors de ces deux domaines (ROCHETTE-EGLY *et al.*, 1990). Il semble que ces résultats variables reflètent des différences dans les promoteurs utilisés ainsi que dans les conditions d'expérience.

Le mécanisme moléculaire, ou plus exactement les mécanismes puisque plusieurs domaines peuvent fonctionner, restent obscurs mais font probablement appel à des associations E1A/protéines cellulaires. E1A peut en effet interagir avec des facteurs de transcription et par là les inactiver. Une étude récente suggère par exemple que E1A peut diminuer l'activité du facteur de transcription AP-1/*c-jun* (OFFRINGA *et al.*, 1990). Une protéine de 98 kDa, le facteur nucléaire BEF-1 peut également intervenir dans la répression induite par E1A (REIFEL-MILLER *et al.*, 1991).

III-3- Interaction avec le cycle cellulaire

III-3-a- Stimulation de la synthèse d'ADN

Le cycle cellulaire, se déroulant sur une période d'environ 24 à 27 heures, est constitué de quatre phases successives: la phase G1, précédant la phase de réplication de l'ADN (15 à 17 h); la phase S, pendant laquelle a lieu la synthèse de l'ADN (3 à 4 h); la phase G2 précédant la mitose (5 à 6 h) et la phase M de division mitotique (40 à 60 mn).

L'infection de cellules primaires de rongeur en phase G1 stimule la synthèse d'ADN cellulaire (SHIMOJO and YAMASHITA, 1968; BRAITHWAITE *et al.*, 1981). Cette stimulation ne dépend que de l'expression de E1A (BRAITHWAITE *et al.*, 1983; BELLETT *et al.*, 1985) et les deux protéines de 243 aa et 289 aa peuvent porter cette fonction

(STABEL *et al.*, 1985). La stimulation de la synthèse d'ADN cellulaire résulte en fait de deux mécanismes : la liaison de E1A à des protéines régulatrices du cycle cellulaire comme p105^{RB} ou la cycline A et l'induction de facteurs de croissances spécifiques.

QUINLAN et GRODZIKER (1987) ont montré que des cellules BRK infectées par un virus exprimant l'ADNc de l'ARNm 12S d'Ad5 synthétisent un facteur de croissance qui permet à des cellules épithéliales de proliférer en culture. Ce facteur est différent de tous les facteurs de croissance connus (QUINLAN *et al.*, 1988). Les cellules transformées par les adénovirus n'induisent pas le facteur de croissance épithélial EGF à des taux détectables (SUBRAMANIAN *et al.*, 1988). Le facteur de croissance sécrété est capable de remplacer les besoins en sérum de cellules embryonnaires de tératocarcinome (F9), et induit une altération morphologique de ces cellules (QUINLAN, 1989).

Certains auteurs ont montré que le C₁ du produit de l'ARNm 12S est nécessaire à l'induction de facteur de croissance (QUINLAN *et al.*, 1988). Cependant pour d'autres, l'extrémité N-terminale de E1A et le CR2 sont les parties importantes pour la sécrétion de facteur de croissance par les cellules infectées (SUBRAMANIAN *et al.*, 1988) ainsi que pour l'induction de synthèse de l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA)(ZERLER *et al.*, 1987). Par la suite, l'induction de la synthèse d'ADN cellulaire a été corrélée avec la capacité des produits de E1A à former des complexes avec les protéines p105^{RB} et p300. Par contre la liaison à la p107 ne semble pas indispensable à cette fonction (HOWE *et al.*, 1990).

La fonction de stimulation de la synthèse d'ADN cellulaire doit être importante pour la multiplication virale dans les cellules humaines, et plus particulièrement les cellules en phase G₀ qui sont la cible naturelle du virus. L'induction de facteur de croissance est peut-être aussi une étape importante pour l'immortalisation de cellules par E1A.

III-3-b- Liaison à la cycline A

Les cyclines sont des protéines régulatrices du cycle cellulaire. Il existe deux familles de cyclines mitotiques: les cyclines A et B (revue par GIRARD *et al.*, 1992). La cycline B s'associe à la protéine kinase p34^{cdc2} pour former le MPF (Maturing Promoting Factor). La cycline A se lie également à une protéine de 33 kDa appelée p33^{cdk2}.

La cycline A est la protéine de 60 kDa associée à E1A dans les cellules transformées (PINES and HUNTER, 1990) et porte l'activité kinase coprécipitée avec E1A et p33^{cdk2} (HERRMANN *et al.*, 1991; KLEIBERGER and SHENK, 1991).

Les résidus Ser⁸⁹ et Ser²¹⁹ de E1A qui sont les sites majeurs de phosphorylation sont le substrat *in vitro* de la p34^{cdc2}. De plus, *in vivo*, les protéines E1A sont phosphorylées à des taux plus élevés dans les cellules en mitose qui expriment fortement la p34^{cdc2} (DUMONT and BRANTON, 1992).

En absence de E1A, la cycline A peut également se lier à la p107 (FAHA *et al.*, 1992) mais pas à l'antioncogène p105^{RB} (EWEN *et al.*, 1992). En phase S, la cycline A se trouve dans un complexe qui contient également E2F, la p107 et p33^{cdk2} (CAO *et al.*, 1992; PAGANO *et al.*, 1992)(fig. G10).

Les aa 30 à 60 et 120 à 127 de E1A sont impliqués dans la formation de complexes avec p60^{cyclineA} (GIORDANO *et al.*, 1991). Ces régions sont aussi nécessaires à l'activation de E2F ou à la liaison à p105^{RB}. Par compétition, E1A peut libérer E2F des complexes protéiques.

III-4- Transformation cellulaire

Les Ad ont été les premiers virus à ADN montrés capables de transformer des cellules *in vitro* et d'induire des tumeurs *in vivo*. Tous les sérotypes humains peuvent transformer des cellules primaires non permissives (GRAHAM *et al.*, 1984) et les gènes responsables de la transformation ont été localisés dans la région précoce E1 (GRAHAM and VAN DER EB, 1973). Les produits du gène E1A immortalisent les cellules alors que l'expression de E1B permet une transformation complète. Le phénotype transformé peut aussi être obtenu par coopération avec l'oncogène *ras* activé (RULEY, 1983).

III-4-a- Domaines nécessaires à la transformation

Le rôle des protéines E1A dans la détermination du phénotype transformé a été largement étudié grâce à des virus mutants et des fragments d'ADN modifiés. Les deux protéines majeures sont nécessaires pour obtenir une transformation complète et efficace (MONTELL *et al.*, 1984). Cependant chaque polypeptide d'Ad2 ou d'Ad5 peut transformer seul les cellules.

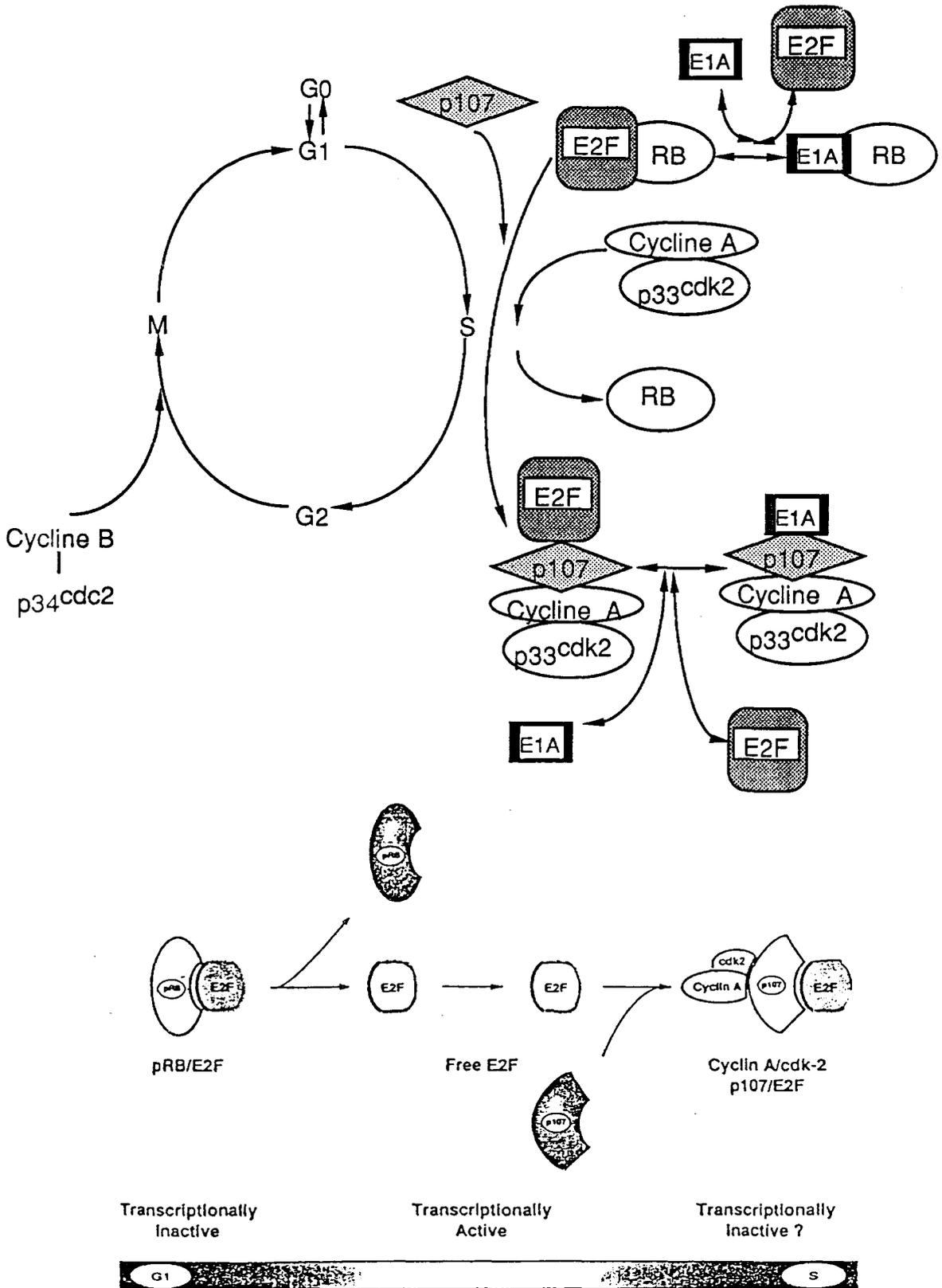


Figure G10 : Formation de complexes multiprotéiques en fonction du cycle cellulaire. (d'après CAO *et al.*, 1992).

Pour l'Ad12, des résultats différents ont été publiés: seul le produit de l'ARNm 13S peut induire une transformation complète de cellules primaires par introduction de virus (LAMBERTI and WILLIAMS, 1990).

Les domaines précis requis pour la transformation ont été déterminés par mutation pour les sous-groupes A et C. Les régions CR1, CR2 ainsi que la partie N-terminale sont nécessaires pour avoir une transformation complète (LILLIE *et al.*, 1986; 1987; SCHNEIDER *et al.*, 1987; MORAN *et al.*, 1986).

Tous les sérotypes sont transformants mais avec des efficacités variables. Les Ad du sous-groupe C sont par exemple beaucoup plus transformants que ceux du sous-groupe A.

III-4-b- Association à des anti-oncogènes

1) Les sites de liaison

Les protéines cellulaires reconnues par E1A dans des cellules infectées ou transformées ont été recherchées. La formation de complexes entre E1A d'Ad12 et les histones H1 et H4 a été mise en évidence *in vitro* (GRAND and GALLIMORE, 1984). Cependant, aucune preuve de l'existence de tels complexes *in vivo* n'a pu être apportée.

Une autre approche pour rechercher des protéines pouvant se lier à E1A a été l'utilisation de la technique d'immunoprécipitation. Avec un sérum polyclonal spécifique de E1A, 5 protéines majeures (250 kDa, un doublet à 105 kDa, 68 kDa et 65 kDa) ont été précipitées à partir de cellules transformées (YEE and BRANTON, 1985b). En utilisant un sérum monoclonal, HARLOW et ses collègues ont mis en évidence 3 protéines de 300, 107 et 105 kDa (HARLOW *et al.*, 1986). La protéine de 105 kDa a ensuite été identifiée comme le produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome (WHYTE *et al.*, 1988).

Les domaines de E1A qui participent à l'interaction avec p105^{RB} ont été localisés. La liaison à p105^{RB} nécessite la présence de deux séquences: les aa 30 à 60 et les aa 121 à 127. Ce second domaine interagit également avec la p107. Par contre, l'interaction avec la troisième protéine importante pour la transformation (la p300) implique le fragment N-terminal des aa 1 à 76 (WHYTE *et al.*, 1989).

2) Le produit du gène RB1

Le gène de susceptibilité au rétinoblastome code pour une phosphoprotéine nucléaire de 110 kDa (LEE *et al.*, 1987) qui fonctionne comme un élément de contrôle du cycle cellulaire (revues par MARSHALL, 1991; WAGNER and GREEN, 1991; WEINBERG, 1991). La protéine p105^{RB} se lie à d'autres protéines virales comme l'antigène T de SV40 (DE CAPRIO *et al.*, 1988), la protéine E7 des papillomavirus (DYSON *et al.*, 1989a; BARBOSA *et al.*, 1990), et l'antigène nucléaire 2 du virus d'Epstein Barr (HARADA and YANAGI, 1991). Leur domaine de liaison à p105^{RB} présente une homologie avec le CR2 de E1A (MORAN, 1988)(fig. G11). p105^{RB} se lie à E1A d'Ad2 mais aussi à l'Ad12 (GRAND *et al.*, 1989).

Les extrémités N-terminales de *c-myc* et *N-myc* peuvent également interagir avec p105^{RB} (RUSTGI *et al.*, 1991). Elles sont homologues aux sites de liaison de E7 d'HPV16.

Il a été démontré que l'antigène T de SV40 se lie exclusivement à la forme sous phosphorylée de p105^{RB} (LUDLOW *et al.*, 1989; 1990). La protéine p105^{RB} a une demi-vie de plus de 10 h, elle est synthétisée pendant tout le cycle cellulaire mais son degré de phosphorylation varie (BUCHKOVICH *et al.*, 1989). Elle existe sous forme sous-phosphorylée pendant les phases G0 et G1 et elle est phosphorylée en de nombreux sites au moment du passage G1/S et en phase S (CHEN *et al.*, 1989; DE CAPRIO *et al.*, 1989; LUDLOW *et al.*, 1990; MIHARA *et al.*, 1989; XU *et al.*, 1989).

Le produit de l'ARNm 12S de E1A induit la phosphorylation de p105^{RB} d'une manière indépendante de sa liaison (WANG *et al.*, 1991), probablement par l'intermédiaire de la kinase p33^{cdk2} qui a été récemment séquencée (TSAI *et al.*, 1991). Il semble exister une interaction entre p105^{RB} et une voie de phosphorylation induite par la cycline A, qui peut être également activée par E1A (HINDS *et al.*, 1992). Ces résultats suggèrent que p105^{RB} sous-phosphorylée fait partie d'un complexe suppresseur de croissance que l'antigène T de SV40 ou E1A peuvent dissocier. Par ailleurs, la fixation de protéines virales sur p105^{RB} abolit l'effet inhibiteur du TGF- β 1 sur la transcription de *c-myc* (PIETENPOL *et al.*, 1990).

La région de p105^{RB} nécessaire à la liaison à E1A ou à d'autres protéines virales s'étend des aa 379 à 792 comprenant deux séquences indispensables non adjacentes: les aa 393 à 572 et les aa 646 à 772 (HU *et al.*, 1990; HUANG *et al.*, 1990; KAELIN *et al.*, 1990). Toutes les mutations spontanées de p105^{RB} sont localisées dans cette région et les mutants ne peuvent plus se lier à E1A ou l'antigène T de SV40 (BOOKSTEIN *et al.*, 1990; HOROWITZ *et al.*, 1989; 1990; KAYE *et al.*, 1990; SHEW *et al.*, 1990). Par ailleurs, le domaine de liaison aux oncogènes viraux peut s'associer à 7

Ad5 E1A	118	EV	I	D	L	T	C	H	E	A	G	F	P	P	S	D	D	E	D	E	137		
Ad12 E1A	103	E	D		D	L	L	C	Y	E		G	F	P	C	S	D	S	E	D	E	122	
Ad7 E1A	111	A	E		D	L	R	C	Y	E	E	G	F	P	P	S	D	D	E	D	E	G	130
Ad41 E1A	93	V	N	L	D		K	C	Y	E	E	G	L	P	P	S	G	S	E	A	D	112	
SV40 large T	99	N	E	E	N	L	F	C	S	E	E		P	S	S	D	D	E	A	T	117		
HPV-16 E7	18	E	T	T	D	L	Y	C	Y	E	Q	L	N	D	S	S	E	E	E	D	E	37	
EBV EBNA-2	455		D		Y	I	F	E	T	T	E	S	P	S	S	D	E	D	Y	474			
consensus		-	-	-	D	L	-	C	-	E	-	-	-	P	-	S	D	D	E	D	E		

Figure G11 : Comparaison des sites de liaison à p105^{RB} de quelques protéines virales

protéines cellulaires issues de différentes lignées tumorales humaines (HUANG *et al.*, 1991; KAELIN *et al.*, 1991). Très récemment il a été montré que p105^{RB} est associé à un facteur de transcription pour former un complexe. Ce facteur a été identifié comme étant E2F (CHELLAPAN *et al.*, 1991; BAGCHI *et al.*, 1991; CHITTENDEN *et al.*, 1991) ou le facteur équivalent dans les cellules F9 : DRTF1 (BANDARA and LA THANGUE, 1991). Les protéines E1A empêcheraient p105^{RB} de se lier à ce facteur et /ou dissocieraient la protéine d'un complexe pré-existant.

Les propriétés transformantes de E1A peuvent en partie s'expliquer par la séparation de p105^{RB} d'un facteur de transcription impliqué dans la régulation de gènes de contrôle du cycle cellulaire comme par exemple *c-myc* dont le promoteur est régulé par E2F.

3) La protéine p107

Tout comme la p105^{RB}, la protéine p107 peut former un complexe spécifique avec l'antigène T de SV40 ou E1A (DYSON *et al.*, 1989b; EWEN *et al.*, 1989; WHYTE *et al.*, 1989). La liaison à E1A se fait par le domaine CR2.

Cette protéine a été jusqu'en 1991 considérée comme une forme modifiée de la p105^{RB} car les deux protéines apparaissaient toujours sous forme de doublet dans les expériences d'immunoprécipitations. Mais l'ADNc a été cloné en 1991 et le gène a été cartographié sur le chromosome 20 (EWEN *et al.*, 1991) alors que RB1 se trouve sur le chromosome 13. Le gène code pour une protéine de plus de 900 aa qui présente une homologie avec p105^{RB} s'étendant sur 564 résidus. Dans cette région d'homologie se trouvent les séquences importantes pour les fonctions de contrôle de la croissance cellulaire et pour la liaison à T/E1A.

La structure de p105^{RB} qui peut se lier à T/E1A a été appelée poche (KAELIN *et al.*, 1991). Elle est constituée de deux domaines A et B séparés par 73 aa. La p107 contient une poche équivalente mais les deux domaines sont séparés par 211 aa (fig. G12). La nature de la séquence entre A et B ne semble pas critique pour la liaison à T/E1A (HU *et al.*, 1990).

L'homologie entre p105^{RB} et la p107, qui existe également sous forme phosphorylée et sous-phosphorylée, suggère qu'elles ont des fonctions proches. Par ailleurs, la p107 ne présente pas d'homologie avec d'autres protéines connues.

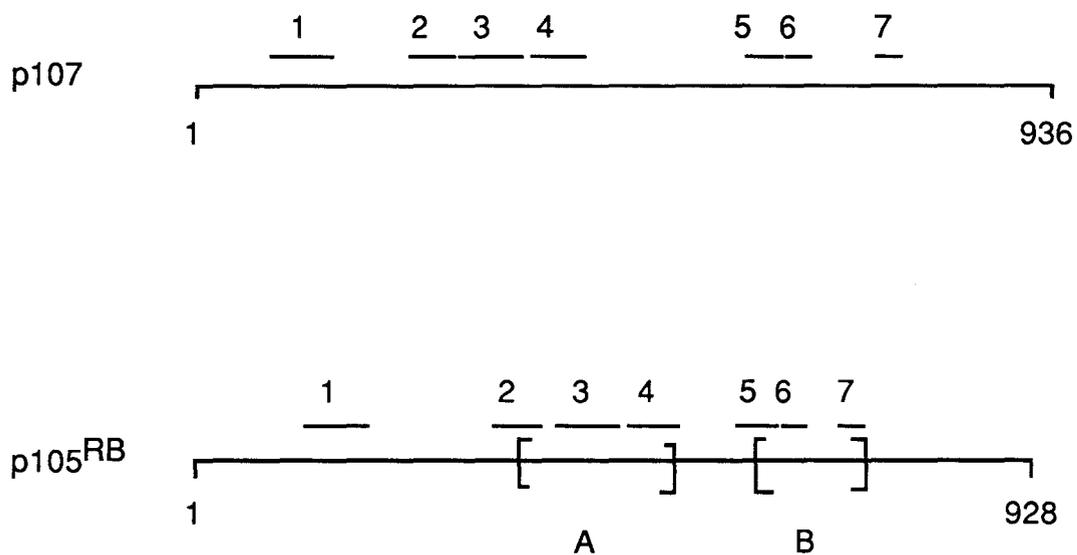


Figure G12 : Comparaison des protéines p105^{RB} et p107.

Les barres représentent les 7 fragments homologues entre les deux protéines.
Les domaines A et B de liaison à E1A sont indiqués entre crochets.
(EWEN *et al.*, 1991).

III-4-c- Association à la p300

Dans les protéines E1A, il existe deux régions importantes pour la transformation: le CR2 et l'extrémité N-terminale incluant le CR1. L'activité de transformation associée à ce domaine dépend essentiellement de sa liaison à une protéine cellulaire de 300 kDa (EGAN *et al.*, 1988). Les deux domaines sont aussi nécessaires mais ils agissent séparément (STEIN *et al.*, 1990).

Des mutations dans E1A qui empêchent la p300 de se fixer sont corrélées avec une perte de certaines fonctions de répression, une inhibition de la capacité d'induction de la synthèse d'ADN et une perte de l'activité mitogénique (JELSMA *et al.*, 1988; SCHNEIDER *et al.*, 1987; SMITH and ZIFF, 1988; STEIN *et al.*, 1990).

La p300 est une protéine nucléaire qui est phosphorylée aussi bien dans les cellules au repos que pendant le cycle cellulaire; elle a une demi-vie de 9 h (YACIUK and MORAN, 1991). Bien qu'aucune liaison physique n'ait été démontrée avec l'antigène T de SV40, ce dernier possède une activité biologique capable de compléter en *trans* des mutants délétés dans E1A (YACIUK *et al.*, 1991). La fonction exacte de cette protéine n'est pas connue mais elle peut se lier à de l'ADN avec une affinité préférentielle pour des séquences reconnues par le facteur de transcription NF κ B (RIKITAKE and MORAN, 1992)(fig. G13).

III-5- Oncogénicité

Tous les adénovirus humains peuvent transformer des cellules de rongeur *in vitro*. Cependant, seules les cellules transformées par les sérotypes des sous-groupes A et B sont capables d'induire des tumeurs chez le hamster nouveau-né immunocompétent. L'Ad12 est donc un virus oncogène (MAK *et al.*, 1979) alors que l'Ad2 et l'Ad5 ne le sont pas (GALLIMORE and PARASKEVA, 1979; VAN DEN ELSEN *et al.*, 1982). Cette différence d'oncogénicité peut en partie s'expliquer par une diminution de l'expression des antigènes (Ag) du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I à la surface des cellules transformées par l'Ad12 (SCHRIER *et al.*, 1983).

III-5-a- Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

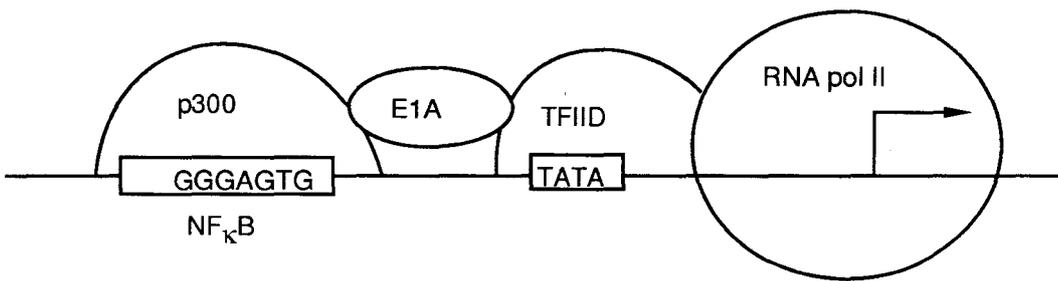


Figure G13 : Liaison de la protéine p30 à l'ADN.

Le CMH (HLA chez l'homme et H-2 chez la souris) est codé par un énorme locus multigénique de plusieurs millions de paires de bases. Il a été initialement découvert comme marqueur du soi et impliqué dans les phénomènes de rejet de greffe.

Les gènes du CMH et leurs produits ont été regroupés en trois classes (I, II et III) sur la base de leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles. Seuls les antigènes de classe I du complexe H-2 qui intéressent notre étude seront décrits ici (revue par DAUSSET et PLA, 1989).

Le complexe H-2 porté par le chromosome 17 code pour des glycoprotéines assemblées sous forme de tétramères. Ceux-ci associent 4 chaînes lourdes (44 kDa) et 4 chaînes légères (12 kDa) de β 2-microglobuline (KRISHNA *et al.*, 1992)(fig. G14). La β 2-m est codée par un gène du chromosome 2. Ces molécules sont exprimées à la surface de la quasi totalité des cellules somatiques, mais leur quantité varie d'un tissu à l'autre.

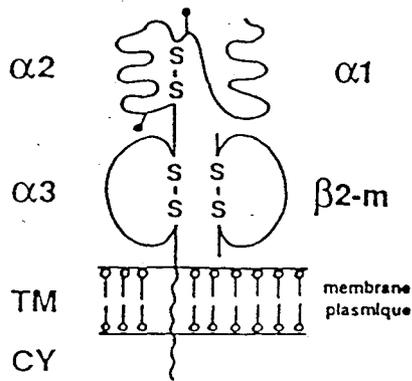
Les Ag de classe I jouent un rôle important dans la réponse immunitaire. En effet, des antigènes exprimés à la surface de cellules infectées ou transformées ne sont reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) que s'ils sont associés avec des molécules du CMH de classe I (ZINKERNAGEL and DOHERTY, 1979). Cette reconnaissance permet une élimination de la cellule anormale.

III-5-b- Interactions Ad/CMH

Bien que d'autres facteurs comme la sensibilité à la lyse par les cellules NK (Natural Killers) ou encore la sensibilité au TNF- α doivent également jouer un rôle, l'inhibition de l'expression des Ag de classe I à la surface des cellules transformées par l'Ad12 est souvent retenue comme modèle de la tumorigénicité (SCHRIER *et al.*, 1983; BERNARDS and VAN DER EB, 1984). En effet, ces cellules ne sont plus reconnues par les CTL et peuvent donc se développer en tumeur *in vivo* alors que les cellules transformées par l'Ad5 exprimant normalement les Ag de classe I sont éliminées par le système immunitaire. Dans certains cas, une stimulation de l'expression des Ag de classe I à la surface des cellules transformées par l'Ad 5 a même été décrite (EAGER *et al.*, 1985; VAESSEN *et al.*, 1986).

En utilisant des recombinants Ad5/Ad12, VAN DER EB et ses collègues ont montré que la région E1A est responsable de la tumorigénicité des cellules transformées (BERNARDS *et al.*, 1983; SCHRIER *et al.*, 1983; BERNARDS and VAN DER EB, 1984). Le produit de l'ARNm 13S est important pour l'inhibition de l'expression des Ag de classe I, mais le second exon n'est pas impliqué (JOCHENSEN *et al.*, 1984).

A



B

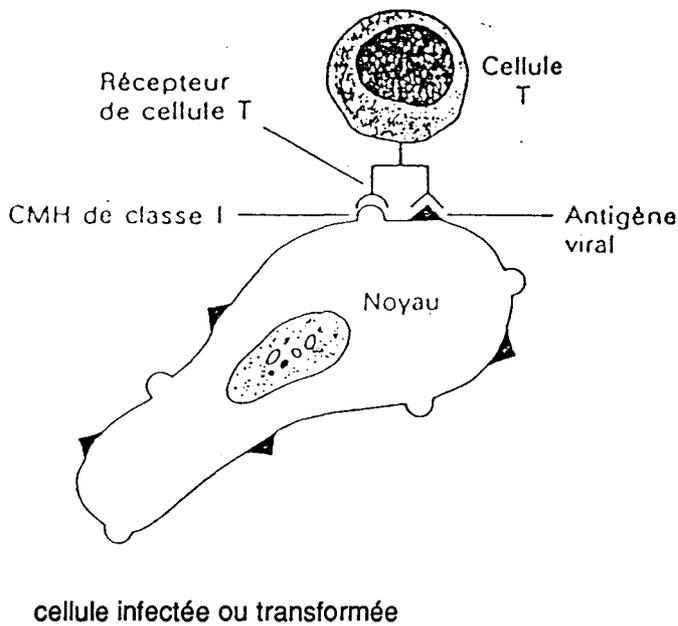


Figure G14: Les antigènes du CMH de classe I

A : structure des antigènes. CY : partie cytoplasmique; TM : fragment transmembranaire; $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$: domaines extracellulaires de la chaîne lourde.
B : rôle des antigènes dans l'élimination de cellules lésées.

Dans les cellules de rongeur transformées par les adénovirus, l'inhibition a lieu au niveau de la transcription (FRIEDMAN and RICCIARDI, 1988; ACKRILL and BLAIR, 1988; MEIJER *et al.*, 1989). Dans ce modèle les promoteurs murins H-2K^b et H-2K^{bm1} sont les plus étudiés (OZAWA *et al.*, 1990). Cependant la cible de l'inhibition de la transcription par les Ad n'a pas été localisée de façon bien déterminée et les résultats publiés à ce jour sont assez controversés (KIMURA *et al.*, 1986; ACKRILL and BLAIR, 1989; KATOH *et al.*, 1990).

L'inhibition de l'expression des Ag du CMH de classe I est probablement un effet indirect de la transformation puisque dans des cellules infectées, l'Ad12 stimule la transcription du gène H-2K^b (ROSENTHAL *et al.*, 1985). D'autre part, dans des expériences de cotransfection dans des cellules HeLa, le promoteur H-2K^b n'est pas inhibé par E1A d'Ad12 (HUVENT, communication personnelle). Cet effet indirect peut en partie expliquer la difficulté à localiser une cible précise sur un promoteur de gène de classe I.

Après immunisation, un antigène tumoral spécifique, codé par la région E1A d'Ad5 ou d'Ad12 confère une protection contre l'induction de tumeurs pour chaque sérotype (SAWADA *et al.*, 1986). La région E1A d'Ad5 code pour une cible des lymphocytes T cytotoxiques (CTL), comme cela a été montré *in vitro* (BELLGRAU *et al.*, 1988; MULLBACHER *et al.*, 1989). Les CTL générés chez la souris C57BL/6(B6) réagissant contre les cellules transformées par l'Ad5 reconnaissent ce peptide en association avec les antigènes H-2D^b. Le peptide a été localisé du côté C_t de E1A entre les aa 232 et 247 (KAST *et al.*, 1989).

En résumé, les protéines E1A sont douées de nombreuses activités portées par les différents domaines (fig. G15) et de manière générale, le mécanisme moléculaire fait appel à des associations à des protéines cellulaires. Cependant, toutes les fonctions attribuées aux oncoprotéines E1A ne sont pas totalement indépendantes. Pour se rendre compte à quel point elles sont imbriquées les unes dans les autres, il suffit de considérer l'association de E1A à p105^{RB} (complexe impliqué dans la transformation cellulaire) et à la p60^{cyclineA} (complexe important pour l'induction de la synthèse d'ADN); ces deux protéines étant elles-mêmes associées à E2F, intervenant dans la fonction de transactivation.

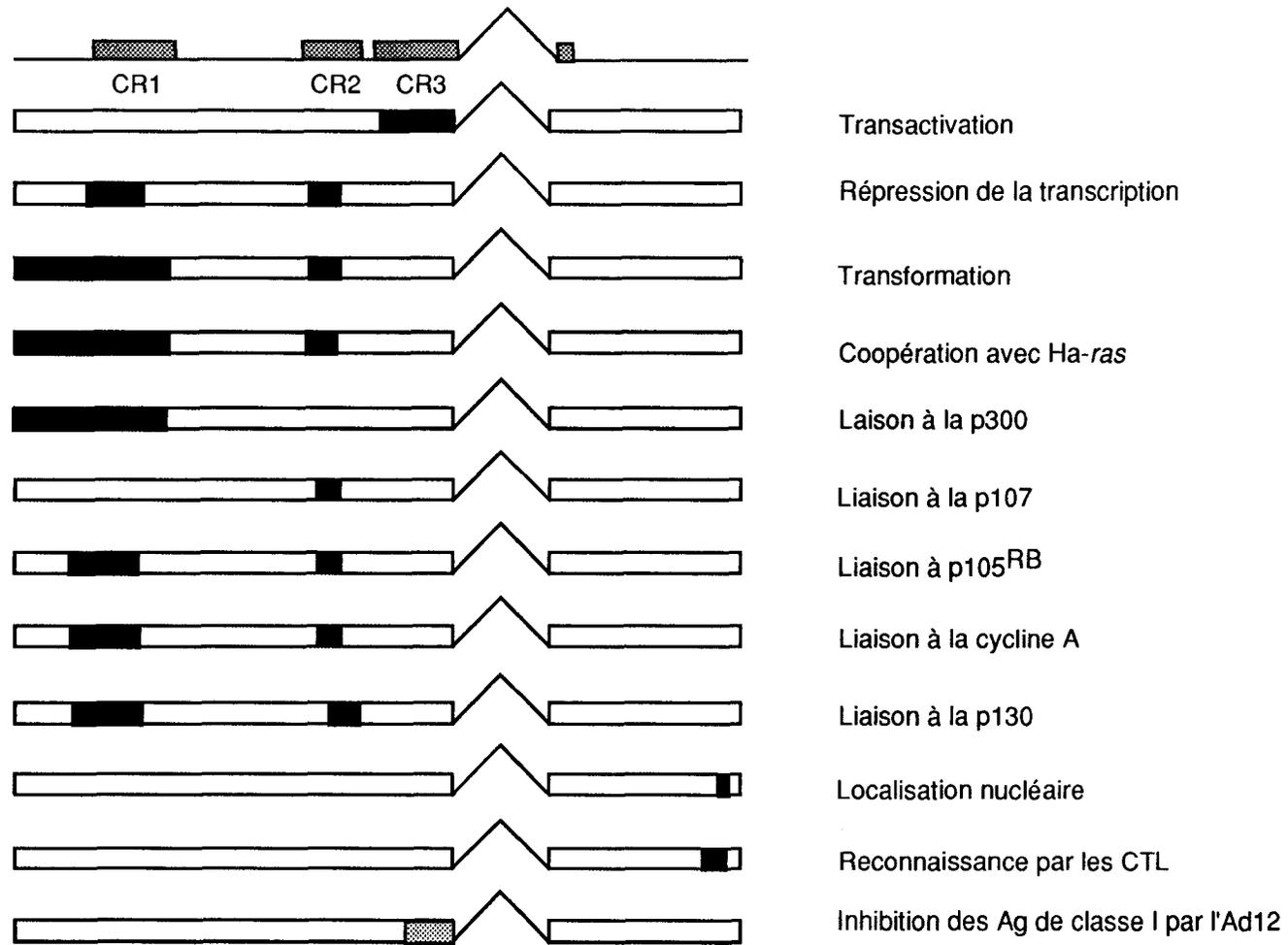


Figure G15 : Domaines de E1A et leurs fonctions.

RESULTATS

Les travaux qui vous sont présentés ici ont pour but de répondre à plusieurs questions :

1) La différence d'efficacité de transformation entre les sérotypes 2 et 12 peut-elle s'expliquer par des taux d'expression différents?

2) S'il s'agit d'une propriété intrinsèque des protéines, quels sont les domaines responsables?

3) Quels sont les domaines responsables de l'inhibition de l'expression des antigènes de classe I à la surface des cellules transformées donc du pouvoir oncogénique de l'Ad12?

4) Existe-t-il des différences entre les complexes multiprotéiques formés entre E1A et les protéines cellulaires des lignées transformées?

5) Ces différences s'expliquent-elles par une différence de conformation des protéines E1A des sérotypes 2 et 12?

I- INFLUENCE DU TAUX D'EXPRESSION DE E1A SUR LA TRANSFORMATION

L'Ad12 et l'Ad2 sont tous les deux transformants mais le taux de transformation de cellules primaires de rongeur est beaucoup plus élevé pour l'Ad2. La région prococe E1A est impliquée dans cette propriété (BERNARDS *et al.*, 1982). Or, la transcription de cette région est régulée différemment selon les sérotypes. Nous nous sommes tout d'abord demandé si le taux d'expression de E1A pouvait être corrélé à l'efficacité de transformation. La régulation de l'expression de E1A du sérotype 2 a été analysée afin de déterminer s'il existe des séquences nécessaires pour avoir un pouvoir transformant élevé.

I- 1- Régulation de E1A d'Ad 2.

I- 1-a- Délétions dans le promoteur.

Le promoteur de E1A d'Ad2 a été délété entre le site *Eco* RI (nt 1) et différents sites de restriction situés aux nt 193 (*Acc* I), 270 (*Bal* I), 336 (*Sst* I) et 456 (*Pvu* II). (fig. R1). Deux séries de plasmides ont été construites. Dans la première série, les plasmides contiennent E1A d'Ad2 et E1B d'Ad2, dans la deuxième série, les plasmides expriment E1A d'Ad2 et les transformations sont réalisées en coopération avec *Ha-ras*. Les résultats présentés dans le tableau II montrent que les délétions progressives du promoteur ont peu d'influence sur la fréquence de transformation sauf lorsque la séquence TATA est touchée. Lorsque cette séquence est délétée, l'activité transformante de E1A est supprimée. Les mêmes résultats sont obtenus en coopération avec E1B et avec *Ha-ras*.

I-1-b- Élément situé en 3'.

Au cours de la transformation cellulaire par les Ad, le gène E1B coopère avec E1A et permet d'obtenir le phénotype transformé. Un des mécanismes par lesquels cette coopération est possible est l'activation de E1A par E1B. Ainsi, des cellules transformées par E1A seul contiennent des concentrations plus faibles d'ARN spécifiques de E1A que les cellules transformées par les deux gènes (VAN DEN ELSEN *et al.*, 1983). Nous avons cherché à savoir si des séquences de E1B pouvaient stimuler la transcription du gène E1A.

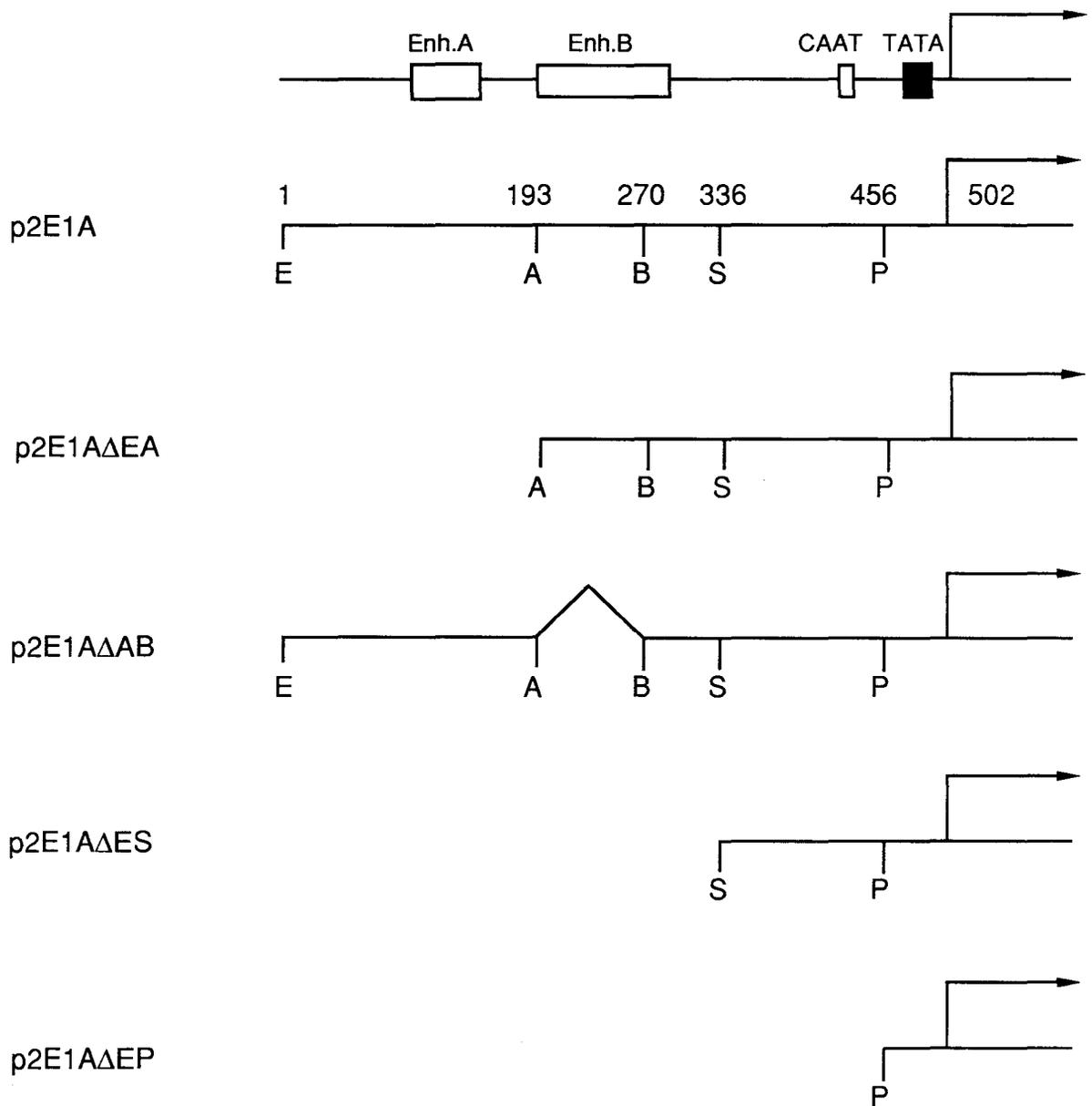


Figure R1 : Délétions dans le promoteur E1A d'Ad2.

Les différents sites de restriction sont indiqués avec leurs coordonnées : E = *Eco* RI; A = *Acc* I; B = *Bal* I; S = *Sst* II; P = *Pvu* II.

Tableau II : Influence de délétions dans le promoteur de E1A sur le taux de transformation .

Plasmides	Délétions	Nombre de foyers ^a				
		+ E1B ^b			+ Ha- <i>ras</i>	
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 1	Exp. 2
p2E1A		63-58	54-45	36-27	180-170	137
p2E1AΔEA	1-193	13-20	31-24	19-23	130-131	155
p2E1AΔAB	193-270	16-20	38-40	12-17	165-130	100
p2E1AΔES	1-336	12-48	23-34	10-8	94-110	61
p2E1AΔEP	1-456	26-42	11-6	18-10	200-195	25

a) 10⁷ cellules BRK ont été transfectées par 20 µg de plasmide et les foyers ont été comptés toutes les semaines pendant un mois

b) Les gènes E1A et E1B sont portés par le même plasmide.

Des cellules primaires BRK ont été transfectées avec des plasmides exprimant E1A et E1B portés par le même vecteur (p2E1AE1B) ou par deux vecteurs distincts (p2E1A + p2E1B)(tableau III). Les foyers de transformation apparaissent plus rapidement lorsque les deux oncogènes sont sur le même plasmide, dans une configuration analogue à celle observée dans le génome viral. De plus dans ce cas, le nombre de foyers obtenus est multiplié par un facteur 2 à 3. Si le gène *Ha-ras* est ajouté, le nombre de foyers est plus élevé et la stimulation en *cis* par E1B est encore observée.

Comme il était difficile de déterminer la séquence activatrice en mesurant le taux de transformation, le gène E1A a été remplacé par le gène *cat* ou le gène *néo* entre les sites *Hind* III (nt 538) et *Xba* I (nt 1336) dans le plasmide p2E1A. Le fragment d'ADN *Xba* I-*Hind* III (nt 1336-6231) contenant la région E1B a été placé en aval des gènes *cat* et *néo*, donnant les plasmides p2catE1B et p2neoE1B (fig. R2). L'activité CAT a été mesurée 40 h après la transfection de cellules HeLa ou HEK-293; l'apparition de foyers de résistance à la G418 a été suivie pendant 7 semaines (tableau IV). Une augmentation de l'expression contrôlée par le promoteur de E1A est observée chaque fois que le gène E1B est placé en aval du gène transcrit montrant ainsi la *cis*-activation de E1A par E1B

Afin de localiser la séquence impliquée dans cette activation, le plasmide p2catE1B a été modifié par délétion des fragments *Xba* I-*Sac* I (dl 1336-1771), *Sac* I-*Hind* III (dl 1771-6231), *Xba* I-*Hpa* I (dl 1336-1571) et *Hpa* I-*Sac* I (dl 1571-1771); les extrémités cohésives ont été rendues franches par le fragment Klenow de l'ADN pol I ou la nucléase S1. Nous avons ainsi confirmé l'activation en *cis* puisqu'elle persiste en absence des produits du gène E1B (dl 1771-6231)(tableau IV). De plus, l'activité *enhancer* a été localisée entre les nt 1571 et 1771. Cette région contient le promoteur de E1B, essentiellement constitué d'une séquence TATA et d'un site de fixation du facteur de transcription SP1 (WU *et al.*, 1987). C'est pourquoi un oligonucléotide (5'pGATCGATCGGGCGGGCGATC) a été cloné en aval du gène CAT dans le site *Xba* I du p2cat, donnant le p2catGC. Il s'est avéré que cette séquence n'est pas active sur le promoteur de E1A, lorsqu'elle est située en 3' du gène (tableau IV).

I-2- Régions E1A chimériques.

Pour déterminer l'influence relative des promoteurs et donc éventuellement corrélérer l'efficacité de transformation à un taux d'expression, des plasmides portant des régions E1A chimériques ont été construits. Le site conservé *Pvu* II situé 13 nt en amont de la séquence TATA a été utilisé pour échanger les promoteurs

Tableau III : La région E1B active en *cis* la transcription à partir du promoteur E1A

Plasmides	Nombre de foyers ^a		Activité CAT ^b		Résistance à la G418 ^c HeLa
	+ Ha- <i>ras</i>		HeLa	293	
p2E1A	1 (1)	60 (8)	14 (3)	29 (4)	30 (6)
p2E1AE1B	73 (9)	87 (9)	38 (6)	77 (11)	89 (12)
p2E1A + p2E1B	32 (5)	ND	17 (5)	ND	ND

a) 10 µg de chaque plasmide ont été transfectés dans des cellules BRK. Les foyers de transformation sont observés après 3 semaines avec Ha-*ras* et 6 semaines avec E1B. Les résultats indiquent le nombre de foyers par boîte de 100 mm de diamètre et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

b) L'activité CAT a été mesurée dans des cellules HeLa et HEK-293. Le gène *cat* remplace le gène E1A et l'activité est calculée par rapport au témoin pSV2cat (100).

c) Le gène E1A est remplacé par le gène *neo*. Le nombre de foyers de résistance à la G418 est compté après 3 semaines de sélection (400 µg/ml de G418). La transfection avec le plasmide pSV2neo donne plus de 100 colonies /boîte.

ND : non déterminé.

Les nombres entre parenthèses indiquent la valeur des écarts types.

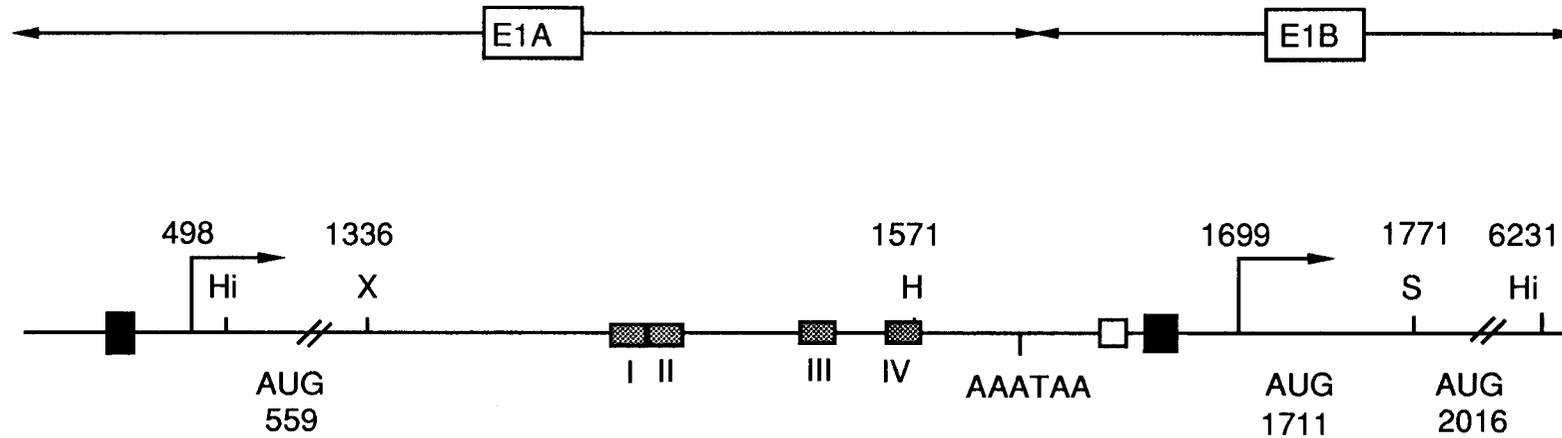


Figure R2 : Représentation schématique de la région E1.

Les flèches indiquent les sites d'initiation de la transcription.

■ : séquence TATA.

□ : site de liaison de SP1.

▨ : 4 sites de liaison dont les protéines sont encore inconnues (PARKS *et al.*, 1988).

X : *Xba* I; H : *Hpa* I; S : *Sac* I; Hi : *Hind* III (introduit au nt 538).

Tableau IV : Localisation de la séquence *cis*-activatrice.

Plasmides	Activité CAT	
	HeLa	293
p2E1Acat	18 (4)	37 (6)
p2E1AcatE1B	50 (9)	83 (8)
dl Xba I- Sca I (1336-1771)	17 (5)	22 (3)
dl Sac I- Hind III(1771-6231)	41 (7)	76 (7)
dl Xba I- Hpa I(1336-1571)	44 (8)	68 (8)
dl Hpa I- Sac I(1571-1771)	26 (5)	24 (6)
p2E1AcatGC	27 (4)	30 (5)

10 µg de chaque plasmide ont été co-transfectés avec 2 µg de RSVlacZ dans des cellules HeLa ou 293. Les réactions ont été standardisées par dosage de l'activité β-galactosidase. L'activité CAT est calculée par rapport à l'activité obtenue avec le pSV2cat (100). Chaque valeur représente la moyenne de 4 expériences indépendantes. Les valeurs entre parenthèses indiquent les écarts types.

entre les deux sérotypes 2 et 12. Le plasmide p2012 exprime E1A d'Ad12 sous contrôle du promoteur d'Ad2; le p1202 exprime la partie codante d'Ad2 contrôlée par le promoteur d'Ad12 (fig. R3). Les plasmides ont été transfectés dans des cellules BRK en association avec E1B d'Ad12 ou l'oncogène activé *Ha-ras*. Au bout de 4 à 6 semaines, les foyers de transformation apparaissent clairement. En coopération avec E1B ou avec *Ha-ras*, le plasmide p1202 a une efficacité de transformation comparable à celle de l'Ad2 sauvage et le p2012 à celle de l'Ad12 (tableau V).

I-3- Contrôle par un promoteur hétérologue.

Si l'efficacité de transformation est dépendante des taux d'expression de E1A, le fait de remplacer les promoteurs par un même promoteur hétérologue doit permettre aux deux sérotypes de transformer les cellules de la même façon. Nous avons donc placé les gènes E1A d'Ad2 et d'Ad12 sous le contrôle du LTR du MMTV (retrovirus de tumeur mammaire murin) grâce au site de restriction *Hind* III introduit dans les deux sérotypes (nt 494 dans l'Ad12 et nt 551 dans l'Ad2)(fig. R3). Ce promoteur présente le double avantage de ne pas être régulé par les produits de la région E1A et d'être inductible par la dexaméthasone (DM). Quel que soit le sérotype utilisé, l'expression sera la même après addition de DM 10^{-5} M dans le milieu. Les taux de transformation de cellules BRK (tableau V) nous montrent que l'efficacité ne dépend pas du taux d'expression de E1A, mais de la partie codante de chaque région E1A. Le pouvoir transformant est donc une propriété intrinsèque des protéines exprimées.

II- PRODUIT(S) RESPONSABLE(S) DE L'EFFICACITE DE TRANSFORMATION ET DE L'ONCOGENICITE.

II-1- Mesure du taux de transformation.

La région E1A est transcrite en deux ARNm majeurs de 12S et 13S. Pour déterminer le rôle de chacun de ces produits dans la fréquence de transformation, la région E1A des deux sérotypes a été remplacée par chacun des ADNc. Les résultats de transformation sont présentés dans le tableau VI. Chacun des deux produits d'Ad2 peut transformer morphologiquement des cellules primaires de rat mais avec une efficacité inférieure à celle de l'Ad2 génomique. Le produit de l'ARNm 12S semble d'ailleurs plus efficace en coopération avec *Ha-ras* mais avec E1B, cette prédominance disparaît. En fait, dans ce cas, le produit de l'ARNm 13S transactive E1B et permet sans doute une

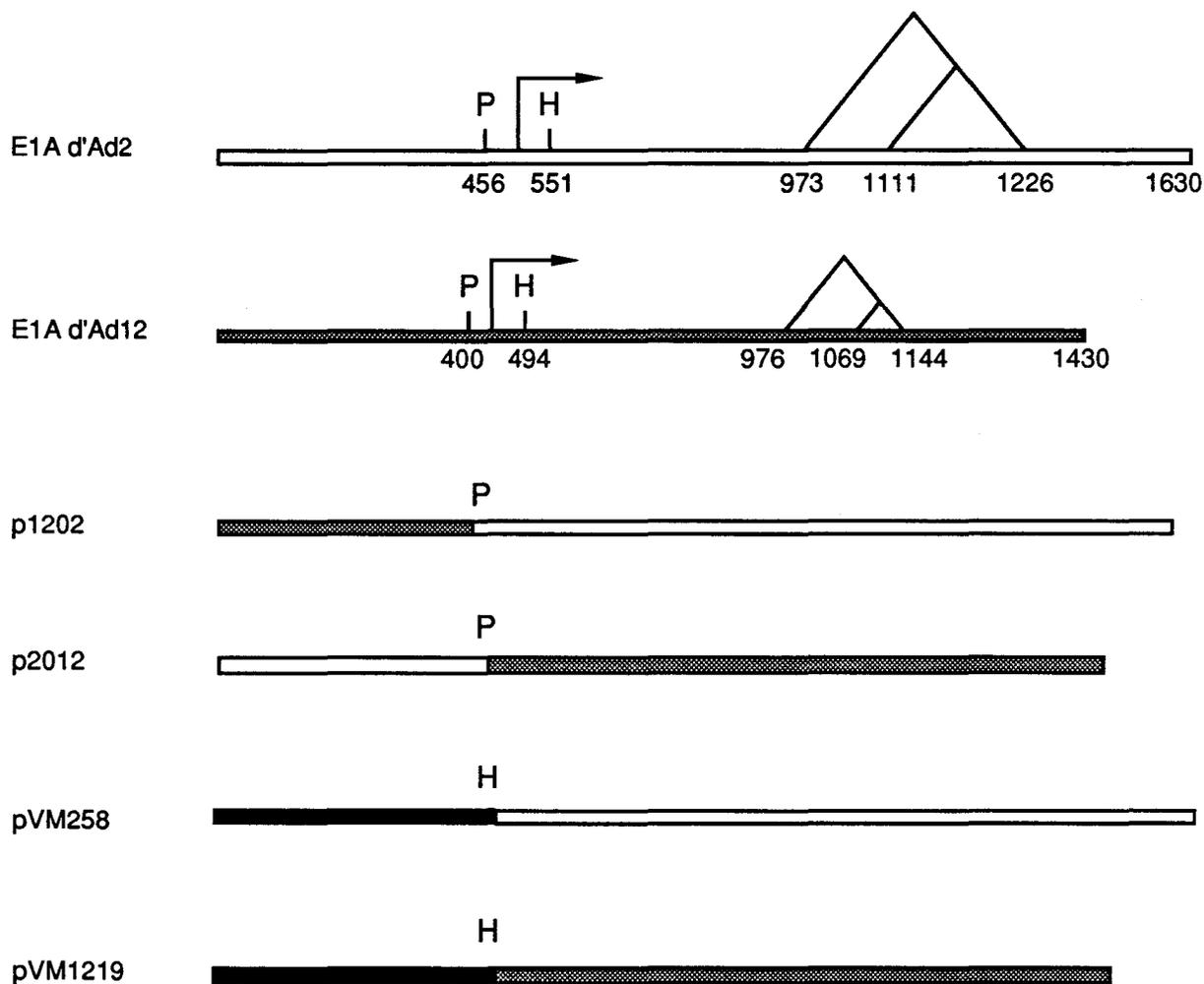


Figure R3 : Régions E1A chimériques.

P : Pvu II; H : Hind III.
□ : Ad2
▨ : Ad12
■ : LTR du MMTV

Tableau V : Transformation de cellules BRK par les régions E1A chimériques ou contrôlées par un promoteur hétérologue.

Plasmides	Sérotype		Nombre de foyers	
	Promoteur	séquence codante	+ E1B	+ Ha-ras
p2E1A	2	2	38(100)	100
p12E1A	12	12	6(15)	4
p1202	12	2	36(94)	84
p2012	2	12	6(15)	3
pVM258	MMTV-LTR ^a	2	31(82)	71
pVM1219	MMTV-LTR	12	4(12)	3

Chaque valeur représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. Entre parenthèses, l'efficacité de transformation est exprimée en pourcentage par rapport à la transformation obtenue avec E1A d'Ad2.

a En présence de dexaméthasone $10^{-5}M$

Tableau VI : Transformation de cellules BRK par des plasmides exprimant chacun des produits de E1A d'Ad2 et d'Ad12.

Plasmides	Sérotipe	ARNm	Foyers de transformation					
			+Ha- <i>ras</i>			+E1B		
			Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.1	Exp.2	Exp.3
p2E1A	2	12S + 13S	66	105	69	34	49	73
p2E1A(13S)	2	13S	5	3	5	5	6	10
p2E1A(12S)	2	12S	46	26	39	1	7	5
p12E1A	12	12S + 13S	10	4	2	2	1	5
p12E1A(13S)	12	13S	14	5	8	1	4	4
p12E1A(12S)	12	12S	15	3	2	4	1	8

10^7 cellules ont été transfectées par 10 µg de chaque plasmide. Le nombre de foyers est compté entre 3 et 6 semaines.

Chaque valeur représente la moyenne de 4 à 6 boîtes de cellules BRK.

meilleure transformation. Par contre pour l'Ad12, chaque ADNc est aussi efficace que la région génomique mais le taux de transformation est inférieur à celui obtenu avec l'Ad2. L'utilisation d'un promoteur hétérologue ne modifie pas ces résultats.

II-2- Inhibition des antigènes du CMH de classe I.

Les sérotypes les plus transformants (Ad2 ou Ad5) sont les moins oncogéniques *in vivo*. Les deux propriétés de transformation et d'oncogénicité ne sont donc pas nécessairement liées ni portées par les mêmes protéines. Le pouvoir oncogène de chaque produit des deux sérotypes a été recherché. Pour cela, des lignées ont été établies à partir de foyers de transformation isolés et l'expression des antigènes du CMH de classe I à la surface de ces cellules a été analysée par immunocytofluorométrie (fig. R4).

L'expression de ces Ag à la surface des cellules transformées par l'Ad12 est inhibée par rapport à celle observée à la surface des cellules transformées par l'Ad2 : le pic de fluorescence est déplacé vers la gauche. La même inhibition est obtenue après transformation par l'ADNc 13S; par contre l'ADNc 12S est sans effet. Après transformation par E1A d'Ad12 ou par l'ADNc 13S, le Log de l'intensité de fluorescence est inférieure à 6 pour plus de 60% des cellules, alors qu'avec l'ADNc 12S, plus de 80% des cellules présentent un Log de l'intensité de fluorescence supérieur à 6.

Les deux produits sont transformants mais seul le produit de l'ARNm 13S d'Ad12 peut inhiber la transcription des antigènes de classe I. C'est donc ce produit qui porte la propriété d'oncogénicité *in vivo*.

III- DOMAINES DES PROTEINES IMPLIQUES DANS LES FONCTIONS DE TRANSFORMATION ET D'ONCOGENICITE.

L'efficacité de transformation et l'oncogénicité étant des propriétés intrinsèques des protéines, nous nous sommes intéressés à rechercher les domaines portant ces fonctions. Les deux propriétés ne sont pas directement liées et peuvent être portées par des domaines fonctionnels différents, d'autant que seul le produit de l'ARNm 13S est impliqué dans l'oncogénicité alors que l'efficacité de transformation est aussi portée par le produit de l'ARNm 12S.

III-1- Construction d'hybrides.

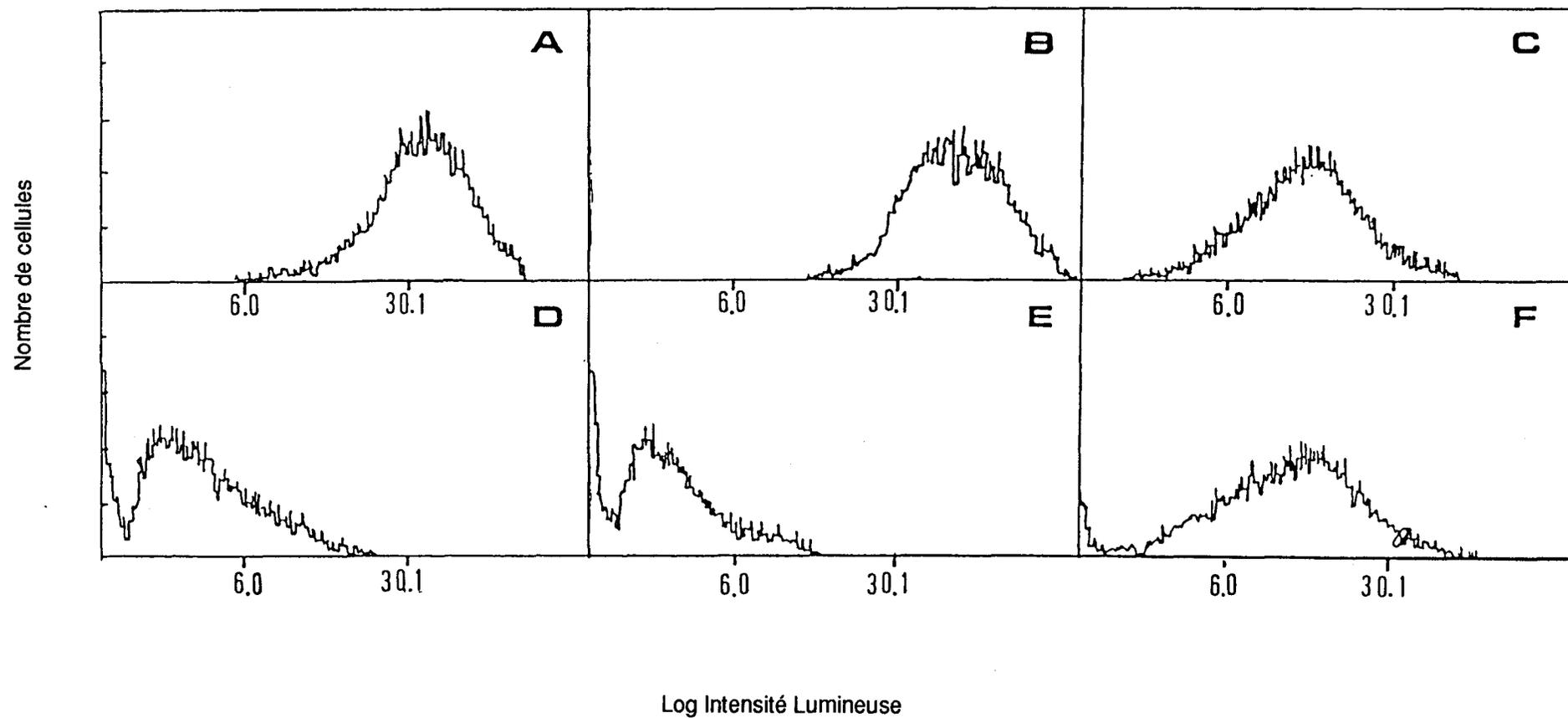


Figure R4 : Expression des antigènes du CMH de classe I à la surface des cellules transformées par chacun des produits de E1A.

A : p2E1A; B : p2E1A (13S); C : p2E1A (12S)
 D : p12E1A; E : p12E1A (13S); F : p12E1A (12S).

Les protéines de E1A d'Ad2 et d'Ad12 ne présentant que 50% d'homologie, certains sites de restriction ne sont pas présents sur les deux gènes (fig. R5). C'est pourquoi, avant d'envisager la construction de protéines hybrides, nous avons créé des sites spécifiques sur l'un ou l'autre gène. Pour cela, nous avons choisi une technique de mutagenèse dirigée dans le but de limiter les modifications apportées aux gènes et aux protéines (par rapport à l'insertion d'oligonucléotides par exemple).

III-1-a- Clonage dans un vecteur du mutagenèse.

Le vecteur de mutagenèse utilisé est le phagemide pSelect de chez PROMEGA. L'ADN introduit sous forme plasmidique dans une souche d'*E. coli* JM109 est produit sous forme simple brin après infection des bactéries par un phage *helper*. La présence d'une séquence multisites dans la partie N-terminale du gène *lacZ* nous a permis de cloner les fragments de E1A d'Ad2 ou d'Ad12 et de sélectionner les recombinants par la couleur des colonies.

L'ADNc 13S d'Ad2 a été inséré entre les sites *Eco* RI et *Xba* I du vecteur (fig. R6) et l'ADNc 13S d'Ad12 entre les sites *Hind* III et *Sal* I. Les oligonucléotides à utiliser pour faire de la mutagenèse dans le pSelectAd2 sont donc complémentaires du brins gauche du génome et complémentaires du brin droit dans le pSelectAd12.

III-1-b- Création de sites.

Trois sites ont été créés dans la séquence d'Ad12 (fig. R7 et R8).

- *Nae* I au nt 750

- *Cla* I au nt 814

- *Sma* I au nt 940

La création du site *Sma* I du côté N₁ du domaine CR3 n'a pas d'incidence sur la séquence protéique. Par contre, l'introduction du site *Cla* I en Nt du CR2 change un résidu Met en résidu Ile; et celle du site *Nae* I change un résidu Val en résidu Ala.

Un site *Kpn* I présent dans l'Ad12 a été introduit au nt 655 de la séquence d'Ad2. Un résidu Glu est remplacé par une Leu et la Pro est changée en Val.

III-1-c- Construction des régions hybrides.

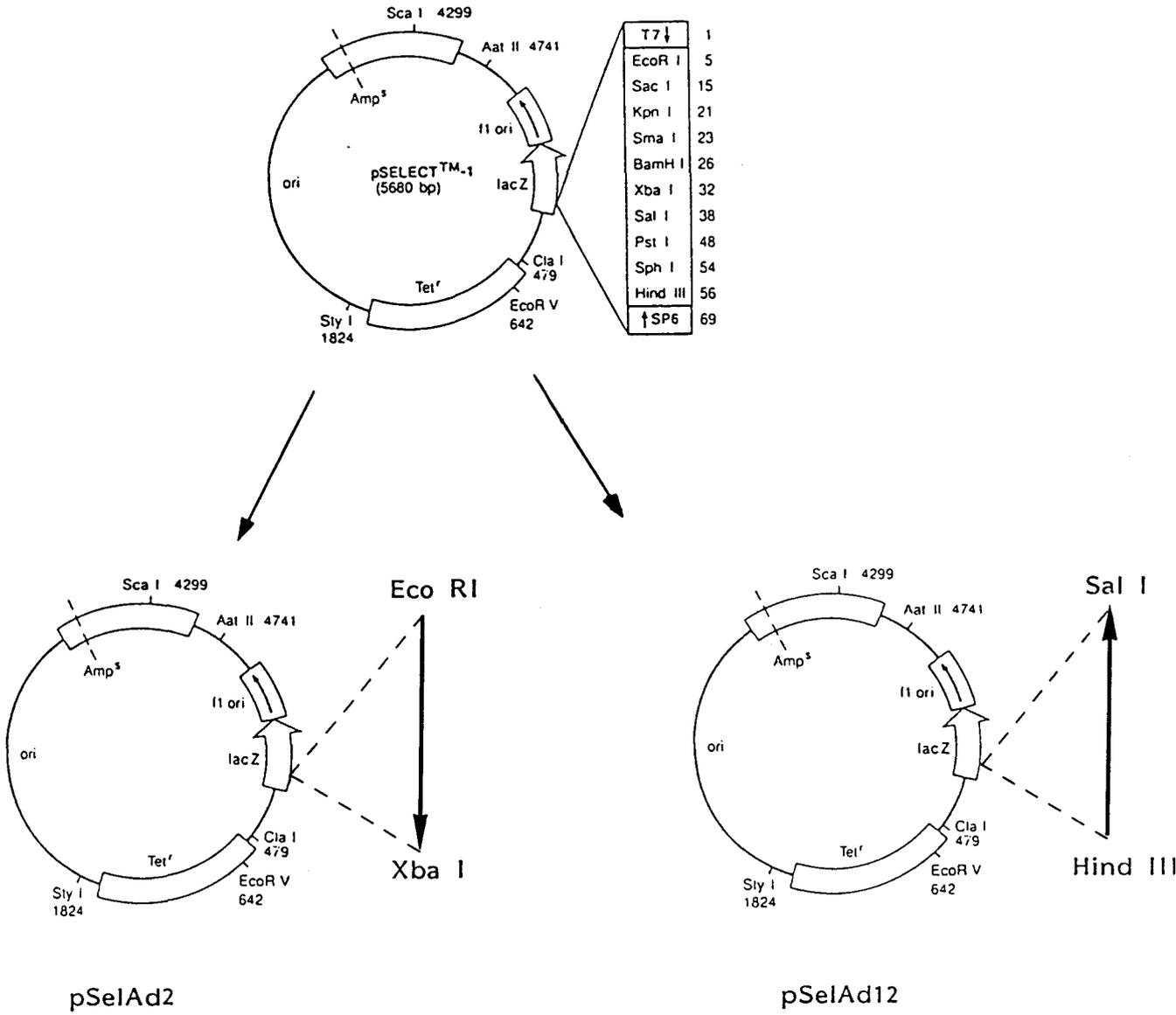


Figure R6 : Clonage de E1A d'Ad2 et E1A d'Ad12 dans un vecteur de mutagenèse.

Sma I

5' ACAATTGTG**CCCGGG**CAAC 3'

Cla I

5' CAATAA**TCGAT**ATCTTCA 3'

Nae I

5' GAAAGT**GCCGGC**GGCTCC 3'

Kpn I

5' ATCTTCC**GGTACCT**AGCC 3'

Figure R7: Oligonucléotides utilisés pour créer des sites de restriction par mutagenèse dirigée.

Les sites *Sma* I, *Cla* I et *Nae* I ont été introduits dans la séquence E1A d'Ad12; le site *Kpn* I dans la séquence d'Ad2. Les nucléotides qui changent par rapport aux séquences E1A sauvages sont indiqués en caractère gras. Les sites de restriction sont soulignés.

KpnI

Ad12 - MR-TEMTPLVLSYQEADDILEHLVDNF--FNEVPSDDDLVPSLYELYDL 47
 Ad2 - MRHIICHGGVITEEMAASLLDQLIEEVLADNLPPPSH-FEPPTLHELVDL 49

V

CR1 A

Ad12 - DVESAGEDNNEQAVNEFFPESLILAASEGLFL-PEPPV-----LSPV 88
 Ad2 - DV-TAPEDPNEEAVSQIFPDSVMLAVQEGIDLLTFPPAPGSPEPPHLSRQ 98

NaeI

I CR2

Ad12 - CE-----PIGGECMPQLHPEDMDLLCYEMGFPCSDSEDEQDENGMAHVSA 133
 Ad2 - PEQPEQRALGPVSMPNLVPEVIDLTCHEAGFPPSDDDEDEEGE----- 140

ClaI

CR3

Ad12 - SAAAAAADREREEFQLDHPPELPGHNCKSCEHHRNSTGNTDLMCSLCYLRA 183
 Ad2 - -----EFVLDYVEHPGHGCRSCHYHRRNTGDPDIMCSLCYMRT 178

SmaI

Ad12 - YNMFIIYSPVSDNEPEPNSTL----- 203
 Ad2 - CGMFVYSPVSEPEPEPEPEPEPARPTRRPKMAPAILRRPTSPVSRECNS 228

Ad12 - ----DGDERPSPPKLGS AVPEGVIKVPQRTGRRRCAVESILDLIQEEE 249
 Ad2 - TDSCDSGPSNTPEIHPVPLCPIKPVAVRVGGRRQ-AVECIEDLLNEPG 277

Ad12 - REQTVPVDLSVKRPRCN -266
 Ad2 - Q----PLDLSCKRPR-P -289

	GAG	GTA	CCC
Ad12	E	V	P
Ad2	L	P	P
	CTT	CCA	CCT
	CTG	GTA	CCT
	L	V	

KpnI

		<u>A</u>					
	CCG	CCG	GCA				CCC GGG
	CCT	CCT	GTA				CCC GGA
Ad12	P	P	V		M	D	P G
Ad2	P	P	A		I	D	P G
	CCG	CCG	GCG		ATC	GAT	CCC GGG
							SmaI

NaeI *ClaI* *SmaI*

Figure R8 : Sites de restriction créés par mutagenèse dirigée.

CR1, CR2, CR3 : régions conservées entre les sérotypes. Les résidus Cys impliqués dans la structure en doigt de zinc sont soulignés. Les modifications apportées dans la séquence protéique sont indiquées.

Les différents sites de restriction nous ont permis d'échanger des fragments homologues entre les deux sérotypes et d'exprimer ainsi des protéines hybrides. Les sites ont été choisis pour permettre des recombinaisons entre les domaines fonctionnels conservés CR1, CR2 et CR3. Onze constructions ont été réalisées, toutes placées dans le même vecteur (fig. R9). Le plasmide p2C12S2 introduit dans l'Ad2 le CR2 d'Ad12 et surtout la séquence de 20 aa particulièrement riche en Ala qui sépare les domaines CR2 et CR3.

III-2- Taux de transformation.

Tous les sérotypes d'Ad peuvent transformer des cellules primaires *in vitro* mais avec des efficacités plus ou moins grandes. Afin de déterminer le ou les domaines protéiques responsables de cette différence, nous avons introduit les plasmides codant pour les protéines E1A hybrides ou sauvages dans des cellules BRK. Nous avons transfecté en même temps un plasmide exprimant la région E1B d'Ad12, et les foyers de transformation qui apparaissent ont été régulièrement comptés pendant 6 semaines (fig. R10). Les cinétiques d'apparition des foyers reflètent le pouvoir transformant des différentes régions introduites. Les courbes donnant le nombre de foyers obtenus en fonction du temps montrent l'importance du domaine CR1 dans l'efficacité de transformation.

Le domaine CR1 d'Ad12 est capable de diminuer l'efficacité de transformation lorsqu'il est introduit dans E1A d'Ad2. En effet, les recombinants qui expriment le CR1 d'Ad12 (p12N2 et p12C2) ont un pouvoir transformant inférieur à celui observé pour les recombinants qui portent le CR1 d'Ad2 (p12K2S12). Notons que les modifications protéiques apportées par la mutagénèse dirigée ne changent pas l'efficacité de transformation : les p12Nae, p12Cla et p2Kpn donnent les mêmes cinétiques de transformation que les plasmides sauvages.

Par contre la partie N-terminale des protéines (aa 1 à 30) ne semble pas importante pour cette fonction : la cinétique observée avec l'hybride p12K2 est identique à celle de l'Ad2 type sauvage.

Des résultats similaires sont obtenus en coopération avec Ha-ras.

III-3- Morphologie des cellules transformées.

Les lignées cellulaires ont été établies à partir de foyers de transformation isolés. Les clones ont été mis en culture, tout d'abord dans des plaques

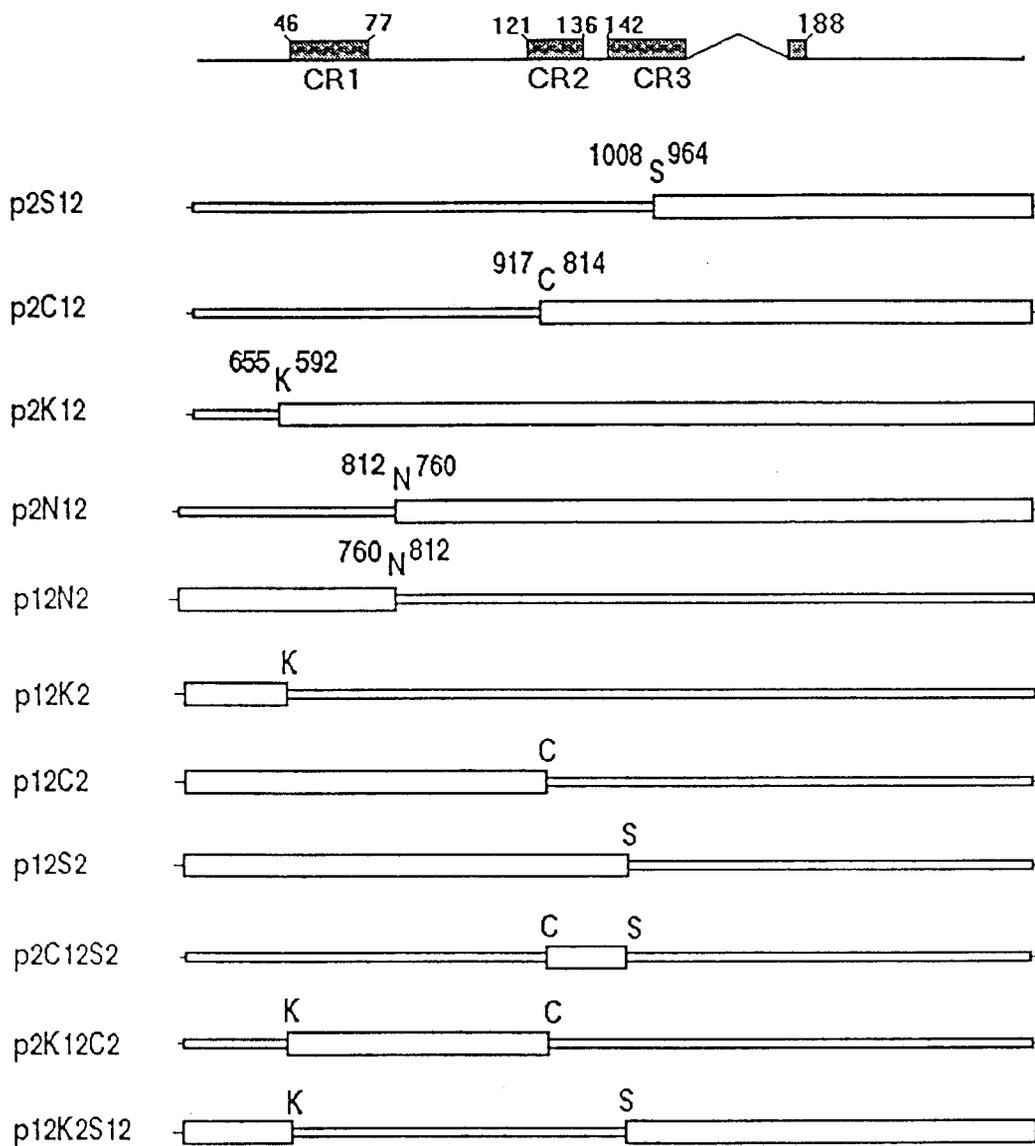


Figure R9 : Régions E1A hybrides.

La position des sites sur la séquence nucléotidique d'Ad2 ou d'Ad12 est indiquée.

Première ligne : CR1, CR2 et CR3 de l'Ad2.

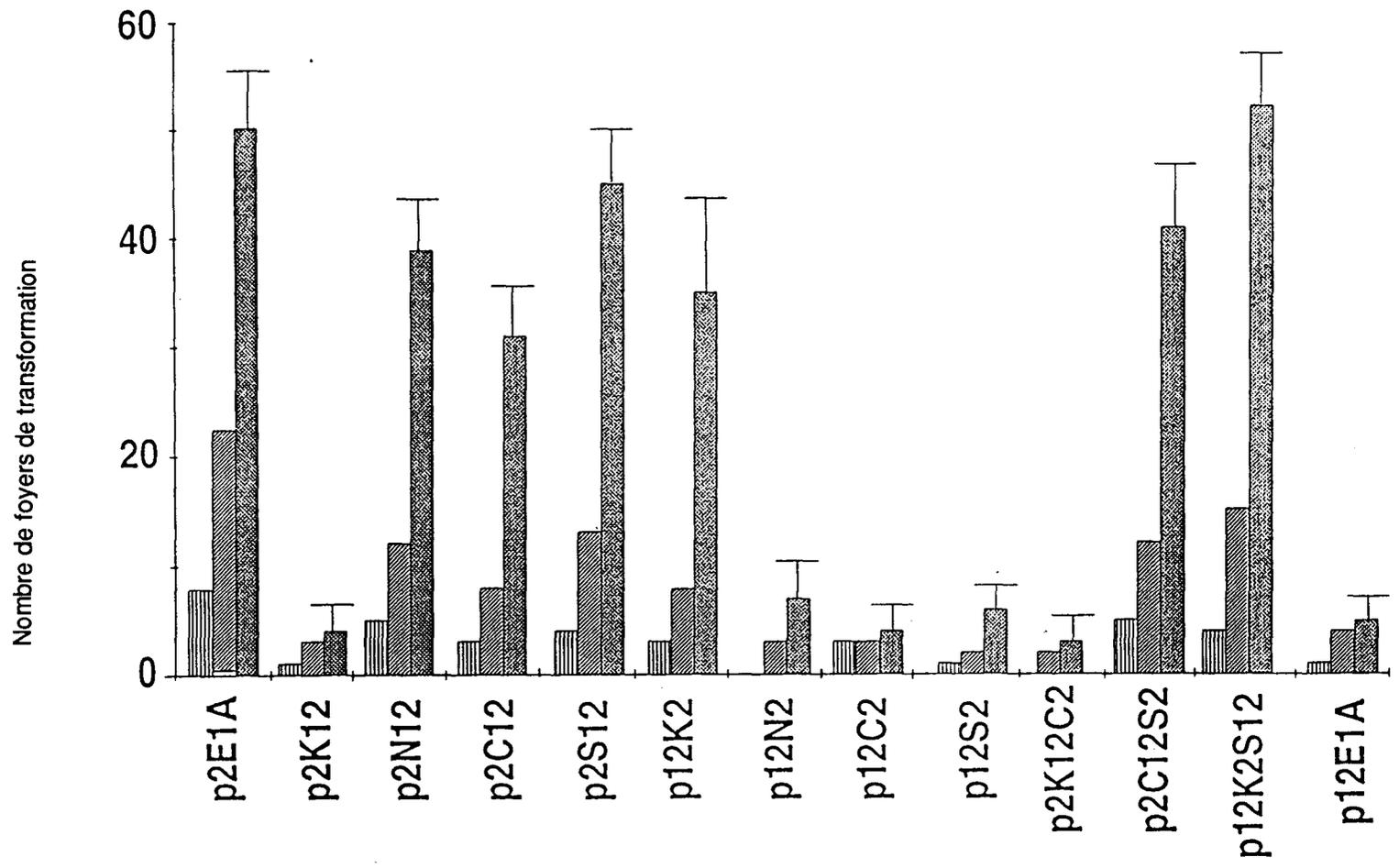


Figure R10 : Cinétiques d'apparition des foyers après transformation par des régions E1A hybrides.

Les foyers ont été comptés pendant 7 semaines, les histogrammes montrent le nombre de foyers apparus au bout de 26, 34 et 45 jours. Chaque valeur représente la moyenne de 3 expériences indépendantes de 4 boîtes de cellules chacune.

multipuits, puis dans des flacons de plus en plus grands. Le milieu est changé tous les trois jours et lorsque la lignée est établie, les cellules sont divisées régulièrement. La morphologie de ces cellules a pu être observée après fixation et coloration au cristal violet, sur des boîtes de 60 mm de diamètre, quand les cellules sont à 70% de confluence.

Nous avons pu distinguer des morphologies différentes entre les cellules transformées par E1A d'Ad2 et celles transformées par l'Ad12 (fig. R11). Avec les recombinants p2C12 et p2S12, nous observons des cellules qui ressemblent à celles obtenues avec l'Ad12 sauvage : les cellules sont plates et effilées. Par contre l'Ad2 donne des cellules plus arrondies qui peuvent pousser à une plus haute densité. En fait, la transformation par l'Ad2 apporte moins de changements morphologiques que l'Ad12. Le domaine protéique qui détermine la morphologie des cellules transformées est l'extrémité C_t incluant le CR3 et la partie codée par le second exon de l'ARNm 13S. Cette propriété est sans doute en corrélation avec la capacité à sécréter un facteur de croissance.

III-4- Expression des antigènes de classe I.

Dans le but de déterminer la séquence protéique nécessaire à l'oncogénicité de l'Ad12, nous avons mesuré l'expression des Ag du CMH-I à la surface des cellules transformées par les régions hybrides. Toutes les lignées mises en culture ont été analysées par cytofluorométrie. Les principaux profils obtenus sont représentés sur la figure R12. Les cellules transformées par les hybrides p2C12S2 et p12N2 montrent des taux élevés d'Ag du CMH-I à leur surface. Ces taux sont équivalents à ceux exprimés à la surface des cellules transformées par l'ADNc 13S d'Ad2. Par contre pour les hybrides p2S12 et p2C12, un déplacement du pic vers les intensités plus faibles est observé. Ceci reflète une inhibition de l'expression des Ag de classe I à la surface cellulaire comme pour les BRK(13SAd12). La région de E1A d'Ad12 située en aval du site de restriction *Sma* I est suffisante pour permettre l'inhibition des Ag de classe I. Nous pouvons donc considérer que le C_t du domaine CR3 est responsable de l'oncogénicité du sérotype 12.

IV- EXPRESSION DE PROTEINES RECOMBINANTES.

La production des protéines E1A chez *E. coli* nous a semblé intéressante pour deux raisons. Tout d'abord nous allons purifier des quantités assez importantes

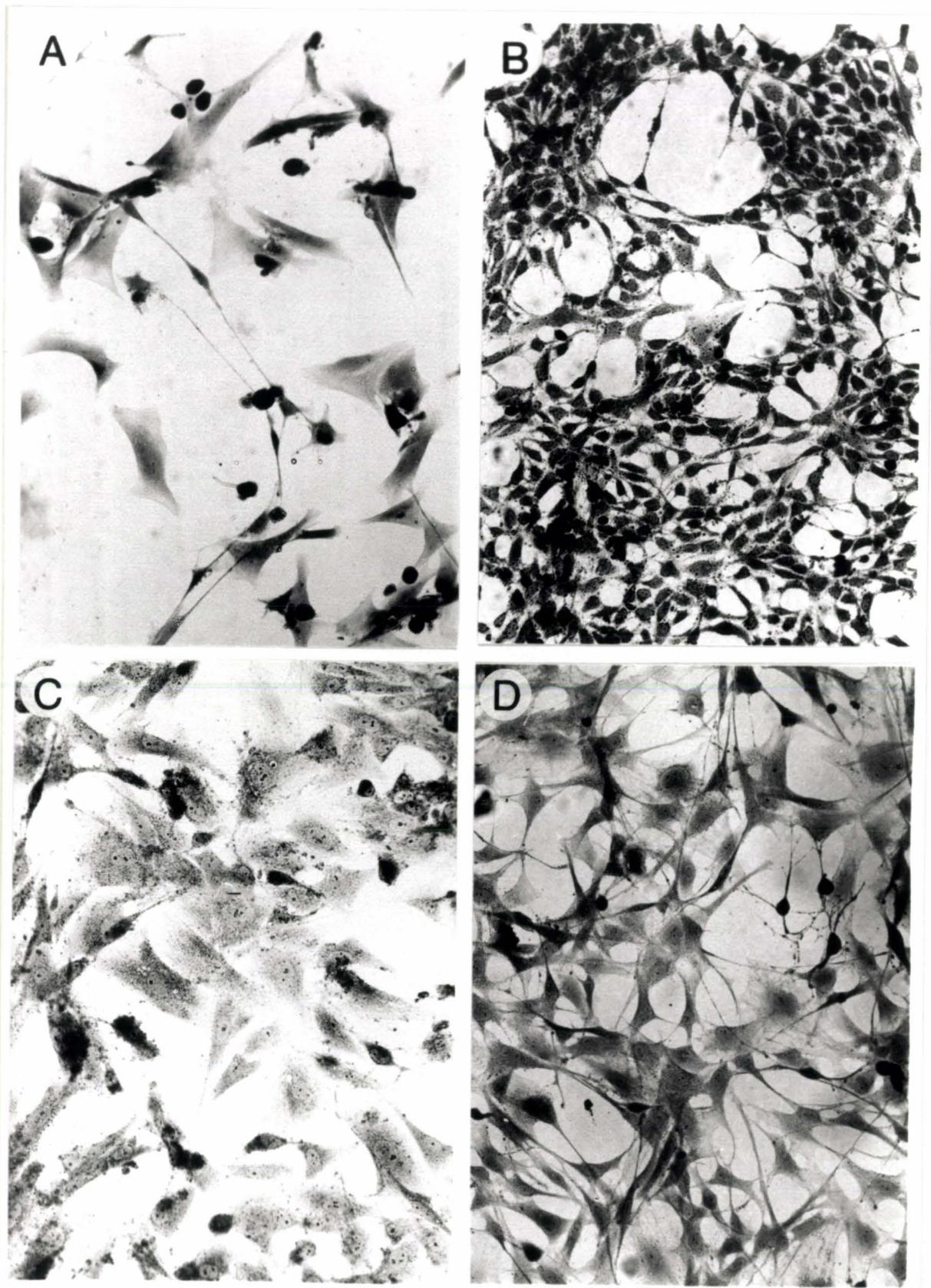


Figure R11 : Morphologie des cellules BRK primaires et transformées.

A : BRK; B : p2E1A + p12E1B; C : p12E1A + p12E1B;
D : p2C12 + p12E1B.

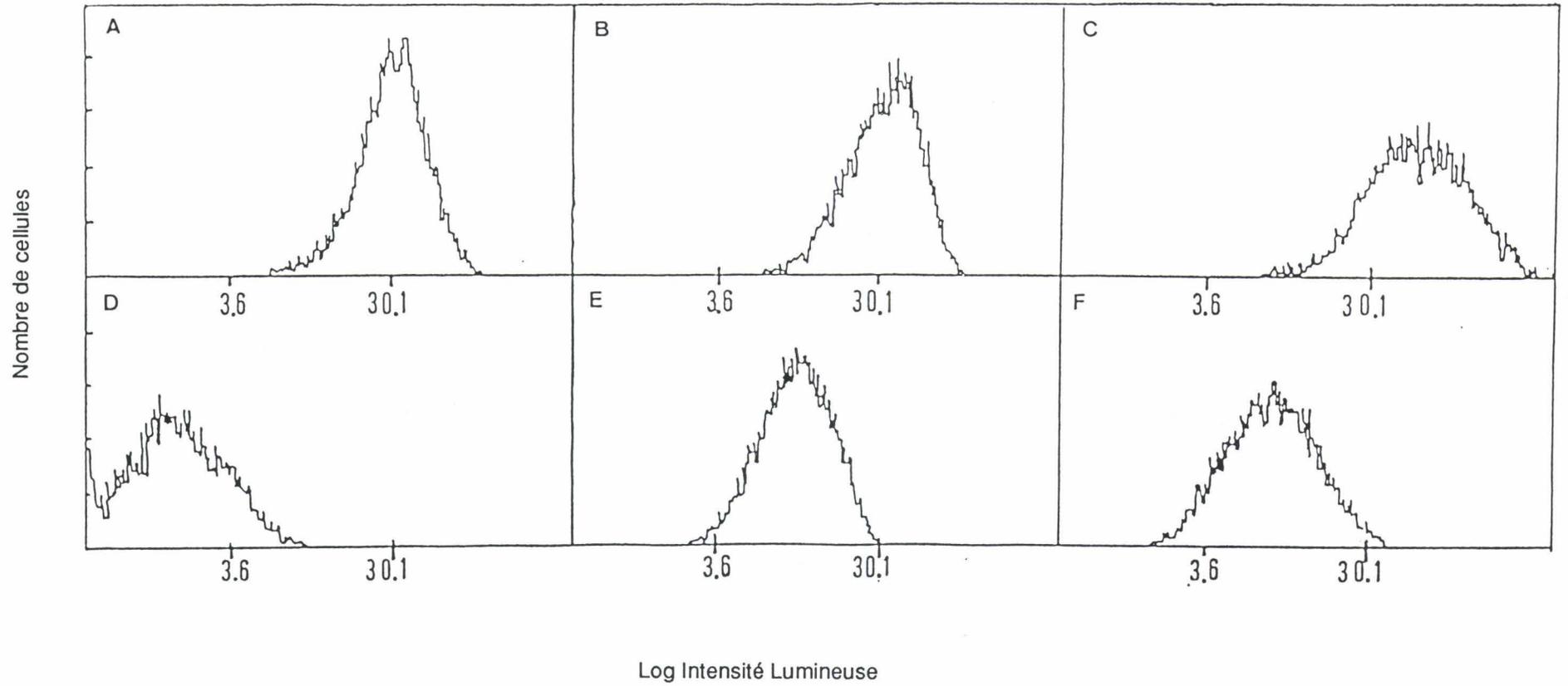


Figure R12 : Expression des antigènes du CMH de classe I à la surface des cellules transformées par les régions E1A hybrides.

A : p2E1A (13S); B : p2C12S2; C : p12N2; D : p12E1A (13S); E : p2S12; F : p2C12.

pour les injecter à un lapin afin d'obtenir un sérum dirigé contre E1A d'Ad12. Ensuite ces protéines nous permettraient d'aller "pêcher" des protéines cellulaires s'associant à E1A au cours de la transformation, le but final étant de comparer les complexes formés dans les cellules transformées par chacun des deux sérotypes.

IV-1- Construction des vecteurs.

IV-1-a- E1A d'Ad12.

Nous avons choisi de produire les protéines E1A chez *E. coli* sous forme fusionnée en utilisant le vecteur pGEX-2T commercialisé par Pharmacia.

L'ADNc 13S d'Ad12 a été cloné entre les sites *Bam* HI (nt 930) et *Aat* II (nt 1220) du vecteur donnant le plasmide pGEX-Ad12(13S)(fig. R13). Le site *Bam* HI a préalablement été ajouté dans la séquence de E1A par insertion d'un adaptateur au niveau du site *Nar* I (nt 494). Le fragment cloné contient toute la partie codante de E1A et c'est le codon STOP naturel qui doit être reconnu. La protéine fusionnée résultante est constituée du côté N-terminal d'une partie de l'enzyme glutathion S-transférase (GST) et du côté C-terminal par la protéine E1A d'Ad12. Les deux parties sont séparées par 8 aa. La transcription du gène de fusion est contrôlée par un promoteur inductible par l'IPTG.

Une construction identique a été réalisée avec l'ADNc correspondant à l'ARNm 12S; le plasmide a été appelé pGEX-Ad12(12S).

IV-1-b- E1A d'Ad2.

L'ADNc de l'ARNm 13S de E1A d'Ad2 a été cloné entre les sites *Bam* HI et *Tth* 111I (nt 1115) changé en site *Hind* III par insertion d'un adaptateur. Dans l'Ad2, le site *Bam* HI a été créé par mutagenèse dirigée en amont du codon d'initiation de la traduction (fig. R14). La protéine recombinante présente du côté N_t le fragment GST et du côté C_t E1A d'Ad2 dans sa totalité. Les deux parties sont unies par une séquence de 7 aa. Le plasmide résultant est appelé pGEX-Ad2.

Les fragments obtenus après digestions enzymatiques des clones sont représentés sur la figure R15.

IV-2- Purification des protéines.

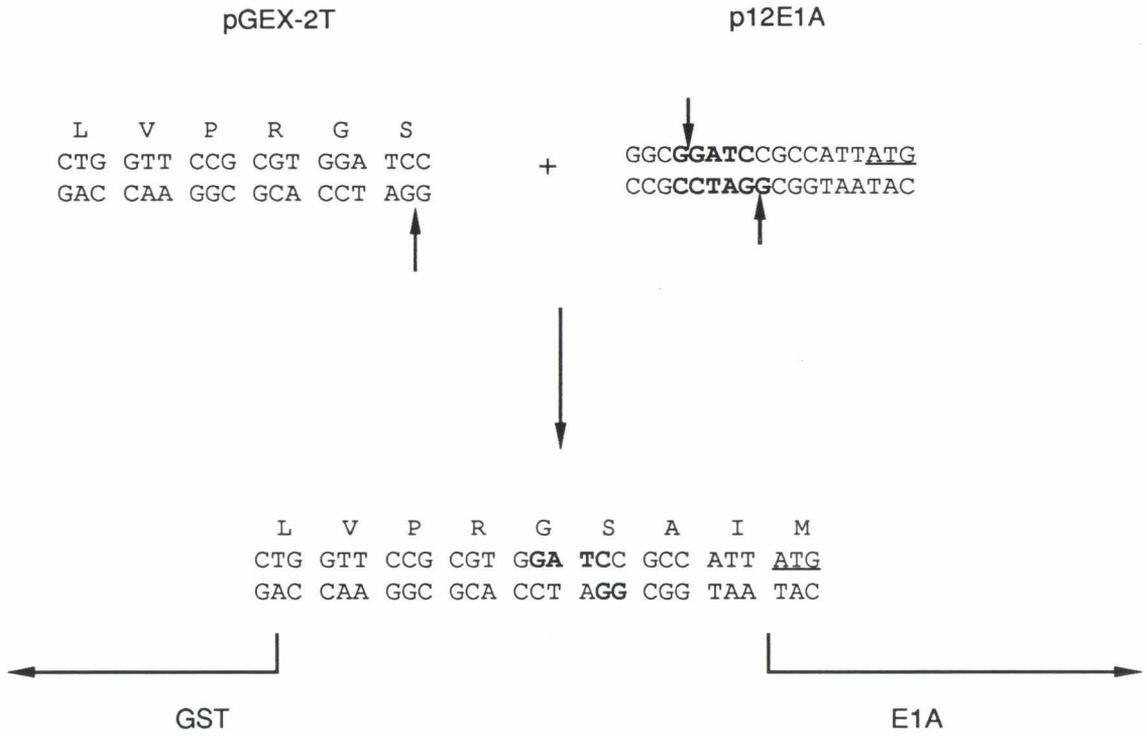


Figure R13 : Schéma de la fusion GST/E1A d'Ad12.

Le fragment cloné contient toute la région E1A. L'adaptateur *Bam* HI ajouté dans la séquence d'Ad12 est indiqué en caractères gras. Les flèches montrent les coupures enzymatiques impliquées dans le clonage. Le codon d'initiation de E1A est souligné.

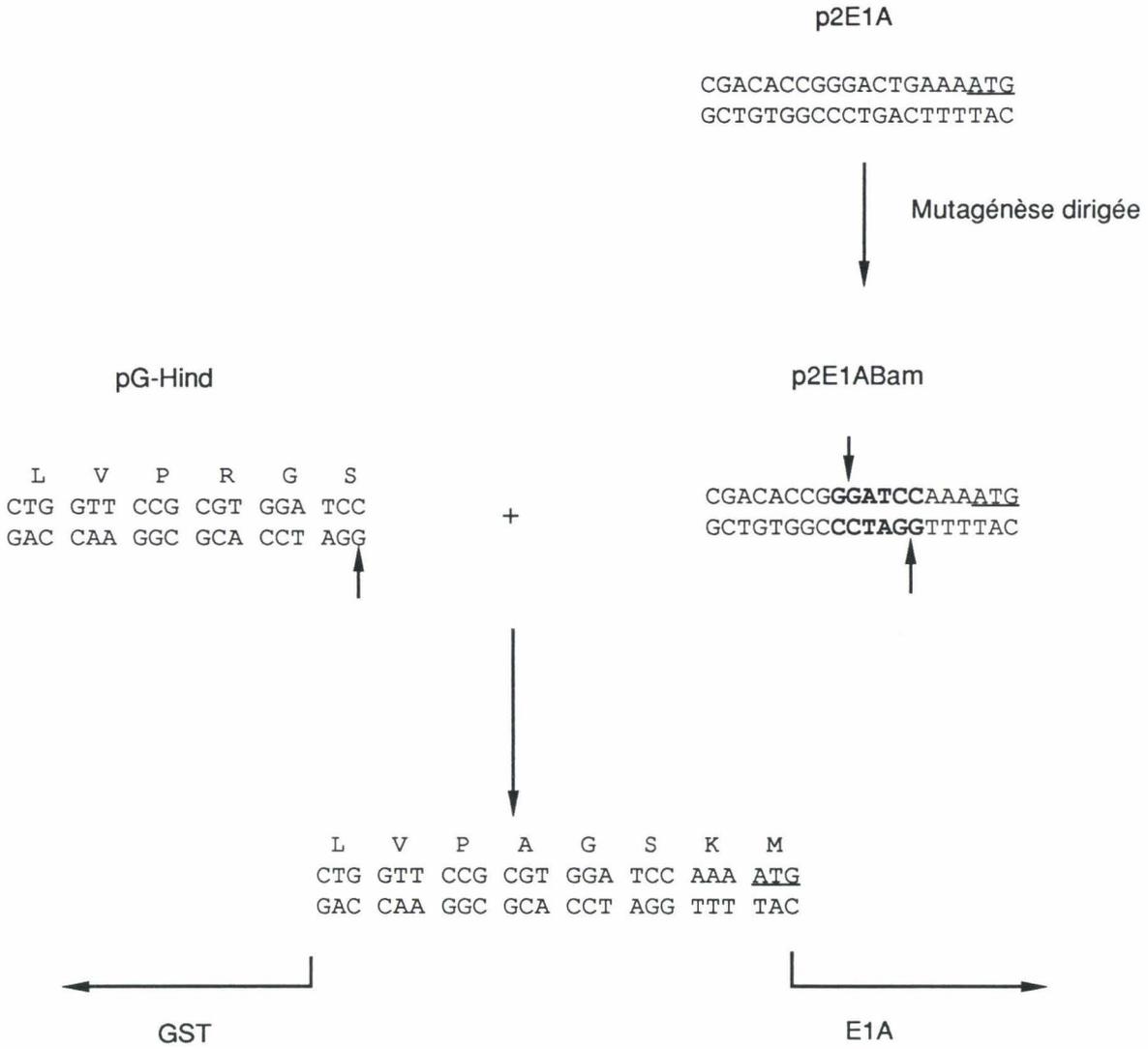


Figure R14 : Schéma de la fusion GST/E1A d'Ad2.

Le plasmide pG-Hind est un dérivé du pGEX-2T créé par insertion d'un adaptateur *Hind* III au nt 1115. Le codon d'initiation de la protéine E1A est souligné. La région clonée contient l'ADNc 13S d'Ad2 dans sa totalité.

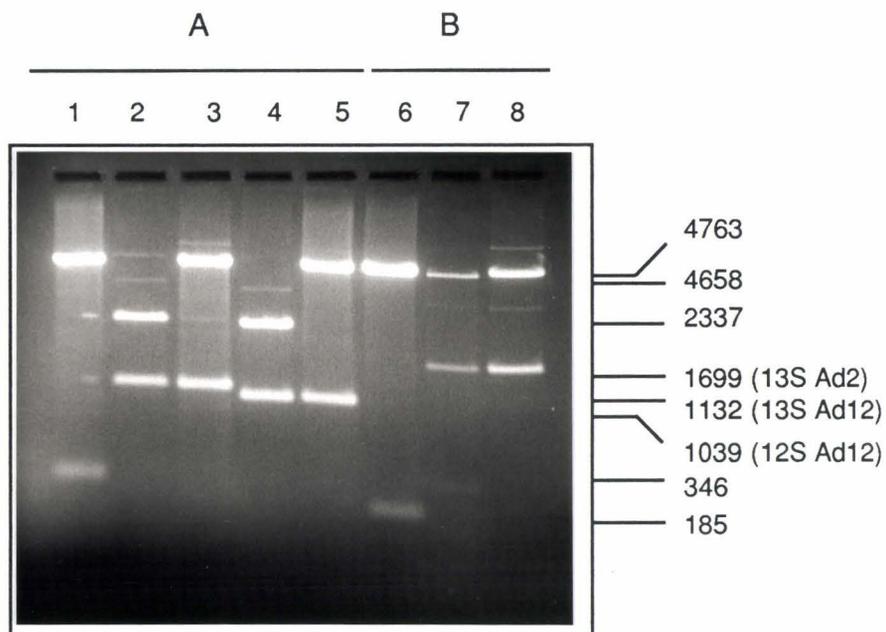


Figure R15 : Analyse des plasmides pGEXAd2, pGEXAd12(12S) et pGEXAd12(13S) par digestions enzymatiques.

A : Analyse des pGEXAd12(12S) et (13S) par la double digestion *Bam* HI-*Aat* II

- 1- pGEX-2T
- 2- p12E1A(13S)
- 3- pGEXAd12(13S)
- 4- p12E1A(12S)
- 5- pGEXAd12(12S)

B : Analyse du pGEXAd2 par la double digestion *Bam* HI-*Hind* III

- 6- pG-Hind
- 7- p2E1ABam
- 8- pGEXAd2

La taille des fragments en nt est indiquée.

Les différents vecteurs d'expression ont été introduits dans une souche JM109 d'*E. coli* et les purifications sont réalisées sur des volumes de 200 ml de culture. Lorsque la culture atteint une $DO_{580}=0,3$ à $0,5$, $200 \mu\text{l}$ d'IPTG $0,1 \text{ M}$ sont ajoutés, l'induction est poursuivie pendant 3 h. L'induction de la synthèse de protéines de fusion est contrôlée par lyse des bactéries, dépôts d'aliquotes sur gel de polyacrylamide-SDS et coloration au bleu de Coomassie (fig. R16). Il est intéressant de noter que les produits sont solubles et sont donc retrouvés dans les surnageants après centrifugation des lysats bactériens. Cette solubilité ainsi que la présence du fragment GST du côté Nt de chaque protéine nous permettent de purifier assez facilement les produits par une technique de chromatographie d'affinité. Les colonnes utilisées sont constituées de billes de sépharose sur lesquelles sont fixées de façon covalente des molécules de glutathion ($\gamma\text{Glu-Cys-Gly}$).

A partir de 200 ml de culture, nous avons pu obtenir jusqu'à 50 mg de protéine purifiée. Cependant les rendements sont meilleurs avec le pGEX-2T qu'avec les vecteurs exprimant les protéines fusionnées.

Des courbes de croissance des bactéries en présence et en absence d'IPTG ont été tracées afin de s'assurer que les protéines induites ne sont pas toxiques pour les bactéries (fig. R17).

IV-3- Analyse par immunotransfert.

IV-3-a- Préparation d'un sérum anti-Ad12.

Les protéines GSTAd12(12S) et GSTAd12(13S) purifiées sur colonnes ont été injectées à des lapins à raison d'un mg par semaine. Le sérum prélevé au bout de trois semaines a été analysé par immunodiffusion. Après six semaines, les deux sérums ($\alpha 13\text{S}$ et $\alpha 12\text{S}$) sont assez puissants (fig. R18). Les immunodiffusions nous ont révélé des réactions croisées avec les protéines GSTAd12(12S) et GSTAd12(13S), ainsi qu'avec la protéine GST. Par contre la réaction avec GSTAd2 est très faible montrant par là une spécificité sérotypique de chacun des sérums.

Chaque sérum préparé est polyclonal, il reconnaît des épitopes séquentiels mais aussi conformationnels. L'absence de réaction croisée avec GSTAd2 suggère que même si les protéines présentent des homologies de séquence (47,7% sur l'ensemble), elles doivent avoir des structures dans l'espace très différentes.

L'analyse par ordinateur des séquences protéiques a permis par la méthode de HOPP et WOOD (1981) de prédire 3 sites potentiels antigéniques majeurs

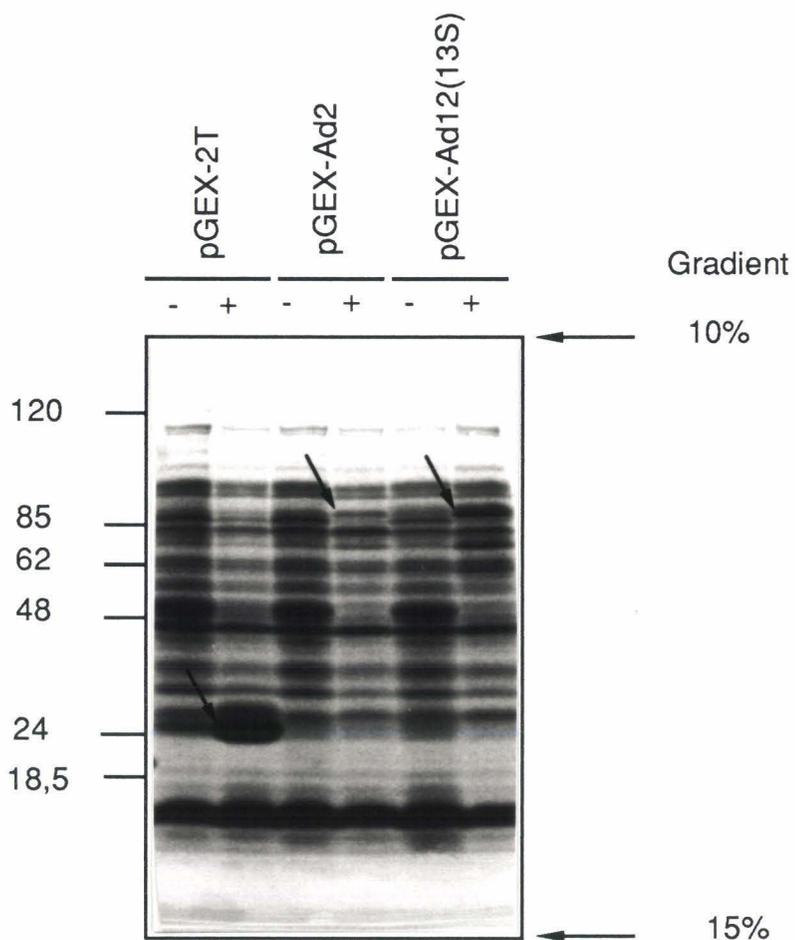
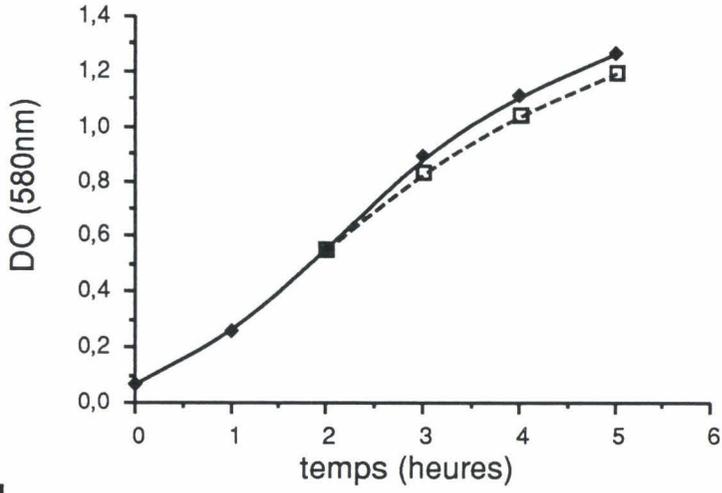


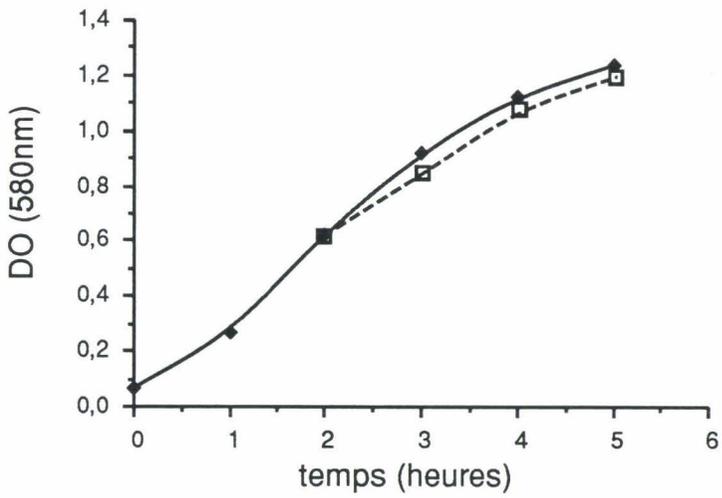
Figure R16 : Analyse en gel de polyacrylamide des protéines de fusion produites chez *E. coli*.

Le gel de polyacrylamide-SDS est coloré au bleu de Coomassie. 50 μ l de lysat de bactéries non induites (-) et induites (+) par l'IPTG ont été déposés.
Les poids moléculaires témoins sont donnés en kDa.
Les protéines recombinantes sont indiquées par les flèches.

GST



GSTAd2



GSTAd12

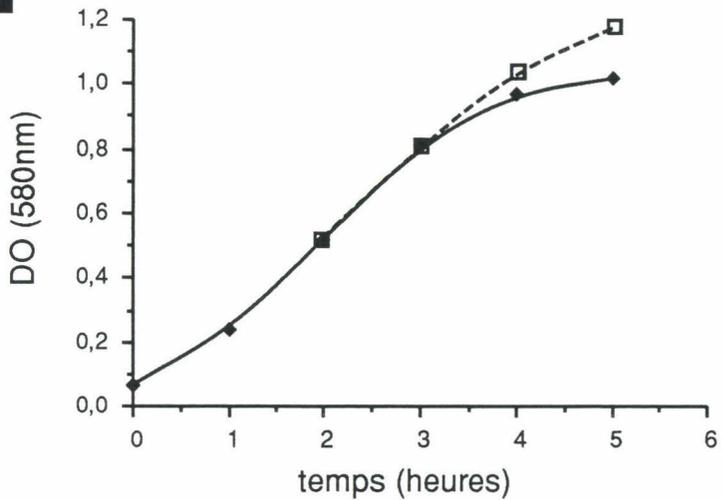


Figure R17 : Courbes de croissance d'*E. coli*

Les bactéries ont été cultivées en présence (♦) ou en absence (□) d'IPTG 0,1 mM

pour chaque sérotype (fig. R19). Le plus conservé des 3 est localisé dans le CR2 pour l'Ad2:

Ad2 133Asp-Asp-Glu-Asp-Glu-Glu138

Ad12 141Asp-Arg-Glu-Arg-Glu-Glu146

Les autres épitopes potentiels ne présentent pas de réelle homologie de séquence ni probablement de structure tertiaire puisqu'on retrouve fréquemment des résidus Pro dans l'Ad2, résidus absents dans l'Ad12. Toutefois, les deux autres épitopes d'Ad2 font partie de la région décrite comme immunodominante (TSUKAMOTO *et al.*, 1986b).

Le sérum α 13S et le sérum α 12S seront par la suite utilisés pour suivre la purification des protéines d'Ad12. Par contre, pour l'Ad2, nous utiliserons un sérum monoclonal commercialisé.

IV-3-b- Détection des protéines.

Après transfert du gel de polyacrylamide-SDS sur une membrane de nitrocellulose, les protéines sont révélées spécifiquement par les différents sérums (fig. R20) dilués au 1/500. Ce transfert confirme que les protéines d'Ad2 et d'Ad12 ont vraisemblablement des conformations très différentes. En effet, la protéine codée par l'ARNm 13S d'Ad12 ne contient que 266 aa contre 289 pour la protéine d'Ad2. Or, GSTAd2 a en gel une masse moléculaire apparente plus faible que l'Ad12. Cette migration ne peut s'expliquer que par la structure tertiaire des molécules déposées; les structures les plus compactes pénétrant plus facilement dans le gel.

D'autre part, les trois protéines fusionnées ont une migration moins importante que celle attendue après calcul des masses moléculaires en fonction de la séquence. Les poids moléculaires calculés sont :

GST	= 27,5 kDa
GSTAd2	= 27,5 + 32 = 59,5 kDa
GSTAd12(13S)	= 27,5 + 29,5 = 57 kDa
GSTAd12(12S)	= 27,5 + 26 = 53,5 kDa

Les masses moléculaires apparentes sont plus élevées (autour de 80 kDa) mais ce comportement électrophorétique particulier de E1A a déjà été décrit (FERGUSON *et al.*, 1984; HANDA *et al.*, 1987).

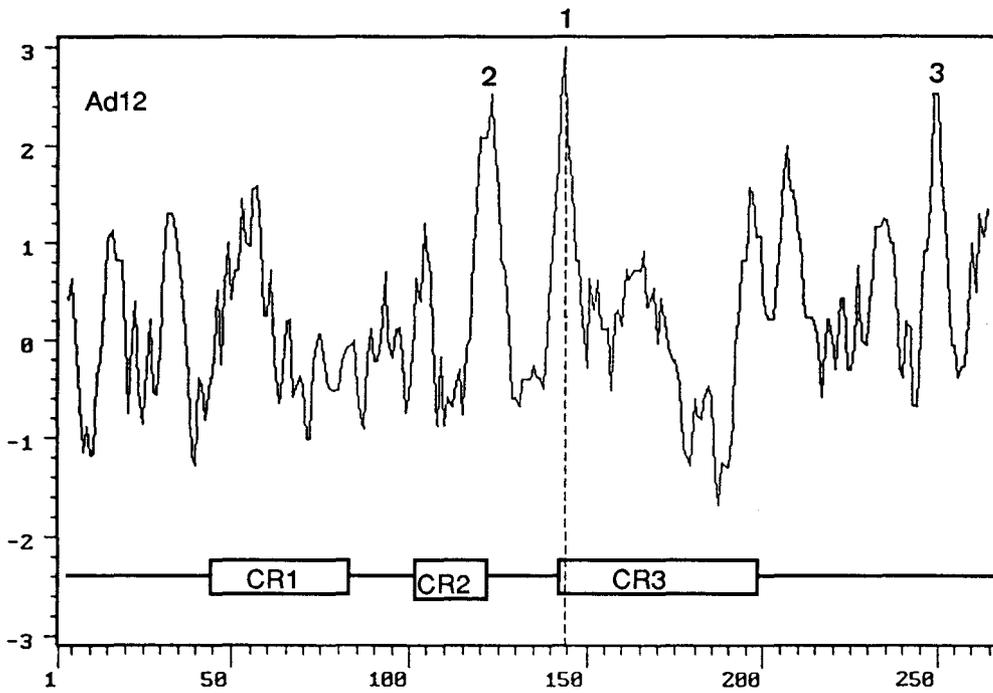
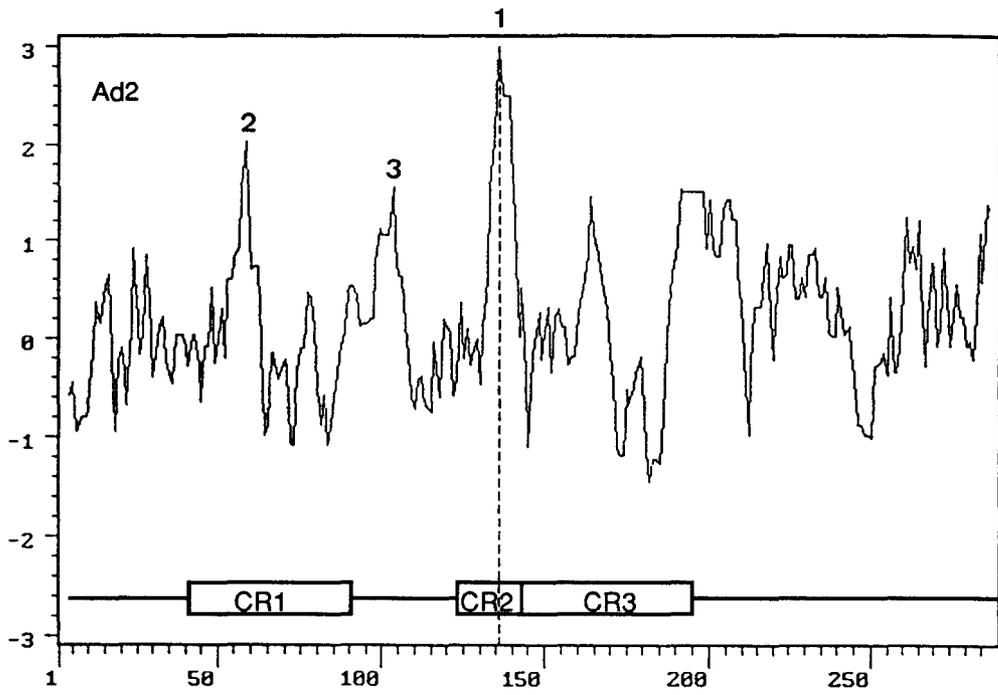


Figure R19 : Prédications de déterminants antigéniques sur les protéines E1A d'Ad2 et d'Ad12.

Les 3 épitopes potentiels de chaque sérotype sont indiqués dans l'ordre décroissant d'hydrophilie (HOPP and WOODS, 1981).

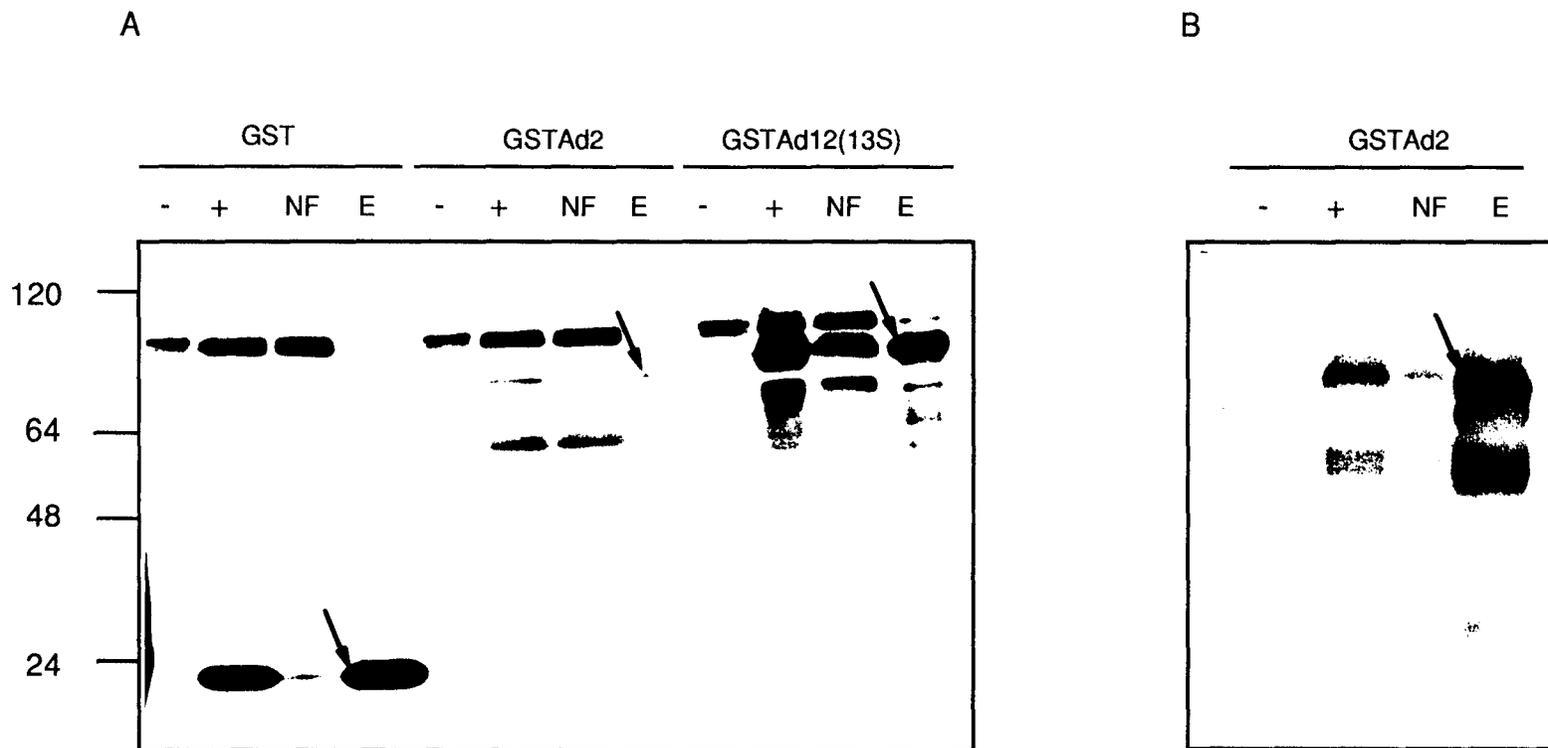


Figure R20 : Détection des protéines de fusion par les deux sérums.

A : α Ad12(13S); B : α Ad2.

Les différentes étapes de purification des protéines sont représentées : lysats de bactéries cultivées en absence (-) ou en présence d'IPTG (+); NF : fraction non fixée sur la colonne; E : éluat de colonne. Les bandes correspondant aux protéines purifiées sont indiquées par les flèches.

De même que notre sérum α 13S d'Ad12 réagit très faiblement avec l'Ad2 (fig. R20A), le sérum dirigé contre l'Ad2 ne révèle pas les protéines d'Ad12.

La quantité de protéine GSTAd2 déposée a été vérifiée par l'anticorps monoclonal M73 (fig. R20B). Par ailleurs, nous constatons que les protéines ainsi préparées sont partiellement dégradées, malgré la présence d'inhibiteurs de protéases ajoutés au moment de la lyse des bactéries.

V- INTERACTIONS E1A/PROTEINES CELLULAIRES.

Après avoir mis en évidence les domaines protéiques de E1A impliqués dans le pouvoir transformant et l'oncogénicité des Ad humains, nous nous sommes intéressés au mécanisme moléculaire mis en jeu.

Les différences observées au niveau du taux de transformation et de l'oncogénicité des deux sérotypes 2 et 12 peuvent être la conséquence de formation et/ou la dissociation de complexes multiprotéiques différents. Deux hypothèses peuvent être émises :

1) les protéines E1A peuvent lier différemment des protéines cellulaires impliquées dans le contrôle de la croissance.

2) les lignées transformées par l'Ad2 et l'Ad12 n'expriment pas les mêmes protéines. Au cours de la transformation, E1A d'un sérotype peut induire ou inhiber des gènes que l'autre sérotype n'affecte pas.

C'est pourquoi nous avons envisagé d'analyser les complexes protéiques dans des lignées transformées par l'ADNc 13S d'Ad2 (lignée BRK 249) ou par l'ADNc 13S d'Ad12 (lignée BRK 1201).

Parallèlement, nous avons étudié la conformation des protéines des deux sérotypes; la différence des propriétés de transformation et d'oncogénicité pouvant résulter d'une structure spatiale particulière favorisant ou au contraire empêchant l'association à certaines protéines cellulaires.

V-1- Immunoprécipitations.

Les lignées BRK 249 et BRK 1201 ont été cultivées en présence de ^{35}S -Met et de ^{35}S -Cys, puis lysées après 4 heures de marquage. 100 000 cpm de lysat ont été mis en contact du sérum monoclonal M73, du sérum polyclonal α 13S, ou d'un sérum monoclonal anti-RB (C36, Oncogene/Sciences). Les protéines

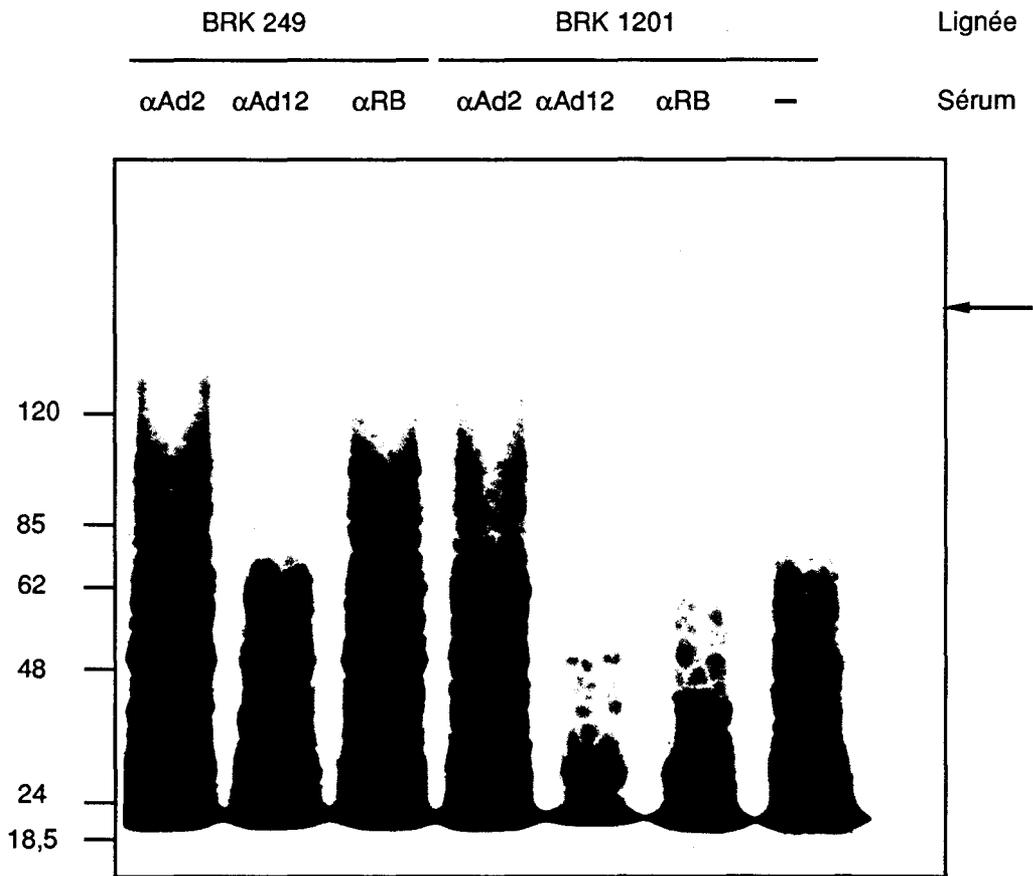


Figure R21 : Immunoprécipitations dans les lignées BRK 249 et BRK 1201.

Les poids moléculaires témoins sont donnés en kDa. La flèche montre une protéine exprimée dans les cellules BRK 249.

immunoprécipitées ont été séparées sur un gel de polyacrylamide-SDS (10-15%) et le gel séché a été autoradiographié (fig. R21).

Nous ne pouvons pas considérer que les réactions reflètent la présence *in vivo* de complexes spécifiques puisque dans la lignée BRK 249, des protéines précipitent alors que le sérum α 13S ne réagit pas avec E1A d'Ad2. D'autre part, de nombreuses protéines sont observées même en absence de sérum (dernière piste). En fait, elles sont captées par la protéine A-sépharose ajoutée pour permettre la précipitation des complexes antigènes/anticorps.

Cependant il est à noter qu'une protéine de haut poids moléculaire (>200 kDa) semble précipitée dans la lignée BRK 249; elle est absente dans la lignée transformée par l'Ad12, à moins qu'elle ne soit pas liée à E1A.

Cette protéine a été recherchée dans d'autres lignées cellulaires. Elle est absente dans une lignée de cellules de rein de rat non transformée (NRK-49F) mais elle est exprimée dans des cellules transformées par la région E1 d'Ad5 (HEK-293).

L'immunoprécipitation ne nous a pas paru être la meilleure technique pour comparer les complexes formés dans les cellules transformées par l'Ad2 ou l'Ad12. Une bonne comparaison aurait peut-être été possible si un seul et même sérum précipitait à la fois E1A d'Ad2 et E1A d'Ad12. De plus les quantités de protéines virales E1A exprimées dans les cellules transformées sont très faibles et limitent la méthode.

V-2- Chromatographie d'affinité.

Les protéines E1A des deux sérotypes ont été exprimées chez *E. coli* sous forme de produits de fusion. Le fragment GST situé du côté N₁ permet de les immobiliser sur des colonnes contenant 1 ml de glutathion-sépharose 4B. Des extraits cellulaires marqués au ³⁵S (20 x 10⁶ cpm) sont appliqués sur ces colonnes et les complexes GST-E1A/protéines cellulaires sont ensuite élués par une solution de glutathion 50 mM. Les éluats sont concentrés puis déposés sur un gel de polyacrylamide-SDS (fig. R22).

En comparant les lignées ou les protéines immobilisées, aucune différence ne peut être observée. Le gel glutathion-sépharose 4B en lui-même retient un nombre assez important de protéines cellulaires.

V-3- Interactions *in vitro*.

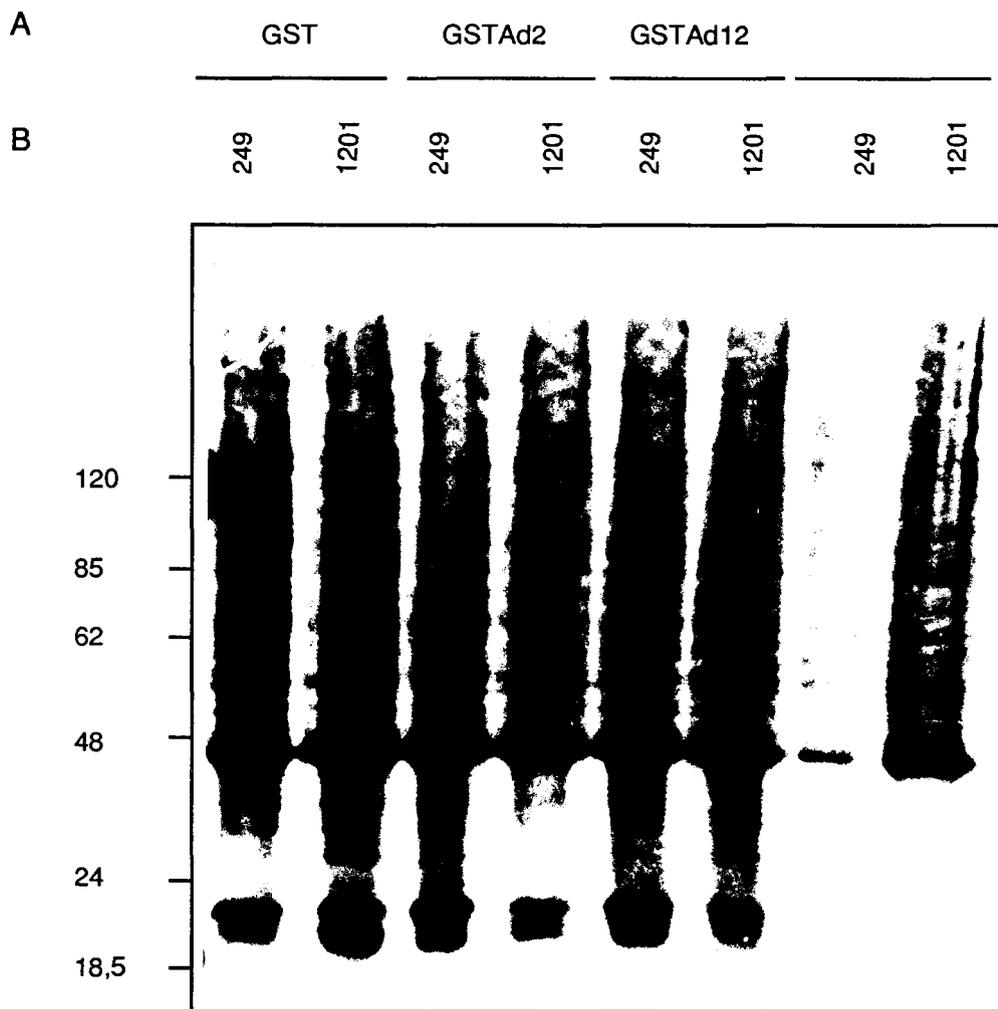


Figure R22 : Protéines cellulaires retenues par les protéines recombinantes immobilisées sur colonnes.

Des protéines recombinantes ont été immobilisées sur des colonnes de glutathion-sépharose 4B (A). Des extraits de cellules marquées (B) ont été appliqués.

Nous avons alors décidé de travailler sur des quantités plus faibles, sans monter le gel dans une colonne, selon un protocole qui a déjà été utilisé pour d'autres produits de fusion GST-X (LUM *et al.*, 1992). Les protéines GST-E1A (50 µg) sont mises au contact de 50 µl de glutathion-sépharose 4B et de 50 µl d'extraits cellulaires marqués. Les complexes formés sont alors séparés par centrifugation et déposés sur un gel de polyacrylamide dénaturant.

Le gel présenté sur la figure R23 nous montre que des protéines cellulaires interagissent avec le support, même en absence de protéine GST-E1A.

Encore une fois, dans tous les extraits de cellules BRK 249, une protéine de haut poids moléculaire est retrouvée. Cette protéine n'apparaît pas dans les extraits de cellules transformées par l'Ad12. Elle n'est donc pas exprimée dans ces cellules.

Ces deux dernières techniques n'ont pas pu être optimisées par modification de la force ionique des tampons puisqu'il fallait rester dans des conditions permettant l'interaction glutathion/GST.

V-4- Far-western blotting.

Afin d'augmenter la spécificité des réactions, nous avons choisi d'immobiliser les protéines cellulaires. Pour cela, les protéines des différentes lignées ont été séparées par électrophorèse puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Cette membrane a alors été mise au contact des protéines recombinantes radio-marquées (fig. R24 et R25).

Dans les conditions expérimentales utilisées, le fragment GST seul ne se fixe sur aucune protéine cellulaire. Par contre les protéines GSTAd2 et GSTAd12(13S) se lient à des protéines dont les masses moléculaires apparentes sont toutes inférieures à 50 kDa. L'efficacité du transfert de protéines de toutes tailles a été vérifiée par coloration réversible de la membrane au Rouge Ponceau. Par contre, il n'est pas impossible que seules les protéines les plus légères soient correctement dénaturées et renaturées par les bains de chlorure de guanidium. Or, il est vraisemblable que l'interaction avec E1A nécessite une conformation proche de celle qui existe *in vivo*, donc une renaturation correcte des protéines cellulaires.

V-5- Mise en évidence des interactions par *Overlay*.

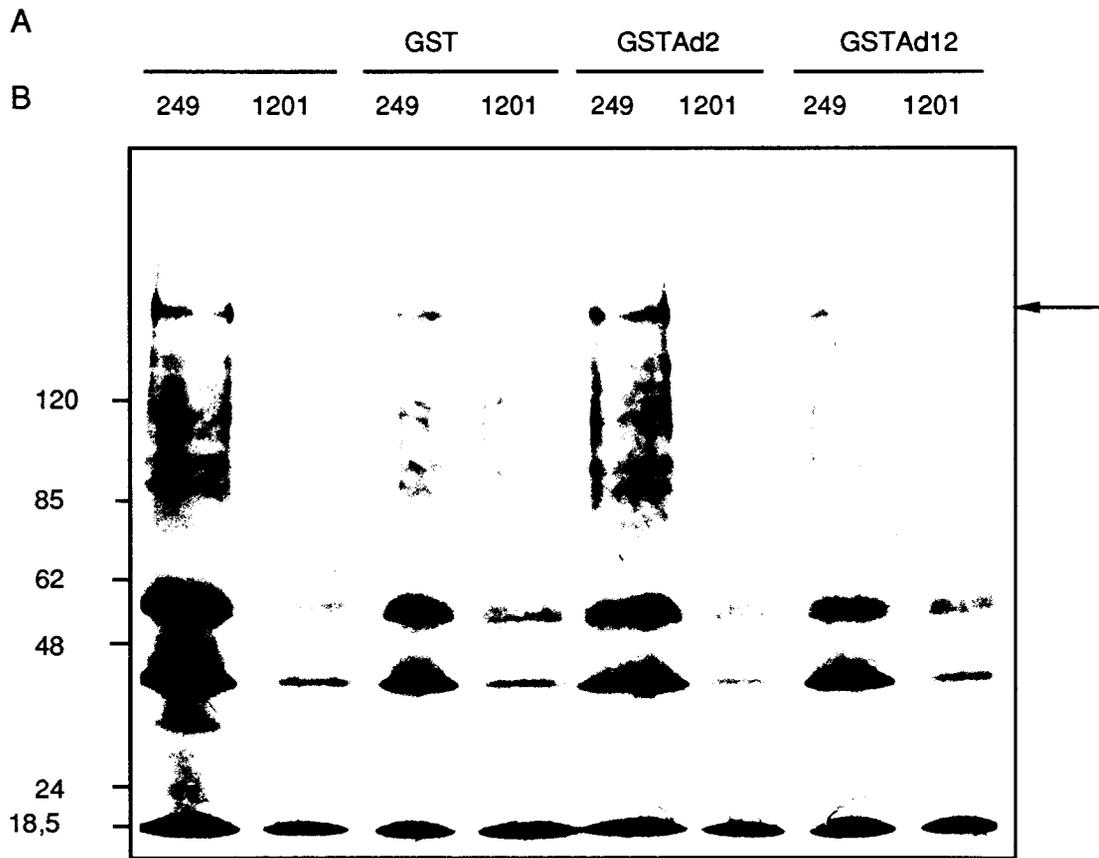


Figure R23 : Protéines cellulaires s'associant aux protéines recombinantes.

Les protéines recombinantes sont retenues sur des billes de glutathion sépharose-4B (ligne A) et des extraits cellulaires marqués des lignées BRK 249 ou BRK 1201 sont ajoutés (ligne B). La flèche montre une protéine spécifique des cellules BRK 249.

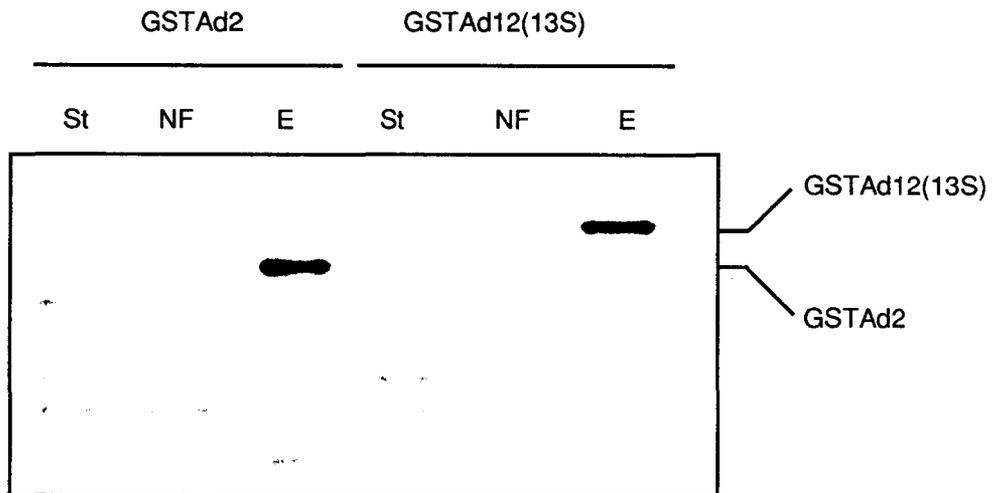


Figure R24 : Purification de protéines de fusion marquées.

Le gel de polyacrylamide est séché puis autoradiographié.

St = surnageant de lyse des bactéries cultivées dans du LB contenant de l'IPTG 0,1 mM.

NF = fraction non fixée sur la colonne de glutathion-sépharose 4B.

E = fraction élue des colonnes par du glutathion 50 mM.

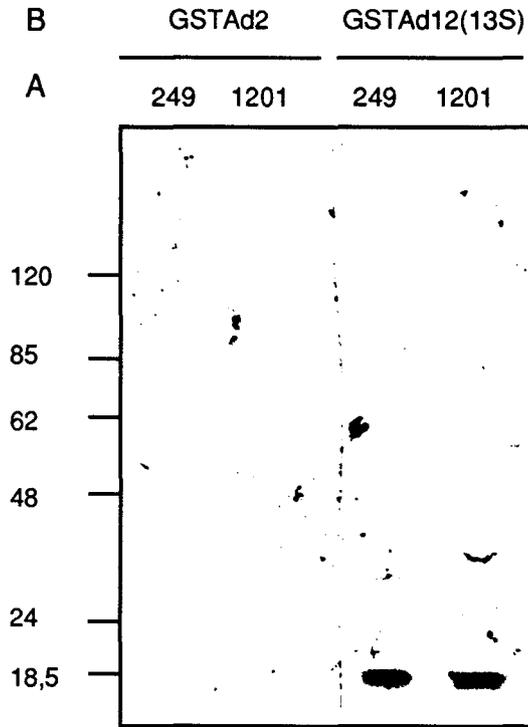


Figure R25 : Associations E1A/protéines cellulaires après transfert sur membrane de nitrocellulose.

A = lignée dont les protéines ont été séparées sur gel de polyacrylamide-SDS.

B = protéines de fusion appliquées sur la membrane de nitrocellulose.

Seules des protéines de masse moléculaire apparente < 50 kDa sont visibles.

Les protéines cellulaires des lignées transformées par E1A d'Ad2 ou d'Ad12 ont été séparées sur gel. Elles ont ensuite été fixées directement dans le gel puis renaturées par élimination du SDS. Le gel a alors été mis au contact des protéines recombinantes marquées (fig. R26).

Il semble que la renaturation des protéines cellulaires soit meilleure qu'après transfert sur une membrane de nitrocellulose et par cette technique, nous pouvons mettre en évidence des protéines qui interagissent de façon spécifique avec GSTAd2 et GSTAd12(13S). En effet, le fragment GST seul ne se fixe sur aucune protéine du gel. Les profils obtenus sont identiques quels que soient le sérotype et la lignée cellulaire transformée. La protéine de haut poids moléculaire précédemment mise en évidence dans la lignée BRK 249 n'est pas reconnue par E1A.

VI- ETUDE DE LA CONFORMATION DES PROTEINES GSTAd2 ET GSTAd12(13S).

La structure des protéines GSTAd2 et GSTAd12(13S) a été analysée par dichroïsme circulaire. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux changements potentiels de structure en présence et en absence de zinc. Le domaine CR3 d'Ad2 contient un doigt de zinc fonctionnel pouvant fixer un atome d'ion métallique (WEBSTER *et al.*, 1991). Les quatre résidus Cys édifiant cette structure sont parfaitement conservés dans l'Ad12 mais aucune fixation de zinc n'a été démontrée pour ce sérotype. Les deux doigts ne sont pas nécessairement dans le même environnement, de même, leur accessibilité n'est peut-être pas identique.

Le spectre dichroïque de GSTAd2 (fig. R27) nous montre que la protéine est au moins partiellement structurée. Lorsque 2 ou 4 équivalents de Zn^{++} sont ajoutés, le spectre change, la protéine a tendance à se désordonner (il y a une variation dans la proportion d'hélices α , de coudes β et de pelotes statistiques).

Par contre, pour la protéine GSTAd12, les spectres en absence ou en présence de zinc (4 équivalents) sont superposés. Deux phénomènes peuvent expliquer ce résultat :

- 1) il n'y a pas de complexation
- 2) la complexation n'engendre pas de changements de structure secondaire.

Par ailleurs, l'allure du spectre semble indiquer une structure globale désordonnée. GSTAd2 plus structurée que GSTAd12 explique que cette dernière migre moins loin en gel de polyacrylamide-SDS bien qu'étant plus petite.

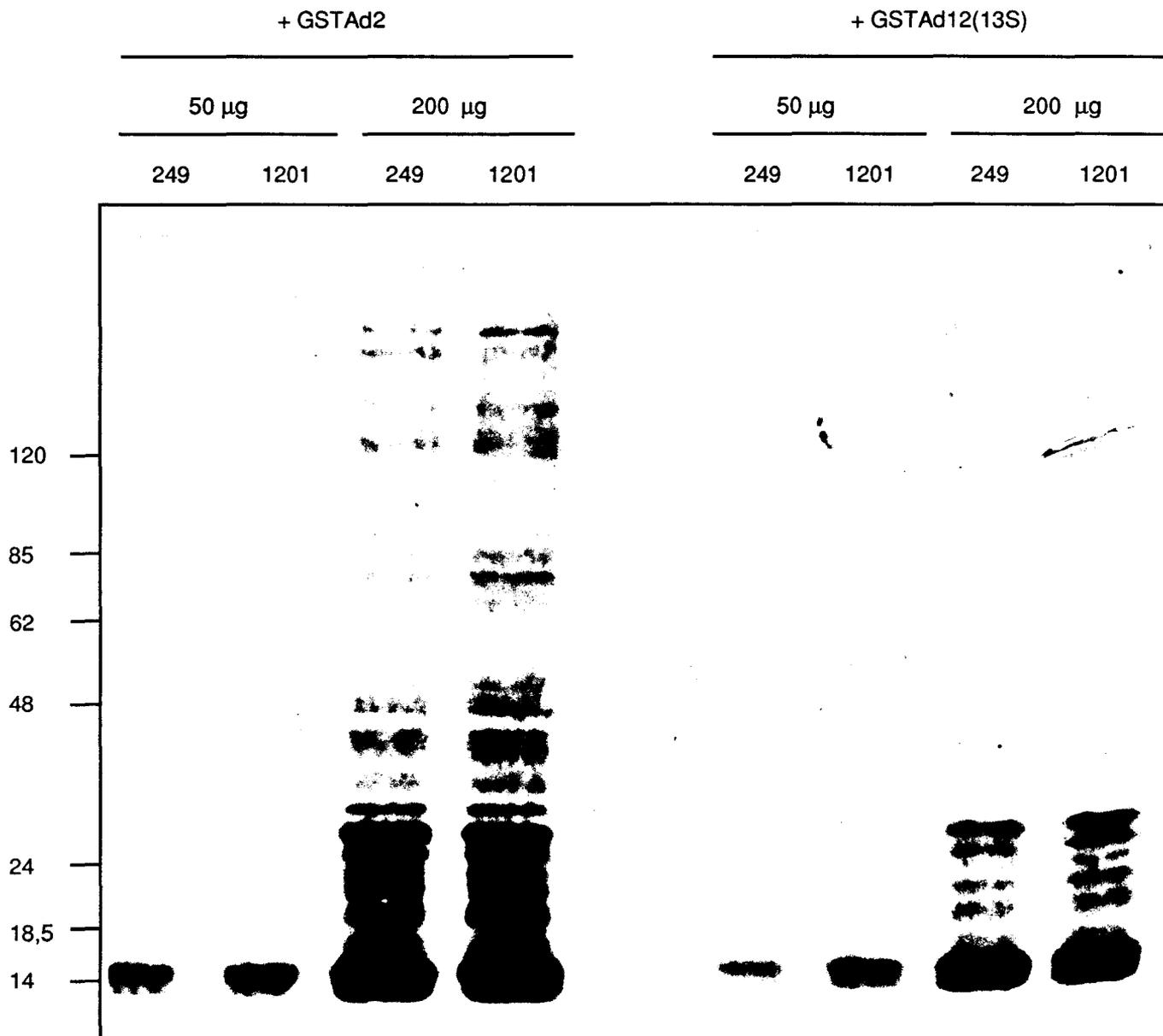
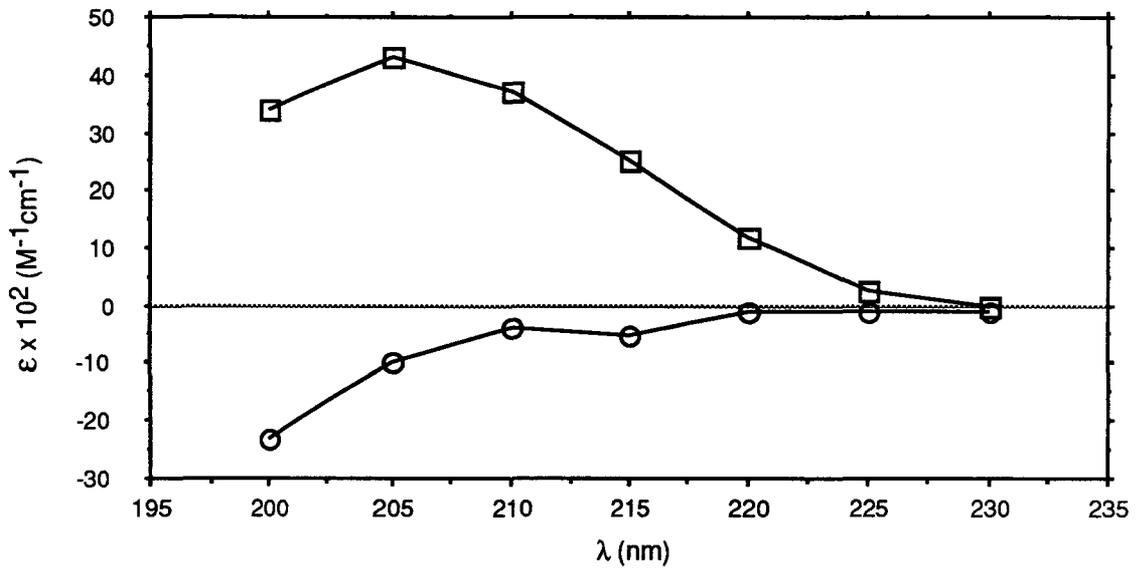


Figure R26 : Mise en évidence des interactions E1A/protéines cellulaires par la technique d'overlay.

Différentes quantités de protéines cellulaires ont été séparées sur gel de polyacrylamide-SDS. Les protéines recombinantes GSTAd2 et GSTAd12 marquées ont été mise en contact avec les gels.

GSTAd2



GSTAd12

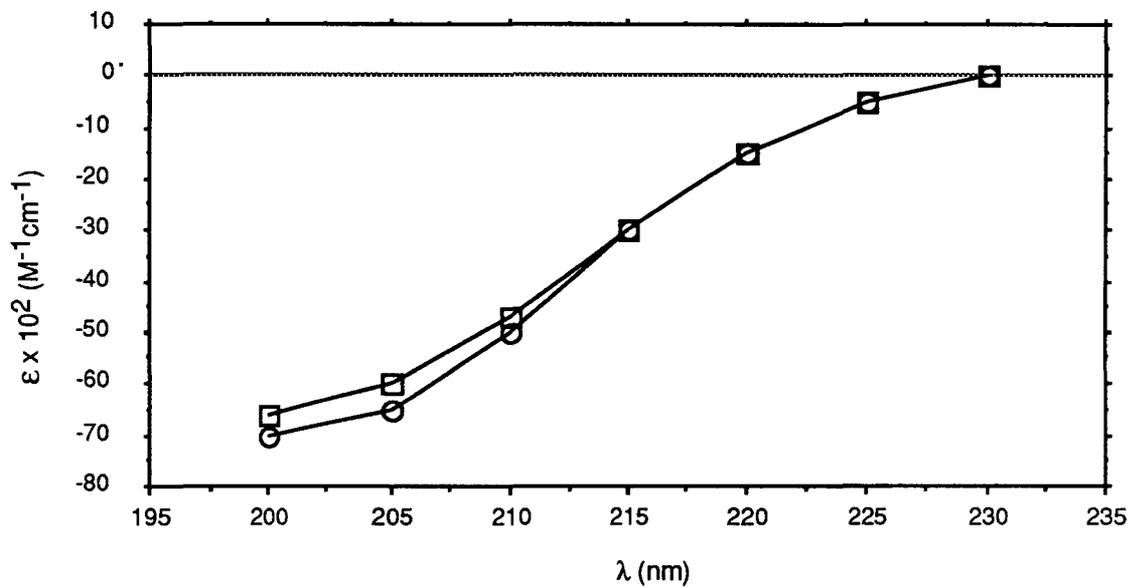


Figure R27 : Spectres dichroïques des protéines GSTAd2 et GSTAd12

Les mesures ont été prises en présence (□) et en absence de zinc (○).

DISCUSSION

I- L'EFFICACITE DE TRANSFORMATION NE DEPEND PAS DU TAUX D'EXPRESSION DE E1A

La région E1A d'Ad2 transforme les cellules BRK avec une forte efficacité par rapport à celle d'Ad12. Or ces régions sont régulées différemment selon les sérotypes. Par exemple, la région E1A de chaque sérotype est régulée d'une manière différente par ses propres produits. Ainsi le produit de l'ARNm 13S d'Ad12 n'active pas la transcription de E1A alors que pour l'Ad2, le produit de l'ARNm 13S stimule sa propre transcription (LEITE *et al.*, 1988; LAMBERTI and WILLIAMS, 1990). L'efficacité de transformation pourrait donc être corrélée au taux d'expression de l'oncogène. Des délétions progressives faisant disparaître les sites de fixation de facteurs de transcription ont été réalisées dans le promoteur de E1A d'Ad2. Ces délétions inhibent le taux de transcription (COUSIN, communication personnelle) mais ont en fait peu d'influence sur le taux de transformation (tableau II) : la délétion des séquences *enhancers* fait chuter ce taux d'un facteur 2 maximum.

Par ailleurs, une séquence de régulation a été localisée en 3' du gène entre les nt 1571 et 1771. La présence de cette séquence en aval de E1A augmente sa transcription ainsi que le taux de transformation d'un facteur 2 à 3 (tableau IV). Dans ce cas, il semble donc que le taux de transformation augmente avec le taux de transcription de E1A. Plusieurs phénomènes peuvent être imbriqués les uns dans les autres et la région E1B joue sans doute un autre rôle que la *cis*-activation du promoteur de E1A dans le processus de transformation. Par exemple l'expression de E1A oriente les cellules vers l'apoptose; cette mort cellulaire est limitée par l'expression de E1B et plus particulièrement de la protéine de 19 kDa qui protège la cellule contre la dégradation de l'ADN induite par E1A (WHITE *et al.*, 1991). La protéine de 19 kDa permet alors aux cellules de s'orienter vers une voie de transformation.

Nos résultats complètent ceux de VAN DEN ELSEN *et al.* (1983) et de JOCHEMSEN *et al.* (1987) qui avaient montré que le taux d'ARNm spécifiques de E1A est plus élevé dans les cellules transformées par E1A et E1B que lorsque E1A seul est exprimé. Il s'agit bien d'une activation en *cis* puisqu'elle existe même en absence des produits de E1B. Dans la région déterminée se trouve un site de liaison du facteur SP1. Celui-ci pourrait activer la transcription de E1A par formation de boucles d'ADN comme cela a été décrit pour le promoteur de SV40 (SU *et al.*, 1991). Cependant une GC *box* placée en aval de E1A n'est pas active. Pour la régulation de E1A, cette séquence apparaît aussi importante que les *enhancers* décrits dans le promoteur (HEN *et al.*, 1983; HEARING and SHENK, 1983; 1985) et sa position dans la région E1A explique

peut être en partie la coopération des deux oncogènes pour l'obtention d'une transformation complète.

Lorsque des régions E1A chimériques sont construites (p1202 et p2012), le taux de transformation observé correspond toujours au sérotype dont la partie codante est exprimée (tableau V). Des résultats identiques sont obtenus lorsque l'oncogène est placé sous le contrôle d'un promoteur hétérologue (LTR-MMTV). L'efficacité de transformation est donc indépendante de taux d'expression comme cela a été décrit pour d'autres oncogènes tels que *c-myc* (ROTHBERG *et al.*, 1985). Dans le cas de l'adénovirus, il s'agit d'une propriété portée par la partie codante des gènes.

Recemment, ADAMI et BABISS (1990) ont montré qu'un adénovirus mutant, exprimant faiblement E1A, transforme des cellules de rongeur avec une fréquence supérieure à celle obtenue avec l'Ad2 sauvage et donc que l'efficacité de transformation est inversement proportionnelle au taux d'expression de E1A. Cette divergence apparente des résultats peut s'expliquer par l'utilisation de techniques différentes (transformation par infection virale *versus* transformation par introduction de plasmides). En effet, lorsqu'un virus entier est utilisé, si E1A est fortement exprimé, il doit activer les autres gènes viraux qui peuvent présenter une certaine cytotoxicité et induire la mort des cellules.

En absence des produits de E1B, l'activation de la transcription est encore observée. Mais le plasmide p2E1AcatGC permet-il une transformation plus efficace que E1A d'Ad2 sauvage? Au vu des résultats obtenus avec les régions E1A hybrides, c'est en fait peu probable.

II- LE CR1 EST RESPONSABLE DE L'EFFICACITE DE TRANSFORMATION.

La région E1A est transcrite en deux ARNm majeurs de 12S et 13S. Chacun des produits d'Ad2 peut transformer morphologiquement des cellules primaires de rein de rat mais avec une efficacité inférieure à celle de l'Ad2 génomique. En coopération avec *Ha-ras*, l'ADNc 12S est plus efficace mais cette prédominance disparaît en coopération avec E1B (tableau VI). Encore une fois, il faut considérer qu'au cours du cycle lytique comme au cours de la transformation cellulaire, les interactions entre E1A et E1B sont assez complexes : il existe en effet une *trans*-activation de E1B par E1A, une *trans*-inhibition (revue par STILLMAN, 1986) et une *trans*-activation de E1A par les produits de E1B (HERRMANN and MATTHEWS, 1989) ainsi qu'une *cis*-activation de E1A par E1B (VAN DEN ELSEN *et al.*, 1983; JOCHEMSEN *et al.*, 1989; nos résultats Tableau III). Lors de la transformation complète obtenue par les deux oncogènes viraux, plusieurs phénomènes viennent probablement se

superposer. Il a été montré que la protéine de 19 kDa codée par la région E1B s'associe aux filaments intermédiaires et les détruit partiellement. Des cellules de rat transformées par E1A et E1B présentent de grosses perturbations dans l'organisation des filaments intermédiaires alors que les filaments des cellules transformées par E1A et Ha-*ras* restent intacts; suggérant qu'un cytosquelette intact inhibe la croissance indépendante de l'ancrage. L'expression de la protéine de 19 kDa lèverait cette inhibition en remaniant les filaments intermédiaires (WHITE and CIPRIANI, 1990).

Dans le cas de l'Ad12, l'efficacité de transformation est toujours plus faible qu'avec l'Ad2 et chacun des deux ADNc transforme avec la même fréquence.

En 1990, LAMBERTI et WILLIAMS ont montré que seul le produit de l'ARNm 13S est nécessaire pour avoir une transformation complète par des particules virales et que le produit de l'ARNm 12S est insuffisant pour transformer. Cette divergence des résultats est sans doute due à l'utilisation de virus alors que nous avons effectué nos transformations avec des plasmides. Lorsque le vecteur utilisé est un virus, de nombreux gènes dont les effets ne sont pas tous connus sont introduits. Plusieurs phénomènes peuvent avoir lieu et l'analyse est plus complexe.

La traduction des 2 ARNm donne 2 protéines ayant les mêmes extrémités N- et C-terminales. La comparaison des séquences entre les sérotypes a permis de dégager trois régions conservées CR1, CR2 et CR3. Les deux premiers domaines sont communs aux 2 protéines alors que le CR3 est spécifique du produit de l'ARNm 13S. La construction de régions hybrides réalisées en échangeant les domaines conservés et la partie N_t des deux sérotypes 2 et 12, nous a permis de montrer que la région N_t incluant le CR1 (aa 1 à 84) détermine l'efficacité de transformation (fig. R10). Dans le même temps, en construisant des virus hybrides Ad5/Ad12 par une technique de recombinaison homologue, JELINEK et GRAHAM (1992) ont montré que deux régions étaient déterminantes pour l'efficacité de transformation : la première est localisée du côté N_t, la seconde comprend la séquence entre le CR1 et le CR2, incluant le CR2 lui-même. La région importante pour la transformation allant jusqu'à l'Ala⁸⁴ d'Ad2 renferme les sites de liaison des protéines cellulaires p107 et p300, ainsi qu'un des deux sites de liaison de p105^{RB} (WHYTE *et al.*, 1988). C'est également le domaine nécessaire à la répression de la transcription des gènes cellulaires JE, *c-myc* et *smf* dans les cellules transformées par l'Ad2 (VAN DAM *et al.*, 1989). Le CR1 peut donc réprimer des gènes impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire et/ou séquestrer des protéines antioncogènes comme la p107. Le CR1 est aussi le domaine responsable du faible pouvoir transformant des adénovirus entériques (COUSIN *et al.*, 1991).

L'utilisation d'un autre modèle (celui des papillomavirus) a permis de montrer que le changement d'un codon dans le site de liaison à p105^{RB} de la protéine

E7 pouvait à lui seul rendre compte d'une différence de pouvoir transformant entre les sérotypes "high risk" (HPV18) et "low risk" (HPV6). HPV6, moins transformant a une affinité pour p105^{RB} beaucoup plus faible (HECK *et al.*, 1992).

Des anticorps polyclonaux anti-p105^{RB} peuvent immunoprécipiter les produits des ARNm 12S et 13S d'Ad12 (GRAND *et al.*, 1989) et la liaison à E1A d'Ad5 a également été démontrée (WHYTE *et al.*, 1988). Les conditions de stringence utilisées dans les deux cas étaient identiques montrant par là que l'affinité de p105^{RB} est sans doute la même pour les deux sérotypes. La différence de pouvoir transformant ne peut donc pas s'expliquer par une modulation de la liaison à cet antioncogène même s'il est impliqué dans le processus de transformation par les Ad. PEEPER *et al.* (1992) ont par ailleurs montré que les deux protéines de E1A d'Ad5 et d'Ad12 produites dans des cellules d'insecte par un vecteur baculovirus peuvent se lier à p105^{RB}, la formation des complexes E1A-RB serait sans doute favorisée par la présence de cofacteurs cellulaires. Ces associations ont été prouvées *in vitro*, mais qu'en est-il *in vivo*?

Dans nos expériences, la présence de la région allant de l'aa 1 à l'aa 30 exprimée dans les hybrides p12K2 et p12K2S12 ne semble pas influencer le taux de transformation. Cette région contient une partie du site de liaison de la protéine p300 (HARLOW *et al.*, 1986). Par conséquent, si la p300 se lie aussi bien à E1A d'Ad2 qu'à E1A d'Ad12, cette interaction ne serait pas impliquée dans l'efficacité de transformation.

III- MORPHOLOGIE DES CELLULES TRANSFORMEES.

Des différences morphologiques ont été observées après transformation de cellules BRK par les régions E1A d'Ad2 ou d'Ad12 mais aussi par les régions hybrides précédemment obtenues. Les cellules transformées par l'Ad2 sont plutôt arrondies alors que les cellules transformées par l'Ad12 ainsi que celles transformées par les hybrides exprimant la région C_t de l'Ad12 sont effilées (fig. R11). Les produits du gène E1A d'Ad12 engendrent moins de changements morphologiques et ces résultats sont en parfait accord avec ceux publiés par SHIROKI *et al.*, (1979). Il est probable que les modifications apportées par l'Ad2 résultent de la sécrétion d'un facteur de croissance épithélial après transformation (QUINLAN *et al.*, 1988). Les cellules transformées par E1A d'Ad12, ainsi que par les recombinants p2C12 et p2S12 ne sécrèteraient pas ce facteur de croissance. Cette hypothèse reste cependant à démontrer. Par ailleurs, des travaux très récents ont montré que les cellules transformées par l'Ad12 produisent un facteur qui inhibe la croissance cellulaire mais le domaine impliqué n'a pas été déterminé (TSUJI *et al.*, 1992).

IV- Le Ct DU CR3 D'Ad12 INHIBE L'EXPRESSION DES Ag DE CLASSE I.

Si tous les sérotypes d'Ad humains peuvent transformer des cellules de rongeur *in vitro*, seules les cellules transformées par les sérotypes des sous-groupes A et B peuvent induire des tumeurs quand elles sont injectées à un animal immunocompétent. Le pouvoir transformant et le potentiel oncogénique sont deux propriétés qui ne sont pas nécessairement liées ni portées par les mêmes domaines.

Il a été proposé que les cellules transformées par l'Ad12 peuvent se développer en tumeurs *in vivo* en échappant à la surveillance immunitaire. En effet, les cellules transformées par les sérotypes oncogéniques expriment des taux faibles d'Ag du CMH de classe I par rapport aux cellules transformées par l'Ad5 (SCHRIER *et al.*, 1983; BERNARDS and VAN DER EB, 1984).

En utilisant des régions E1A hybrides contenant les domaines CR1, CR2, et CR3 de l'Ad2 ou de l'Ad12, nous avons montré que la région située en aval de l'aa Pro¹⁵⁵ est suffisante pour permettre l'inhibition de l'expression des Ag de classe I à la surface des cellules transformées (fig. R12). Nous pouvons donc considérer que le C_t du CR3 est responsable de l'oncogénicité du sérotype 12 puisque la partie codée par le second exon de l'ARNm 13S n'est pas importante pour cette propriété (JOCHEMSEN *et al.*, 1984).

Nous nous attendions à ce que le domaine impliqué se situe dans cette région puisque le produit de l'ARNm 13S inhibe l'expression des Ag de classe I alors que le produit de l'ARNm 12S est sans effet (fig. R4). Cependant par cette étude, nous avons apporté une preuve directe du phénomène et nous avons réduit la séquence à 35 aa.

Le CR3 est défini comme le domaine transactivateur de E1A et l'effet inhibiteur sur la transcription des gènes de classe I n'est pas direct (HUVENT, communication personnelle). Au cours de la transformation, le CR3 de E1A d'Ad12 pourrait activer un ou plusieurs gènes cellulaires dont les produits inhibent l'expression des Ag de classe I. De même, le CR3 d'Ad2 peut activer des gènes dont les produits stimulent l'expression des Ag de classe I.

Récemment il a été montré que des fibroblastes de rongeur transformés par l'Ad5 expriment fortement l'IFN β , cette expression résultant de l'induction des facteurs ISGF3 et NF κ B. Dans les cellules transformées par l'Ad12, cette induction n'existe pas (NIELSCH *et al.*, 1991). Elle est peut-être inhibée par l'expression de gènes transactivés par le CR3 d'Ad12. Une régulation passant par l'IFN γ est aussi possible. En effet, le traitement par l'IFN γ de cellules transformées par l'Ad12 a pour

conséquence d'augmenter le taux d'Ag de classe I à la surface cellulaire (EAGER *et al.*, 1985; ACKRILL and BLAIR, 1990).

Plusieurs modèles de transactivation incluant la liaison à l'ADN de différentes protéines comme ATF-2 (LIU and GREEN, 1990) ou TFIID (LEE *et al.*, 1991; WEBSTER and RICCIARDI, 1991) ont été proposés. GREEN et ses collègues ont décrit plusieurs régions dans le CR3 montrant que le C_t de ce domaine se lie au facteur de transcription ATF-2 (LIU and GREEN, 1990). E1A associé à ces facteurs agit comme co-activateur dans le processus de transactivation (DYNLACHT *et al.*, 1991). Afin de s'assurer que la liaison de ATF-2 au C_t du CR3 est associée à l'absence de transactivation par l'Ad12, des études complémentaires sont nécessaires. Il serait particulièrement intéressant d'obtenir une région E1A hybride exprimant les aa 180 à 188 d'Ad12.

Il a également été démontré que 4 aa acides entre les résidus 140 et 149 fonctionnent comme un domaine transactivateur (LILLIE and GREEN, 1989). Or dans la protéine E1A d'Ad12, ce domaine est séparé en deux par une séquence de 20 aa riche en résidus Ala. Cette différence majeure entre les deux sérotypes pourrait rendre compte de la différence d'oncogénicité entre l'Ad2 et l'Ad12. Elle renferme peut-être un site de liaison à des protéines cellulaires que E1A d'Ad2 ne possède pas; elle peut également inhiber la fixation de protéines sur d'autres sites. Cependant les résultats obtenus avec le plasmide p2C12S2 nous indiquent que la séquence séparant le CR2 et le CR3 d'Ad12 ne peut pas à elle seule inhiber l'expression des Ag de classe I à la surface des cellules transformées (fig. R12). Toutefois, même sans être fondamentale, cette séquence peut apporter une conformation de la protéine qui favoriserait l'inhibition des Ag de classe I.

Les processus de transformation et d'oncogénicité passent par l'association de E1A à différentes protéines cellulaires. Chaque domaine de E1A voire sous-domaine semble jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, touchant les différentes étapes de la prolifération.

V- LES INTERACTIONS E1A/PROTEINES CELLULAIRES SONT LES MEMES DANS LES CELLULES TRANSFORMEES PAR L'Ad2 OU PAR L'Ad12.

Les protéines E1A ne se lient pas directement à des séquences spécifiques d'ADN (FERGUSON *et al.*, 1985) mais elles agissent en s'associant à des protéines cellulaires comme p105^{RB}, la p300 ou la cycline A (YEE and BRANTON, 1985b; HARLOW *et al.*, 1986).

La différence dans le pouvoir transformant et l'oncogénicité des sérotypes 2 et 12 peut résulter de plusieurs phénomènes parmi lesquels :

- une différence d'affinité entre E1A et des protéines cellulaires connues comme la p107.

- la liaison de E1A de l'un des sérotypes à une ou plusieurs protéine(s) non encore identifiée(s).

- l'expression dans les cellules transformées par l'Ad2 ou par l'Ad12 d'une protéine spécifique.

C'est pourquoi nous avons utilisé diverses techniques afin de mettre ces protéines en évidence et d'analyser la formation de complexes multiprotéiques dans les cellules transformées.

Les protéines E1A ont été exprimées chez *E. coli* sous forme de produits fusionnés au fragment GST. Leur migration électrophorétique en gel dénaturant est particulière, donnant une masse moléculaire apparente supérieure à celle calculée à partir de la séquence en aa (fig. R20). Cette migration inattendue est une propriété intrinsèque qui résulte probablement d'une structure spatiale particulière (FERGUSON *et al.*, 1984). Les résultats de dichroïsme circulaire confirment d'ailleurs cette hypothèse.

Nous n'avons observé aucune protéine cellulaire n'interagissant qu'avec l'un des deux sérotypes. Cependant, par deux techniques différentes (immunoprécipitations et interactions *in vitro*), nous avons visualisé une protéine de haut poids moléculaire qui ne semble exprimée que dans les cellules transformées par l'Ad2, que ce soit des cellules humaines (HEK-293) ou de rat (BRK 249).

Après transfert sur une membrane de nitrocellulose, seules des protéines cellulaires de masse moléculaire inférieure à 50 kDa sont reconnues par les produits de fusion. Il s'agit probablement d'un problème de renaturation des protéines cellulaires qui disparaît quand celles-ci sont renaturées directement dans le gel (fig. R26). La technique d'*overlay* apparaît donc plus appropriée d'autant qu'elle est spécifique. En effet, aucune protéine cellulaire ne se lie au fragment GST seul. Notons cependant que les protéines révélées sont reconnues par des produits de fusion, elles peuvent en fait interagir avec E1A mais aussi avec de nouveaux sites créés par la fusion. Afin de s'assurer que les interactions sont spécifiques de la protéine virale, il faudrait pouvoir cliver les protéines recombinantes. En effet, il existe au niveau de la fusion un site potentiel de clivage par la thrombine (Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser). Malheureusement, les essais se sont révélés infructueux, le site protéolytique devant être masqué par la présence de E1A. Ceci expliquerait qu'un sérum anti-GST ne révèle pas les protéines recombinantes après immunotransfert. Le site de fixation du

glutathion reste cependant accessible (en présence de Triton X-100) puisque la purification sur colonnes de glutathion-sépharose 4B est efficace.

La renaturation des protéines cellulaires, indispensable à l'association avec E1A, est sans doute meilleure par la technique d'*overlay*. Toutefois, si E1A de l'un ou l'autre des sérotypes nécessite plusieurs sous-unités d'une même protéine pour se fixer, nous ne pourrions pas observer d'interaction puisque la structure quaternaire est détruite au cours de l'électrophorèse. De plus, cette méthode ne nous permet pas de déterminer les affinités avec les protéines cellulaires, elle est qualitative et ne nous donne pas d'indications sur l'existence de telles associations *in vivo*.

VI- LES PROTEINES GSTAd2 ET GSTAd12 ONT UNE CONFORMATION DIFFERENTE.

L'analyse des produits de fusion par dichroïsme circulaire nous a montré que les protéines des deux sérotypes ont des conformations différentes comme leur migration électrophorétique particulière le laissait penser.

La présence d'un doigt de zinc fonctionnel a été prouvée pour l'Ad2 (WEBSTER *et al.*, 1991) et bien que les 4 résidus Cys impliqués dans cette structure soient parfaitement conservés dans l'Ad12, aucune étude structurale n'avait été conduite sur ce sérotype. Les doigts de zinc sont en général des motifs de reconnaissance de l'ADN. Cependant, ce sont des structures parfaitement définies (un feuillet β suivi d'une hélice α) qui peuvent stabiliser la conformation de la protéine entière (BERG, 1988; revue par STRUHL, 1989). Par conséquent ils peuvent également jouer un rôle dans la formation de complexes multiprotéiques.

La présence de zinc ne semble pas influencer sur la structure secondaire de E1A d'Ad12. Toutefois, la complexation de zinc par GSTAd12(13S) devra être analysée par d'autres techniques telle que la liaison à des atomes marqués ($^{65}\text{ZnCl}$). Il serait également intéressant d'étudier la structure tertiaire des protéines par fluorescence.

CONCLUSION

Tous les sérotypes d'Ad humains peuvent transformer des cellules primaires de rongeur *in vitro* mais seules les cellules transformées par les sérotypes des sous-groupes A et B induisent des tumeurs lorsqu'elles sont injectées à un animal immunocompétent. L'Ad12 est donc un virus oncogène alors que l'Ad2 et l'Ad5 ne le sont pas. Cette différence d'oncogénicité peut en partie s'expliquer par une diminution de l'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I à la surface des cellules transformées par l'Ad12. Ces cellules échappent à la surveillance immunitaire par les CTL et peuvent alors se développer en tumeurs *in vivo*.

Les activités de transformation et d'oncogénicité sont localisées dans la région précoce E1A du virus qui code essentiellement pour deux protéines de 289 et 243 aa pour le sérotype 2. Nous avons montré que l'efficacité de transformation est indépendante du taux d'expression de E1A, il s'agit d'une propriété intrinsèque des protéines, portée par le domaine conservé CR1. Par ailleurs, l'oncogénicité de l'Ad12, spécifique du produit de l'ARNm 13S, a été localisée dans la partie Ct du domaine CR3.

Les séquences en aa des protéines des 2 sérotypes 2 et 12 présentent environ 50% d'homologie mais il apparaît qu'elles ont des structures secondaires et tertiaires différentes. Malgré cela, elles s'associent aux mêmes protéines extraites de cellules transformées par l'Ad2 ou par l'Ad12.

Nous avons choisi l'inhibition de l'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I comme modèle de tumorigénèse mais il ne faut pas perdre de vue qu'il ne s'agit que d'une facette du développement tumoral et qu'il existe sans doute d'autres mécanismes moléculaires qui entrent en jeu. En effet, des cellules transformées par les sérotypes 40 et 41 (non oncogéniques) expriment à leur surface des taux réduits d'antigènes de classe I (COUSIN *et al.*, 1991). La sensibilité à la lyse par les cellules NK ou encore la sensibilité au TNF α doivent également intervenir dans le processus d'élimination par l'organisme de cellules transformées.

L'inhibition de l'expression des molécules impliquées dans la destruction des cellules transformées est un bon modèle qui permet de comprendre comment dans certaines conditions une cellule peut former une tumeur, et permet de mieux appréhender les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de l'oncogénèse.

MATERIELS ET METHODES

I- TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES

I-1- Electrophorèse en gel d'agarose

Le gel d'agarose est utilisé pour la séparation des fragments d'ADN. Sa concentration varie de 0,8% à 2% en fonction de la taille des fragments à séparer. L'ADN est mélangé vol/vol avec une solution de BBØ (bleu de bromophénol 0,25%, saccharose 40%, EDTA 10 mM) avant d'être déposé. La migration se fait dans du tampon TBE (Tris-HCl 135 mM; acide borique 45 mM; EDTA 2,5 mM; pH 8,3), pendant environ 3 h sous une tension de 90 V. Grâce au BrEt contenu dans le gel (80 µg/ml), l'ADN est visualisé sous UV (366 nm).

I-2- DEAE-élution

L'élution des fragments d'ADN d'un gel d'agarose se fait par insertion d'une membrane de DEAE-cellulose (NA45 Schleicher et Schuell) en aval de la bande intéressante, et migration à 90 V pendant 15 mn. L'ADN adsorbé à la membrane est élué par 400 µl d'une solution chargée en sel (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; EDTA 1 mM; NaCl 1,5 mM), 30 mn à 68°C. L'éluat est ensuite précipité par 2,5 volumes d'éthanol à - 70°C, pendant 20 mn. Après centrifugation 15 mn à 12 000 g, rinçage du culot par 1 ml d'éthanol à 70%, et séchage sous vide, l'ADN est repris par 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8).

I-3- Electrophorèses en gel de polyacrylamide

I-3-a- *Pour les acides nucléiques*

La concentration des gels varie de 3,5 à 12% (rapport acrylamide/bisacrylamide: 29/1) selon la taille des fragments à séparer. Le gel est polymérisé par un mélange TEMED 0,1%, persulfate d'ammonium 1%. Les échantillons sont mélangés vol/vol avec une solution de BBØ contenant du xylène cyanol 0,005%. La migration a lieu dans un tampon TBE une nuit sous une tension de 35 V.

I-3-b- *Pour les protéines*

Les échantillons sont mélangés vol/vol à une solution de dénaturation (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; glycérol 20%; SDS 2%; β -mercaptoéthanol 2%; BB \emptyset 0,05%) et chauffés 3 mn à 100°C. Ils sont déposés sur un gel de tassement à 5% d'acrylamide (rapport acrylamide/bisacrylamide: 50/1,33) dans du Tris-HCl 125mM, pH 6,8 contenant 0,1% de SDS et entrent ensuite dans le gel de résolution dont la concentration varie de 10 à 15% (rapport acrylamide/bisacrylamide: 50/0,235) dans du Tris-HCl 375mM, pH 8,9; SDS 0,1% (LAEMMLI, 1970). Le tampon d'électrophorèse est une solution de Tris 0,025 M pH 8,9; glycolle 0,192 M; SDS 1%. L'électrophorèse est conduite 16 h à 35 V. Le gel peut ensuite être transféré ou fixé et coloré par un bain de 30 mn dans une solution de bleu de Coomassie (bleu R250 0,25%; méthanol 50%; acide acétique 10%). Les protéines sont visibles après décoloration dans un mélange eau/méthanol/acide acétique (45/45/10).

II - CULTURE CELLULAIRE

II-1- Cultures primaires

Les cellules primaires de rein de rat (BRK) sont mises en culture après traitement à la trypsine-PSA (2,5 μ g/ml; KCl 5,4 mM; NaCl 137 mM; NaHCO₃ 4,2 mM; glucose 5,5 mM; rouge de phénol 5mg/l; pH 7,5; pénicilline 75 000 U/ml; streptomycine 50 mg/ml; fungizone 5 μ g/ml) sous agitation. Toutes les 10 mn, les cellules sont centrifugées à 20°C, 5 mn à 1000 g, et reprises dans 20 ml de milieu MEM (Milieu Essentiel Minimum) contenant 20% de sérum de cheval. Elles sont alors mises en culture dans des flacons (Falcon de 75 cm²), incubées à 37°C et le milieu est changé après 24 h (DF10: milieu de Dulbecco contenant 10% de sérum de veau foetal décomplémenté).

II-2- Obtention des lignées

Après transformation, les cellules sont établies en lignées. Les foyers de transformation sont décollés au Versène (EDTA 3 mM; NaCl 137 mM; Na₂HP0₄ 16 mM; KCl 2,7 mM; KH₂P0₄ 1,5mM, pH 7,2) 10 mn et repris dans des boites multi-puits de Falcon (96 puits de 0,6 cm de diamètre). Quand les cellules cultivées dans du milieu DF10 de Dulbecco (Flow) contenant 10% de sérum de veau foetal décomplémenté sont confluentes, elles sont mises dans un puits de diamètre plus important et ainsi de suite jusqu'au flacon de 75 cm².

Les cellules en lignées continues (HeLa, HEK-293, NRK-49F et les lignées transformées par les Ad) sont cultivées dans du milieu DF10. Elles sont divisées deux fois par semaine.

II-3- Transfection

La transfection se fait sur des cellules à 70% de confluence. La technique a été décrite par GRAHAM et VAN DER EB (1973) et consiste en une co-précipitation de phosphate de calcium et d'ADN. Le précipité est préparé en diluant 20 µg d'ADN dans 225 µl d'eau stérile, en ajoutant 25 µl de CaCl₂ 2,5 M puis 250 µl de solution HBSX2 (NaCl 280 mM; Hépès 50 mM; Na₂HP0₄ 1,5 mM; glucose 12 mM; KCl 10 mM; pH 7,1). Après 20 mn à température ambiante, le précipité est mis au contact des cellules. Les boîtes sont placées à 37°C et le milieu est changé au bout de 4 h.

II-4- Marquage des cellules

Le marquage de l'ensemble des protéines cellulaires est réalisé avec un mélange contenant 70% de L-Mét [³⁵S] et 15% de L-Cys [³⁵S] (activité spécifique : 1000 Ci/mmol). Cette solution est encore appelée Tran³⁵S-label (ICN). Les cellules sont cultivées 1 h dans du milieu sans méthionine puis incubées 4 h en présence de Tran³⁵S-label. Après une chasse de 30 mn par du milieu contenant de la méthionine et de la cystéine froides, les cellules sont récoltées.

II-5- Préparation d'extraits cellulaires totaux

Les cellules sont décollées au Versène 10 mn. Reprises dans 20 ml de milieu DF10, elles sont centrifugées 10 mn à 1000 g. Le culot est rincé 2 fois par du PBS (Na₂HP0₄ 16 mM; NaH₂P0₄ 4 mM; NaCl 150 mM; CaCl₂ 7 mM; pH 7,3) et repris dans 400 µl de tampon de lyse (Hépès 50 mM, pH 7; NaCl 250 mM; NP40 0,1%; DTT 0,5 mM; EDTA 5 mM; PMSF 1 mM) avant d'être passé 30 sec aux ultrasons. Après une centrifugation 10 mn à 12 000 g, le surnageant est aliquoté et conservé à -80°C.

II-6- Dosage de l'activité Chloramphénicol Acétyl Transférase.

40 heures après la transfection, les cellules sont décollées au Versène, lavées dans 4 ml d'eau physiologique, et centrifugées 10 mn à 1000 g. Les culots sont repris par 100 µl de Tris-HCl 0,25 M, pH 7,7. Les cellules sont ensuite soumises à des ultra-sons pendant 20 secondes. Les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation 10 mn à 10000 g.

A 30 µl de surnageant sont ajoutés 20 µl d'acétyl coenzyme A 4 mM, 1 µl de ¹⁴C chloramphénicol (1 mCi/mol), 35 µl d'eau et 70 µl de Tris-HCl 0,25M, pH 7,7. L'ensemble est incubé 1 h à 37°C et la réaction est arrêtée par addition de 800 µl d'acétate d'éthyle froid. Après centrifugation 10 mn à 10000 g, la phase organique est prélevée puis séchée. Le culot sec repris par 15 µl d'acétate d'éthyle est déposé sur une couche mince de silice. Une pré-migration dans l'acétone concentre les dépôts, puis une migration de 45 mn dans un solvant chloroforme/méthanol (95/5) permet de séparer les formes acétylées de chloramphénicol de la forme non acétylée. Après autoradiographie 3 jours à -70°C, la plaque est découpée et la radioactivité est comptée dans du liquide scintillant.

II-7- Cellules résistantes à la généticine.

Les cellules transfectées avec des plasmides contenant le gène *neo* sont divisées dans des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre au bout de 24 heures. Lorsqu'elles arrivent à confluence (2-3 jours), le milieu est remplacé par du DF10 contenant 400 µg/ml de généticine (G418). Le milieu est changé 2 fois par semaine et les clones de cellules résistantes sont comptés au bout d'environ 3 semaines.

III- TRANSFORMATION BACTERIENNE

III-1- Souches et milieux de culture

En général la souche bactérienne utilisée pour l'amplification des plasmides est une souche HB101 d '*Escherichia coli* (*hsdS20*(r_b⁻, m_b⁻), *SupE44*, *ara 14*, *gal K2*, *lac Y1*, *pro A2*, *rsp L20*, *xyl-5*, *mtl-1*, *rec A13*, *mcr B*, *mrr*).

Les bactéries sont conservées à -20°C dans un milieu riche 2XTY + MC (pour un litre: tryptone 18 g; extrait sec de levure 10 g; NaCl 86 mM; + extrait sec

de viande 8 g) contenant 30% de glycérol et cultivées dans un milieu LB (peptone 10 g; extrait sec de levure 5 g; NaCl 86 mM; pH 7,5).

Lorsqu'une digestion par une enzyme sensible à la méthylation est nécessaire, la souche utilisée *dam-* est la GM272 (*supE44, dcm-6, dam-6, metB1, hsdS21, lacY1, galK2, mtl-2, tonA2, tsx-1, λ-*).

Les vecteurs d'expression des protéines inductibles par l'IPTG ainsi que les plasmides sélectionnés par la couleur des colonies (blanches ou bleues) sont introduits dans une souche JM109 (* 14-(mcrA), rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hsd R17, (rk-, mk-), Sup E44, rel A1, Δ(lac-proAB), (F'traD36, proAB, laqI9ZΔM15), λ-*). Cette souche est conservée dans du milieu minimum M9 (Na₂HP0₄ 34 mM. KH₂P0₄ 22 mM; NaCl 9 μM; NH₄Cl 20 mM; MgS0₄ 2 mM; glucose 0,2%; CaCl₂ 0,1 mM; vitamine B1 9 μM; pH 7,5).

Les phagemides obtenus par mutagénèse dirigée sont transformés dans une souche *minus repair* BMH 71-18 mut S (*thi, SupE, Δ(lac-proAB), (mutS : : Tn10) (F', proA⁺B⁺, laqI9ZΔM15)*). Cette souche est également conservée sur des boites de M9.

III-2- Vecteurs de clonage

Le plasmide pBR322 ou ses dérivés ont été utilisés pour le clonage des fragments d'adénovirus.

Le plasmide pGEX-2T (Pharmacia)(fig. M1) a été choisi pour la production de protéines fusionnées contenant EIA. Ce vecteur contient la partie codante C-terminale de la glutathion S-transférase du parasite *Schistosoma japonicum* (SMITH *et al.*, 1986) sous le contrôle d'un promoteur *tac* inductible par l'IPTG, ainsi qu'un site multiple de clonage. Les inserts clonés dans cette séquence sont exprimés sous forme de protéine de fusion contenant du côté N-terminal une partie affine pour le glutathion.

Le phagemide pSelect (Promega)(fig. M2) a été utilisé pour la mutagénèse dirigée. Il contient le gène de résistance à la tétracycline et le gène de résistance à l'ampicilline inactivé par mutation ponctuelle dans le site *Pst* I (LEWIS and THOMPSON, 1990). La restauration de l'activité au cours de la réaction de mutagénèse permet une sélection rapide des clones intéressants. Le vecteur contient une origine de réplication plasmidique (*ori*) ainsi qu'une origine de réplication phagique (*ϕl ori*). Cette dernière permet d'obtenir de l'ADN simple brin après surinfection de la souche bactérienne transformée par un phage non lytique *helper* (R408). Cet ADN simple brin est utilisé pour réaliser la mutagénèse dirigée. Le site multiple de clonage est placé dans le fragment de gène codant pour le peptide α de lacZ.

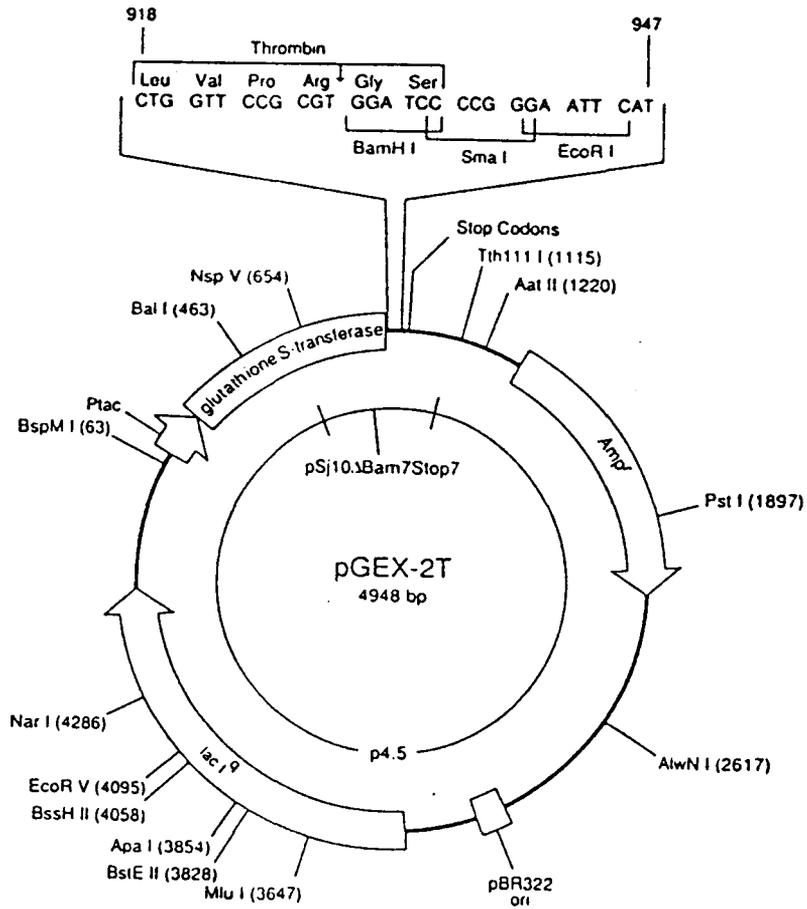


Figure M1 : Plasmide pGEX-2T (Pharmacia).

Ce vecteur permet l'expression de protéines sous forme fusionnée avec le fragment GST.

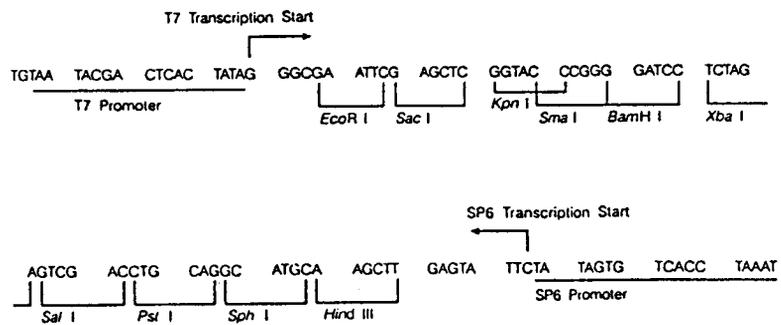
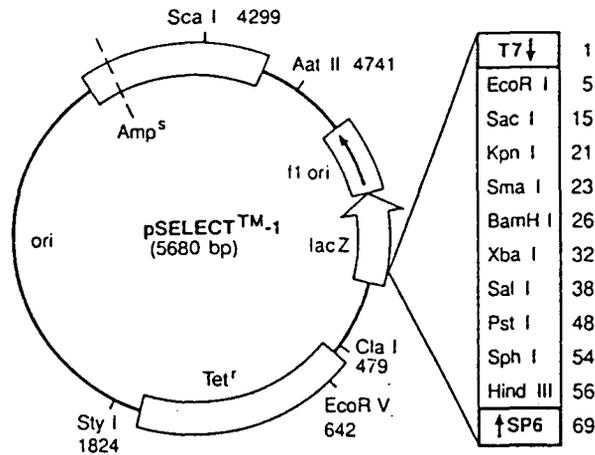


Figure M2 : Phagemide pSelect (Promega).

Ce vecteur est Amp^S et Tét^R. Il est utilisé pour faire de la mutagenèse dirigée. La séquence du site multiple de clonage est présentée en dessous.

III-3- Clonage moléculaire

Les plasmides sont digérés par des endonucléases de restriction à raison d'une unité enzymatique par μg d'ADN. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 1 h, en présence de tampon salin. Après électrophorèse, les fragments intéressants sont élués et circularisés par une unité d'ADN ligase du phage T4, une nuit à 16°C .

III-4- Mutagénèse dirigée

III-4-a- Préparation de l'ADN simple brin

Les colonies de JM109 contenant le phagemide sont cultivées une nuit à 37°C sous agitation, dans 30 ml de milieu LB contenant de la tétracycline ($15 \mu\text{g/ml}$). La culture est diluée dans 200 ml de milieu LB, et agitée jusqu'à obtention d'une $D_{0580} = 0,3$. Le phage *helper* R408 est alors ajouté à raison de 10 pfu par bactérie et l'infection dure 20 h. Les bactéries sont alors éliminées par centrifugation 15 mn à 10 000 g. Le surnageant est clarifié par une deuxième centrifugation, puis le phage est précipité par 50 ml de PEG (PM: 8000) à 20% dans l'acétate d'ammonium 3,75 M, pH 7,5. Après 30 mn dans la glace, le phage est centrifugé 15 mn à 10 000 g. Le culot est repris dans 400 μl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM). Le phage est alors lysé par 400 μl d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Les protéines sont ensuite éliminées par une extraction au phénol. L'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité par 2 volumes d'éthanol en présence de 0,5 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M, une nuit à -20°C . Après rinçage à l'alcool 70% et séchage, le culot est repris par 20 μl d'eau. Un μl est déposé sur un gel d'agarose à 1%.

III-4-b- Réaction de mutagénèse

L'ADN simple brin (0,005 pmol) est mis en présence de l'oligonucléotide qui restaure la résistance à l'ampicilline (0,25 pmol) et de l'oligonucléotide de mutagénèse (1,25 pmol) dans du tampon d'hybridation (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; MgCl_2 10 mM; NaCl 50 mM). Après chauffage 5 mn à 70°C , l'hybridation se fait par refroidissement lent jusqu'à température ambiante. L'ADN polymérase du phage T4 et la ligase du phage T4 sont alors ajoutées dans du tampon de synthèse (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; dNTP 0,5 mM; ATP 1 mM; DTT 2 mM). Une incubation de 90 mn à 37°C permet la

synthèse du double brin et la ligation. L'ADN est ensuite introduit dans la souche BMH 71-18 mut S. Le phagemide des colonies résistantes à l'ampicilline est extrait et réintroduit dans la souche JM109.

III-5- Transformation

La méthode a été décrite par COHEN *et al.* (1973). Un ml de culture bactérienne est dilué dans 30 ml de milieu LB et mis sous agitation à 37°C jusqu'à obtention d'une D₀₅₈₀ comprise entre 0,5 et 0,7. Les bactéries sont centrifugées à 8000 g, 10 mn à 4°C. Le culot est lavé deux fois par 20 ml de CaCl₂ 0,1M froid, resuspendu dans 20 ml de CaCl₂ 0,1 M et laissé 20 mn dans la glace. Les bactéries sont centrifugées une dernière fois et reprises dans 1 ml de CaCl₂ 0,1 M. Des fractions de 100 µl sont mises en contact avec 25 µl d'ADN transformant dans un tube en verre qui est placé dans la glace pendant 20 mn. Cinq chocs thermiques sont ensuite effectués par passages successifs de 0°C à 37°C. Le tube est remis dans la glace pour 20 mn puis 1 ml de milieu 2XTY est ajouté. Les bactéries sont placées sous agitation pendant 45 mn. Des aliquotes de 0,2 et 0,8 ml sont étalées sur des boîtes de LB gélosé contenant l'antibiotique de sélection (ampicilline 50 µg/ml ou tétracycline 15 µg/ml). Les boîtes sont placées dans une étuve à 37°C pendant 16 h.

III-6- Sélection des clones

III-6-a- Sélection des colonies blanches

Les phagemides utilisés pour la mutagenèse dirigée sont introduits dans une souche *E. coli* JM109. Les bactéries sont étalées sur des boîtes de LB gélosé contenant de l'IPTG 0,4 mM et du Bluo-Gal (80 µg/ml). Les bactéries contenant un phagemide avec insert formeront des colonies blanches; les autres formeront des colonies bleues.

III-6-b- Minipréparation

Cette méthode permet d'obtenir environ 15 µg de plasmide. 10 ml de culture bactérienne sont centrifugés à 12 000 g pendant 5 mn. Le culot est repris dans 100 µl de tampon de lyse (Tris-HCl 25 mM, pH 8; EDTA 10 mM; glucose 50 mM). Après une incubation de 5 mn à température ambiante, 200 µl d'une solution NaOH 0,2N, SDS

1% sont ajoutés. Au bout de 5 mn, la réaction est neutralisée par une solution d'acétate (5M) de potassium (3M) pH 4,8 (cette solution est préparée en mélangeant 60 ml d'acétate de potassium 5M, 11,5 ml d'acide acétique glacial et 28,5 ml d'H₂O). Le lysat est ensuite centrifugé 10 mn à 12000 g. Le surnageant est traité vol/vol par un mélange chloroforme/alcool isoamylique/phénol (24/1/25). La phase aqueuse est précipitée par 2 volumes d'éthanol à -20°C. Après centrifugation, le culot est repris dans 50 µl d'eau et traité par 1 µg de RNase A.

III-7- Purification de plasmides

Les bactéries sont cultivées une nuit à 37°C dans 200 ml de milieu LB. La culture est centrifugée 10 mn à 4 500 g, à 4°C. Le culot est resuspendu dans 2,5 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8; saccharose 25%, et placé dans la glace. Un ml de lysozyme (10 mg/ml dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8) est ajouté après 5 mn, puis 1 ml d'EDTA 0,2 M pH 8. Après 5 mn, la lyse est complétée par addition de 4,5 ml d'une solution de Tris-HCl 50 mM pH 8; EDTA 20 mM; Triton X-100 0,1%. Les débris bactériens sont éliminés par centrifugation 30 mn à 35 000 tpm dans un rotor BECKMAN SW41. 9 g de chlorure de césium sont dissous dans 9 ml de surnageant traité par 20 µg de RNase A. 90 µl de bromure d'éthidium (5mg/ml) sont également ajoutés. Les plasmides sont séparés des ARN et des protéines par centrifugation 20 h à 16°C, à 55 000 tpm dans un rotor KONTRON TFT65. La bande de plasmide visualisée grâce au BrEt est ponctionnée. Le BrEt est extrait par de l'isopropanol ajouté vol à vol. Au moins trois extractions successives sont nécessaires. Les plasmides sont ensuite dialysés contre du TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM) et stockés à 4°C.

IV- PREPARATION DE PROTEINES RECOMBINANTES

IV-1- Production de protéines fusionnées

La méthode a été décrite en 1988 par SMITH et JOHNSON.

Les bactéries contenant les vecteurs d'expression sont cultivées dans 200 ml de milieu LB, à 37°C, sous agitation. Lorsque la D₀₅₈₀ atteint 0,3, 200 µl d'IPTG 0,1 M sont ajoutés. 3 h après l'induction de la synthèse, les bactéries sont centrifugées à 4500 g, 10 mn. Elles sont ensuite lysées selon le même protocole que pour la purification des plasmides. Le surnageant de centrifugation est additionné d'inhibiteurs de protéases:

PMSF et TPCK à 100 µg/ml (Sigma). Les protéines fusionnées seront par la suite purifiées sur colonnes d'affinité.

IV-2- Production de protéines marquées

Le protocole est identique mais au moment de l'induction, 1 mCi de Tran³⁵S-label (ICN) est ajoutée.

IV-3- Purification par chromatographie d'affinité

Les colonnes d'affinité (Pharmacia) contiennent 2 ml de sépharose 4B-glutathion. Elles sont lavées 2 fois par 10 ml de PBS (NaCl 150 mM; Na₂HP0₄ 16 mM; NaH₂P0₄ 4 mM; pH 7,3) puis équilibrées par 6 ml de PBS + 1% de Triton X-100. Les surnageants de lyse des bactéries sont déposés. Un passage en continu toute la nuit permet une bonne fixation des protéines. Après 2 lavages par 2 volumes de PBS, les protéines fixées sont éluées par 10 ml de glutathion 5 mM dans le Tris-HCl 50 mM pH 8. Les colonnes sont régénérées par du PBS + NaCl 3 M. Les éluats sont dialysés contre de l'eau contenant des inhibiteurs de protéases, et lyophilisées.

V- PRODUCTION DE SERUM

V-1- Immunisations

La protéine fusionnée lyophilisée est resuspendue dans de l'eau stérile. 1 mg est injecté au lapin en 10 points par voie sous-cutannée, mélangés vol/vol avec de l'adjuvant complet de FREUND. Les injections de rappel, dans l'adjuvant incomplet de FREUND, se font toutes les semaines jusqu'à obtention d'arcs de précipitation en immunidiffusion.

V-2- Préparation du sérum

Les prélèvements de sang des lapins sont placés 30 mn à 37°C puis une nuit à 4°C afin d'obtenir un coagulat qui est séparé du plasma par une centrifugation 20 mn à 10000 g. Le sérum est aliquoté et conservé à -20°C.

V-3- Sérum anti-EIA d'Ad2 (Ab-I)

Ce sérum monoclonal est commercialisé par Oncogene/Science. Il est purifié à partir de liquide d'ascites. Il a été obtenu du clone M73 (HARLOW *et al.*, 1986) dérivé de cellules de rate de souris BALB/c et de cellules de myélome de souris NS-I.

VI- TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

VI-1- Immunotransfert ou *Western blotting*

Le transfert sur feuille de nitrocellulose (Millipore) se fait dans du tampon (Tris-HCl 25 mM; glycolle 192 mM; méthanol 20%; pH 8,9), pendant 3 h, sous une tension de 80 V, dans une cuve réfrigérée. L'efficacité du transfert est vérifiée par une coloration réversible au rouge Ponceau 0,2% dans de l'acide trichloroacétique à 3%. La feuille est rincée 5 mn dans du tampon Tris salin (Tris-HCl 10 mM; NaCl 150 mM; pH 7,4), puis saturée 1 h à 45°C dans du Tris-lait (Tris salin contenant 5% de lait écrémé). Le sérum est alors ajouté, dilué dans du Tris-lait. L'incubation dure 1 h à 37°C, sous agitation. La feuille est lavée 1 fois 15 mn dans du Tris salin, 2 fois 15 mn dans du Tris Tween (Tris salin + 1% de Tween 20), puis incubée 1 h à température ambiante avec le deuxième anticorps (anti-souris ou anti-lapin) couplé à la peroxydase (Pasteur Production), dilué dans du Tris-lait. Une révélation au chloronaphtol (25 mg; 17 ml de méthanol; qsp 50 ml de Tris salin; 60 µl d'H₂O₂ 30 volumes) donne une coloration mauve des bandes spécifiques.

VI-2- Immunodiffusions

Des lames de verre sont recouvertes d'agarose à 1,2% dans du tampon Véronal sodé 77 mM, pH 8,2. Les puits sont faits dans le gel durci à l'aide d'un équipement adapté Gelman. 10 µl de sérum et 10 µg de protéine de fusion sont déposés dans 2 puits voisins. Les lames sont incubées 24 h à température ambiante et 24 h en chambre froide. Elles sont ensuite lavées 8 fois à 4°C dans une solution saline tamponnée (NaCl 0,9%; pH 8,2), puis déminéralisées 3 fois 1 nuit. Les arcs de précipitation sont visibles après coloration par le noir amido (1 g/l; acétate de Na 45 mM; acide acétique 3%) et décoloration dans l'acide acétique à 5%.

VI-3- Dosage des antigènes cellulaires de surface

La densité des antigènes de classe I du CMH à la surface des cellules est déterminée par analyse en FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*). Les cellules d'un flacon de 75 cm² (environ 10⁷ cellules) sont décollées au Versène. Elles sont centrifugées 10 mn à 500 g et lavées 2 fois dans du tampon phosphate TP (NaCl 35 mM; KCl 1 mM; Na₂HP0₄ 4 mM; KH₂P0₄ 0,4 mM). Le culot est repris dans 300 µl de TP et réparti dans 3 tubes. L'anticorps monoclonal anti-RT-IA des antigènes de classe I de rat (Biosys) est alors ajouté (2 µl). Après une incubation de 30 mn dans la glace, les cellules sont lavées 3 fois dans du tampon TP et centrifugées à 500 g, 10 mn. Le culot est repris dans 500 µl de TP. Le deuxième anticorps couplé à la fluorescéine (Pasteur Production) est ajouté (0,5 µl). Après une incubation de 30 mn dans la glace, les cellules sont à nouveau lavées 3 fois par du TP. Le culot repris dans 500 µl de TP est analysé sur un EPICS (Coulter Electronics, Inc, FL).

VII- MISE EN EVIDENCE D'INTERACTIONS PROTEINES-PROTEINES

VII-1- Immunoprécipitations

10 µl de sérum sont mis au contact de 10 µl d'extraits de cellules marquées, 8 h dans la glace. 10 µg de protéine A-sépharose 6MB (Pharmacia) dilués dans du tampon d'immunoprécipitation (Hépès 50 mM pH 7; NaCl 250 mM; NP40 0,1%; DTT 0,5 mM; EDTA 5 mM; PMSF 1 mM) sont ajoutés. Après une incubation d'une nuit à 4°C, le gel est lavé 3 fois par du tampon d'immunoprécipitation. Les culots repris par 20 µl de solution dénaturante sont déposés sur un gel de polyacrylamide-SDS (gradient 10%-15%). Après migration, le gel est séché et mis en impression une semaine à -70°C.

VII-2- Technique d'*overlay*

Cette technique a été décrite en 1983 par OTTO.

Les protéines cellulaires sont séparées sur un gel de polyacrylamide-SDS. Elles sont ensuite fixées 30 mn par un mélange méthanol/ acide actétique/ eau (40/10/50). Le gel est rincé 3 fois dans l'eau et le SDS est éliminé par 2 bains dans l'éthanol 10%. Les protéines sont renaturées 1 h dans du tampon *overlay* (Hépès 20 mM;

BSA 0,5%; gélatine 0,25%; NP40 1%; NaCl 0,01 M, NaN₃ 0,05%; EGTA 1 mM; β-mercaptoéthanol 15 mM; pH 7,5). Après une incubation 16 h à température ambiante, en présence de protéine purifiée marquée, le gel est lavé 10 fois dans du tampon *overlay* (sur 3 jours). Le gel est ensuite baigné 30 mn dans une solution de salicylate de sodium 1 M, pH 6 pour augmenter le signal β. Il est enfin séché et autoradiographié à -70°C.

VII-3- Far-Western blotting

Les extraits cellulaires (200 µg) sont déposés sur gel de polyacrylamide-SDS puis électrotransférés sur une feuille de nitrocellulose. Le transfert est dénaturé et renaturé par des bains successifs dans une solution CZ 0,1 M (Hépès 20 mM; pH 7,9; glycérol 17%; KCl 0,1 M; MgCl₂ 5 mM; ZnCl₂ 0,1 M; EDTA 0,1 mM; DTT 2 mM; BSA 5 mg/ml; polyvinylpyrrolidone 0,02%) + chlorure de guanidine 6M 1 fois 30 mn, 2 fois 1 h dans une solution de CZ 0,1 M contenant du chlorure de guanidine 0,1 M et enfin 2 h dans la solution CZ 0,1 M. La feuille de nitrocellulose est lavée 1 h dans du tampon Hépès 10 mM pH 7,9. Elle est ensuite incubée une nuit dans une solution CZ 0,05 M, en présence de protéine purifiée radioactive. Après 2 lavages dans la solution CZ 0,05 M, la membrane est autoradiographiée (LEE *et al.* 1991).

VII-4- Chromatographie d'affinité

Les colonnes contenant 1 ml de gel sépharose 4B-glutathion sont lavées 2 fois par 5 ml de PBS puis équilibrées par 3 ml de PBS + Triton X-100 (PBST). Les protéines fusionnées (1 mg dilué dans 5 ml de PBST) sont fixées par 3 passages successifs. Les extraits cellulaires radioactifs sont appliqués sur les colonnes après 3 lavages au PBS. Les complexes protéine fusionnée-protéines cellulaires sont élués par 5 ml de glutathion 5 mM dans le Tris-HCl 50 mM pH 8.

Les colonnes sont lavées au PBS + NaCl 3 M et les éluats sont concentrés par l'acide trichloroacétique (TCA). A 900 µl d'éluat sont ajoutés 100 µl de TCA 100%. Après une incubation de 10 mn dans la glace et une centrifugation 5 mn à 12 000 g, le culot est lavé 2 fois par du TCA 0,1%. Finalement, le culot est repris dans 30 µl de solution dénaturante et déposé sur gel de polyacrylamide-SDS. Après migration, le gel est séché et autoradiographié à -70°C.

VII-5- Interactions *in vitro*.

Le gel de sépharose 4B-glutathion est lavé 3 fois dans du tampon MJ (Hépès 25 mM, pH 7,8; MgCl₂ 5 mM; ZnCl₂ 0,1 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 2 mM; BSA 10 mg/ml; NaCl 110 mM). 50 µl sont mis en présence de 50 µg de protéine de fusion purifiée et environ 5 µl d'extrait cellulaire marqué (correspondant à 100 000 cpm). 100 µl de tampon MJ sont ajoutés et les échantillons sont laissés 2 h à 4°C. Après 3 lavages dans du tampon MJ + NP40 1%, et ébullition 2 mn dans la solution dénaturante, les protéines sont déposées sur un gel de polyacrylamide-SDS (LUM *et al.*, 1992).

VIII- DICHROISME CIRCULAIRE

Les mesures ont été effectuées entre 200 et 230 nm, dans des cuves en quartz d'une longueur de 0,01 cm, sur un appareil JOBIN YVON RJ Mark III. Les protéines sont solubilisées dans du Tris-HCl 50 mM, pH 8, glutathion 5 mM, à une concentration de 0,8 mg/ml. Les équivalents Zn⁺⁺ sont ajoutés extemporanément par une solution de ZnSO₄ 1 M.

BIBLIOGRAPHIE

ACKRILL, A. M. & BLAIR, G. E. (1988).

Regulation of major histocompatibility class I gene expression at the level of transcription in highly oncogenic adenovirus-transformed rat cells.

Oncogene **3**, 483-487.

ACKRILL, A. M. & BLAIR, G. E. (1989).

Nuclear proteins binding to an enhancer element of the major histocompatibility class I promoter : differences between highly oncogenic and non-oncogenic adenovirus transformed rat cells.

Virology **172**, 643-646.

ACKRILL, A. M. & BLAIR, G. E. (1990).

Interferon- γ regulation of major histocompatibility class I gene expression in rat cells containing the adenovirus 12 E1A oncogene.

Virology **174**, 325-328.

ADAMI, G. R. & BABISS, L. E. (1990).

The efficiency of adenovirus transformation of rodent cells is inversely related to the rate of viral E1A gene expression.

J. Virol. **64**, 3427-3436.

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

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

Mol. Cell. Biol. **5**, 2552-2558.

BABISS, L. E. (1989).

The cellular transcription factor E2F requires viral E1A and E4 gene products for increased DNA-binding activity and functions to stimulate adenovirus E2A gene expression.

J. Virol. **63**, 2709-2717.

BAGCHI, S., RAYCHAUDHURI, P. & NEVINS, J. R. (1989).

Phosphorylation-dependent activation of the adenovirus-inducible E2F transcription factor in a cell-free system.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 4352-4356.

BAGCHI, S., RAYCHAUDHURI, P. & NEVINS, J. R. (1990).

Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1a *trans*-activation.

Cell **62**, 559-569.

BAGCHI, S., WEINMANN, R. RAYCHAUDHURI, P. (1991).

The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F.

Cell **65**, 1063-1072.

BANDARA, L. R. & LA THANGUE, N. B. (1991).

Adenovirus E1A prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor.

Nature **351**, 494-497.

BARBOSA, M. S., EDMONDS, C., FISHER, C., SCHILLER, J. T., LOWY, D. R. & VOUSDEN, K. H. (1990).

The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and SV40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation.

EMBO J. **9**, 153-160.

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

Adenovirus proteins from both E1A reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection.

Virology **156**, 107-121.

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

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

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

BELLETT, A. J. D., LI, P., DAVID, T., MACKEY, E. J., BRAITHWAITE, A. W. & CUTT, J. R. (1985).

Control functions of adenovirus transformation region E1A gene products in rat and human cells.

Mol. Cell. Biol. **5**, 1933-1939.

BELGRAU, D., WALKER, T. A. & COOK, J. L. (1988).

Recognition of adenovirus E1A gene product on immortalized cell surfaces by cytotoxic T lymphocytes.

J. Virol. **62**, 1513-1519.

BERG, J. M. (1988).

Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor III A and related proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 99-102.

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

The structure of adenovirus 2 early mRNAs.

Cell **14**, 685-711.

BERK, A. J., LEE, F., HARRISSON, T., WILLIAMS, J. & SHARP, P. A. (1979).

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

Cell **17**, 935-944.

BERK, A. J. (1986).

Functions of adenovirus E1A.

Cancer Survey **5**, 367-387.

BERNARDS, R., HOUWELING, A., SCHRIER, P. I., BOS, J. L. & VAN DER EB, A. J. (1982).

Characterization of cells transformed by Ad5/Ad12 hybrid early region I plasmids.

Virology **120**, 422-432.

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

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

Nature **305**, 776-779.

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

Adenovirus : transformation and oncogenicity.

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

- BOOKSTEIN, R., SHEW, J.-Y., CHEN, P.- L., SCULLY, P. & LEE, W.-H. (1990).
Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene.
Science **247**, 712-715.
- BORRELLI, E., HEN, R. & CHAMBON, P. (1984).
Adenovirus-2 E1A products repress enhancer-induced stimulation of transcription.
Nature **312**, 608-612.
- BORRELLI, E., HEN, R., WAZYLYK, C. & CHAMBON, P. (1986).
The immunoglobulin heavy chain enhancer is stimulated by the adenovirus type 2 E1A products in mouse fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**, 2846-2849.
- BOULANGER, P. A. & BLAIR, G. E. (1991).
Expression and interaction of human adenovirus oncoproteins.
Biochem. J. **275**, 281-299.
- BRAITHWAITE, A. W., MURRAY, J. D. & BELLETT, A. J. D. (1981).
Alterations to controls of cellular DNA synthesis by adenovirus infection.
J. Virol. **39**, 331-340.
- BRAITHWAITE, A. W. & JENKINS, J. R. (1989).
Ability of p53 and the adenovirus E1b 58 kilodalton protein to form a complex is determined by p53.
J. Virol. **63**, 1792-1799.
- BRANTON, P. E., BAYLEY, S. T. & GRAHAM, F. L. (1985).
Transformation by human adenoviruses.
Biochem. Biophys. Acta **780**, 67-94.
- BROCKMAN, D., TRIES, B. & ESCHE, H. (1990).
Isolation and characterization of novel adenovirus type 12 E1A mRNAs by cDNA PCR technique.
Virology **179**, 585-590.

BRUDER, J. T. & HEARING, P. (1989).

Nuclear factor EF-1A binds to the adenovirus E1A core enhancer element and to other transcriptional control regions.

Mol. Cell. Biol. **9**, 5143-5153.

BRUDER, J. T. & HEARING, P. (1991).

Cooperative binding of EF-1A to the E1A enhancer region mediates synergistic effects on E1A transcription during adenovirus infection.

J. Virol. **65**, 5084-5087.

BUCHKOVICH, K., DUFFY, L. A. & HARLOW, E. (1989).

The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle.

Cell **58**, 1097-1105.

CAO, L., FAHA, B., DEMBSKI, M., TSAI, L.-H., HARLOW, E. & DYSON, N. (1992).

Independent binding of the retinoblastoma protein and p107 to the transcription factor E2F.

Nature **355**, 176-179.

CHELLAPAN, S. P., HIEBERT, S., MUDRYL, M., HOROWITZ, J. M. & NEVINS, J. R. (1991).

The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein.

Cell **65**, 1053-1061.

CHEN, P.-L., SCULLY, P., SHEW, J.-Y., WANG, J. Y. J. & LEE, W.-H. (1989).

Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation.

Cell **58**, 1193-1198.

CHITTENDEN, T., LIVINGSTON, D. M. & KAELIN, W. G. JR. (1991).

The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein.

Cell **65**, 1073-1082.

CHIU, R., IMAGAWA, M., IMBRA, R. J., BOCKOVEN, J. R. & KARIN, M. (1987).

Multiple *cis*- and *trans*-acting elements mediate the transcriptional response to phorbol esters.

Nature **329**, 648-651.

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

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

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

CIECHANOVER, A., DIGIUSEPPE, J. A., BERCOVICH, B., ORIAN, A., RICHTER, J. D., SCHWARTZ, A. L. & BRODEUR, G. M. (1991).

Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system *in vitro*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88**, 139-143.

COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y. & HSU, L. (1973).

Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R. factor DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **69**, 2110-2114.

COUSIN, C., WINTER, N., GOMES, S. & D'HALLUIN, J. C. (1991).

Cellular transformation by enteric adenoviruses.

Virology **181**, 277-287.

CULP, J. S., WEBSTER, L. C., FRIEDMAN, D. J., SMITH, C. L., HUANG, W.-J., WU, F. Y.-H., ROSENBERG, M. & RICCIARDI, R. P. (1988).

The 289-amino acid E1a protein of adenovirus binds zinc in a region that is important for transactivation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 6450-6454.

DAUSSET, J. & PLA, M. (1989).

HLA complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme.

Ed. Flammarion.

DE CAPRIO, J. A., LUDLOW, J. W., FIGGE, J., SHEW, J.-Y., HUANG, C.-M., LEE, W.-H., MARSILIO, E., PAUCHA, E. & LIVINGSTON, D. M. (1988).

SV40 large T antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene.

Cell **54**, 275-283.

DE CAPRIO, J. A., LUDLOW, J. W., LYNCH, D., FURUKAWA, Y., GRIFFIN, J., PIWNICAWORMS, H., HUANG, C.-M. & LIVINGSTON, D. M. (1989).

The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulated element.

Cell **58**, 1085-1095.

D'HALLUIN, J. C. & LECLERE, V. (1992).

The adenovirus E1A gene: immortalizing nuclear oncogene prototype.

Bull. Inst. Pasteur **90**, 45-65.

DIJKEMA, R., DEKKER, B. M. M., VAN DER FELTZ, M. J. M. & VAN DER EB, A. J. (1979).

Transformation of primary rat kidney cells by DNA fragments of weakly oncogenic adenoviruses.

J. Virol. **32**, 943-950.

DOERFLER, W. (1968).

The fate of the DNA of adenovirus type 12 in baby hamster kidney cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **60**, 636-640.

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

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

Curr. Topics Microbiol. Immunol. **109**, 193-228.

DOERFLER, W. (1991).

Abortive infection and malignant transformation by adenoviruses: integration of viral DNA and control of viral gene expression by specific patterns of DNA methylation.

Adv. Virus Res. **39**, 89-128.

DUMONT, D. J. & BRANTON, P. E. (1992).

Phosphorylation of adenovirus E1A proteins by the p34^{cdc2} protein kinase.

Virology **189**, 111-120.

DYSON, N., HOWLEY, P. M., MUNGER, K. & HARLOW, E. (1989a).

The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to retinoblastoma gene product.

Science **243**, 934-937.

DYSON, N., BUCHKOVICH, K., WHYTE, P. & HARLOW, E. (1989b).

The cellular 107K protein that binds to adenovirus E1A also associates with the large T antigens of SV40 and JC virus.

Cell **58**, 249-255.

EAGER, K. B., WILLIAMS, J., BREIDING, D., PAN, S., KNOWLES, B., APPELLA, E. & RICCIARDI, R. P. (1985).

Expression of histocompatibility antigens H2-K, -D and -L is reduced in adenovirus-12-transformed mouse cells and restored by interferon.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82**, 5525-5529.

EGAN, C., JELSMA, T. N., HOWE, J. A., BAYLEY, S. T., FERGUSON, B. & BRANTON, P. E. (1988).

Mapping of cellular protein-binding sites on the products of early-region 1A of human adenovirus type 5.

Mol. Cell. Biol. **8**, 3955-3959.

EWEN, M. E., LUDLOW, J. W., MARSILIO, E., DE CAPRIO, J. A., MILLIKAN, R. C., CHENG, S.-H., PAUCHA, E. & LIVINGSTON, D. M. (1989).

An N-terminal transformation-governing sequence of SV40 large T antigen contributes to the binding of both p110^{Rb} and a second cellular protein, p120.

Cell **58**, 257-267.

EWEN, M. E., XING, Y., LAWRENCE, J. B. & LIVINGSTON, D. M. (1991).

Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein.

Cell **66**, 1155-1164.

EWEN, M. E., FAHA, B., HARLOW, E. & LIVINGSTON, D. M. (1992).

Interaction of p107 with cyclin A independent of complex formation with viral oncoproteins.

Science **255**, 85-87.

FAHA, B., EWEN, M. E., TSAI, L.-H., LIVINGSTON, D. M. & HARLOW, E. (1992).
Interaction between human cyclin A and adenovirus E1A-associated p107 protein.
Science **255**, 87-90.

FELDMAN, L. T. & NEVINS, J. R. (1983).
Localization of the adenovirus E1A protein, a positive acting transcriptional factor in
infected cells.
Mol. Cell. Biol. **3**, 829-838.

FERGUSON, B., JONES, N., RICHTER, J. & ROSENBERG, M. (1984).
Adenovirus E1a gene product expressed at high levels in *Escherichia coli* is functional.
Science **224**, 1343-1346.

FERGUSON, B., KRIPPL, B., ANDRISANI, O., JONES, N., WESTPHAL, H. & ROSENBERG, M.
(1985).
E1A 13S and 12S mRNA products made in *Escherichia coli* both function as nucleus-
localized transcription activators but do not directly bind DNA.
Mol. Cell. Biol. **5**, 2653-2661.

FRIEDMAN, D. J. & RICCIARDI, R. P. (1988).
Adenovirus type 12 E1A gene represses accumulation of MHC class I mRNAs at the level of
transcription.
Virology **165**, 303-305.

GALLIMORE, P. H. & PARASKEVA, C. (1979).
A study to determine the reasons for differences in the tumorigenicity of rat cell lines
transformed by adenovirus 2 and adenovirus 12.
Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol. **44**, 703-713.

GALLIMORE, P. H., BYRD, P. J., WHITTAKER, J. L. & GRAND, R. J. A. (1985).
Properties of rat cells transformed by DNA plasmids containing adenovirus type-12 E1
DNA or specific fragments of E1 region: comparison of transforming frequencies.
Cancer Res. **45**, 2670-2680.

GAYNOR, R. B., HILLMAN, D. & BERK, A. J. (1984).

Adenovirus early region 1A protein activates transcription of a non-viral gene introduced into mammalian cells by infection or transfection.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **81**, 1193-1197.

GILARDI, P. & PERRICAUDET, M. (1984).

The E4 transcriptional unit of Ad2: far upstream sequences are required for its transactivation by E1a.

Nucl. Acids Res. **12**, 7877-7888.

GILARDI, P. & PERRICAUDET, M. (1986).

The E4 promoter of adenovirus type 2 contains an E1a dependent *cis*-acting element.

Nucl. Acids Res. **14**, 9035-9049.

GIORDANO, A., Mc CALL, C., WHYTE, P. & FRANZA, B. R. Jr. (1991).

Human cyclin A and the retinoblastoma protein interact with similar but distinguishable sequences in the adenovirus E1A gene product.

Oncogene **6**, 481-485.

GIRARD, F., LAMB, N. & FERNANDEZ, A. (1992).

Le cycle cellulaire analysé par micro-injection dans les cellules somatiques des mammifères : rôles distincts des cyclines A et B.

Médecine/ Sciences **8**, 375-378.

GLENN, G. M. & RICCIARDI, R. P. (1986).

Adenovirus 5 early region 1A host range mutants *hr3*, *hr4*, and *hr5* contain point mutation which generate single amino acid substitutions.

J. Virol. **56**, 66-74.

GRAHAM, F. L. & VAN DER EB, A. J. (1973).

A new technique for the assay infectivity of human adenovirus 5 DNA.

Virology **52**, 456-467.

GRAHAM, F. L., ROWE, D. T., Mc KINNON, R., BACCHETTI, S., RUBEN, M. & BRANTON, P. E. (1984).

Transformation by human adenoviruses.

J. of Cell. Physiology, Suppl. **3**, 151-163.

GRAND R. J. A. & GALLIMORE, P. H. (1984).

Adenovirus type 12 early region 1 proteins: a study of their sub-cellular localization and protein-protein interactions.

J. Gen. Virol. **65**, 2149-2166.

GRAND, R. J. A. (1987).

The structure and functions of the adenovirus early region 1 proteins.

Biochem. J. **241**, 25-38.

GRAND, R. J. A., BYRD, P. J., GRABHAM, P. W., GREGORY, C. D., HUEN, D. S., MERRICK, R. M., YOUNG, L. S. & GALLIMORE, P. H. (1989).

The expression of the retinoblastoma gene product Rb1 in primary and adenovirus-transformed human cells.

Oncogene **4**, 1291-1298.

GREEN, M. (1986).

Transformation and oncogenesis : DNA viruses.

In *Fundamental Virology*, Raven Press NY 183-284.

GREEN, M. (1992).

Activities of adenovirus E1A proteins.

In *Origins of human cancers*. CSHL Press NY. 383-392.

GREEN, M. R., TREISMAN, R. & MANIATIS, T. (1983).

Transcriptional activation of cloned human β -globin genes by viral immediate-early products.

Cell **35**, 137-148.

HANDA, H., TODA, T., TAJIMA, M., WADA, T., IIDA, H. & FUKASAWA, T. (1987).

Expression of the human adenovirus E1a product in yeast.

Gene **58**, 127-136.

HARADA, S. & YANAGI, K. (1991).

Amino acid sequence homology of Epstein-Barr virus nuclear antigen-2 to adenovirus E1A, human papilloma virus-16 E7 and SV40 large T antigen in the functional domains for growth transformation.

Oncogene **6**, 461-462.

HARDY, S., ENGEL, D. A. & SHENK, T. (1989).

An adenovirus early region 4 gene product is required for induction of the infection-specific form of cellular E2F activity.

Genes & Dev. **3**, 1062-1074.

HARDY, S. & SHENK, T. (1989).

E2F from adenovirus-infected cells binds cooperatively to DNA containing two properly oriented and spaced recognition sites.

Mol. Cell. Biol. **9**, 4495-4506.

HARLOW, E., FRANZA, B. R. Jr. & SCHLEY, C. (1985).

Monoclonal antibodies specific for adenovirus early region 1A proteins: extensive heterogeneity in early region 1A products.

J. Virol. **55**, 533-546.

HARLOW, E., WHYTE, P., FRANZA, B. R. Jr. & SCHLEY, C. (1986).

Association of adenovirus early-region 1A proteins with cellular polypeptides.

Mol. Cell. Biol. **6**, 1579-1589.

HARRISON, T., GRAHAM, F. & WILLIAMS, J. (1977).

Host range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells.

Virology **77**, 319-329.

HEARING, P. & SHENK, T. (1983).

The adenovirus type-5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element.

Cell **33**, 695-703.

HEARING, P. & SHENK, T. (1985).

Sequence-independent autoregulation of the adenovirus type-5 E1A transcription unit.

Mol. Cell. Biol. **5**, 3214-3221.

HEARING, P. & SHENK, T. (1986).

The adenovirus type 5 contains two functionally distinct domains: one is specific for E1A and the other modulates all early units in *cis*.

Cell **45**, 229-236.

HECK, D. V., YEE, C. L., HOWLEY, P. M. & MUNGER, K. (1992).

Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**, 4442-4446.

HEN, R., BORRELLI, E., SASSONE-CORSI, P. & CHAMBON, P. (1983).

An enhancer element located 340 base pairs upstream from the adenovirus-2 E1A cap site.

Nucl. Acids Res. **11**, 8747-8761.

HEN, R., BORRELLI, E. & CHAMBON, P. (1985).

Repression of the immunoglobulin heavy chain enhancer by the adenovirus-2 E1A products.

Science **230**, 1391-1394.

HERBOMEL, P., BOURACHOT, B. & YANIV, M. (1984).

Two distinct enhancers with different cell specificities coexist in the regulatory region of polyoma.

Cell **39**, 653-662.

HERBST, R. S., PELLETIER, M., BOCZKO, E. M. & BABISS, L. E. (1990).

The state of cellular differentiation determines the activity of the adenovirus E1A enhancer element: evidence for negative regulation of enhancer functions.

J. Virol. **64**, 161-172.

HERRMANN, C. H. & MATHEWS, M. B. (1989).

The adenovirus E1B 19-kilodalton protein stimulates gene expression by increasing DNA levels.

Mol. Cell. Biol. **9**, 5412-5423.

HERRMANN, C. H., SU, L.-K. & HARLOW, E. (1991).

Adenovirus E1A is associated with a serine/threonine protein kinase.

J. Virol. **65**, 5848-5859.

HINDS, P. W., MITTNACHT, S., DULIC, V., ARNOLD, A., REEDS, S. I. & WEINBERG, R. A. (1992).

Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins.

Cell **70**, 993-1006.

HOPP, T. P. & WOODS, K. R. (1981).

Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **78**, 3824-3828.

HORIKOSHI, N., MAGUIRE, K., KRALLI, A., MALDONADO, E., REINBERG, D. & WEINMANN, R. (1991).

Activation of the E2F transcription factor in adenovirus E1A-dependent stimulation of DNA-binding activity and induction of cooperative binding mediated by an E4 gene product.

J. Virol. **64**, 2702-2710.

HOROWITZ, J. M., YANDELL, D. W., PARK, S.-H., CANNING, S., WHYTE, P., BUCHKOWICH, K., HARLOW, E., WEINBERG, R. A. & DRYJA, T. P. (1989).

Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene.

Science **243**, 937-940.

HOROWITZ, J. M., PARK, S.-H., BOGENMANN, E., CHENG, J.-C., YANDELL, D. W., KAYE, F. J., MINNA, J. D., DRYIA, T. P. & WEINBERG, R. A. (1990).

Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**, 2775-2779.

HOWE, J. A., MYMRYK, J. S., EGAN, C., BRANTON, P. E. & BAYLEY, S. T. (1990).

Retinoblastoma growth suppressor and a 300-kDa protein appear to regulate cellular DNA synthesis.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**, 5883-5887.

HU, Q., DYSON, N. & HARLOW, E. (1990).

The regions of the retinoblastoma protein needed for binding to adenovirus E1A or SV40 large T antigen are common sites for mutations.

EMBO J. **9**, 1147-1155.

HUANG, S., WANG, N.-P., TSENG, B. Y., LEE, W.-H. & LEE, E. H.-H. P. (1991).

Two distinct and frequently mutated regions of retinoblastoma protein are required for binding to SV40 T antigen.

EMBO J. **9**, 1815-1822.

HUANG, S., LEE, W.-H. & LEE, Y.-H. P. (1990).

A cellular protein that competes with SV40 T antigen for binding to the retinoblastoma gene product.

Nature **350**, 160-162.

JELINEK, T. & GRAHAM, F. L. (1992).

Recombinant human adenovirus containing hybrid adenovirus type 5 (Ad5)/Ad12 E1A genes : characterization of hybrid E1A proteins and analysis of transforming activity and host range.

J. Virol. **66**, 4117-4125.

JELSMA, T. N., HOWE, J. A., MYMRYK, J. S., EVELEGH, C. M., CUNNIFF, N. F. A. & BAYLEY, S. T. (1989).

Sequences in E1A proteins of human adenovirus 5 required for cell transformation, repression of a transcriptional enhancer, and induction of proliferating cell nuclear antigen.

Virology **171**, 120-130.

JOICHEMSEN, A. G., BOS, J. L. & VAN DER EB, A. J. (1984).

The first exon of region E1a genes of adenoviruses 5 and 12 encodes a separate functional protein domain.

EMBO J. **3**, 2923-2927.

JOICHEMSEN, A. G., PELTENBURG, L. T. G., TE PAS, M. P. W., DE WIT, C. M., BOS, J. L. & VAN DER EB, A. J. (1987).

Activation of adenovirus-5 E1a transcription by region E1b in transformed primary rat cells.

EMBO J. **6**, 3399-3405.

JONES, N. & SHENK, T. (1979a).

Isolation of Ad5 host-range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells.

Cell **17**, 683-689.

JONES, N. & SHENK, T. (1979b).

An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes.

Proc. Natl. Acad. Sci. **76**, 3665-3669.

JUTTERMANN, R., WEYER, U. & DOERFLER, W. (1989).

Defect of adenovirus type 12 replication in hamster cells: absence of transcription of viral virus-associated and L1 RNAs.

J. Virol. **63**, 3535-3540.

KAELIN, W. G. Jr., EWEN, M. E. & LIVINGSTON, D. M. (1990).

Definition of the minimal simian virus 40 large T antigen- and adenovirus E1A-binding domain in the retinoblastoma gene product.

Mol. Cell. Biol. **10**, 3761-3769.

KAELIN, W. G. Jr., DALLAS, D. C., DE CAPRIO, J. A., KAYE, F. J. & LIVINGSTON, D. M. (1991).

Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product.

Cell **64**, 521-532.

KAO, H. T. & NEVINS, J. R. (1983).

Transcriptional activation and subsequent control of the human heat-shock gene during adenovirus infection.

Mol. Cell. Biol. **3**, 2058-2065.

KAST, W. M., OFFRINGA, R., PETERS, P. J., VOORDOUW, A. C., MELOEN, R. H., VAN DER EB, A. J. & MELIEF, C. J. M. (1989).

Eradication of adenovirus-E1-induced tumors by E1A-specific cytotoxic T lymphocytes.

Cell **59**, 603-614.

KATOH, S., OZAWA, K., KONTOH, S., SOEDA, S., GACHELIN, G. & YOKOYAMA, K. (1990).
Identification of sequences responsible for positive and negative regulation by E1A in the promoter of H-2K^{bm1} class I MHC gene.

EMBO J. **9**, 127-135.

KAYE, F. J., KRATZKZ, R. A., GERSTER, J. L. & HOROWITZ, J. M. (1990).

A single aminoacid substitution results in a retinoblastoma protein defective in phosphorylation and oncoprotein binding.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**, 6922-6926.

KENYON, D. J., DOUGHERTY, J. & RASKA, K. Jr. (1991).

Tumorigenicity of adenovirus-transformed cells and their sensitivity to tumor necrosis factor α and NK/LAK cell cytotoxicity.

Virology **180**, 818-821.

KIMURA, A., ISRAEL, A., LE BAIL, O. & KOURILSKI, P. (1986).

Detailed analysis of the mouse H-2K^b promoter : enhancer-like sequences and their role in the regulation of class I gene expression.

Cell **44**, 261-272.

KITCHINGMAN, G. R. & WESTPHAL, H. (1980).

The structure of adenovirus 2 early nuclear and cytoplasmic RNAs.

J. Mol. Biol. **137**, 23-48.

KLEINBERGER, T. & SHENK, T. (1991).

A protein kinase is present in a complex with adenovirus E1A proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88**, 11143-11147.

KOVESDI, I., REICHEL, R. & NEVINS, J R. (1986).

Identification of a cellular transcription factor involved in E1A *trans*-activation.

Cell **45**, 219-228.

KOVESDI, I., REICHEL, R. & NEVINS, J R. (1987).

Identification of a cellular transcription factor in E1A-mediated coordinate gene control.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **84**, 2180-2184.

KRIPPL, B., FERGUSON, B., JONES, N., ROSENBERG, M. & WESTPHAL, H. (1985).
Mapping of functional domains in adenovirus E1A proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82**, 7480-7484.

KRISHNA, S., BENARROCH, P & PILLAI, S. (1992).
Tetrameric cell-surface MHC class I molecules.
Nature **357**, 164-167.

LAEMMLI, U. K. (1970).
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**, 680-685.

LAMBERTI, C. & WILLIAMS, J. (1990).
Differential requirement for adenovirus type 12 E1A gene products in oncogenic transformation.
J. Virol. **64**, 4997-5007.

LEE, K. A. W. & GREEN, M. R. (1987).
A cellular transcription factor E4F1 interacts with an E1a-inducible enhancer and mediates constitutive enhancer function *in vitro*.
EMBO J. **6**, 1345-1353.

LEE, W.-H., SHEW, J.-Y., HONG, F. D., SERY, T. W., DONODO, L. A., YOUNG, L.-J., BOOKSTEIN, R. & LEE, E. Y.-H. P. (1987).
The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA-binding activity.
Nature **329**, 642-645.

LEE, W. S., KAO, C. C., BRYANT, G. O., LIU, X. & BERK, A. J. (1991).
Adenovirus E1A activation domain binds the basic repeat in the TATA box transcription factor.
Cell **67**, 365-376.

LEITE, J. P. G. (1987).

La région E1A des sérotypes 2, 3, et 12 de l'adénovirus: transdominance et régulation de la transcription.

Thèse de l'Université de Lille I.

LEITE, J. P. G. & D'HALLUIN, J. C. (1988).

Differences in the organization of adenovirus E1A promoters are not important for their full activity.

FEBS Lett. **235**, 233-236.

LEITE, J. P. G., COLLARD, J. F. & D'HALLUIN, J. C. (1988).

The regulation of E1A: the role of both E1A mRNA products of the subgroup B adenoviruses on the early promoters of the subgroup C adenoviruses.

Gene **69**, 111-120.

LEWIS, M. K. & THOMPSON, D. V. (1990).

Efficient site directed *in vitro* mutagenesis using ampicillin selection.

Nucl. Acids Res. **18**, 3439-3443.

LILLIE, J. W., GREEN, M. & GREEN, M. R. (1986).

An adenovirus E1a protein region required for transformation and transcriptional repression.

Cell **46**, 1043-1051.

LILLIE, J. W., LOEWENSTEIN, P. M., GREEN, M. R. & GREEN, M. (1987).

Functional domains of adenovirus type 5 E1a proteins.

Cell **50**, 1091-1100.

LILLIE, J. W. & GREEN, M. R. (1989).

Transcription activation by the adenovirus E1a protein.

Nature **338**, 39-44.

LUDLOW, J. W., DE CAPRIO, J. A., HUANG, C.-M., LEE, W.-H., PAUCHA, E. & LIVINGSTON, D. M. (1989).

SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family.

Cell **56**, 57-65.

LUDLOW, J. W., SHON, J., PIPAS, J. M., LIVINGSTON, D. M. & DE CAPRIO, J. A. (1990).
The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T.
Cell **60**, 387-396.

LUM, L. S. Y., HSU, S., VAEWHONG, M. & WU, B. (1992).
The hsp70 gene CCAAT-binding factor mediates transcriptional activation by the adenovirus E1a protein.
Mol. Cell. Biol. **12**, 2599-2605.

LYONS, R. H., FERGUSON, B. Q. & ROSENBERG, M. (1987).
Pentapeptide nuclear localization signal in adenovirus E1a.
Mol. Cell. Biol. **7**, 2451-2456.

MAK, S., MAK, I., SMILEY, I. R. & GRAHAM, F. L. (1979).
Tumorigenicity and viral gene expression in rat cells transformed by Ad12 virions or by the *Eco* RI C fragment of Ad12 DNA.
Virology **98**, 456-460.

MARSHALL, C. J. (1991).
Tumor suppressor genes.
Cell **64**, 313-326.

MARTIN, K. J., LILLIE, J. W. & GREEN, M. R. (1990).
Evidence for interaction of different eukaryotic transcriptional activators with distinct cellular targets.
Nature **346**, 147-152.

MEIJER, I., JOCHEMSEN, A. J., DE WIT, C. M., BOS, J. L., MORELLO, D. & VAN DER EB, A. J. (1989).
Adenovirus type 12 E1A down regulates expression of a transgene under control of a major histocompatibility complex class I promoter : evidence for transcriptional control.
J. Virol. **63**, 4039-4042.

MIHARA, K., CAO, X.-R., YEN, A., CHANDLER, S., DRISCOLL, B., MURPHREE, A. L., TANG, A. & FUNG, Y.-K. T. (1989).

Cell-cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product.

Science **246**, 1300-1303.

MITCHELL, P. J. & TJIAN, R. (1989).

Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins.

Science **245**, 371-378.

MONTELL, C., COURTOIS, G., ENG, C. & BERK, A.J. (1984).

Complete transformation by adenovirus 2 requires both E1A proteins.

Cell **36**, 951-961.

MORAN, E., ZERLER, B., HARRISON, T. M. & MATHEWS, M. B. (1986).

Identification of separate domains in the adenovirus E1a gene for immortalization activity and the activation of virus early genes.

Mol. Cell. Biol. **6**, 3470-3480.

MORAN, E. & MATHEWS, M. B. (1987).

Multiple functional domains in the adenovirus E1A gene.

Cell **48**, 177-178.

MORAN, E. (1988).

A region of SV40 large T antigen can substitute for a transforming domain of the adenovirus E1A products.

Nature **334**, 168-170.

MULLBACHER, A., BELLETT, A. J. D. & HLA, R. T. (1989).

The murine cellular immune response to adenovirus type 5.

Immunol. Cell Biol. **67**, 31-39.

NEILL, S. D., HEMSTROM, C., VIRTANEN, A. & NEVINS, J. R. (1990).

An adenovirus E4 gene product trans-activates *E2* transcription and stimulates stable E2F binding through a direct association with E2F.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**, 2008-2012.

NELSON, C. C., BRAITHWAIT, E. A. W., SILVESTRO, M. & BELLETT, A. J. D. (1990).
Defective expression of adenovirus genes during early infection of undifferentiated OTF963 embryonal carcinoma cells.

J. Virol. **64**, 4329-4337.

NEVINS, J. R., GINSBERG, H. S., BLANCHARD, J. M., WILSON, M. C. & DARNELL, J. E. Jr. (1979).

Regulation of the primary expression of the early adenovirus transcription units.

J. Virol. **32**, 727-733.

NIELSCH, U., ZIMMER, S. G. & BABISS, L. E. (1991).

Changes in NF- κ B and ISGF3 DNA binding activities are responsible for differences in MHC and β -IFN gene expression in Ad5- versus Ad12-transformed cells.

EMBO J. **10**, 4169-4175.

OFFRINGA, R., GEBEL, S., VAN DAM, H., TIMMERS, M., SMITS, A., AWART, R., STEIN, B., BOS, J. L., VAN DER EB, A. J. & HERRLICH, P. (1990).

A novel function of the transforming domain of E1a: repression of AP-1 activity.

Cell **62**, 527-538.

OSBORN, T. F., ARVIDSON, D. N., TYAN, E., S., DUNSWORTH-BROWNE, M. & BERK, A. J. (1984).

Transcription control region with the protein-coding portion of adenovirus E1A genes.

Mol. Cell. Biol. **4**, 1293-1305.

OTTO, J. J. (1986).

Gel overlay methods for detecting specific protein-protein interactions.

Methods in enzymology **134**, 555-560.

OZAWA, K., SAKA, F., KITABAYASHI, I., IMAI, T., SOEDA, E., ISRAEL, A., GACHELIN, G. & YOKOYAMA, K. (1990).

Comparison of the promoter regions of H-2K^b and H-2K^{bm1} class I MHC genes.

Nucl. Acids Res. **18**, 4185-4190.

PAGANO, M., DRAETTA, G. & JANSEN-DÜRR, P. (1992).

Association of cdk2 kinase with the transcription factor E2F during S phase.
Science **255**, 1144-1146.

PARKS, C. L., BANERJEE, S. & SPECTOR, D. J. (1988).

Organization of the transcriptional control region of the E1b gene of adenovirus type 5.
J. Virol. **62**, 54-67.

PATEL, G. & JONES, N. C. (1990).

Activation *in vitro* of RNA polymerase II and III directed transcription by baculovirus produced E1A protein.
Nucl. Acids Res. **18**, 2909-2915.

PEEPER, D. S., ZANTEMA, A., DOWDY, S. F. & VAN DER EB, A. J. (1992).

Expression, purification, and functional characterization of adenovirus 5 and 12 E1A proteins produced in insect cells.
Virology **190**, 733-745.

PERRICAUDET, M., AKUSJARVI, G., VIRTANEN, A. & PETERSON, U. (1979).

Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses.
Nature **281**, 694-696.

PHELP, W. C., YEE, C. L., MUNGER, K. & HOWLEY, P. M. (1988).

The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A.
Cell **53**, 539-547.

PIETENPOL, J. A., STEIN, R. W., MORAN, E., YACIUK, P., SCHLEGEL, R., LYONS, R. M., PITTELKOW, M. R., MUNGER, K., HOWLEY, P. M. & MOSES, H. L. (1990).

TGF- β 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains.
Cell **61**, 777-785.

PINES, J. & HUNTER, T. (1990).

Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B.

Nature **346**, 760-763.

PTASHNE, M. (1988).

How eukaryotic transcriptional activators work.

Nature **335**, 683-689.

QUINLAN, M. P. & GRODZIKER, T. (1987).

Adenovirus E1A 12S protein induces DNA synthesis and proliferation in primary epithelial cells in both the presence and absence of serum.

J. Virol. **61**, 673-682.

QUINLAN, M. P., WHYTE, P. & GRODZIKER, T. (1988).

Growth factor induction by the adenovirus type 5 E1a 12S protein is required for immortalization of primary epithelial cells.

Mol. Cell. Biol. **8**, 3191-3203.

QUINLAN, M. P. (1989).

The Ad5 12S growth factor induces F9-cell proliferation and differentiation.

Oncogene **4**, 1051-1055.

RALSTON, R. & BISHOP, J. M. (1983).

The protein products of the *myc* and *myb* oncogenes and adenovirus E1A are structurally related.

Nature **306**, 803-806.

RAYCHAUDHURI, P., BAGCHI, S. & NEVINS, J. R. (1989).

DNA-binding activity of the adenovirus-induced E4F transcription factor is regulated by phosphorylation.

Genes & Dev. **3**, 620-627.

REICHEL, R., KOVESDI, I. & NEVINS, J. R. (1988).

Activation of a pre-existing cellular factor as the basis for adenovirus E1a-mediated transcription control.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **85**, 387-390.

REICHEL, R., NEILL, S. D., KOVESDI, I., SIMON, M. C., RAICHAUDHURI, P. & NEVINS, J. R. (1989).

The adenovirus E4 gene, in addition to the E1a gene, is important for trans-activation of E2 transcription and E2F activation.

J. Virol. **63**, 3643-3650.

RECHSTEINER, M., ROGERS, S. & ROTE, K. (1987).

Protein structure and intracellular stability.

TIBS **12**, 390-394.

REIFEL-MILLER, A. E., BERG, D. T. & GRINNEL, B. W. (1991).

Repression of enhancer activity by the adenovirus E1A tumor protein(s) is mediated through a novel HeLa cell nuclear factor.

J. Biol. Chem. **266**, 13873-13882.

RIKITAKE, Y. & MORAN, E. (1992).

DNA-binding properties of the E1A-associated 300-kilodalton protein.

Mol. Cell. Biol. **12**, 2826-2836.

ROCHETTE-EGLY, C., FROMENTAL, C. & CHAMBON, P. (1990).

General repression of enhancer activity by the adenovirus-2 E1A proteins.

Genes & Dev. **4**, 137-150.

ROSENTHAL, A., WRIGHT, S., QUADE, K., GALLIMORE, P., CEDAR, H. & GROSVELD, F. (1985).

Increased MHC H-2K gene transcription in cultured mouse embryo cells after adenovirus-infection.

Nature **315**, 579-581.

ROTHBERG, P. G., SPANDOFER, H. M., ERISMAN, M. D., STAROSCIK, R. N., SEARS, H. F., PETERSON, R. O. & ASTRIN, S. M. (1985).

Evidence that *c-myc* expression defines two genetically distinct forms of colorectal adenocarcinoma.

Br. J. Cancer **52**, 629-632.

ROWE, W. P., HUEBNER, R. J., GALLIMORE, L. K., PARROTT, R. H. & WARD, T. G. (1953).
Isolation of a cytogenic degeneration in tissue culture.
Proc. Soc. Exp. Med. **84**, 570-573.

ROWE, D. T., GRAHAM, F.L. & BRANTON, P.E. (1983).
Intracellular localization of adenovirus type 5 tumor antigens in productively infected cells.
Virology **129**, 456-468.

ROWE, D. T., BRANTON, P.E., YEE, S.-P, BACCHETTI, S. & GRAHAM, F.L. (1984a).
Establishment and characterization of hamster cell lines transformed by restriction endonuclease fragments of adenovirus 5.
J. Virol. **49**, 162-170.

ROWE, D. T., BRANTON, P. E. & GRAHAM, F. L. (1984b).
The kinetics of synthesis of early viral proteins in KB cells infected with wild type mutants of human adenovirus type 5.
J. Gen. Virol. **65**, 585-597.

ROWE, D. T., RUBEN, M., BACCHETTI, S. & GRAHAM, F. L. (1984c).
Identification of an adenovirus function required for initiation of cell transformation possibly at the level of DNA integration.
In *Gene Transfer and Cancer*. Ed. Raven Press, NY, 135-141.

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

RUSSEL, W. C. & PRECIOUS, B. (1982).
Nucleic acid-binding properties of adenovirus structural polypeptides.
J. Gen. Virol. **63**, 69-79.

RUTSGI, A. K., DYSON, N. & BERNARDS, R. (1991).
Amino-terminal domains of *c-myc* and *N-myc* proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product.

Nature **352**, 541-544.

SAMBROOK, J., BOTCHAN, M., GALLIMORE, P., OZANNE, B., PETTERSSON, U., WILLIAMS, J. F. & SHARP, P. A. (1975).

Viral DNA sequences in cells transformed by simian virus 40, adenovirus type 2 and adenovirus type 5.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **39**, 615-632.

SAWADA, Y., FOHRING, B., SHENK, T. E. & RASKA, K. (1985).

Tumorigenicity of adenovirus-transformed cells : region E1A of adenovirus 12 confers resistance to naturel killer cells.

Virology **147**, 413-421.

SAWADA, Y., URBANELLI, D., RASKOVA, J., SHENK, T. E. & RASKA, K., Jr. (1986).

Adenovirus tumor-specific transplantation antigen is a function of the E1A early region.

J. Exp. Med. **163**, 563-572.

SCHNEIDER, J. F., FISHER, F., GODING, C. R. & JONES, N. C. (1987).

Mutational analysis of the adenovirus E1a gene: the role of transcriptional regulation in transformation.

EMBO J. **6**, 2053-2060.

SCHRIER, P. I., BERNARDS, R., VAESSEN, R. T. M. J., HOUWELING, A. & VAN DER EB, A. J. (1983).

Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells.

Nature **305**, 771-775.

SHARP, P. A., PETTERSSON, U. & SAMBROOK, J. (1974).

Viral DNA in transformed cells. A study of the sequences of adenovirus 2 DNA in a line of transformed rat cells using specific fragments of the viral genome.

J. Mol. Biol. **86**, 709-726.

SHENK, T. & FLINT, J. (1991)

Transcriptional and transforming activities of the adenovirus E1A proteins.

Adv. Cancer Res. **57**, 47-85.

SHEW, J.-Y., LIN, B. T.-Y., CHEN, P.-L., TSENG, B.-Y., YANG-FENG, T. L. & LEE, W.-H. (1990).

C-terminal truncation of the retinoblastoma gene product leads to functional inactivation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**, 6-10.

SHIMOJO, H. & YAMASHITA, T. (1968).

Induction of DNA synthesis by adenoviruses in contact-inhibited hamster cells.
Virology **36**, 422-433.

SHIROKI, K., SHIMOJO, H., SAWADA, Y., UEMIZU, Y. & FUJINAGA, K. (1979).

Incomplete transformation of rat cells by small fragments of Ad12 DNA.
Virology **95**, 127-136.

SHIROKI, K., SEGAWA, K. & SHIMOJO, H. (1980).

Two tumor antigens and their polypeptides in adenovirus type-12-infected and transformed cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **77**, 2274-2278.

SIMON, M. C., FISCH, T. M., BENECKE, B. J., NEVINS, J. R. & HEINTZ, N. (1988).

Definition of multiple, functionally distinct TATA elements, one of which is a target in the *hsp70* promoter for E1A regulation.
Cell **52**, 723-729.

SIMON, R. & RICHTER, J. D. (1990).

The degradation sequence of adenovirus E1A consists of the amino-terminal tetrapeptide Met-Arg-His-Ile.
Mol. Cell. Biol. **10**, 5609-5615.

SMITH, D. B., DAVERN, K. M., BOARD, P. G., GARCIA, E. G. & MITCHELL, G.F. (1986).

Mr 26,000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**, 8703-8707.

SMITH, D. B. & JOHNSON, K. S. (1988).

Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase.

Gene **67**, 31-40.

SMITH, D. H. & ZIFF, E. B. (1988).

The amino-terminal region of the adenovirus serotype 5 E1a protein performs two separate functions when expressed in primary baby rat kidney cells.

Mol. Cell. Biol. **8**, 3882-3890.

SMITH, C. L., DEBOUCK, C., ROSENBERG, M. & CULP, J. S. (1989).

Phosphorylation of serine residue 89 of human adenovirus E1A proteins is responsible for their characteristic electrophoretic mobility shifts, and its mutation affects biological function.

J. Virol. **63**, 1569-1577.

SOGAWA, K., HANDA, H., FUJISAWA-SEHARA, A., HIROMASA, T., YAMANE, M. & FUJII-KURIYAMA, Y. (1989).

Repression of cytochrome P-450c gene expression by cotransfection with adenovirus E1a DNA.

Eur. J. Biochem. **181**, 539-544.

STABEL, S., ARGOS, P. & PHILIPSON, L. (1985).

The release of growth arrest by microinjection of adenovirus E1A DNA.

EMBO J. **4**, 2329-2336.

STEIN, R. W. & ZIFF, E. B. (1984).

HeLa cell β -tubulin gene transcription is stimulated by adenovirus 5 in parallel with viral early genes by an E1a-dependent mechanism.

Mol. Cell. Biol. **4**, 2792-2801.

STEIN, R. W. & ZIFF, E. B. (1987).

Repression of insulin gene expression by adenovirus type-5 E1a proteins.

Mol. Cell. Biol. **7**, 1164-1170.

STEIN, R. W., CORRIGAN, M., YACIUK, P., WHELAN, J. & MORAN, E. (1990).

Analysis of E1A-mediated growth regulation functions : binding of the 300-kilodalton cellular product correlates with E1A enhancer repression function and DNA synthesis-inducing activity.

J. Virol. **64**, 4421-4427.

STEPHENS, C. & HARLOW, E. (1987).

Differential splicing yields novel adenovirus-5 E1A mRNAs that encode 30 KD and 35 KD proteins.

EMBO J. **6**, 2027-2035.

STILLMAN, B. (1986).

Function of the adenovirus E1B tumor antigens.

Cancer Survey **5**, 389-403.

STRUHL, K. (1989).

Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins.

TIBS **14**, 137-140.

SU, W., JACKSON, S., TJIAN, R. & ECHOLS, H. (1991).

DNA looping between sites for transcriptional activation : self-association of DNA-bound Sp1.

Genes & Dev. **5**, 820-826.

SUBRAMANIAN, T., KUPPUSWAMY, M., NASR, R. J. & CHINNADURAI, G. (1988).

An N-terminal region of adenovirus E1a essential for cell transformation and induction of an epithelial cell growth factor.

Oncogene **2**, 105-112.

SVENSSON, C. & AKUSJARVI, G. (1984).

Adenovirus 2 early region 1A stimulates expression of both viral and cellular genes.

EMBO J. **3**, 789-794.

THALMEIER, K., SYNOUZYK, H., MENTZ, R., WINNACKER, E. L. & LIPP, M. (1989).

Nuclear factor E2F mediates basic transcription and *trans*-activation by E1a of the human *myc* promoter.

Genes & Dev. **3**, 527-536.

TOOZE, J. (1981).

Molecular biology of tumor viruses. Part 2.
Cold Spring Harbor laboratory, New York.

TRENTIN, J. J., YABE, Y. & TAYLOR, G. (1962).

The quest for human cancer viruses.
Science **137**, 835-849.

TSAI, L.-H., HARLOW, E. & MEYERSON, M. (1991).

Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A and adenovirus E1A-associated p33 kinase.
Nature **353**, 174-177.

TSUJI, T., MORI, K., SUGIMOTO, K., HAMADA, C. & MORI, K. J. (1992).

Production of a low molecular weight growth inhibitory factor by adenovirus 12-transformed cells.
Biochem. Biophys. Res. Comm. **187**, 1232-1240.

TSUKAMOTO, A. S., PONTICELLI, A., BERK, A. J. & GAYNOR, R.B. (1986a).

Genetic mapping of a major site of phosphorylation in adenovirus type 2 E1A proteins.
J. Virol. **59**, 14-22.

TSUKAMOTO, A. S., FERGUSON, B., ROSENBERG, G. M., WEISSMANN, I. L. & BERK, A. J. (1986b).

An immunodominant domain in adenovirus type 2 early region 1A proteins.
J. Virol. **60**, 312-316.

ULFENDAHL, P. J., LINDER, S., KREIVI, J. P., NORDQUIST, K., SEVENSSON, C., HULTERG, H. & AKUSJARVI, G. (1987).

A novel adenovirus-2 E1A mRNA encoding a protein with transcription activation properties.
EMBO J. **6**, 2037-2044.

VAESSEN, R. T. J. M., HOUWELING, A., ISRAEL, A., KOURILSKI, P. & VAN DER EB, A. J. (1986).

Adenovirus-E1A-mediated regulation of class I MHC expression.
EMBO J. **5**, 335-341.

VAN DAM, H., OFFRINGA, R., SMITS, A. M. M., BOS, J. L., JONES, N. C. & VAN DER EB, A. J. (1989).

The repression of the growth-factor-inducible gene J.E., c-myc and stromelysin by adenovirus E1A is mediated by conserved region 1.
Oncogene **4**, 1207-1212.

VAN DAM, H., OFFRINGA, R., MEIJER, I., STEIN, B., SMITS, A. M., HERRLICH, P., BOS, J. L. & VAN DER EB, A. J. (1990).

Differential effects of the adenovirus E1A oncogene on members of the AP-1 transcription factors family.
Mol. Cell. Biol. **10**, 5857-5864.

VAN DEN ELSEN, P., DE PATERS, S., HOUWELING, A., VAN DER VEER, J. & VAN DER EB, A. J. (1982).

The relationship between region E1A and E1B of human adenoviruses in cell transformation.
Gene **18**, 175-185.

VAN DEN ELSEN, P., HOUWELING, A. & VAN DER EB, A. J. (1983).

Morphological transformation of human adenovirus is determined to a large extent by gene products of region E1A.
Virology **131**, 242-246.

VELCICH, A. J. & ZIFF, E. (1985).

Adenovirus E1A proteins repress transcription from the SV40 early promoter.
Cell **40**, 705-716.

VELCICH, A. J., KERN, F. G., BASILICO, C. & ZIFF, E. B. (1986).

Adenovirus E1A proteins repress expression from polyoma-virus early and late promoters.
Mol. Cell. Biol. **6**, 4019-4025.

VIRTANEN, A. & PETTERSSON, U. (1983).

The molecular structure of the 9 S mRNA from early region 1A of adenovirus serotype 2.
J. Mol. Biol. **165**, 496-499.

WAGNER, S. & GREEN, M. R. (1991).

Retinoblastoma, a transcriptional tryst.
Nature **352**, 189-190.

WANG, H.-G. H., DRAETTA, G. & MORAN, E. (1991).

E1A induces phosphorylation of the retinoblastoma protein independently of direct physical association between the E1A and retinoblastoma products.
Mol. Cell. Biol. **11**, 4253-4265.

WASYLYK, B., WAZYLYK, C., FLORES, P., BEGUE, A., LEPRINCE, D. & STEHELIN, D. (1990).

The *c-ets* proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with *c-Fos* and *c-Jun* for transcriptional activation.
Nature **346**, 191-193.

WEBSTER, L. C., ZHANG, K., CHANCE, B., AYENE, I., CULP, J. S., HUANG, W.-J., WU, F. Y.-H. & RICCIARDI, R. P. (1991).

Conversion of the E1A Cys₄ zinc finger to a non functional His₂, Cys₂ zinc finger by a single point mutation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88**, 9989-9993.

WEINBERG, R. A. (1991).

Tumor supressor genes.
Science **254**, 1138-1146.

WEINTRAUB, S. J., PRATER, C. A. & DEAN, D. C. (1992).

Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element.
Nature **358**, 259-261.

WHITE, E., SPECTOR, D. & WELCH, W. (1988).

Differential distribution of the adenovirus E1A proteins and colocalization of E1A with the 70-kilodalton cellular heat-shock protein in infected cells.

J. Virol. **62**, 4153-4166.

WHITE, E. & CIPRIANI, R. (1990).

Role of adenovirus E1B proteins in transformation : altered organization of intermediate filaments in transformed cells that express the 19-kilodalton protein.

Mol. Cell. Biol. **10**, 120-130.

WHITE, E., CIPRIANI, R., SABBATINI, P. & DENTON, A. (1991).

Adenovirus E1B 19-kilodalton protein overcomes the cytotoxicity of E1A proteins.

J. Virol. **65**, 2968-2978.

WHITE, E., SABBATINI, P., DEBBAS, M., WOLD, W. S. M., KUSHER, D. I. & GOODING, L. R. (1992).

The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor α .

Mol. Cell. Biol. **12**, 2570-2580.

WHITTAKER, J. L., BYRD, P. J., GRAND, R. J. A. & GALLIMORE, P. H. (1984).

Isolation and characterization of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines.

Mol. Cell. Biol. **4**, 110-116.

WHYTE, P., BUCHKOVICH, K. J., HOROWITZ, J. M., FRIEND, S. H., RAYBUCK, M., WEINBERG, R. A. & HARLOW, E. (1988).

Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product.

Nature **334**, 124-129.

WHYTE, P., WILLIAMSON, N. M. & HARLOW, E. (1989).

Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins.

Cell **56**, 67-75.

WILSON, M. C. & DARNELL, J. E. Jr. (1981).

Control of mRNA concentration by differential cytoplasmic half-life adenovirus mRNA from transcription units 1A and 1B.

J. Mol. Biol. **148**, 231-251.

WU, B. J., HURST, H. C., JONES, N. C. & MORIMOTO, R. I. (1986).

The E1A 13S product of adenovirus 5 activates transcription of the cellular human HSP70 gene.

Mol. Cell. Biol. **6**, 2994-2999.

WU, L., ROSSER, D. S. E., SCHMIDT, M. C. & BERK, A. J. (1987).

A TATA box implicated in E1A transcriptional activation of a simple adenovirus 2 promoter.

Nature **326**, 512-515.

XU, H.-J., HU, S.-X., HASHIMOTO, T., TAKAHASHI, R. & BENEDICT, W. F. (1989).

The retinoblastoma susceptibility gene product: a characteristic pattern in normal cells and abnormal expression in malignant cells.

Oncogene **4**, 807-812.

YACIUK, P. & MORAN, E. (1991).

Analysis with specific polyclonal antiserum indicates that the E1A-associated 300-kDa product is a stable nuclear phosphoprotein that undergoes cell cycle phase-specific modification.

Mol. Cell. Biol. **11**, 2116-2124.

YACIUK, P., CARTER, M. C., PIPAS, J. M. & MORAN, E. (1991).

Simian virus 40 large-T antigen expresses a biological activity complementary to the p300-associated transforming function of the adenovirus E1A gene products.

Mol. Cell. Biol. **11**, 2116-2124.

YAMAGUCHI, M., HAYASHI, Y., HIROSE, F., SHIROKI, K. & MATSUKAGE, A. (1992).

Activation of the mouse DNA polymerase β gene promoter by adenovirus type 12 E1A proteins.

Nucl. Acids Res. **20**, 2321-2325.

YEE, S. P. & BRANTON, P. E. (1985a).

Analysis of the multiple forms of human adenovirus type-5 E1A polypeptides using an anti-peptide serum specific for the amino terminus.

Virology **146**, 315-322.

YEE, S. P. & BRANTON, P. E. (1985b).

Detection of cellular proteins associated with human adenovirus type 5 early region 1A polypeptides.

Virology **147**, 142-153.

YOSHIDA, K., NARITA, M. & FUJINAGA, K. (1989).

Binding site of HeLa cell nuclear proteins on the upstream region of adenovirus type 5 E1A gene.

Nucl. Acids Res. **17**, 10015-10034.

YU, D., SUEN, T.-C., YAN, D.-H., CHANG, L.-S. & HUNG, M.-C. (1990).

Transcriptional repression of the *neu* protooncogene by the adenovirus 5 E1A gene products.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**, 4499-4503.

ZERLER, B., ROBERTS, R. J., MATHEWS, M. B. & MORAN, E. (1987).

Different functional domains of the adenovirus E1A gene are involved in regulation of host cell cycle products.

Mol. Cell. Biol. **7**, 821-829.

ZHANG, S., MAK, S. & BRANTON, P. E. (1991).

Overexpression of the E1B 55-kilodalton (485R) protein of human adenovirus 12 appears to permit efficient transformation of primary baby rat kidney cells in the absence of the E1B 19-kilodalton protein.

J. Virol. **66**, 2302-2309.

ZINKERNAGEL, L. M. & DOHERTY, P. C. (1979).

MHC restricted cytotoxic T cells : studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction specificity, function and responsiveness.

Adv. Immunol. **27**, 51-177.

