

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE

N° d'ordre

**THESE**

présentée pour l'obtention du grade de:

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES  
ET TECHNOLOGIES DE LILLE**

**EN**

**SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

par

*ISABELLE HUVENT*



**ONCOGENICITE DES CELLULES TRANSFORMEES  
PAR L'ADENOVIRUS 12 :  
REGULATION D'UN PROMOTEUR DE CLASSE I DU CMH ET DOMAINES DES  
PROTEINES E1A IMPLIQUES DANS LA RESISTANCE A LA LYSE PAR LES  
CELLULES NK.**

Soutenue le 7 Janvier 1997 devant la Commission d'Examen:

Président:	Professeur J. P. BOHIN
Rapporteurs:	Professeur P.A. BOULANGER Professeur D. BLANGY
Examineurs:	Professeur E. BLAIR Docteur J. C. D'HALLUIN Docteur C. VERWAERDE

*A mes parents,  
A Christophe,  
A ma famille et mes amis,  
en témoignage de mon affection.*

*Que Messieurs les Professeurs J.P. BOHIN, P.A. BOULANGER, D. BLANGY, E. BLAIR et Madame le Docteur C. VERWAERDE soient assurés de ma profonde reconnaissance pour avoir accepté de juger les travaux présentés dans ce mémoire.*

*Le travail présenté dans ce mémoire a été commencé au laboratoire de Virologie Moléculaire, U. 233 INSERM à Lille puis continué à partir de Janvier 1992 à l'institut de Recherches sur le Cancer de Lille au sein du laboratoire d'Oncohématologie Moléculaire, U. 124 INSERM dirigé par le Dr M.H. Loucheux-Lefebvre. Il a bénéficié d'un financement de la part du Ministère de la Recherche et des Technologies mais aussi pendant les derniers mois de la part de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille.*

*Je remercie le Dr J.C. D'Halluin de m'avoir dirigée et soutenue tout au long de ce travail de recherches.*

*Mes remerciements s'adressent également au Dr M.H. Loucheux-Lefebvre et au Dr J.P. Kerckaert qui a pris la relève dans la direction de l'unité, pour m'avoir permis de continuer ce travail sur l'adénovirus dans les meilleures conditions possibles.*

*Je tiens aussi à témoigner toute ma sympathie au Dr M. Collyn-D'Hooghe pour les nombreux moments de détente partagés avec elle.*

*Mes plus vifs remerciements vont également à mes collègues de labeur et en particulier: Malika Hamdane et Marie-Hélène David-Cordonnier, leur soutien moral et leur amitié m'ont été très précieux.*

*Chantal Cousin et Alexi Kiss pour leur aide dans les études de cytotoxicité.*

*Toute ma reconnaissance va aussi à l'ensemble du personnel de l'unité 124 et de l'IRCL pour m'avoir bien souvent facilité la tâche.*

*Enfin, un grand merci à Marie-Claire Duvieuxbourg pour son excellent travail photographique et sa collaboration précieuse pour la frappe de ce manuscrit.*

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	4
INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES	10
ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	17
GENERALITES	23
I - Les Adénovirus	24
I - 1 - Historique - Classification des adénovirus humains.	24
I - 2 - Structure du virus.	26
I - 2 - a - Structure de la capside.	26
I - 2 - b - Le génome viral.	28
I - 3 - Les différents types d'interactions virus - cellules.	28
I - 3 - a - Le cycle lytique (ou permissif).	30
I - 3 - b - Le cycle abortif.	31
I - 3 - c - Le cycle transformant (ou intégratif).	31
II - La transformation cellulaire.	32
III - La région transformante.	35
III - 1 - La région E1A.	35
III - 1 - a - Le promoteur de E1A.	36
III - 1 - b - Les ARN messagers.	38
III - 1 - c - Les polypeptides de la région E1A.	39
III - 2 - La région E1B.	42
III - 2 - a - Promoteur et ARNm majeurs de E1B.	42
III - 2 - b - Polypeptides majeurs de E1B.	44
III - 2 - c - Fonctions des protéines E1B dans le cycle lytique et la transformation.	44

IV - Fonctions biologiques des protéines E1A.	45
IV - 1 - Contrôle de l'expression des gènes.	45
IV - 1 - a - Transactivation.	45
IV - 1 - b - Répression transcriptionnelle.	48
IV - 2 - Régulation du cycle cellulaire.	50
IV - 3 - Transformation cellulaire.	52
IV - 3 - a - Domaines des protéines E1A nécessaires à la transformation.	52
IV - 3 - c - Mécanisme de transformation.	53
IV - 4 - Oncogénicité.	58
V - Antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.	60
V - 1 - Restriction par le CMH.	62
V - 2 - Structure des antigènes du CMH-I.	62
V - 3 - Apprêtement et présentation de l'antigène.	62
V - 4 - Déterminants antigéniques de la région transformante des adénovirus.	64
V - 5 - Régulation de l'expression des antigènes du CMH-I.	64
V - 6 - Promoteur du gène H-2K <sup>b</sup> .	67
V - 6 - a - Eléments de contrôle.	67
V - 6 - b - Mécanismes de dérégulation induits par E1A d'Ad12.	73
VI - Cellules <i>natural killer</i> .	76
VI - 1 - Définition et caractéristiques.	76
VI - 2 - Récepteurs des cellules NK.	77
VI - 2 - a - Récepteurs impliqués dans l'activation.	77
VI - 2 - b - Récepteurs responsables de l'inhibition.	78
VI - 3 - Influence de E1A sur la détermination du phénotype cytolytique des cellules transformées.	81
RESULTATS	83
Etude de la régulation de la transcription du gène H-2K <sup>b</sup> dans les cellules transformées par l'Ad2 et l'Ad12.	85
I - Analyse préliminaire.	85
I - 1 - Analyse dans les cellules transformées.	85

I - 1 - a - Délétions dans le promoteur et constructions plasmidiques.	85
I - 1 - b - Etude fonctionnelle des différentes constructions plasmidiques.	87
I - 2 - Etude de l'activité du promoteur H-2K <sup>b</sup> en cotransfection dans les cellules non transformées.	89
I - 2 - a - Description des plasmides utilisés.	89
I - 2 - b - Etude fonctionnelle en cotransfection.	89
II - Analyse de la région activatrice (-365 à -61).	91
II - 1 - Obtention des mutants de délétion.	91
II - 2 - Contribution respective des différentes séquences à l'activité stimulatrice de la région proximale (-365 à -61).	91
II - 3 - Analyse détaillée de la séquence (-365 à -254).	93
II - 3 - a - Influence de la séquence XbaI-Sau3AI sur l'activité d'un promoteur hétérologue.	93
II - 3 - b - Analyse par retard en gel.	95
II - 3 - c - Analyse de la région (-365 à -254) par expériences de compétition.	95
II - 4 - Analyse détaillée de la séquence (-254 à -61).	98
II - 4 - a - Influence dans le contexte d'un promoteur hétérologue.	98
II - 4 - b - Analyse par retard en gel.	100
II - 4 - c - Conséquences d'un traitement à l'acide rétinoïque.	100
III - Etude de la région localisée entre -653 et -365.	103
III - 1 - Stratégies de clonage utilisées.	103
III - 2 - Etude fonctionnelle des mutants de délétion.	103
III - 3 - Influence de ces séquences dans le contexte d'un promoteur basal hétérologue.	105
III - 4 - Analyse par retard en gel.	107
IV - Etude de la région (-653 à -365) par mutagenèse dirigée.	109
IV - 1 - Influence des mutations introduites dans les sites consensus pour les facteurs de transcription Sp1 et E2A.	109
IV - 2 - Etude de l'influence du site potentiel d'initiation de la transcription par mutagenèse.	111
IV - 3 - Contribution de la structure potentielle en épingle à cheveux à l'activité transcriptionnelle du fragment -653 à -365.	114
IV - 3 - a - Etude fonctionnelle par mutagenèse dirigée.	114
IV - 3 - b - Analyse par retard en gel.	115

IV - 3 - c - "Southwestern blotting".	117
V - Analyse de la région la plus en amont dans le promoteur (-2015 à -653).	119
V - 1 - Obtention des différentes constructions hybrides.	119
V - 2 - Contribution respective des différentes séquences à l'activité inhibitrice de la région distale.	119
Etude du phénomène de résistance/sensibilité des cellules transformées par les adénovirus à la lyse par les cellules NK.	124
I - Détermination des domaines de E1A d'Ad12 impliqués dans le phénomène de résistance des cellules transformées à la lyse par les cellules NK.	124
I - 1 - Etude préliminaire.	124
I - 2 - Analyse par "Northern blotting".	125
I - 3 - Essais de cytotoxicité sur les lignées hybrides.	130
II - Sensibilité des cellules transformées par les adénovirus entériques à la lyse par les cellules NK.	133
DISCUSSION	135
I - L'activité du promoteur H-2K <sup>b</sup> est régulée par de nombreux éléments dans les cellules transformées.	136
II - Deux domaines des protéines E1A confèrent la résistance à la lyse par les cellules NK.	146
CONCLUSION	150
MATERIELS ET METHODES	152
I - Techniques électrophorétiques appliquées à l'ADN.	153
I - 1 - Electrophorèse en gel d'agarose.	153
I - 1 - a - Séparation électrophorétique.	153
I - 1 - b - DEAE - élution.	153
I - 2 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide.	153
I - 2 - a - Séparation électrophorétique.	153

I - 2 - b - Isolement et purification de fragments d'ADN contenus dans les gels de polyacrylamide.	154
II - Marquage des sondes d'ADN à l' $\alpha$ $^{32}\text{P}$ .	154
II - 1 - Marquage en 5' des fragments de restriction.	154
II - 2 - Marquage en 5' des oligonucléotides double brin.	155
III - Culture cellulaire.	155
III - 1 - Culture primaire et caractéristiques des cellules non transformées utilisées.	155
III - 2 - Caractéristiques et origine des lignées de cellules transformées utilisées.	156
III - 3 - Transfection des cellules.	156
III - 4 - Dosage de l'activité Chloramphénicol Acétyl Transférase.	158
IV - Transformation bactérienne.	158
IV - 1 - Souches bactériennes.	158
IV - 2 - Milieux de culture et milieux de conservation.	159
IV - 3 - Clonage moléculaire.	160
IV - 3 - a - Vecteurs de clonage.	160
IV - 3 - b - Digestions enzymatiques des plasmides et clonage des fragments d'ADN.	161
IV - 4 - Mutagenèse dirigée par oligonucléotide.	161
IV - 4 - a - Préparation de la matrice d'ADN simple brin.	162
IV - 4 - b - Réaction de mutagenèse.	162
IV - 5 - Transformation bactérienne.	163
IV - 6 - Sélection des clones recombinants.	164
IV - 6 - a - Méthode de dénaturation par la chaleur.	164
IV - 6 - b - "Mini - préparation".	164
IV - 6 - c - Séquençage de l'ADN plasmidique.	164
IV - 7 - Purification de plasmides en gradient de chlorure de césium.	166
V - Interactions ADN - protéines	166
V - 1 - Préparation d'extrait de protéines nucléaires.	166
V - 2 - Retard en gel.	168
V - 3 - "Southwestern blotting".	169
V - 3 - a - Electrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide - SDS.	169

V - 3 - b - Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose.	169
V - 3 - c - Incubation sonde - protéine(s).	169
VI - "Northern blotting".	170
VI - 1 - Extraction des ARN totaux.	170
VI - 2 - Electrophorèse en gel d'agarose et transfert sur membrane.	171
VI - 3 - Synthèse de la sonde et hybridation avec la membrane.	171
VII - Techniques immunologiques.	172
VII - 1 - Dosage des antigènes cellulaires de surface.	172
VII - 2 - Essais de cytotoxicité.	173
VII - 2 - a - Marquage des cellules cibles.	173
VII - 2 - b - Préparation d'une fraction riche en cellules NK.	173
VII - 2 - c - Coculture des lymphocytes de rate et des cellules cibles marquées.	174
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>176</b>

## INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES

### GENERALITES

- Tableau I : Classification des adénovirus humains avec leurs principales caractéristiques.
- Figure G1: Représentation schématique de l'adénovirus de type 2.
- Figure G2: Génome de l'Ad2 et ARNm.
- Figure G3: Structure et fonctions de la région transformante E1 de l'adénovirus de type 2.
- Figure G4: Promoteur de la région E1A d'Ad2.
- Figure G5: ARNm et protéines de la région E1A.
- Figure G6: Protéines majeures codées par la région E1A.
- Figure G7 : Modèles de transactivation par E1A.
- Figure G8: Protéines et complexes protéiques ciblés par E1A.
- Figure G9 : Fonctions des différents domaines de E1A.
- Figure G10 : Modèle de répression de la fonction co-activatrice de la p300 par E1A.
- Tableau II : Caractéristiques des cellules transformées par les adénovirus humains.
- Figure G11 : Représentation schématique de l'interaction des antigènes du CMH de classe I présentés par la cellule cible avec le récepteur du lymphocyte T cytotoxique.
- Figure G12 : Relation entre protéasome, transporteurs de peptides et molécules du CMH-I.
- Figure G13 : Représentation schématique du promoteur H-2K<sup>b</sup> et cibles de la régulation négative par E1A de l'Ad12.
- Figure G14 : Eléments de contrôle du promoteur H-2K<sup>b</sup>
- Figure G15: Récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK.
- Tableau III: Récepteurs NK humains et murins des molécules du CMH de classe I.

### RESULTATS

- Figure R1: Séquence nucléotidique du promoteur H-2K<sup>b</sup>.
- Figure R2: Analyse préliminaire de l'activité transcriptionnelle du promoteur H-2K<sup>b</sup>.
- Figure R3: Etude fonctionnelle du promoteur H-2K<sup>b</sup> en cotransfection dans les cellules NRK49F.

- Figure R4: Histogramme des activités CAT obtenues avec les mutants de délétion dans la région activatrice (-365 à -61).
- Figure R5: Influence des séquences composant la région proximale (-365 à -61) dans le contexte d'un promoteur basal hétérologue.
- Figure R6: Analyse de la séquence *XbaI-Sau3AI* (nt -365 à -254) par retard en gel.
- Figure R7: Mise en évidence d'interactions de protéines nucléaires avec la séquence *Sau3AI-Sau3AI* (nt -254 à -61) par retard en gel.
- Figure R8: Histogramme des activités CAT obtenues avec les mutants de délétion dans la région - 653 à -365.
- Figure R9: Influence des séquences comprises entre -653 et -365 dans le contexte d'un promoteur basal hétérologue.
- Figure R10: Analyse par retard en gel de la séquence *Sau3AI-NlaIV* (nt -585 à -472).
- Figure R11: Séquence nucléotidique et "signatures" de la région promotrice -653 à -365.
- Tableau IV: Oligonucléotides utilisés dans cette étude.
- Figure R12: Influence des mutations introduites dans la séquence -653 à -365 clonée en amont d'un promoteur hétérologue.
- Figure R13: Analyse par retard en gel de la séquence impliquée dans la structure en épingle à cheveux.
- Figure R14: Mise en évidence d'interactions spécifiques de protéines nucléaires avec les sondes H2K et 18 par la technique du *Southwestern blotting*.
- Figure R15: Influence des délétions introduites dans la région distale du promoteur H-2K<sup>b</sup>.
- Figure R16: Analyse par retard en gel des oligonucléotides 13 et 14 hybridés correspondant à la séquence (-1735 à -1696) contenant l'un des motifs CAA répété décrits par OZAWA *et al.* (1993).
- Tableau V: Pourcentage de cellules transformées résistantes à la lyse par les cellules NK.
- Figure R17: Degré de sensibilité des lignées transformées par chacune des protéines majeures de E1A d'Ad2 ou d'Ad12 à la lyse par les cellules NK.
- Figure R18: Représentation schématique des plasmides exprimant les protéines E1A hybrides entre l'Ad2 et l'Ad12.
- Figure R19: Comparaison des séquences en acides aminés de la plus grande des protéines E1A d'Ad12 et d'Ad2 et sites de restriction créés par mutagenèse dirigée au niveau de l'ADNc 13S d'Ad12.

- Figure R20: Etude comparative de l'expression des régions E1A hybrides dans les cellules transformées par la technique du *Northern blotting*.
- Figure R21: Résistance des cellules BRK transformées par les régions E1A hybrides entre l'Ad2 et l'Ad12 à la lyse par les NK.
- Figure R22: Degré de sensibilité des lignées transformées par les adénovirus entériques à la lyse par les cellules NK.

## **DISCUSSION**

- Figure D1: Eléments régulateurs de la transcription du promoteur H-2K<sup>b</sup> dans les cellules transformées par les adénovirus 2 et 12.
- Figure D2: Alignement des protéines E1A de différents sérotypes.

## **MATERIELS ET METHODES**

- Tableau VI: Lignées de cellules BRK transformées par les adénovirus humains.

## ABREVIATIONS

### *Virus et termes viraux*

Ad :	Adénovirus humain.
HPV :	Human Papilloma Virus.
HSV :	Herpes Simplex Virus.
MMTV :	Mouse Mammary Tumor Virus.
SA :	Simian Adenovirus.
SV40 :	Simian Virus 40. Papovavirus dont l'hôte naturel est le singe.
LTR :	Long Terminal Repeat.

### *Cellules*

AGMK :	African Green Monkey Kidney.
BRK :	Baby Rat Kidney, cellules primaires de rein de rat Wistar nouveau-né.
CTL :	Cytotoxic T Lymphocyte.
CV1 :	Lignée établie de cellules de rein de singe vert africain.
HEK :	Human Embryonary Kidney. Lignée établie de cellules embryonnaires de rein humain.
HEK-293 :	Cellules HEK transformées par les 11,5 % de l'extrémité gauche du génome de l'Ad5 (nt 270-4123).
HeLa :	Lignée établie de cellules de carcinome du col utérin.
KB :	Lignée établie de cellules de carcinome du plancher buccal humain.
NIH 3T3:	Lignée établie de cellules embryonnaires de souris Swiss.
NK:	Natural Killer.
NRK:	Normal Rat Kidney.
NRK-49F:	Lignée établie de cellules NRK (cellules de rein de rat non transformées).

*Gènes*

<i>myb</i> :	Oncogène de la leucémie myoblastique aviaire.
<i>myc</i> :	Oncogène de la leucémie myélo-monocytaire.
<i>cat</i> :	Gène d'origine procaryote codant la chloramphénicol acétyl transférase.
<i>Ha-ras</i> :	Oncogène du sarcome murin de Harvey.
<i>tk</i> :	Gène codant pour la thymidine kinase.

*Réactifs*

BBØ :	Bleu de bromophénol.
Bluo - Gal :	5-bromo-4-chloro-3-indoyle-β-D-galactopyranoside.
BrEt :	Bromure d'éthidium.
BSA :	Sérum albumine bovine.
CsCl :	Chlorure de césium.
DEPC :	Diéthyl pyrocarbonate.
DTT :	Dithiothréitol.
EDTA :	Acide éthylène-dinitrilo-tétra acétique.
EGTA :	Acide éthylène glycol bis (2-aminoéthylether) -N, N, N', N'-tétra acétique.
Hépès :	Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-éthanesulfonique.
IPTG :	Isopropyl-β-D galactopyranoside.
MOPS :	Acide 3-[N-Morpholino] propane-sulfonique.
PEG :	Polyéthylène glycol.
PMSF :	Fluorure de phénylméthylsulfonyle.
SDS :	Dodécyl sulfate de sodium.
TCA :	Acide trichloracétique.
TEMED :	N, N, N', N'-tetraméthyl éthylène diamine.
TRIS :	Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane.

*Unités*

Ci :	Curie.
cpm :	Coups par minute.
g :	Accélération de la pesanteur.

h :	Heure.
kDa :	Kilodalton.
mA :	Milliampère.
MM :	Masse moléculaire.
mn :	Minute.
nt :	Nucléotide.
pb :	Paire de bases.
pfu :	Plaques forming unit.
S :	Coefficient de Svedberg.
U :	Unité.
u.g. :	Unité génomique (1 u.g. = 360 pb).
V :	Volt.
V/V :	Volume/Volume.
P/V :	Poids/Volume.

#### *Autres*

aa :	Acide aminé.
ADN :	Acide désoxyribonucléique.
ADNc :	ADN complémentaire.
Ag :	Antigène.
AMPC :	AMP cyclique, adénosine 3', 5'-monophosphate.
ARN :	Acide ribonucléique.
ARNm :	ARN messenger.
ATP :	Adénosine triphosphate.
C :	Cytosine.
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité.
CMH-I:	CMH de classe I.
CMH-II:	CMH de classe II.
dATP :	Désoxyadénosine triphosphate.
dCTP :	Désoxycytidine triphosphate.
ddNTP :	Didésoxynucléotide triphosphate.
dGTP :	Désoxyguanosine triphosphate.

dNTP :	Désoxynucléotide triphosphate.
dTTP :	Désoxythymidine triphosphate.
E :	Early, précoce.
G :	Guanine.
Ig :	Immunoglobuline.
IL-2 :	Interleukine 2.
L :	Late, tardif.
pI :	Point isoélectrique.
R :	Résidu.
RNase :	Ribonucléase.
SMC:	Site multiple de clonage.
SVF :	Sérum de veau foetal.
UV :	Ultra violet.
Ø :	Diamètre.

## **INTRODUCTION**

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

***Publications:***

LECLERE, V., HUVENT, I., VERWAERDE, P., COUSIN, C. & D'HALLUIN, J.C. (1993).  
Comparison between E1A gene from oncogenic and non oncogenic adenoviruses in cellular transformation.

*Arch. Virol.* 132, 343-357.

HUVENT, I., COUSIN, C., KISS, A., BERNARD, C & D'HALLUIN, J.C. (1996).  
Susceptibility to natural killer cells and down regulation of MHC class I expression in adenovirus 12 transformed cells are regulated by different E1A domains.

*Virus Res.* 45, 123-134.

HUVENT, I. & D'HALLUIN, J.C.

Some different elements are involved in the regulation of the MHC class I gene expression in adenovirus transformed cell lines.

Article en préparation.

***Communications orales:***

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

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

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

HUVENT, I., COUSIN, C. & D'HALLUIN, J.C.

Régulation de l'expression du gène H-2K<sup>b</sup> dans les cellules transformées par les adénovirus.

*Réunion conjointe des Sociétés Françaises d'Immunologie et du Cancer, Marseille, 16-17 Décembre 1993.*

**HUVENT, I., COUSIN, C. & D'HALLUIN, J.C.**

Inhibition de l'expression des antigènes de classe I du CMH dans les cellules transformées par les adénovirus oncogéniques.

*XXI<sup>e</sup> Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire, Université de Reims Champagne-Ardenne, 5-8 Juillet 1994.*

**HUVENT, I., KISS, A. & D'HALLUIN, J.C.**

Susceptibility to natural killer cells and down regulation of MHC class I expression in cells transformed with the oncogenic adenovirus 12 are regulated by different E1A domains.

*Symposium on Biomedical diagnostic and pronostic indicators, Boston, MA, 11-13 Décembre 1994.*

***Communications par affiches:***

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

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

*20th FEBS meeting, Budapest, Août 1990.*

**D'HALLUIN, J.C., COUSIN, C., LECLERE, V. & 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. & 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. & 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. & D'HALLUIN, J.C.**

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

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

La transformation cellulaire est un processus séquentiel impliquant plusieurs oncogènes responsables de l'immortalisation puis de la transformation complète. Le développement d'une tumeur fait intervenir de nombreuses étapes supplémentaires, en particulier la résistance des cellules tumorales aux mécanismes de rejet par le système immunitaire. La réponse immune à médiation cellulaire comprend au moins deux composants distincts. Le premier est spécifique et fait intervenir les lymphocytes T cytotoxiques CD<sup>8+</sup>, tandis que l'autre impliquant les cellules NK s'avère être non spécifique. La littérature médicale décrit un grand nombre d'exemples de tumeurs échappant au contrôle de l'hôte. La recherche d'un modèle expérimental est donc fondamentale pour étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de la tumorigenèse. Les familles d'adénovirus et de papillomavirus humains sont particulièrement intéressantes pour étudier ces mécanismes puisqu'elles contiennent des sérotypes aux propriétés oncogéniques différentes. Ainsi l'HPV 16 (Human PapillomaVirus 16) est associé à des cancers cervicaux, alors que le sérotype 6 n'induit pas de tumeurs malignes. Cette différence d'oncogénicité serait le résultat des propriétés intrinsèques des protéines E7. Il semble que dans le cas des papillomavirus les plus tumorigènes, les cellules transformées échappent au contrôle exercé par les cellules NK. Les adénovirus présentent un avantage majeur par rapport aux papillomavirus puisqu'ils permettent de disposer d'un modèle expérimental. En effet, les adénovirus humains transforment uniquement les cellules de rongeurs. Cependant, si tous les sérotypes sont transformants *in vitro*, seuls ceux qui appartiennent aux sous-groupes A et B induisent des tumeurs chez les animaux immunocompétents. Cette différence est liée aux propriétés des protéines E1A qui sont les équivalents de la protéine E7 des HPV. La grande protéine E1A des adénovirus oncogéniques est responsable de l'inhibition de l'expression des antigènes de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité, permettant ainsi aux cellules transformées d'échapper aux lymphocytes T cytotoxiques. De plus, elle confère aux cellules transformées une résistance à la lyse par les cellules NK.

Comme l'inhibition de l'expression des antigènes de classe I du CMH a lieu au niveau transcriptionnel, nous nous proposons d'étudier la régulation du promoteur d'un gène du CMH de classe I, dans les cellules transformées par des adénovirus oncogéniques et non oncogéniques. Nous identifierons ainsi dans une première étape les séquences responsables de l'inhibition de

l'expression du gène, ce qui nous permettra alors d'identifier éventuellement les facteurs de transcription impliqués.

Le domaine de la protéine E1A responsable de l'inhibition de l'expression des antigènes de classe I a été identifié. Il s'agit du domaine C-terminal de la région conservée 3 (CR3). Il nous a semblé intéressant de délimiter également le ou les domaines de E1A qui permettent aux cellules transformées par les adénovirus oncogéniques d'échapper à la lyse par les cellules NK.

## **GENERALITES**

## I - Les Adénovirus

### I - 1 - Historique - Classification des adénovirus humains.

Décélés la première fois dans des cultures de tissu adénoïdien humain en 1953 par ROWE *et al.*, les adénovirus sont des virus animaux regroupant plus d'une centaine de sérotypes répartis dans différentes espèces (humaine, simienne, bovine, équine, canine, aviaire...).

Les mieux caractérisés à l'heure actuelle sont les adénovirus humains (Ad). Plus de 45 sérotypes ont été à ce jour répertoriés. Ceux-ci sont à l'origine de pathologies nombreuses et diverses, affectant essentiellement les muqueuses respiratoires et oculaires ainsi que le tractus urinaire (pharyngite, bronchopneumonie, kératoconjonctivite...).

Il semble que les adénovirus soient responsables d'environ 30 % des affections respiratoires (HORWITZ, 1990). Certains sérotypes tels les sérotypes dits "fastidieux" (Ad40, Ad41) sont quant à eux la cause d'affections digestives graves (gastroentérites) (KIDD *et al.*, 1983), ceci principalement dans les pays en voie de développement.

En 1962, TRENTIN *et al.* mirent en évidence la capacité de certains sérotypes (Ad12 par exemple) à induire des tumeurs malignes chez le hamster nouveau-né. Ce fut la première démonstration du pouvoir oncogène *in vivo* d'un virus humain à ADN sur un animal. Cette propriété parmi quelques autres a permis d'affiner une classification préalablement établie à partir de critères immunologiques (pouvoir d'héماغglutination d'érythrocytes de rat et de singe Rhésus) (HUEBNER *et al.*, 1965). C'est ainsi qu'actuellement ces différents sérotypes se trouvent répartis en six sous-groupes (de A à F) intégrant à la fois des critères biochimiques, biologiques et pathologiques (Tableau I).

Sont retrouvés le plus fréquemment parmi ceux-ci :

- les données antigéniques (groupe d'héماغglutination)
- le contenu en bases G + C du génome. En 1965, PINA et GREEN ont montré que le pouvoir oncogène des adénovirus humains augmente quand la proportion en bases G+C diminue et se rapproche de celle des cellules hôtes (42 à 44%).

- la longueur de la fibre
- le degré d'homologie de leur ADN
- le pouvoir oncogène chez le hamster nouveau-né

Sous-groupe	Sérotypes	Degré d'homologie de l'ADN		Teneur en bases G+C	Longueur de la fibre (nm)	Efficacité de transformation	Oncogénicité chez le hamster nouveau-né	Groupe d'héماغglutination
		intra sous-groupe	inter sous-groupe					
A	12, 18, 31.	48-69%	8-20%	Basse: 47-49%	28-31	Elevée	Forte	IV (faible agglutination)
B	3,7,11,14...	89-94%	9-20%	Moyenne: 49-52%	9-16 *	Elevée	Faible	I (agglutination complète GR singe)
C	1, 2, 5, 6.	99-100%	10-16%	Haute: 57-59%	23-37 *	Très élevée	Nulle	III (agglutination partielle GR rat)
D	8,9,10,13...	94-99%	4 -17%	Haute: 57-59%	12-13	Moyenne	Nulle (sauf Ad9)	II (agglutination complète GR rat)
E	4.		4 -23%	Haute: 57%	17	Moyenne	Nulle	III (agglutination partielle GR rat)
F	40, 41.	62-69%	15%	Moyenne: 49-52%	28-33 18-20 #	Moyenne	Nulle	IV (faible agglutination)

**Tableau I** : Classification des adénovirus humains avec leurs principales caractéristiques.  
D'après PETERSON et WADELL (1985), modifié.

(\*) Longueurs des fibres Ad2 et Ad3 réactualisées (RUIGROK *et al.*, 1990).

(#) Les Ad du sous-groupe F possèdent deux fibres (KIDD *et al.*, 1993).

Ainsi les adénovirus du sous-groupe A incluant les sérotypes 12, 18 et 31 sont hautement oncogènes, alors que ceux du sous-groupe B (Ad3, 7, 11...) ne le sont qu'à un certain degré (apparition de tumeurs seulement chez quelques animaux et de façon retardée).

Les adénovirus appartenant aux autres sous-groupes (tel le sous-groupe C regroupant les sérotypes 1, 2, 5 et 6) sont quant à eux non-oncogènes. Cependant, bien qu'avec des efficacités différentes (BERNARDS *et al.*, 1982), les virus et l'ADN de tous les sérotypes peuvent transformer *in vitro* des cellules de rongeurs en culture primaire ou établie.

Parmi les sérotypes de ces différents sous-groupes, certains ont été ou sont plus particulièrement étudiés. C'est le cas de l'adénovirus de type 12 qui constitue le modèle de l'adénovirus à caractère oncogène et qui sera au centre de notre étude. Ce sérotype est à opposer aux sérotypes 2 et 5 qui représentent quant à eux les prototypes de virus transformants mais non-oncogènes.

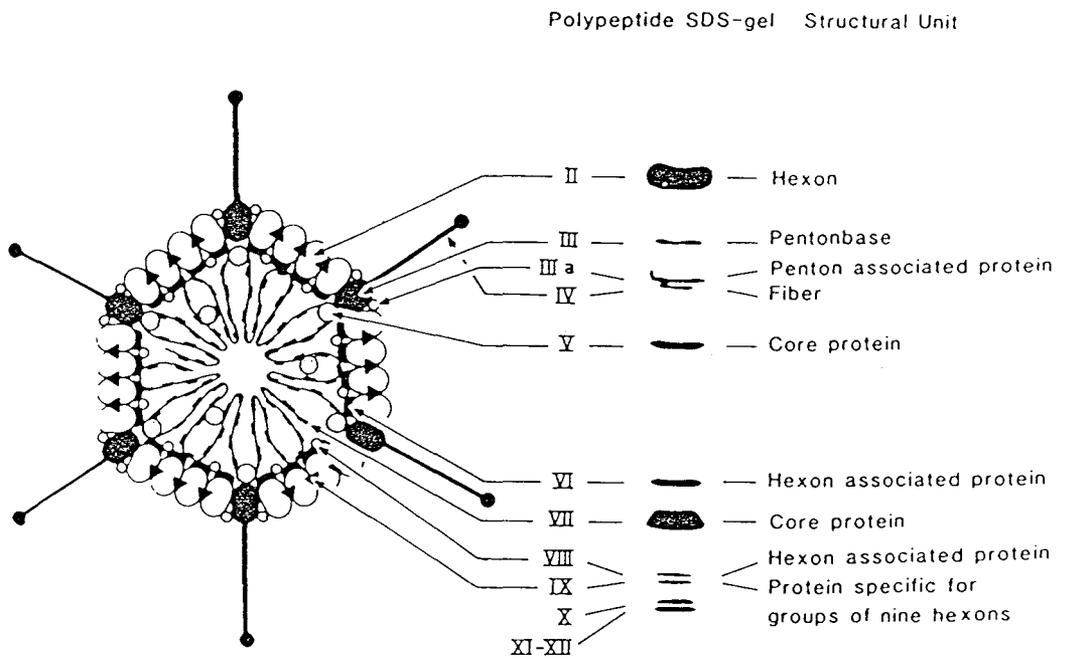
En ce qui concerne les sérotypes 40 et 41, ceux-ci sont depuis quelques années l'objet d'études plus approfondies.

## **I - 2 - Structure du virus.**

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin, possédant une capsid de symétrie icosaédrique et non enveloppés.

### ***I - 2 - a - Structure de la capsid.***

La capsid virale dont la taille varie de 65 à 80 nm (fig. G1), comprend 252 capsomères formant une structure en icosaèdre. Ceux-ci se subdivisent en 240 hexons (12 hexons édifiant chacune des 20 faces de la structure) et en 12 pentons se trouvant à chacun des sommets de l'icosaèdre. Chaque penton est constitué d'une base et d'une projection apicale appelée fibre. Dans le cas des adénovirus du sous-groupe F (Ad40 et Ad41), deux fibres différentes peuvent coexister au niveau d'une même capsid en s'attachant à des bases de penton distinctes (KIDD *et al.*, 1993).



**Figure G1:** Représentation schématique de l'adénovirus de type 2.

(D'après PERSSON et PHILIPSON, 1982).

### ***I - 2 - b - Le génome viral.***

Le génome viral est constitué d'un ADN bicaténaire linéaire d'environ 36000 paires de nucléotides (fig. G2).

Cet ADN est protégé et compacté à l'intérieur de la capsidie par trois protéines virales basiques riches en arginine de type histone appelées pV, pVII et  $\mu$ .

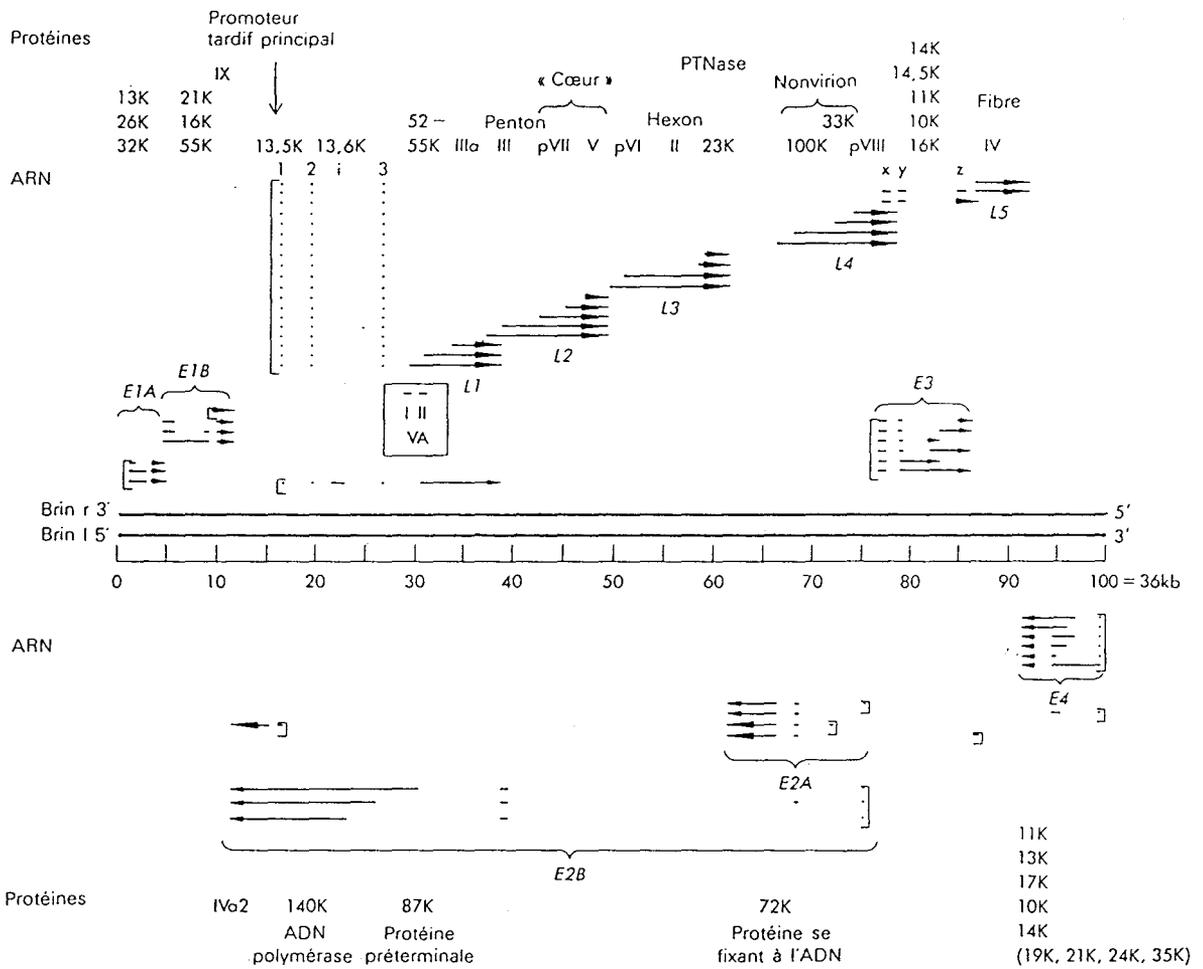
Cet ensemble ADN-protéines constitue le nucléoïde viral ou "core" et possède une organisation similaire à celle de la chromatine des cellules eucaryotes.

Outre ces protéines associées à l'ADN viral, se trouve à chaque extrémité de celui-ci une protéine de 55 kDa appelée protéine terminale (TP) liée de façon covalente et dont le précurseur (pTP) est impliqué dans l'initiation de la réplication.

Le génome de l'adénovirus divisé par convention en 100 unités génomiques (u.g) est caractérisé par l'existence de régions dites précoces (E) et tardives (L) en fonction de leur expression durant le cycle viral.

### **I - 3 - Les différents types d'interactions virus - cellules.**

Les virus, de par leur structure simple et leur génome réduit, sont des parasites dépendants des systèmes enzymatiques des cellules qu'ils infectent. En ce qui concerne l'adénovirus, les interactions de la particule virale avec une cellule sont très diverses et ne conduisent pas toujours à une production virale efficace. Ainsi, après avoir pénétré dans la cellule via des récepteurs membranaires spécifiques, la particule virale migre vers le noyau où l'ADN est injecté sous forme de nucléoïde. Une fois dans le noyau, trois types de cycles viraux sont envisageables en fonction de la nature de la cellule hôte et du sérotype du virus: le cycle lytique, le cycle abortif et le cycle transformant. Les travaux présentés dans ce mémoire reposant sur le modèle des cellules transformées par les adénovirus, ce dernier fera l'objet d'une attention toute particulière.



**Figure G2:** Génome de l'Ad2 et ARNm.

Les grandes têtes de flèches indiquent les messagers tardifs et les petites, les messagers précoces.

Les crochets regroupent les messagers partageant le même promoteur.

(D'après, TOOZE, 1980).

### ***I - 3 - a - Le cycle lytique (ou permissif).***

Cette interaction est dite productive car elle correspond au cycle de multiplication du virus. Il en résulte la lyse de la cellule hôte et une progéniture virale abondante. C'est le cas lorsque les adénovirus humains sont en présence de cellules hôtes sensibles et permissives (cas des cellules humaines HeLa et KB). En effet, exposées à l'adénovirus, les cellules se définissent d'une part par leur sensibilité, d'autre part par leur permissivité. Le premier caractère dépend de leur capacité à assurer l'attachement, la pénétration et la décapsidation du virus (une cellule non sensible peut toutefois être "infectée" par de l'acide nucléique viral). Le second caractère est fonction de leur aptitude à permettre ou non la réplication de l'ADN viral et la production de virions. Le degré de sensibilité et/ou de permissivité des cellules provenant d'une même espèce peut varier selon le type cellulaire, l'état physiologique des cellules (état de différenciation), le nombre de passages et les conditions d'entretien *in vitro*.

La durée de ce cycle est d'environ 40 heures. Il existe un contrôle temporel de l'expression génétique dont l'acide nucléique viral est porteur. Ainsi, schématiquement, trois phases se distinguent:

- la phase précoce: durant cette phase, sont retrouvées certaines étapes communes aux trois cycles. En effet, celle-ci commence dès la pénétration de l'acide nucléique viral au sein du noyau. Elle dure approximativement 6 heures et englobe tous les événements précédant la réplication de l'ADN viral. Au cours de cette phase, quatre régions précoces sont transcrites par l'ARN polymérase II cellulaire selon les deux orientations du génome viral (fig. G2). Ainsi la région E1 (subdivisée en régions E1A et E1B) et la région E3 sont transcrites à partir du brin droit ("r") de l'ADN tandis que les régions E2 (E2A et E2B) et E4 le sont à partir du brin gauche ("l"). Chacune de ces régions correspond à une unité de transcription, utilisant le même promoteur, mais pouvant générer différents ARN messagers et différentes protéines par le jeu d'épissages multiples et de sites de polyadénylation variables. Les protéines précoces synthétisées sont impliquées essentiellement dans la régulation de l'expression des gènes viraux et cellulaires et dans la réplication de l'ADN viral mais interviennent également pour protéger les cellules infectées de la réponse immunitaire (cas de certaines protéines dont la synthèse est dirigée par l'unité E3).

- la phase intermédiaire: elle correspond à la réplication de l'ADN viral qui marque le passage de la phase précoce à la phase tardive. Après le démarrage de la réplication, plusieurs régions du génome sont transcriptionnellement actives. En plus des gènes précoces, deux nouvelles unités de transcription sont activées: celles qui codent le polypeptide IX et le polypeptide IVa2.

- la phase tardive: elle est caractérisée par l'arrêt de la synthèse des protéines cellulaires et par la traduction préférentielle des ARNm viraux, conduisant à la production des protéines de structure et aux protéines nécessaires à l'assemblage du virus. Les messagers de ces protéines sont transcrits à partir du même promoteur (le MLP pour *Major Late Promotor*) situé sur le brin "r". A partir de celui-ci, un seul transcrit primaire est formé. Celui-ci est épissé pour donner 5 familles d'ARNm (dénommées L1, L2, L3, L4 et L5) conduisant à la formation d'au moins onze polypeptides distincts. A l'issue de cette phase, de nouvelles particules infectieuses sont produites et le cycle lytique est terminé lorsque les virions lysent la cellule hôte.

### ***I - 3 - b - Le cycle abortif.***

Au contraire du cycle précédemment évoqué qui s'accompagne de la production d'une progéniture virale, ce cycle est caractérisé par l'absence de production de virions infectieux et en général par la survie de la cellule hôte. L'information génétique de l'adénovirus n'est exprimée que partiellement et le blocage peut intervenir à différents niveaux selon la nature de la cellule hôte et le sérotype utilisé:

- au niveau de la maturation des messagers tardifs: en particulier avec les cellules de singe AGMK infectées par les adénovirus humains.

- au niveau de la réplication de l'ADN viral: il en est ainsi des adénovirus appartenant aux sous-groupes A et B incapables de répliquer leur ADN dans les cellules de singe CV1.

- au niveau de l'expression des gènes précoces.

### ***I - 3 - c - Le cycle transformant (ou intégratif).***

Infectées par l'adénovirus, les cellules non permissives, plus rarement les cellules permissives, peuvent subir une transformation. Ainsi, tous les sérotypes d'adénovirus humains

sont capables de transformer, *in vitro*, des cellules primaires (fibroblastes ou cellules épithéliales) de rein de rat ou de hamster nouveaux-nés (FREEMAN *et al.*, 1967). La transformation est généralement définie par l'acquisition héréditaire de propriétés nouvelles qui s'accompagne d'une altération du mécanisme de la croissance cellulaire. En effet, les cellules transformées par les adénovirus subissent un changement morphologique, dû aux modifications du cytosquelette, se manifestant, par exemple dans le cas de fibroblastes transformés, par un aspect plus arrondi des cellules. De même, suite à la perte d'inhibition de contact, elles ont tendance à adopter une densité de population cellulaire anormalement élevée avec possibilité de formation de foyers. Leur besoin en sérum est également réduit. Enfin, la transformation se traduit par l'immortalisation de la culture cellulaire.

Cette interaction met en jeu l'intégration stable d'une partie du génome viral à des positions aléatoires dans l'ADN chromosomique.

En effet, trois observations démontrent que l'information nécessaire et suffisante à la transformation est contenue entièrement dans les onze premiers pour cent du génome. Cette région correspond à la région E1 contenant les unités de transcription E1A et E1B (fig. G3):

- Tout d'abord, les lignées cellulaires viro-transformées contiennent et expriment toujours les gènes E1A et E1B, et certaines ne renferment que ces régions (GRAHAM and VAN DER EB, 1973a).

- Ensuite, la transfection de cellules de rongeur *in vitro* avec de l'ADN a montré que des fragments ne contenant que les gènes E1A et E1B sont suffisants à l'induction de la transformation (DIJKEMA *et al.*, 1979).

- Enfin, des virus mutants avec des altérations dans les gènes E1A ou E1B sont généralement défectifs pour la transformation.

## **II - La transformation cellulaire.**

La transformation par les Ad peut être considérée comme un processus en deux étapes dans lequel les gènes de la région E1 sont impliqués.

Ce processus ressemble à la situation rencontrée dans les cancers spontanés chez les animaux qui requièrent eux aussi l'activité concertée de deux, ou éventuellement plus, oncogènes cellulaires. Les cellules cancéreuses diffèrent en effet des cellules normales par deux aspects fondamentaux. D'une part, il y a perte du contrôle génétique de la durée de vie de ces cellules, ce qui résulte en leur immortalité, d'autre part ces cellules sont plus ou moins insensibles aux

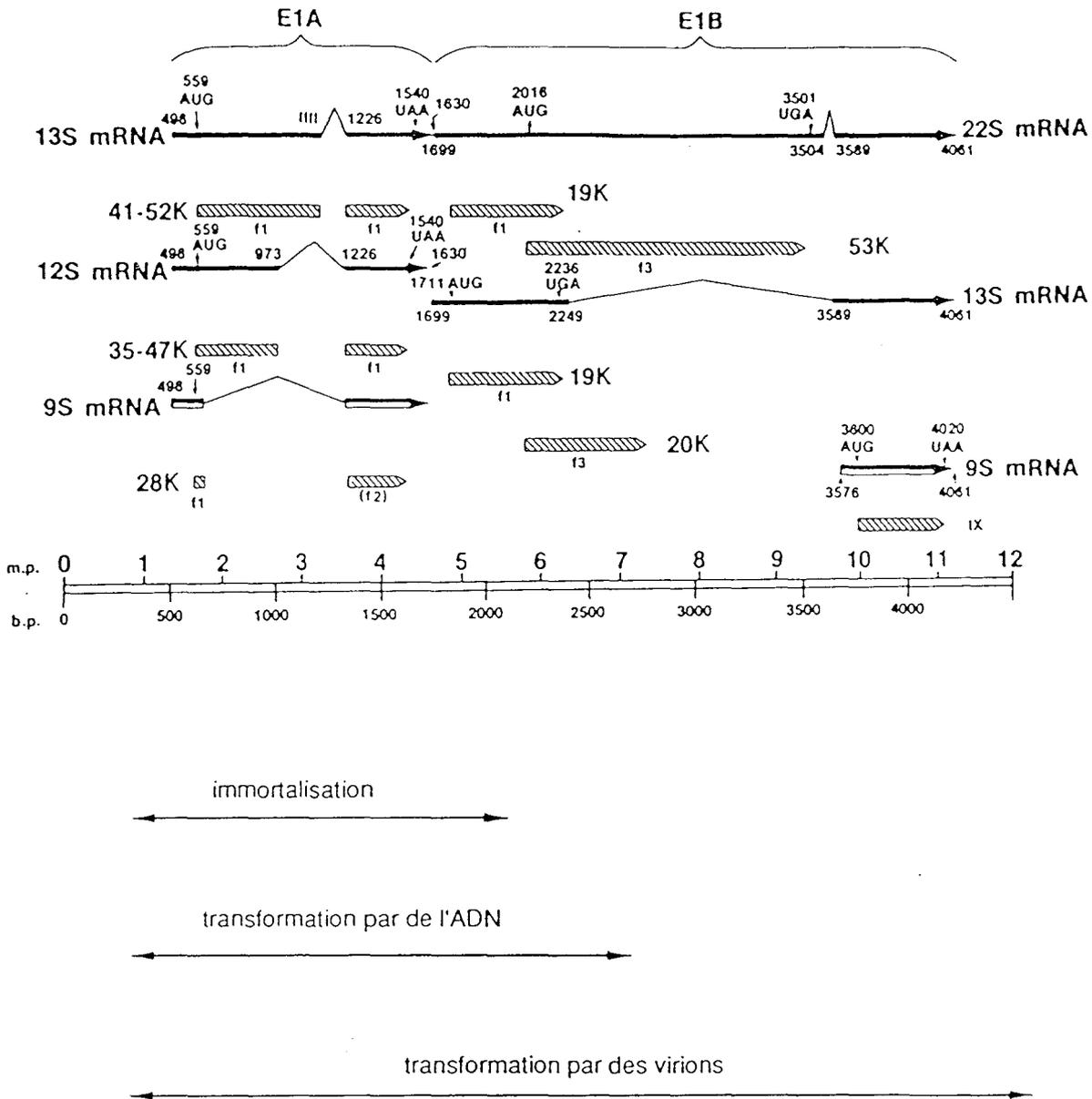


Figure G3: Structure et fonctions de la région transformante E1 de l'adénovirus de type 2.

signaux provenant des cellules avoisinantes, ce qui leur confère un potentiel prolifératif incontrôlé.

Le modèle de l'adénovirus est particulièrement intéressant puisque l'organisation de ses gènes transformants est telle que des unités de transcription distinctes sont responsables pour chacune des deux étapes dans la transformation.

Ainsi, la première étape implique l'oncogène E1A qui agit comme gène immortalisant. La transfection de cellules primaires (ou même établies comme les NIH3T3) de rongeurs avec des fragments de restriction de l'ADN viral comprenant la région E1A seule, résulte en effet, en des "*transformants*" atypiques qui ne sont que partiellement transformés (SHIROKI *et al.*, 1979; HOUWELING *et al.*, 1980). Ces cellules ont la possibilité de se diviser indéfiniment dans du milieu avec sérum, sont aneuploïdes comme les cellules transformées mais ne présentent pas les caractéristiques morphologiques et de croissance de ces dernières. Elles conservent, par exemple, une morphologie fibroblastique plutôt qu'épithélioïde et sont incapables de croître à haute densité cellulaire. De plus, ces "*transformants*" n'induisent pas de tumeur quand ils sont injectés à des souris *nude*, induction qui est habituellement retenue comme critère supplémentaire de la transformation. A fortiori, dans le système des adénovirus oncogéniques (Ad12), ces "*transformants*" ne sont pas tumorigènes chez les hamsters ou les rats nouveaux-nés comme le sont ceux résultant de la transformation par E1A plus E1B (SHIROKI *et al.*, 1979; VAN DEN ELSEN *et al.*, 1982).

La conversion des cellules immortalisées et partiellement transformées par E1A en cellules présentant un phénotype totalement transformé, est assurée, dans la seconde étape, par l'expression de la région E1B. Le gène E1A peut également coopérer avec l'oncogène *Ha-ras* pour induire ce phénotype (RULEY, 1983).

Ainsi, une similarité fonctionnelle a été établie entre E1A et d'autres oncogènes comme *c-myc* (LAND *et al.*, 1983), l'antigène grand T du virus du polyome ou de SV40, constituant un groupe de gènes dits immortalisants dont les produits ont une localisation nucléaire.

De la même façon, E1B s'apparente quant à lui à une famille d'oncogènes dits transformants qui inclut *v-ras* et dont les produits ont une localisation cytoplasmique.

Cette notion de groupe de complémentation est confortée également par le fait qu'à cette similarité fonctionnelle, s'ajoutent des similarités structurales entre les différents membres d'une même famille. Ainsi, il existe des homologies de séquence entre les protéines E1A d'Ad12 et les produits des gènes *myc* et *myb* (RALSTON and BISHOP, 1983). De même, la plus grande des

protéines E1A d'Ad5 et la protéine *myc* du virus de la myélocytomatose aviaire présentent des homologies dans la répartition de leurs acides aminés hydrophobes (BRANTON *et al.*, 1985). En outre, tout comme *myc* et *myb*, les protéines E1A ont une demi-vie relativement courte de l'ordre de 90 mn dans les cellules transformées (SPINDLER and BERK, 1984).

Cependant, en ce qui concerne les adénovirus, le modèle de transformation en deux étapes suggérant que des classes séparées de gènes sont responsables de l'induction de l'immortalisation et de la transformation morphologique et oncogénique ne constitue qu'une vision simplifiée de ce processus. En effet, il a été montré que les cellules transfectées par E1A seul ont des taux d'ARNm de E1A beaucoup plus faibles que ceux des cellules transformées par la région E1 en totalité (VAN DEN ELSEN *et al.*, 1983a) laissant supposer un rôle important de E1B dans la transformation : celui d'augmenter l'expression de E1A. Or, l'augmentation de ces taux via l'utilisation de promoteurs inductibles comme celui du gène de la métallothionéine (SENEAR and LEWIS, 1986) ou du rétrovirus de tumeur mammaire de souris (MMTV-LTR) (VAESSEN *et al.*, 1987a) résulte en une morphologie cellulaire et en des propriétés de croissance similaires à celles induites par l'action coordonnée des deux gènes E1A et E1B, ceci à la fois dans les lignées établies et dans les cellules primaires. D'autre part, lorsque la région E1B seule est utilisée dans des essais de transformation de lignées pré-établies, une transformation morphologique complète n'est pas observée même en fusionnant la partie codante de E1B à un promoteur fort comme celui du virus SV40 (VAN DEN ELSEN *et al.*, 1983b).

De ces différentes observations, il est donc possible d'attribuer à E1A un rôle central dans la transformation. Cet oncogène pourrait en effet, être en fait le premier gène transformant des adénovirus.

### **III - La région transformante.**

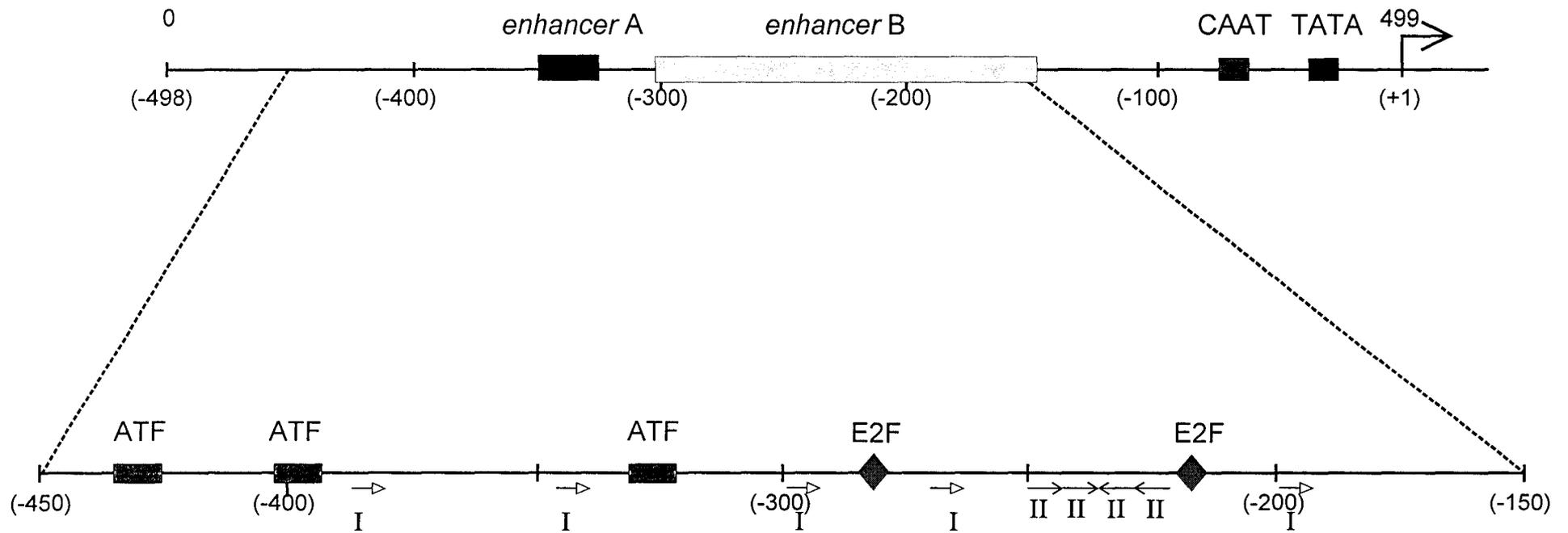
#### **III - 1 - La région E1A.**

Située à l'extrémité gauche du génome viral entre 0 et 4,5 u.g., cette région est la première à être exprimée suite à l'infection (fig. G3). Les protéines qu'elle code stimulent fortement la transcription des autres gènes viraux précoces et tardifs (BERK, 1986), aussi la régulation de sa propre transcription s'avère-t-elle primordiale pour une infection productive efficace.

### III - 1 - a - Le promoteur de E1A.

Outre la TATA *box* et la CAAT *box* qui sont des éléments essentiels à la transcription de la grande majorité des gènes, le promoteur de la région E1A d'Ad5 contient un arrangement complexe d'éléments régulateurs de la transcription. Un premier *enhancer*, l'*enhancer* A (fig. G4), a été décrit par HEN *et al.*, en 1983. Il est localisé entre les nucléotides -343 et -322 par rapport au site d'initiation de la transcription. En 1983, HEARING et SHENK ont mis en évidence une seconde région activatrice de la transcription, l'*enhancer* B, située entre les nucléotides -304 et -146. Cette dernière contient trois éléments activateurs distincts fonctionnellement : le premier, l'élément I est répété de façon parfaite aux positions -300 et -200. Il a été démontré que des virus mutants d'Ad5 avec des délétions de chaque copie de cet élément produisent des taux faibles d'ARNm spécifiques de E1A. Cependant, une seule copie suffit à maintenir un haut niveau de transcription du gène. L'élément I est un élément *enhancer* prédominant dont il existe en fait cinq copies dans le promoteur mais trois d'entre elles sont dégénérées (BRUDER and HEARING, 1989). Un facteur cellulaire, EF-1A, présent dans les extraits nucléaires préparés à partir de cellules humaines ou à partir de cellules de rongeurs, se lie à chacun de ces cinq sites mais induit différents niveaux d'activation de la transcription en fonction des sites impliqués. Il a été observé une synergie dans l'activation lorsque les deux sites adjacents les plus en amont dans l'*enhancer* B coopéraient (BRUDER and HEARING, 1991). Ce facteur se lie également à une séquence de réponse à l'activation par E1A dans le promoteur E4 et est donc probablement identique au facteur E4TF1 (E4F1) mis en évidence par WATANABE *et al.* en 1988. Récemment, l'ADNc codant le facteur EF-1A humain a été isolé et la séquence de celui-ci a révélé 94 % d'identité en acides aminés avec le facteur PEA3 murin appartenant à la famille de l'oncogène *ets*. Le facteur EF-1A serait donc un nouveau membre de cette famille (HIGASHINO *et al.*, 1993). Le deuxième élément *enhancer* contenu dans l'*enhancer* B, l'élément II, présent en quatre exemplaires, est situé entre -250 et -220 entre les deux copies parfaites de l'élément I. Contrairement aux éléments I qui régulent essentiellement la transcription de E1A, l'élément II module en *cis* la transcription de toutes les unités précoces dans les cellules infectées (HEARING and SHENK, 1986). Le troisième des éléments, le site de liaison du facteur de transcription cellulaire E2F est présent en deux copies. La première d'entre elles est située à -285, la seconde à -220.

Dans les cellules infectées par les adénovirus, une augmentation considérable de l'activité de liaison à l'ADN de ce facteur est observée (KOVESDI *et al.*, 1986). Celle-ci est influencée à



**Figure G4:** Promoteur de la région E1A d'Ad2.

Les *enhancers* décrits par HEN *et al.* (1983) et par HEARING et SHENK (1983) sont indiqués de même que les sites de liaison pour différents facteurs nucléaires.

la fois par les produits du gène E1A mais aussi par ceux de E4 (BABISS, 1989). Il a été montré que la liaison coopérative de E2F est le résultat de l'action combinée des produits de ces deux gènes dans le processus de transactivation du promoteur précoce E2A (REICHEL *et al.*, 1989). Mis à part les promoteurs de E1A et de E2, des sites de liaison pour E2F existent également dans les promoteurs de nombreux gènes cellulaires dont les produits sont importants pour la prolifération (NEVINS, 1992) et qui sont donc exprimés à la transition G1/S. Par ailleurs, ce facteur régule aussi des gènes exprimés quant à eux à d'autres étapes du cycle cellulaire, comme c'est le cas pour *c-myc* (THALMEIER *et al.*, 1989; HIEBERT *et al.*, 1989).

Hormis ces trois éléments contenus dans l'*enhancer* B, la région promotrice de E1A contient d'autres sites pour des protéines nucléaires, comme il a été montré par YOSHIDA *et al.* en 1989. Ces auteurs ont en effet observé 21 sites de fixation de facteurs nucléaires au niveau de cette région. Parmi ceux-ci, trois sites potentiels (GTGACGT) pour le facteur cellulaire ATF. Le premier est situé dans l'*enhancer* A, entre les nucléotides -330 et -324. Les deux autres sont localisés plus en amont entre -404 et -398 et entre -436 et -430. La séquence de ces trois sites présente une homologie avec le consensus (TGACGTCA) de l'élément de réponse à l'AMPC (CRE). Il a été décrit une activation synergique de la transcription de E1A par ses propres produits en combinaison avec des effecteurs augmentant la concentration en AMPC intracellulaire (ENGEL *et al.*, 1988), cependant jusqu'à présent peu de travaux ont été réalisés afin de connaître la participation exacte dans la transcription de E1A de ces sites de fixation pour ATF.

Les études concernant la région promotrice de E1A ont été menées en grande majorité sur les sérotypes appartenant au sous-groupe C (Ad2, Ad5). Les éléments *enhancer* décrits sont partiellement conservés pour les sérotypes des autres sous-groupes, toutefois leur organisation est très différente. Ceci peut donc expliquer en partie une activité moindre du promoteur de certains sérotypes comme c'est le cas pour la région promotrice d'Ad3 (LEITE and D'HALLUIN, 1988) et d'Ad40 (ISHINO *et al.*, 1988).

### ***III - 1 - b - Les ARN messagers.***

La transcription de la région E1A conduit à la synthèse d'un transcrit primaire unique qui selon les sérotypes fournit après épissage alternatif cinq (Ad2, Ad5) (STEPHENS and

HARLOW, 1987; ULFENDHAL *et al.*, 1987) ou six messagers (Ad12) (BROCKMANN *et al.*, 1990) (fig. G5).

Les ARNm sont nommés en fonction de leur coefficient de sédimentation : 13S, 12S, 11S, 10S, 9S et 9,5S, ce dernier étant spécifique de l'Ad12.

Pour un sérotype donné, tous les ARNm synthétisés présentent des extrémités 5' et 3' communes et ne diffèrent les uns des autres que par l'absence ou la présence de certains introns.

Les deux ARNm les plus abondants (13S et 12S) sont exprimés dans les cellules transformées et infectées productivement avant le démarrage de la réplication de l'ADN viral (PERRICAUDET *et al.*, 1979). Plus tardivement au cours du cycle lytique trois ARNm supplémentaires (11S, 10S et 9S) sont détectés, les deux premiers à des concentrations très faibles tandis que le dernier s'accumule (SPECTOR *et al.*, 1978 ; CHOW *et al.*, 1979). Contrairement aux messagers 11S et 10S qui s'expriment dans les cellules infectées, le produit de l'ARNm 9S n'a jamais été détecté *in vivo*, néanmoins il s'avère facilement synthétisable dans un système de traduction *in vitro*. Récemment BROCKMANN *et al.* (1990) ont montré que les ARNm tardifs (11S, 10S et 9S) sont également présents dans les cellules transformées par les adénovirus du sous-groupe A (Ad12), cependant les produits des deux plus grands messagers sont défectifs dans le processus de transformation. Ces auteurs ont également mis en évidence une nouvelle espèce (9,5S) dans les cellules infectées par l'Ad12, celle-ci est produite en quantité très faible.

En ce qui concerne les adénovirus entériques (Ad40, Ad41), ceux-ci ont la possibilité de donner naissance aux messagers 13S, 12S et 9S. Tandis que ces trois messagers sont détectés dans les cellules transformées par l'Ad40, seul le premier a été mis en évidence dans les cellules transformées par l'Ad41 (pour revue, MAUTNER *et al.*, 1995).

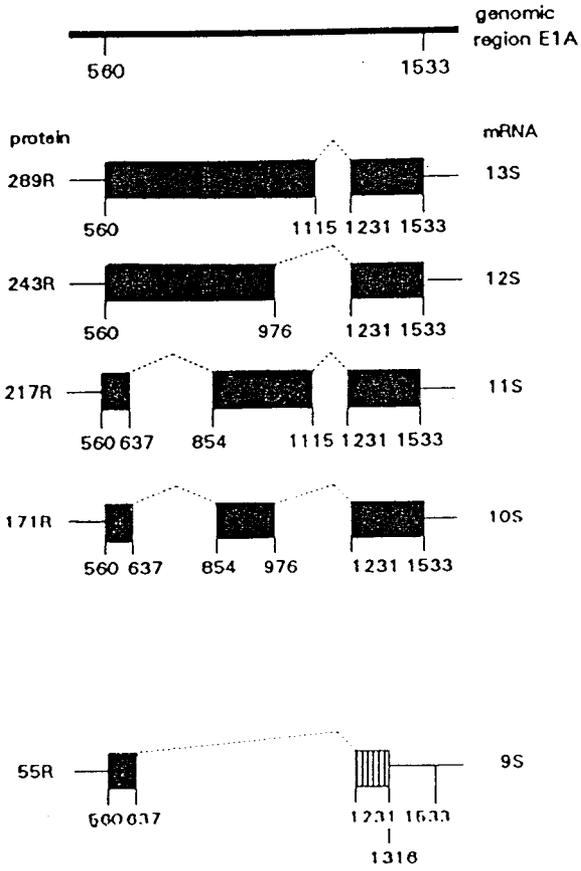
### **III - 1 - c - Les polypeptides de la région E1A.**

#### **III - 1 - c - $\alpha$ - Caractéristiques biochimiques et localisation subcellulaire.**

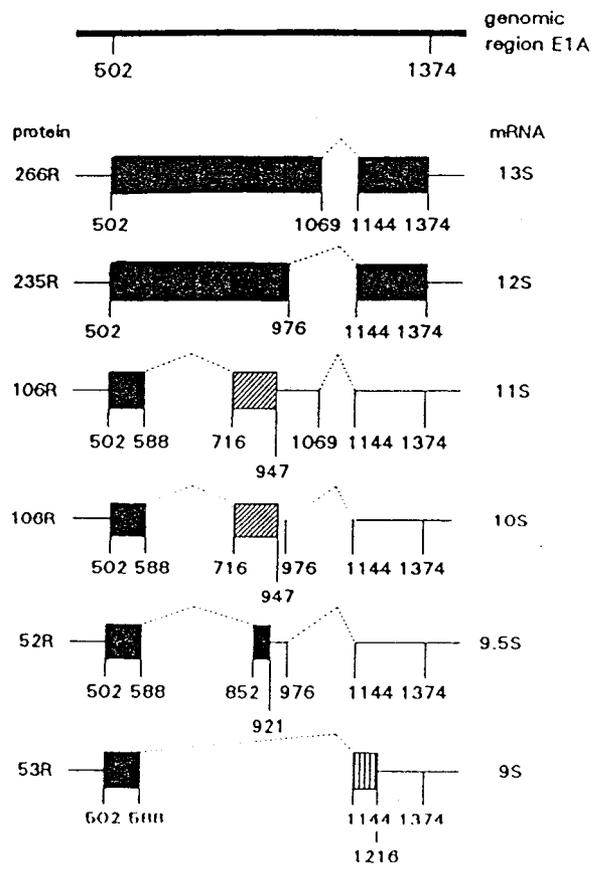
Pour chacun des sérotypes d'adénovirus, les deux messagers les plus abondants (13S et 12S) de la région E1A sont traduits en deux protéines majeures qui sont exprimées à la fois dans les cellules infectées et dans les cellules transformées.

Ces protéines possèdent respectivement 289 et 243 résidus d'aa (289R et 243R) dans le cas d'Ad2 (fig. G5). Elles sont fortement apparentées puisqu'elles présentent les mêmes extrémités N- et C-terminales, sont traduites dans le même cadre de lecture et ne diffèrent l'une

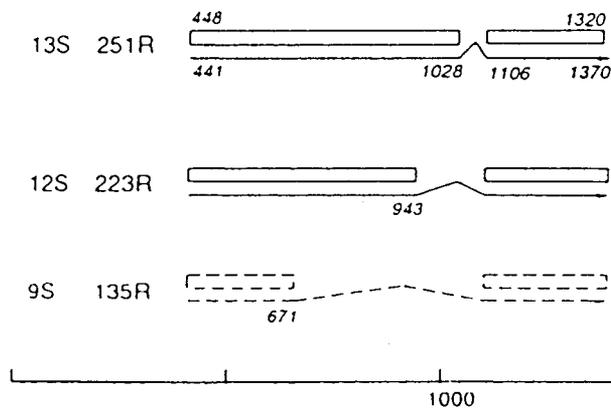
### Ad2



### Ad12



### Ad41



**Figure G5:** ARNm et protéines de la région E1A.

Les boîtes représentent les parties codantes et les chiffres qui leur sont associés indiquent les nucléotides.

Ad41 (souche Tak).

(D'après BROCKMANN et ESCHE, 1995; MAUTNER *et al.*, 1995).

de l'autre que par la présence d'une séquence interne de 46 aa unique au produit du messenger 13S (PERRICAUDET *et al.*, 1979). D'organisation similaire, la région E1A d'Ad12 donne naissance à une protéine de 266R et une protéine de 235R. En ce qui concerne ce sérotype, la région excisée du produit du 13S dans la protéine de 235R représente quant à elle 31 aa seulement. Enfin, notons que pour l'Ad41 des protéines potentielles possédant 251R et 223R ont été prédites à partir de la structure des messagers 13S et 12S (revue par TIEMESSEN et KIDD, 1995).

Les deux protéines majeures de E1A sont remarquablement acides avec un pI d'environ 5 et 4,5 respectivement pour la 289R et la 243R. La plupart des résidus acides se localisent dans la moitié N-terminale des protéines. Elles contiennent également un pourcentage élevé en résidus proline (16 % pour la 289R et 18 % pour la 243R). Ces résidus sont distribués tout au long des chaînes polypeptidiques empêchant probablement la formation d'importantes structures secondaires régulières.

Chacun des produits du gène E1A subit des modifications post-traductionnelles multiples. Celles-ci consistent principalement en la phosphorylation de résidus sérine (YEE and BRANTON, 1985a). Les sites majeurs de phosphorylation sont les résidus 89 et 219 (TREMBLAY *et al.*, 1988).

Les protéines E1A sont localisées dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules infectées (ROWE *et al.*, 1983) et transformées (GRAND and GALLIMORE, 1984). La fraction cytoplasmique est liée en partie aux structures du cytosquelette, probablement les microtubules et les filaments de 10 nm. Cette association est sans doute un des moyens par lequel les protéines E1A altèrent la morphologie des cellules transformées. Les formes nucléaires sont associées quant à elles avec la matrice nucléaire ou sont présentes dans le nucléoplasme mais ne se lient en aucun cas à l'ADN (FERGUSON *et al.*, 1985).

Bien qu'ayant des demi-vies relativement courtes (35 à 55 mn dans les cellules infectées, 80 à 90 mn dans les cellules transformées) (SPINDLER and BERK, 1984) comme la plupart des oncogènes nucléaires, les protéines E1A sont remarquablement stables. Ainsi une incubation 5 mn à 100° C suivie d'une microinjection de ces protéines dans les cellules de mammifères ne s'accompagne d'aucune perte de leur fonction biologique (KRIPPL *et al.*, 1984).

### III - 1 - c - $\beta$ - Domaines conservés.

La comparaison des séquences primaires de la plus grande des protéines de E1A de différents sérotypes d'Ad humains et simiens a révélé l'existence de trois régions conservées (VAN ORMONDT *et al.*, 1980 ; KIMELMAN *et al.*, 1985) (fig. G6). Ces régions ont été dénommées CR1, CR2 et CR3 (MORAN and MATHEWS, 1987). Elles présentent au moins 50 % d'homologie. Le produit de l'ARNm 13S contient les trois domaines, tandis que celui du 12S ne renferme que les CR1 et CR2. Par des expériences de mutagenèse, il a été possible de corréler ces régions avec certains domaines fonctionnels importants des protéines E1A.

Dans la recherche des facteurs pouvant contribuer aux propriétés particulières de certains sérotypes, comme l'oncogénicité par exemple, des études se sont focalisées également sur les régions non conservées. Parmi celles-ci, un segment de 20 aa (*spacer*) chez l'Ad12, localisé entre le CR2 et le CR3 et totalement absent des protéines E1A d'Ad2/5 s'avère différencier remarquablement ces deux sérotypes (VAN ORMONDT and GALIBERT, 1984). Une séquence similaire existe aussi dans les protéines E1A des sérotypes 3 et 7 et dans la région E1A analogue du SA7 (adénovirus simien sérotype 7) (KIMELMAN *et al.*, 1985). Comme cette dernière, le *spacer* de l'Ad12 contient un fort pourcentage en alanine (8 résidus sur 20). L'importance de cette région sera discutée plus loin.

### III - 2 - La région E1B.

(Revue: STILLMAN, 1986).

#### III - 2 - a - *Promoteur et ARNm majeurs de E1B.*

Située immédiatement en aval de l'unité de transcription E1A entre 4,8 et 11,2 u.g., la région E1B code trois ARNm majeurs : le 22S, le 13S et le 9S (fig. G3).

Un promoteur commun dirige la synthèse des deux premiers messagers. De structure relativement simple comparée à celle du promoteur de E1A, et représentant seulement 68 paires de bases, cette région régulatrice comprend deux éléments principaux : une TATA *box* à - 30 nt du site d'initiation de la transcription, seul élément requis pour la transactivation par E1A, et une séquence consensus de réponse au facteur de transcription Sp1 à - 48 nt (WU *et al.*, 1987). Les ARNm 22S et 13S sont générés à partir d'un précurseur unique par un mécanisme d'épissage alternatif.



Un promoteur différent est utilisé dans le cas de la synthèse du 9S. Ce transcrit code un composant structural de la capsid, le polypeptide IX qui n'est pas exprimé dans les cellules transformées.

### ***III - 2 - b - Polypeptides majeurs de E1B.***

L'ARNm 22S est traduit selon deux cadres de lecture différents et à partir de deux codons AUG distincts. Les deux protéines produites possèdent une masse moléculaire apparente de 55 kDa (correspondant à 495R, 482R ou 472R respectivement pour l'Ad2, l'Ad12 ou l'Ad41) et 19 kDa (175R, 163R ou 170R respectivement pour l'Ad2, l'Ad12 ou l'Ad41). Cette dernière est également traduite à partir du messenger 13S.

La protéine de 55 kDa est localisée en majeure partie dans le noyau des cellules infectées mais est détectée également dans le cytoplasme (ROWE *et al.*, 1983; GRAND and GALLIMORE, 1984). Celle de 19 kDa est associée aux membranes nucléaires et cytoplasmiques (PERSSON *et al.*, 1982; ROWE *et al.*, 1983).

### ***III - 2 - c - Fonctions des protéines E1B dans le cycle lytique et la transformation.***

#### *la protéine de 55 kDa*

La protéine de 55 kDa est essentielle pour que le cycle lytique soit complet. Elle permet notamment l'accumulation des ARNm tardifs dans le cytoplasme et l'arrêt des synthèses cellulaires (BABISS and GINSBERG, 1984; PILDER *et al.*, 1986). Durant le cycle lytique, elle est associée au polypeptide E4-34 kDa (SARNOW *et al.*, 1984) qui intervient également dans l'accumulation des ARNm.

Dans les cellules de rongeurs transformées par l'Ad2, la protéine de 55 kDa est complexée au produit du gène suppresseur de tumeur p53 (SARNOW *et al.*, 1982) et ce complexe est retenu dans le cytoplasme. Bien que la 55 kDa de E1B d'Ad12 ne soit pas capable d'une telle séquestration elle inactive néanmoins la fonction de transactivation de cette phosphoprotéine nucléaire impliquée dans le contrôle de l'entrée des cellules en phase G1 (YEW and BERK, 1992).

L'expression de la 55 kDa n'est pas indispensable à la transformation induite par transfection de plasmides (ROWE *et al.*, 1984), cependant elle devient nécessaire lorsque cette transformation est réalisée par des virus (fig. G3), probablement en intervenant au niveau de l'intégration de l'ADN viral (ROWE and GRAHAM, 1983).

#### *la protéine de 19 kDa*

L'expression de la protéine de 19 kDa est primordiale à la fois pour les cellules infectées et transformées. Elle permet le maintien de l'intégrité de l'ADN viral et cellulaire (CHINNADURAI, 1983; WHITE *et al.*, 1984) en contrecarrant l'apoptose induite par E1A et en protégeant les cellules des effets cytotoxiques du TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*) (WHITE *et al.*, 1992). Le mécanisme d'action de cette protéine dans l'inhibition de l'apoptose n'est pas encore résolu, cependant il semble qu'elle agisse en s'associant à des protéines promotrices de la mort cellulaire programmée et en les neutralisant. Parmi celles-ci, la protéine Bak récemment clonée (FARROW *et al.*, 1995).

### **IV - Fonctions biologiques des protéines E1A.**

(Revue : BERK, 1986; BOULANGER and BLAIR, 1991; D'HALLUIN and LECLERE, 1992; BAYLEY and MYMRYK, 1994).

#### **IV - 1 - Contrôle de l'expression des gènes.**

##### ***IV - 1 - a - Transactivation.***

Il est clairement démontré que l'expression de E1A est nécessaire à l'accumulation des ARNm viraux des autres unités précoces. Par ailleurs, les protéines E1A autorégulent l'activité de leur propre promoteur et sont des inducteurs puissants de la transcription d'une grande variété de gènes cellulaires transcrits par l'ARN polymérase II. Parmi ceux-ci des gènes endogènes tels que ceux codant les protéines de choc thermique (KAO and NEVINS, 1983) au cours de l'infection ou encore des gènes introduits par transfection comme *c-jun* (VAN DAM *et al.*, 1990) dans les cellules transformées par l'Ad5 ou l'Ad12. Il est à noter cependant que cette activité est fortement réduite dans le cas des adénovirus appartenant au sous-groupe F (VAN LOON *et al.*,

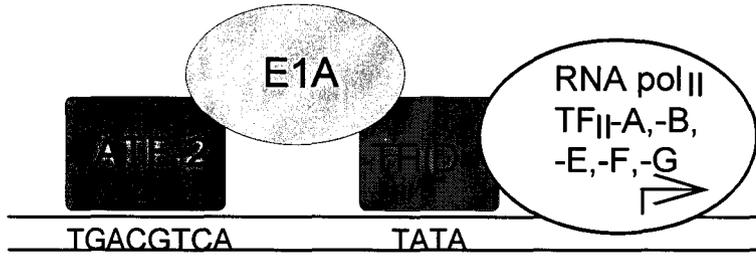
1987; ISHINO *et al.*, 1988). Comme E1A ne se lie pas à l'ADN (FERGUSON *et al.*, 1985), le mécanisme de transactivation implique l'existence d'interactions entre E1A et des facteurs de régulation de la transcription.

Dans la grande majorité des cas, il s'avère que c'est le CR3 (domaine unique au produit du messager 13S) qui est directement responsable des effets de stimulation de la transcription créés par E1A (MORAN *et al.*, 1986). Néanmoins, il a été montré également que la transactivation de certains gènes est réalisée au travers de régions communes aux deux protéines majeures de E1A.

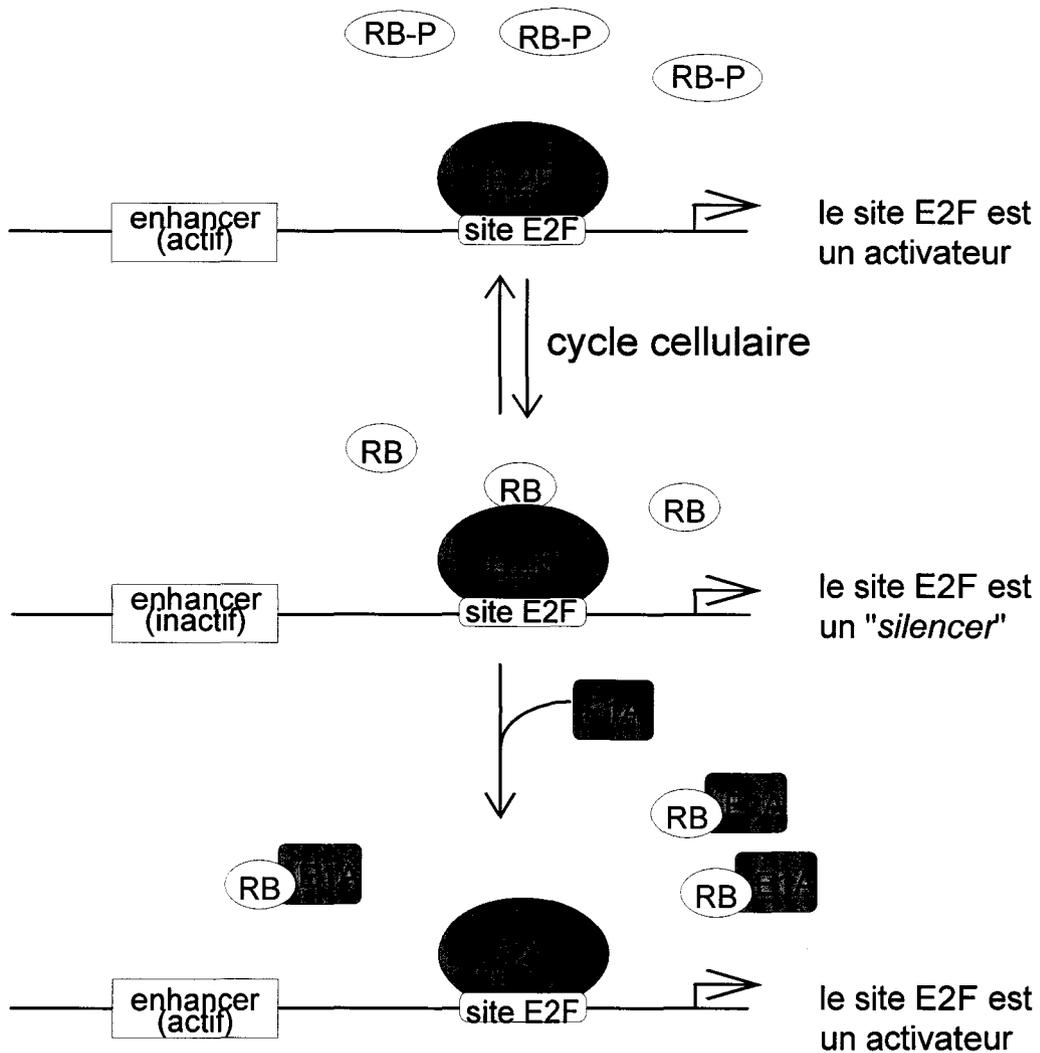
### *induction par le CR3*

En 1987, GREEN et ses collaborateurs ont montré que la microinjection, dans les cellules HeLa, d'un peptide de 49 résidus englobant le domaine CR3 résultait en l'activation de l'expression à partir de promoteurs d'adénovirus (LILLIE *et al.*, 1987). Ce domaine conservé contient un motif en doigt de zinc formé de quatre cystéines et divisé en deux régions distinctes fonctionnellement (LILLIE and GREEN, 1989). La première, située entre les résidus 147 et 177, renferme le domaine d'activation tandis que la seconde dans la partie C-terminale (résidus 183 à 188) dirige et maintient la protéine E1A sur le promoteur cible via une interaction avec un facteur cellulaire déjà placé sur son site. En fait, chacune des deux régions se lie à une protéine cellulaire distincte (WEBSTER and RICCIARDI, 1991). La partie carboxy-terminale établit un contact avec un facteur de transcription séquence-spécifique tel que ATF-2 ou c-Jun tandis que la région N-terminale transactivatrice contenant l'essentiel de la structure du doigt de zinc interagit avec un composant du complexe basal de transcription (fig. G7A). La protéine codée par le 13S fonctionne donc en établissant un pont entre des facteurs de transcription situés en amont dans le promoteur et des facteurs généraux de la transcription comme la TBP (*TATA box Binding Protein*) et se comporte par conséquent comme une protéine TAF (*TBP-Associated Factor*). Récemment, il a été émis l'hypothèse qu'en plus de la TBP, un second facteur devait interagir avec la région transactivatrice de E1A pour former un complexe transactivateur fonctionnel (GEISBERG *et al.*, 1994).

A



B



**Figure G7:** Modèles de transactivation par E1A.

A: Induction par le CR3 (d'après LEE *et al.*, 1991).

B: Induction par le produit du messageur 12S (modifié d'après WEINTRAUB *et al.*, 1992).

*induction par le produit du messenger 12S.*

Différents chemins de transactivation impliquant les régions incluses dans cette protéine ont été décrits. Ceux-ci se distinguent tant au point de vue des régions de E1A intéressées (MYMRYK and BAYLEY, 1993) que du mécanisme utilisé. L'un d'entre eux concerne le facteur de transcription E2F. E1A stimule la transcription de nombreux gènes à partir d'une grande variété de promoteurs contenant des sites de liaison de ce facteur. C'est le cas du promoteur précoce E2 d'adénovirus, de celui de *c-myc* (voir III - 1 - a). Le mécanisme fait intervenir la libération de E2F de son association avec des protéines cellulaires comme pRB, convertissant ainsi un complexe actif d'inhibition de l'expression du gène en un activateur transcriptionnel (WEINTRAUB *et al.*, 1992) (fig. G7B). RAYCHAUDHURI *et al.* (1991) ont clairement démontré que la dissociation des complexes E2F/protéines cellulaires était sous la dépendance des domaines CR1 et CR2 de E1A.

Un autre chemin implique la famille de facteurs de transcription AP-1. Ces protéines dimérisent soit entre elles-mêmes, soit avec d'autres membres de la famille. Le promoteur du gène *c-jun* lie un hétérodimère du type c-Jun/ATF-2 et E1A s'avère capable par le biais de l'hyperphosphorylation du domaine transactivateur de c-Jun de stimuler la transcription du gène (HAGMEYER *et al.*, 1993). Dans ce mécanisme seule la région CR1 est nécessaire (VAN DAM *et al.*, 1990). Nous verrons plus loin que E1A fait la distinction entre différents dimères et se révèle trans-répresseur dans le contexte d'autres promoteurs.

**IV - 1 - b - Répression transcriptionnelle.**

En plus de son activité de transactivation, E1A réprime la transcription de nombreux gènes viraux et cellulaires. Différents *enhancers* transcriptionnels (incluant l'*enhancer* de E1A lui-même) ont été identifiés comme cible de cette répression. Ainsi cette activité s'observe sur l'*enhancer* du virus du polyome (BORRELLI *et al.*, 1984), sur celui de SV40 (VELCICH and ZIFF, 1985), sur l'*enhancer* 2 du virus de l'hépatite B (CHEN *et al.*, 1992), sur la région de contrôle du gène de l'insuline (STEIN and ZIFF, 1987), sur les éléments activateurs de promoteurs de gènes impliqués dans la différenciation myogénique (WEBSTER *et al.*, 1988), sur l'expression de gènes inductibles par l'interféron (IFN) via leur élément de réponse ISRE

(*Interferon-Stimulated Response Element*) (KALVAKOLANU *et al.*, 1991; GUTCH and REICH, 1991; ACKRILL *et al.*, 1991). Cette répression s'exerce également sur le chemin de transactivation associé à la famille de facteurs de transcription AP-1 (OFFRINGA *et al.*, 1990; HAGMEYER *et al.*, 1993) : c'est le cas du gène de la collagénase dont l'expression est inhibée au travers de son élément de réponse au TPA (TRE).

Il faut préciser aussi que selon le type cellulaire, E1A se comporte globalement comme un répresseur ou comme un activateur. Ainsi E1A réprime l'*enhancer* de la chaîne lourde des Ig dans des lignées lymphocytaires murines (HEN *et al.*, 1985) mais stimule ce même élément dans des lignées de fibroblastes murins (BORRELLI *et al.*, 1986).

Dans les cellules transformées ce mécanisme de répression existe également : pour exemple, la transcription des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I est inhibée dans les cellules transformées par l'Ad12 (SCHRIER *et al.*, 1983).

L'identification des régions des protéines E1A responsables de cette activité s'est avérée plus complexe que celle des séquences impliquées dans la transactivation. Ainsi pour certains auteurs la répression s'exerce quand chacune des protéines majeures de E1A est exprimée (BORRELLI *et al.*, 1984) tandis que pour d'autres, le produit du messager 13S semble entrer en compétition avec la répression par sa fonction transactivante (LILLIE *et al.*, 1987; BAUTISTA *et al.*, 1991). L'activité de trans-répression a été reliée aux domaines CR1 et CR2 agissant en coopération (SCHNEIDER *et al.*, 1987) ou non (KUPPUSWAMY and CHINNADURAI, 1987; ACKRILL *et al.*, 1991 pour le CR1 et LILLIE *et al.*, 1986 pour le CR2). Outre ces deux domaines qui sont majoritairement impliqués, il a été montré que cette fonction de répression est attribuable à d'autres régions de la protéine. Parmi celles-ci, la portion N-terminale de l'exon 2 (BAUTISTA *et al.*, 1991) ou le CR3 important pour l'inhibition de l'expression des antigènes de classe I (JOCHEMSEN *et al.*, 1984; LECLERE, 1993).

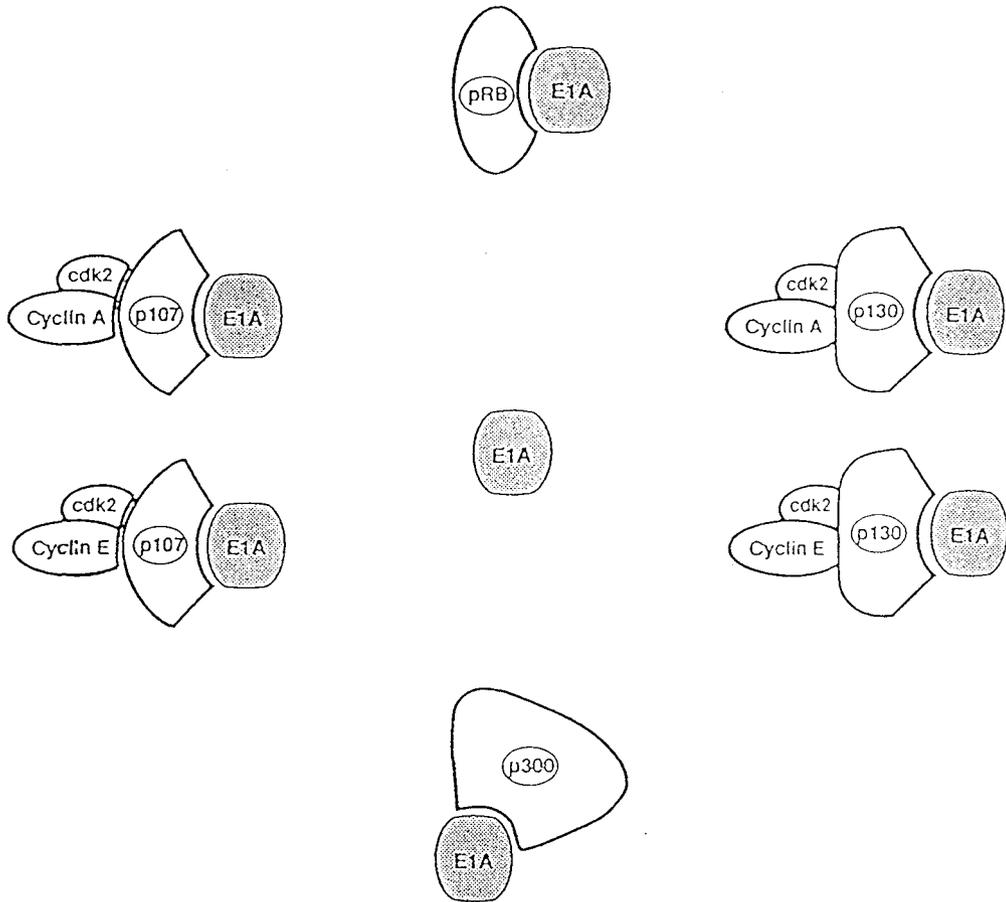
Il semble que la trans-répression résulte de l'association de E1A avec des protéines cellulaires intervenant dans la régulation. Plusieurs auteurs ont par exemple suggéré une corrélation fonctionnelle entre cette activité et la liaison de E1A à une protéine cellulaire de 300 kDa (MYMRYK *et al.*, 1992). Cependant comme certaines régions de E1A ne participant pas à la liaison de cette protéine cellulaire ont été impliquées dans la fonction de répression, ce phénomène est sans doute beaucoup plus complexe et fait probablement intervenir différents mécanismes indépendants.

## IV - 2 - Régulation du cycle cellulaire.

La stimulation de la synthèse de l'ADN cellulaire est l'une des fonctions importantes des protéines E1A. En effet, l'adénovirus infecte normalement des cellules quiescentes, mais est incapable d'assurer lui-même sa propre réplication, aussi lui est-il nécessaire d'interférer avec les mécanismes de contrôle normaux du cycle cellulaire de l'hôte. A l'origine, cette activité a été découverte lors d'expériences d'infection de cellules primaires de rongeurs arrêtées en G0 (SHIMOJO and YAMASHITA, 1968). En 1985, STABEL *et al.* ont démontré que cette fonction est assurée par chacune des deux protéines majeures de E1A. Actuellement deux mécanismes indépendants rentrent en compte pour expliquer cette activité : d'une part l'induction de la sécrétion de facteurs de croissance (BELLET, 1983), d'autre part l'association de E1A avec des protéines régulatrices du cycle cellulaire comme les cyclines A et E.

Par des expériences d'immunoprécipitation, il a été montré que E1A coprécipite avec de nombreuses protéines cellulaires et parmi elles une protéine de 60 kDa, identifiée depuis comme la cycline A. Cette protéine est associée à E1A à la fois dans les cellules infectées (GIORDANO *et al.*, 1989) et transformées (PINES and HUNTER, 1990). L'interaction E1A/p60<sup>cycA</sup> est de nature indirecte impliquant l'association avec une autre protéine cellulaire, la p107 (HOWE and BAYLEY, 1992). Les cyclines sont des protéines dont la synthèse et la destruction sont cruciales pour la progression normale du cycle cellulaire. En fait, ces protéines sont associées à des kinases (cdks) dont elles constituent les sous-unités régulatrices. Il a été montré que E1A s'associe non seulement à la cycline A mais aussi à la cycline E (FAHA *et al.*, 1993) régulant toutes deux l'activité de la p33<sup>cdk2</sup>. Ces auteurs ont montré qu'une autre protéine cellulaire, la p130, apparentée à la p107, interagissait également avec la cycline A (fig. G8). Nous verrons plus loin que cette protéine coprécipite aussi avec E1A. Ainsi en s'associant à ces différents complexes, E1A induit l'hyperphosphorylation des protéines cellulaires liées aux cyclines, altérant par conséquent leur fonction biologique (BARBEAU *et al.*, 1994).

En ce qui concerne le complexe avec la cycline A, il a été montré que ce sont les aa 30 à 60 et 120 à 127 de E1A qui sont impliqués (GIORDANO *et al.*, 1991). Ces régions correspondent également à celles concernées par la liaison à la p105<sup>RB</sup>.



**Figure G8:** Protéines et complexes protéiques ciblés par E1A.

(D'après FAHA *et al.*, 1993).

### IV - 3 - Transformation cellulaire.

(Revue : SHENK, 1989; BUCHKOVICH *et al.*, 1989; SHENK and FLINT, 1991).

Bien qu'avec des efficacités très différentes, tous les sérotypes d'adénovirus humains sont capables de transformer *in vitro* des cellules primaires non permissives (GRAHAM *et al.*, 1984). Le plus petit fragment viral capable de transformation comprend les gènes précoces E1A et E1B (GRAHAM and VAN DER EB, 1973b). L'expression de la région E1A est responsable de l'immortalisation des cellules (HOUWELING *et al.*, 1980) tandis que celle de E1B est nécessaire à leur transformation complète. Décrite à l'origine pour les adénovirus appartenant au sous-groupe C (Ad2,5) (VAN DER EB *et al.*, 1977), il a été montré que cette coopération existe pour tous les sérotypes : citons pour exemple les travaux de SHIROKI *et al.* en 1977 en ce qui concerne les adénovirus du sous-groupe A (Ad12) et ceux de VAN LOON *et al.* en 1985 pour les adénovirus "fastidieux" (Ad40, 41).

#### IV - 3 - a - Domaines des protéines E1A nécessaires à la transformation.

Dans le cas des adénovirus appartenant au sous-groupe C, les deux protéines majeures de E1A sont requises pour une transformation complète et stable de cellules de rongeurs après infection (BABISS *et al.*, 1984). En utilisant des ADNc il a été démontré néanmoins que chacune des protéines pouvait immortaliser des cellules de rongeurs et les transformer totalement en coopération avec l'oncogène *ras* activé (ZERLER *et al.*, 1986).

En accord avec les résultats obtenus avec les ADNc, des études par mutations indiquent que les régions nécessaires à la transformation, pour les sous-groupes A et C, sont communes aux deux protéines majeures de E1A. Ainsi pour obtenir une transformation complète, sont requis les domaines CR1 et CR2 de même que la partie N-terminale (LILLIE *et al.*, 1986; KUPPUSWAMY and CHINNADURAI, 1987; SCHNEIDER *et al.*, 1987).

#### IV - 3 - b - Efficacité de transformation.

Une différence notable entre les sérotypes est l'efficacité avec laquelle ils sont capables de transformer des cellules primaires de rongeurs comme les BRK (Baby Rat Kidney). Ainsi la région E1A d'Ad12, comparée à celle d'Ad5, transforme ces cellules à une fréquence au moins vingt fois inférieure (BERNARDS *et al.*, 1982; SCHRIER *et al.*, 1983; JOCHEMSEN *et al.*, 1984). De même en ce qui concerne les adénovirus entériques Ad40 et Ad41, il a été montré récemment que leur efficacité de transformation était encore plus faible que celle des adénovirus du sous-groupe A (COUSIN *et al.*, 1991). Par transfection en cellules primaires de plasmides contenant la région E1A délétée dans sa partie promotrice, il a été démontré que le taux de transformation n'est pas corrélé au niveau d'expression des protéines E1A (LECLERE, 1993). Cependant en utilisant des virus mutants exprimant faiblement E1A, ADAMI et BABISS (1990) ont montré que l'efficacité de transformation est inversement proportionnelle au taux d'expression de la protéine. Enfin, des études avec des protéines chimériques de E1A ont indiqué que cet effet est induit par le premier exon de E1A (JOCHEMSEN *et al.*, 1984).

Les régions de la protéine responsables de l'efficacité de transformation ont été localisées par différentes techniques. Les travaux de JELINEK et GRAHAM (1992), utilisant des virus hybrides Ad5/Ad12 créés grâce à une technique de recombinaison homologue, ont montré que deux régions déterminent le taux de transformation. La première est située en N-terminal, la seconde inclut la séquence comprise entre le CR1 et CR2 et le CR2 lui-même. En désaccord avec ces derniers, LECLERE (1993), par l'utilisation de plasmides contenant des régions hybrides Ad2/Ad12, a attribué cette fonction à la région comprise entre les aa 34 et 86 qui inclut le CR1. Dans le modèle des adénovirus entériques, COUSIN *et al.* (1991) ont également identifié le CR1 comme responsable.

#### IV - 3 - c - Mécanisme de transformation.

Comme nous l'avons vu précédemment, le CR3 et donc la fonction de transactivation dont il est responsable n'est pas nécessaire à la transformation. Bien que cette activité et celle de trans-répression requièrent des régions communes, il a été démontré par des études avec des mutants que ces deux fonctions ne sont pas non plus couplées (KUPPUSWAMY and CHINNADURAI, 1987; VELCICH and ZIFF, 1988). En fait le mécanisme de transformation

fait intervenir l'association des produits de E1A à des protéines cellulaires agissant comme anti-oncogènes. Par expériences d'immunoprécipitations, E1A s'est avéré coprécipiter avec plusieurs d'entre elles (YEE and BRANTON, 1985b; HARLOW *et al.*, 1986). En plus de la p60<sup>cycA</sup> évoquée au paragraphe IV - 2, ces complexes incluent par exemple la p105<sup>RB</sup> (WHYTE *et al.*, 1988a; EGAN *et al.*, 1989), une espèce lui étant apparentée, la p107 et deux autres polypeptides de 130 et 300 kDa.

### *la p105<sup>RB</sup>*

Identifiée à l'origine de par son implication dans la prédisposition au rétinoblastome, la p105<sup>RB</sup> (référéncée le plus souvent comme p110<sup>RB</sup>) nucléaire contribue à la régulation de la prolifération cellulaire dans une grande variété de tissus de mammifères. Son activité est contrôlée durant le cycle cellulaire par phosphorylation. Ainsi elle est non phosphorylée ou sous-phosphorylée en G0/G1, devient graduellement hyperphosphorylée au travers de la transition G1/S, maintient cet état de phosphorylation en phase S et en phase G2 puis retourne à son degré de phosphorylation initial durant la mitose (MIHARA *et al.*, 1989; DE CAPRIO *et al.*, 1989; MITTNACHT *et al.*, 1994).

La liaison de E1A à la p105<sup>RB</sup> nécessite la présence de deux séquences : aa 30 à 60 et 121 à 127 (fig. G9) (WHYTE *et al.*, 1989) et s'établit avec la même efficacité pour l'Ad5 et l'Ad12 (JELINEK and GRAHAM, 1992). Une association similaire de p105<sup>RB</sup> à d'autres oncoprotéines de petits virus tumoraux à l'ADN a également été décrite. C'est le cas pour l'antigène T du SV40 (DE CAPRIO *et al.*, 1988) et pour la protéine E7 du papillomavirus humain de type 16 (HPV 16) (DYSON *et al.*, 1989). Une séquence consensus (L-X-C-X-E) s'est d'ailleurs dégagée pour la liaison de cette protéine au CR2 de E1A, à T de SV40 et à E7 d'HPV16 (DYSON *et al.*, 1989). Comme E1A, ces deux dernières protéines se lient préférentiellement à la forme non ou sous-phosphorylée de la p105<sup>RB</sup> (LUDLOW *et al.*, 1989; DYSON *et al.*, 1992; MITTNACHT *et al.*, 1994) et interfèrent ainsi avec sa fonction normale qui est de restreindre l'entrée des cellules dans le cycle.

Une étude structurale de la p105<sup>RB</sup> a révélé deux séquences non contiguës, formant un domaine dénommé "poche", nécessaire à la liaison des différentes oncoprotéines virales (HU *et al.*, 1990; HUANG *et al.*, 1990; KAELIN *et al.*, 1990). Il semble que le mécanisme d'action de E1A réside principalement dans sa capacité à entrer en compétition avec les partenaires normaux

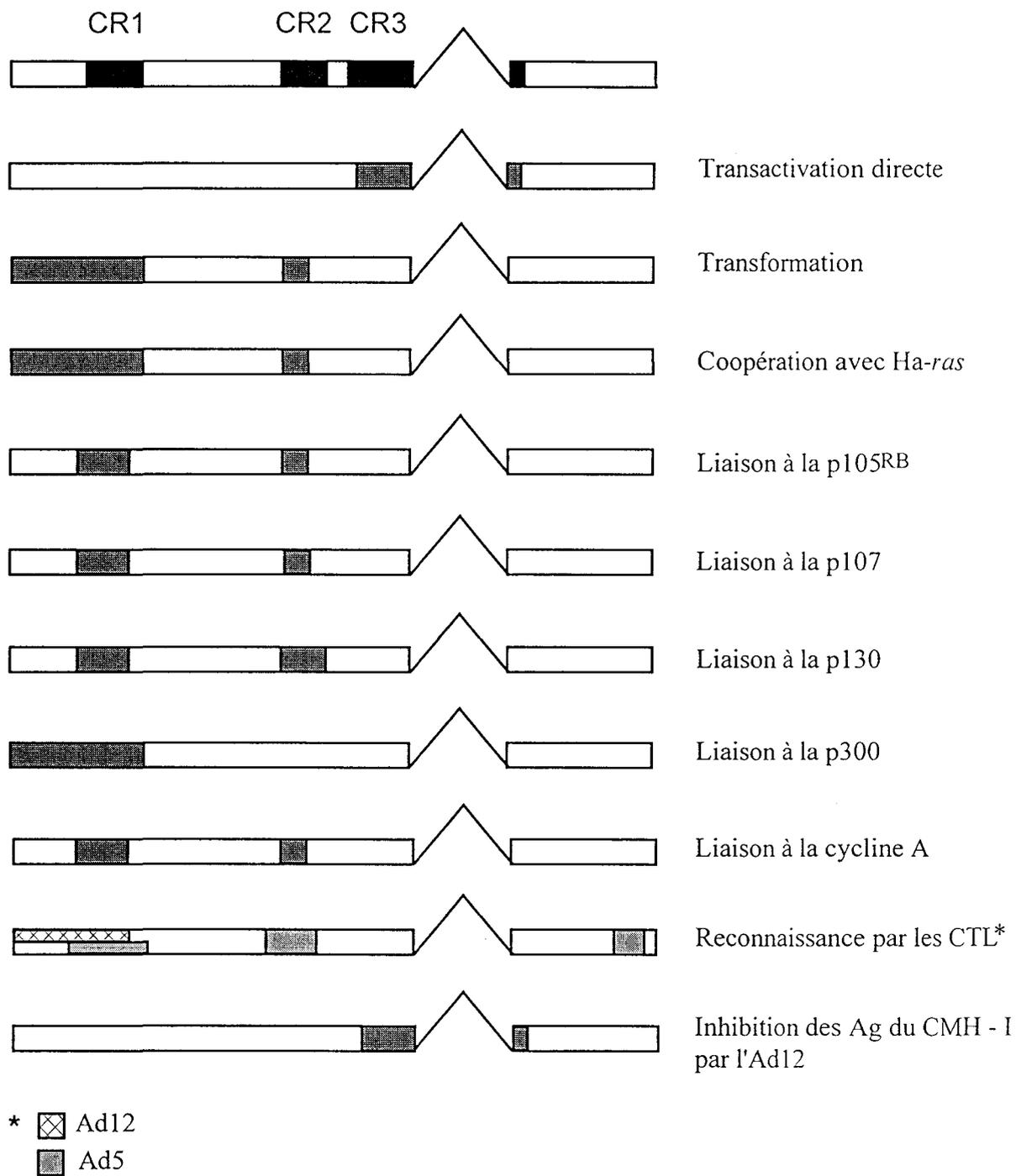


Figure G9: Fonctions des différents domaines de E1A.

de cet anti-oncogène qui requièrent eux-aussi cette poche pour leur interaction. Tel est le cas du facteur de transcription E2F impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes dont les produits sont importants pour la prolifération cellulaire (NEVINS, 1992). Ainsi en s'associant à p105<sup>RB</sup>, E1A libère E2F qui peut alors exercer sa fonction de transactivation sur ses gènes cibles. Récemment il a été montré que la p105<sup>RB</sup> se lie en réalité à toute une famille de facteurs de transcription E2F ayant probablement des spécificités distinctes (LEES *et al.*, 1993). Un autre exemple est celui de la cycline D1 régulée également par son association avec la p105<sup>RB</sup> (DOWDY *et al.*, 1993) et qui établit avec elle une relation différente de celle existant avec la cycline A, cette dernière étant probablement responsable de la phosphorylation de l'anti-oncogène et donc de la régulation de son activité (HINDS *et al.*, 1992).

### *la p107*

Les domaines de E1A participant à la liaison de cette protéine incluent surtout le CR2 (WHYTE *et al.*, 1989) mais aussi la séquence comprenant les aa 30 à 60 (DYSON *et al.*, 1992) tout comme pour la p105<sup>RB</sup> (fig. G9). Bien qu'apparentée structurellement à cette dernière, de par l'existence d'une "poche" similaire pour la liaison à E1A ou à d'autres oncoprotéines virales comme T de SV40 (EWEN *et al.*, 1991), la p107 s'en distingue à plusieurs niveaux. Ainsi l'une des différences majeures entre ces deux anti-oncogènes, tous deux régulés au cours du cycle cellulaire par phosphorylation, réside dans le fait que la p107 forme des complexes avec des kinases cyclines-dépendantes qui sont beaucoup plus stables que ceux impliquant la p105<sup>RB</sup> (EWEN *et al.*, 1992). D'autre part l'interaction qui existe avec le facteur de transcription E2F, également dissociée par la liaison à E1A, s'établit à une autre étape du cycle. Il a ainsi été montré que ces complexes p107-cycline A-cdk2/E2F coïncident avec l'apparition de la phase S contrairement à ceux impliquant la p105<sup>RB</sup> qui existent en phase G1 et sont dissociés à la transition G1/S (CAO *et al.*, 1992). En outre, une étude récente a montré que la p107 s'associe à une forme différente de celle de E2F-1 interagissant avec la p105<sup>RB</sup> (DYSON *et al.*, 1993).

### *la p130*

Des anticorps spécifiques de E1A peuvent coprécipiter également une autre protéine, la p130 (HARLOW *et al.*, 1986). En plus des aa 30 à 60, l'interaction de cette protéine avec le

produit du messager 12S nécessite l'intégralité du CR2 (BARBEAU *et al.*, 1994) (fig. G9). Des mutants de la protéine E1A, capables de s'associer à la p105<sup>RB</sup> et à la p107, mais défectifs dans l'interaction avec cette protéine, ont une capacité réduite à transformer des cellules primaires en coopération avec *ras* activé (WHYTE *et al.*, 1988b; GIORDANO *et al.*, 1991), aussi la p130 est-elle considérée également comme anti-oncogène.

Tout comme les deux protéines évoquées précédemment, la p130 s'associe avec la famille de facteurs de transcription E2F. Dans les fibroblastes de souris, elle semble d'ailleurs être le partenaire majeur de E2F en G0, partenaire remplacé ensuite par la p107 au cours de la transition G1/S (COBRINIK *et al.*, 1993). Or dans ces cellules, les protéines E1A sont capables de dissocier les complexes E2F présents en G0/G1 (MUDRYJ *et al.*, 1991) ceci suggère que E1A se lie à la p130 de la même façon qu'elle s'associe à la p105<sup>RB</sup> ou à la p107.

Les complexes E2F/p130 s'apparentent fortement aux complexes E2F/p107 par leur capacité à s'associer avec des kinases cyclines-dépendantes. Ainsi en 1993, COBRINIK *et al.* ont montré qu'en fin de phase G1, le complexe E2F/p130 interagit avec la cycline E-cdk2. En 1994, BARBEAU *et al.* ont décrit quant à eux l'association de p130 avec la cycline A. Cette cycline, responsable de la phosphorylation de la p130, est fortement stimulée dans les cellules infectées par l'Ad5.

### *la p300*

Outre le CR2 majoritairement impliqué dans la liaison à la p105<sup>RB</sup>, à la p107 et à la p130, un second domaine des protéines E1A, fonctionnellement indépendant, est requis pour la transformation. Celui-ci englobe la portion N-terminale et le CR1 de la protéine (fig. G9). L'activité transformante associée à ce domaine est étroitement reliée à son interaction avec une protéine de 300 kDa (EGAN *et al.*, 1988; WHYTE *et al.*, 1989).

La p300 est une phosphoprotéine nucléaire relativement stable dont le degré de phosphorylation varie au cours du cycle cellulaire (YACIUK and MORAN, 1991).

La liaison de E1A à cette protéine est corrélée à la répression de l'activité de certains *enhancers* et à l'induction de la synthèse d'ADN (JELSMA *et al.*, 1989; STEIN *et al.*, 1990).

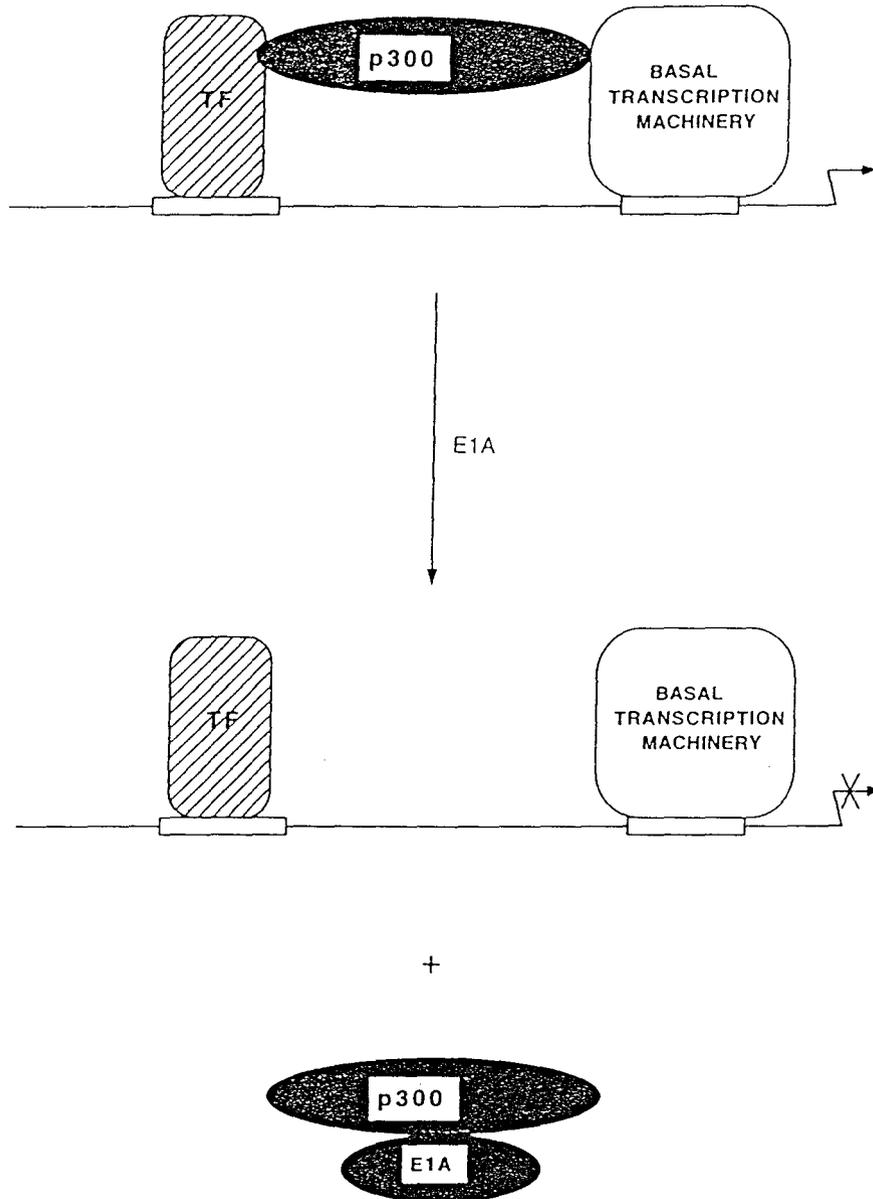
En 1992, RIKITAKE et MORAN ont montré que cette protéine possède intrinsèquement la propriété de se lier à certaines séquences d'ADN habituellement reconnues par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. En fait, la p300 est capable de stimuler la transcription en agissant comme "adaptateur" (ou co-activateur) (ECKNER *et al.*, 1994) et cette fonction est inhibée par E1A

(ARANY *et al.*, 1995) (fig. G10). Corroborant ces résultats, il a été montré très récemment que la p300 est l'homologue fonctionnel d'un autre "adaptateur", la CBP qui active le facteur de transcription CREB (LUNDBLAD *et al.*, 1995).

En dépit du fait que la liaison de la p300 requière certaines séquences non conservées dans la protéine E1A, il a été montré qu'elle s'établit avec la même efficacité pour l'Ad5 ou l'Ad12 (JELINEK and GRAHAM, 1992; WANG *et al.*, 1993). Néanmoins les produits de E1A d'Ad12 incluent des formes modifiées en N-terminal, particulièrement stables mais incapables d'interagir avec cette protéine cellulaire (WANG *et al.*, 1993). A ce jour, aucune corrélation n'a été établie entre l'existence de ces formes modifiées et les différences dans les propriétés transformantes de ces deux sérotypes.

#### IV - 4 - Oncogénicité.

Si tous les adénovirus sont capables de transformer des cellules de rongeurs *in vitro*, seules les cellules transformées par les sérotypes des sous-groupes A (Ad12) et B (Ad3) peuvent induire des tumeurs quand elles sont injectées à des animaux syngéniques immunocompétents comme les rats nouveaux-nés (BERNARDS *et al.*, 1983). Transformation et oncogénicité sont donc deux propriétés distinctes et non nécessairement associées. La tumorigénicité des cellules transformées dans ces animaux immunocompétents reflète le potentiel oncogénique des sérotypes d'adénovirus utilisés pour la transformation. Par contre si la tumorigénicité de ces cellules est testée chez des animaux immunodéficients comme les souris *nude*, une partie des cellules transformées par l'Ad2 (sous-groupe C) deviennent alors "efficaces" elles aussi (GALLIMORE *et al.*, 1977). Ceci a permis de formuler l'hypothèse que l'incapacité d'Ad2 d'induire des tumeurs pouvait provenir en partie de ce que les cellules qu'il transforme sont immunologiquement rejetées, tandis que les cellules transformées par l'Ad12 peuvent échapper à la surveillance immunitaire. Confortant cette hypothèse, il a été montré que les cellules transformées par l'Ad12 expriment à leur surface un taux réduit d'antigènes (Ag) du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) comparé aux cellules transformées par l'Ad5 (SCHRIER *et al.*, 1983; BERNARDS *et al.*, 1983). La diminution de l'expression en surface de ces protéines coïncide d'ailleurs avec une lyse réduite de ces cellules par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) syngéniques (BERNARDS *et al.*, 1983; EAGER *et al.*, 1985). En accord avec cette interprétation d'un rôle des Ag du CMH-I dans l'oncogénicité, il a été montré que la



**Figure G10:** Modèle de répression de la fonction co-activatrice de la p300 par E1A.  
(D'après JONES, 1995)

tumorigénicité des cellules de souris transformées par l'Ad12 est inhibée par l'expression d'un gène du CMH-I transfecté (TANAKA *et al.*, 1985). Un traitement à l'interféron (IFN) restaurant l'expression des gènes de classe I endogènes produit également cet effet (HAYASHI *et al.*, 1985).

Chez la souris *nude*, l'efficacité avec laquelle les cellules transformées par l'Ad2 induisent des tumeurs reste bien inférieure à celle des cellules transformées par l'Ad12. Or les souris *nude* sont incapables de générer une réponse CTL. De plus il a été montré que certaines lignées de souris ou de hamster transformées par l'Ad2 ou l'Ad5 pouvaient présenter de bas niveaux d'expression des Ag du CMH-I, comparables à ceux des cellules transformées par l'Ad12 et étaient cependant incapables d'induire des tumeurs après injection à des animaux syngéniques immunocompétents (HADDADA *et al.*, 1986). Inversement, une lignée transformée par l'Ad2 devenue fortement oncogénique après adaptation *in vivo* avait conservé néanmoins le même niveau d'expression d'Ag du CMH-I (HADDADA *et al.*, 1986). En conséquence, l'absence d'expression des Ag du CMH-I ne peut rendre compte à elle seule de l'oncogénicité des cellules transformées par l'Ad12.

Mise à part l'immunité spécifique assurée par les CTL, il existe en effet un second effecteur pouvant contribuer à la réponse anti-tumorale : les cellules *natural killer* (NK). Or il existe entre les cellules transformées, ou même infectées, par les deux sérotypes une différence de sensibilité vis à vis de la lyse assurée par ces cellules. Ainsi les cellules transformées par l'Ad12 y sont très peu sensibles ou résistantes, tandis que celles transformées par l'Ad2 y sont sensibles (Tableau II) (COOK *et al.*, 1982; RASKA and GALLIMORE, 1982). En tenant compte du fait que les souris *nude* contiennent des cellules NK fonctionnelles, ceci peut expliquer également la différence d'oncogénicité observée entre les deux sérotypes. D'autre part, il a été montré par SHEIL *et al.* (1984) que la sensibilité des cellules transformées par l'Ad2 à la lyse par les NK est directement corrélée à l'absence de tumorigénicité *in vivo*.

## **V - Antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.**

(Revue : DEMANT *et al.*, 1989; COLOMBANI, 1991; MÖLLER and HÄMMERLING, 1992; RAMMENSEE *et al.*, 1993).

Sous-groupe	Sérotypes	Efficacité de transformation	Oncogénicité chez les rongeurs nouveaux-nés	Niveau d'Ag du CMH-I à la surface des cellules transformées	Sensibilité des cellules transformées aux NK
A	12, 18	++	+++	bas	basse
B	3, 7	++	+	moyen	
C	2, 5	+++	-	haut	haute
D	8, 9	+	-		
E	4	+	-		
F	40, 41	+	-	bas	

**Tableau II:** Caractéristiques des cellules transformées par les adénovirus humains.

### V - 1 - Restriction par le CMH.

Les Ag du CMH-I jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire aux cellules infectées ou transformées. En effet, les structures antigéniques exprimées à la surface de ces cellules "anormales" ne sont reconnues par les CTL qu'en association avec les molécules du CMH-I. C'est le phénomène de restriction décrit en 1974 par ZINKERNAGEL et DOHERTY.

### V - 2 - Structure des antigènes du CMH-I.

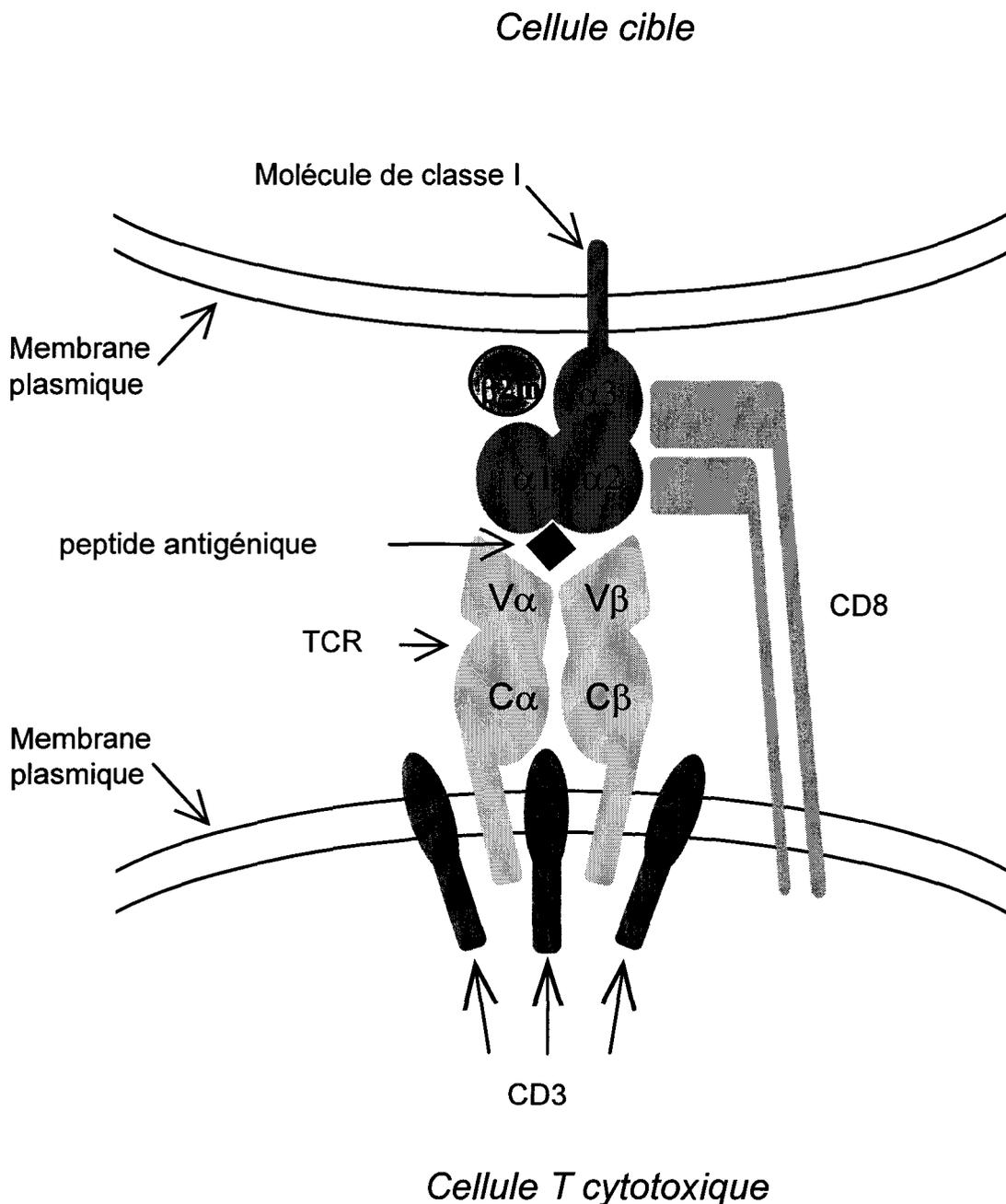
Seuls les Ag du CMH-I de souris qui intéressent notre étude seront évoqués ici.

Les molécules du CMH-I sont composées d'une chaîne lourde glycosylée transmembranaire d'environ 45 kDa associée de manière non covalente à une chaîne légère (12 kDa) de  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2-m). La  $\beta$ 2-m est codée par un gène situé sur le chromosome 2 de la souris tandis que la chaîne lourde est codée par l'un des gènes de classe I H-2K, -D ou -L du CMH (H-2 chez la souris) situé sur le chromosome 17. Deux des trois domaines extracellulaires,  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2, forment une "poche" pour la liaison du déterminant antigénique (BJORKMAN *et al.*, 1987) tandis que la  $\beta$ 2-m stabilise la conformation de la chaîne lourde permettant ainsi la liaison de l'Ag (KOZLOWSKI *et al.*, 1991) (fig. G11).

### V - 3 - Apprêtement et présentation de l'antigène.

(Revue : LJUNGGREN, 1992; NEEFJES and MOMBURG, 1993).

La molécule du CMH-I ne présente pas, sauf exception, l'Ag natif mais un fragment de celui-ci. Pour l'haplotype H-2K<sup>b</sup>, il a été montré qu'il correspond le plus souvent à un octamère (FALK *et al.*, 1991). Ainsi pour pouvoir s'associer au complexe binaire chaîne lourde/ $\beta$ 2-m stabilisé dans le réticulum endoplasmique (RE) par une protéine de 88 kDa (DEGEN and WILLIAMS, 1991) identifiée depuis comme la calnexine, une protéine chaperon (AHLUWALIA *et al.*, 1992), la protéine antigénique doit subir un "apprêtement". La dégradation de la protéine native, première étape de l'"apprêtement", est réalisée au travers d'une structure appelée protéasome. Le protéasome est un complexe protéolytique ATP-dépendant dont les sous-unités



**Figure G11:** Représentation schématique de l'interaction des antigènes du CMH de classe I présentés par la cellule cible avec le récepteur du lymphocyte T cytotoxique. Le récepteur de la cellule T (TCR) reconnaît le peptide antigénique présenté par la partie polymorphe de la molécule de classe I, tandis que le CD8 interagit avec les déterminants monomorphes des protéines de classe I. (D'après DEMANT *et al.* (1989), modifié).

sont codées en partie par deux gènes localisés dans la région du CMH-II, *Imp2* et *Imp7*. La translocation du cytosol au RE du peptide résultant de cette dégradation est ensuite assurée par les produits de deux gènes, *Tap1* et *Tap2* (*Transporter Associated with antigen Presentation*). Ces deux gènes ont également été cartographiés dans la région du CMH-II et font partie de la famille de transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*) situés sur la membrane de RE. Après translocation, ces peptides s'associent aux molécules du CMH-I pour être exprimés à la surface des cellules (fig. G12).

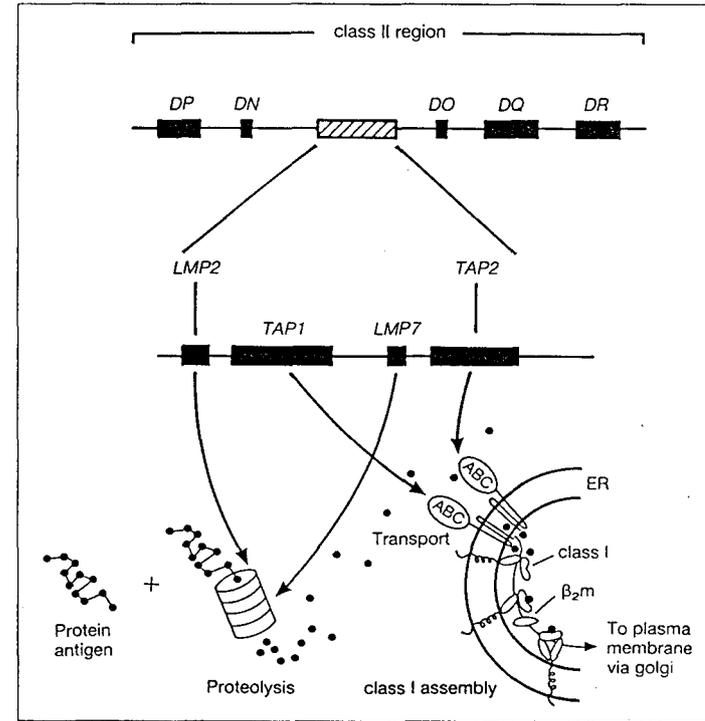
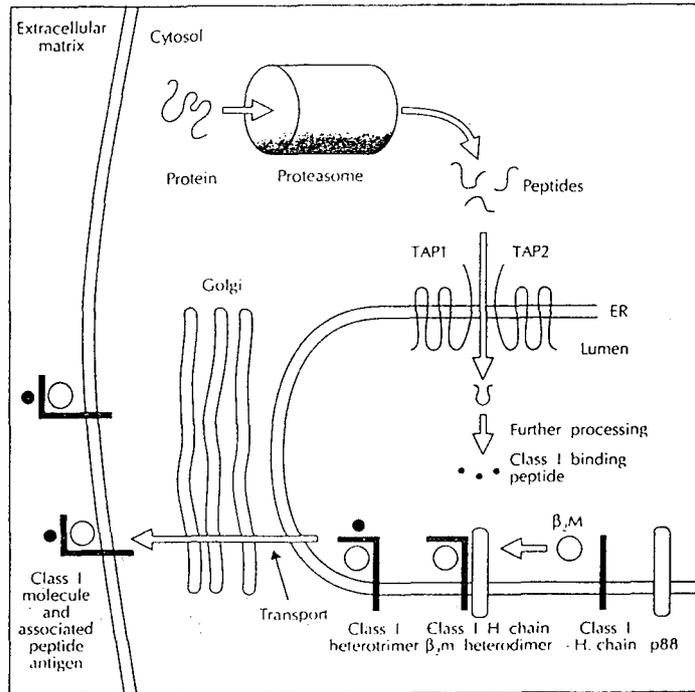
Bien qu'à des taux variables selon les tissus, les molécules du CMH-I sont exprimées sur la plupart des cellules somatiques (HOOD *et al.*, 1983). Le système nerveux central de même que les cellules embryonnaires en sont néanmoins dépourvues (OZATO *et al.*, 1985). Il existe également des différences quantitatives dans l'expression des produits des gènes appartenant à différents loci; par exemple le produit du gène H-2K est généralement exprimé à de plus hauts niveaux que ceux des gènes H-2D et H-2L (LE and DOYLE, 1982).

#### **V - 4 - Déterminants antigéniques de la région transformante des adénovirus.**

Ce sont les protéines E1A qui fournissent de façon prédominante les déterminants antigéniques reconnus par les CTL (SAWADA *et al.*, 1986 ; BELLGRAU *et al.*, 1988). Chez le rat Lister les épitopes immunodominants pour les CTL spécifiques des cellules transformées par l'Ad5 ont été localisés dans le second exon des protéines E1A (URBANELLI *et al.*, 1989; SAWADA *et al.*, 1994), tandis que pour les cellules transformées par l'Ad12, ceux-ci sont compris dans la partie N-terminale du premier exon (SAWADA *et al.*, 1994). Dans le modèle des rats Fischer, ROUTES *et al.* (1991) ont localisé quant à eux deux épitopes dans E1A d'Ad5 au niveau du premier exon dans les domaines CR1 et CR2 (fig. G9). Chez la souris, tout comme chez le rat, les déterminants reconnus par les CTL sont fonction du répertoire d'Ag du CMH-I de l'animal. Pour la souris d'haplotype H-2D<sup>d</sup>, cet épitope provient également du second exon de E1A d'Ad5 (KAST *et al.*, 1989).

#### **V - 5 - Régulation de l'expression des antigènes du CMH-I.**

(Revue : McFADDEN and KANE, 1994).



**Figure G12:** Relation entre protéasome, transporteurs de peptides et molécules du CMH-I.

A: Modèle schématique de la genèse du peptide antigénique, de son chargement et du transport intracellulaire des molécules du CMH de classe I.

(D'après NEEFJES et MOMBURG, 1993).

B: Position des gènes de molécules de classe II, de composants du protéasome et de transporteurs.

DP, DN, DO, DQ et DR: loci des molécules du CMH de classe II.

(D'après TROWSDALE, 1993).

Une littérature abondante concernant une expression réduite des Ag du CMH-I en surface des cellules fournit différents exemples de niveaux auxquels cette expression peut être bloquée. Chacune des entités du complexe trimoléculaire chaîne lourde/ $\beta$ 2-m/peptide, mais aussi chaque étape de l'expression peuvent être impliquées. En fonction de la nature du mécanisme à l'origine de ce déficit, l'expression de ces molécules en surface des cellules, est soit irréversiblement bloquée, soit encore peut être restaurée par différents stimuli agissant en tant que signaux inducteurs ou activateurs.

Un exemple intéressant de contrôle post-traductionnel est illustré par le rôle de la protéine de 19 kDa codée par la région E3 des adénovirus appartenant aux sous-groupes B, C, D et E. Cette protéine, résidente du RE de par l'existence d'une séquence signal de rétention dans ce compartiment de la cellule, s'associe aux complexes chaîne lourde/ $\beta$ 2-m à la fois dans les cellules transformées et infectées de façon productive, empêchant ainsi leur transport à la surface cellulaire (PÄÄBO *et al.*, 1986; WOLD and GOODING, 1991). Il a été montré que ce phénomène de rétention est cependant spécifique de certains haplotypes. Ainsi l'expression des antigènes H-2D<sup>b</sup> est affectée par cette protéine tandis que celle des antigènes H-2K<sup>b</sup> ne l'est pas (TANAKA and TEVETHIA, 1988).

Plusieurs études attestent de l'existence d'un contrôle post-transcriptionnel de l'expression des Ag du CMH-I dans les cellules transformées par l'Ad12, soit au niveau de la maturation des ARN (VAESSEN *et al.*, 1987b), soit au niveau du transport de ces molécules à la surface cellulaire (SHEMESH *et al.*, 1991). Ainsi il a été montré récemment que dans les cellules transformées par l'Ad12 l'expression des gènes codant les transporteurs Tap1 et Tap2 est inhibée (ROTEM-YEHUDAR *et al.*, 1994a). Cependant, il est admis que cette répression s'exerce principalement au niveau de l'initiation de la transcription (FRIEDMAN and RICCIARDI, 1988; ACKRILL and BLAIR, 1988; MEIJER *et al.*, 1989; LASSAM and JAY, 1989). De plus l'inhibition de l'expression des molécules du CMH-I est probablement un effet indirect de la transformation puisqu'au cours de l'infection de cellules d'embryon de souris par l'Ad12, la transcription du gène H-2K<sup>b</sup> est initialement augmentée (ROSENTHAL *et al.*, 1985).

L'implication de la région E1A dans l'inhibition transcriptionnelle de l'expression des Ag du CMH-I en surface des cellules transformées par l'Ad12 a été mise en évidence par plusieurs groupes (BERNARDS *et al.*, 1983; SCHRIER *et al.*, 1983; VAESSEN *et al.*, 1986; VASAVADA *et al.*, 1986). Il s'avère que c'est en fait le produit du messager 13S de E1A d'Ad12 qui est responsable de cet effet (BERNARDS *et al.*, 1983; SCHRIER *et al.*, 1983; KATOH *et al.*, 1990; MEIJER *et al.*, 1991). Par ailleurs, les travaux de JOCHEMSEN *et al.* en

1984 ont démontré que les séquences contenues dans le second exon de la protéine de 266R ne sont pas importantes pour cette propriété. Enfin, par l'utilisation de régions E1A hybrides entre l'Ad2 et l'Ad12, LECLERE en 1993 a pu délimiter le domaine impliqué dans la régulation transcriptionnelle négative des gènes du CMH-I à la partie carboxy-terminale du CR3. Récemment, des résultats différents ont été publiés : deux régions contenues dans le premier exon de E1A d'Ad12, à l'exclusion du domaine transactivateur CR3, seraient impliquées dans cette fonction. La première est située entre les aa 1 à 42, la seconde entre les aa 105 à 144 incluant le *spacer* (PEREIRA *et al.*, 1995; KUSHNER *et al.*, 1996). Comme nous l'avons évoqué au paragraphe III - 1 - c -  $\beta$ , cet élément, absent des protéines E1A d'Ad2/5, contient un pourcentage élevé en résidus alanine, ce qui apparaît être une caractéristique de certains répresseurs transcriptionnels (LICHT *et al.*, 1990; JELINEK *et al.*, 1994; TELLING and WILLIAMS, 1994).

#### **V - 6 - Promoteur du gène H-2K<sup>b</sup>.**

(Revue par ELLIOTT *et al.*, 1989 ; DAVID-WATINE *et al.*, 1990 ; TING et BALDWIN, 1993).

La transformation, par la région E1 d'Ad12, de cellules primaires de rein dérivées de souris transgéniques portant le gène de l'hormone de croissance humaine sous le contrôle des éléments régulateurs du gène de classe I H-2K<sup>b</sup> montre que les séquences situées entre -2015 et +12 suffisent pour la régulation négative du transgène (MEIJER *et al.*, 1989). Les travaux présentés dans ce mémoire ont en partie pour objet d'étudier la régulation transcriptionnelle du gène de souris H-2K<sup>b</sup> dans les cellules transformées par l'Ad2 et l'Ad12. Il nous a donc semblé intéressant de présenter, dans les paragraphes suivants, les différents éléments qui régulent la transcription du gène, de même que l'état actuel des connaissances sur les mécanismes de dérégulation induits par l'expression de la région E1A d'Ad12.

##### **V - 6 - a - Eléments de contrôle.**

En plus d'une TATA *box* et d'une CAAT *box* consensus, situées respectivement à -25 et -51 pb par rapport au site d'initiation de la transcription, l'étude du promoteur du gène H-2K<sup>b</sup> par

délétions et par comparaison de séquences a permis de démontrer l'existence de deux séquences à activité *enhancer*. La première, dénommée *enhancer A*, est localisée entre -205 et -159 et recouvre en partie une séquence consensus de réponse à l'IFN (IRS pour *Interferon Responsive Sequence*). La seconde, l'*enhancer B*, est située entre -120 et -61 (fig. G13). Ces deux *enhancers* sont conservés dans les promoteurs de la plupart des gènes murins codant les molécules du CMH-I (KIMURA *et al.*, 1986).

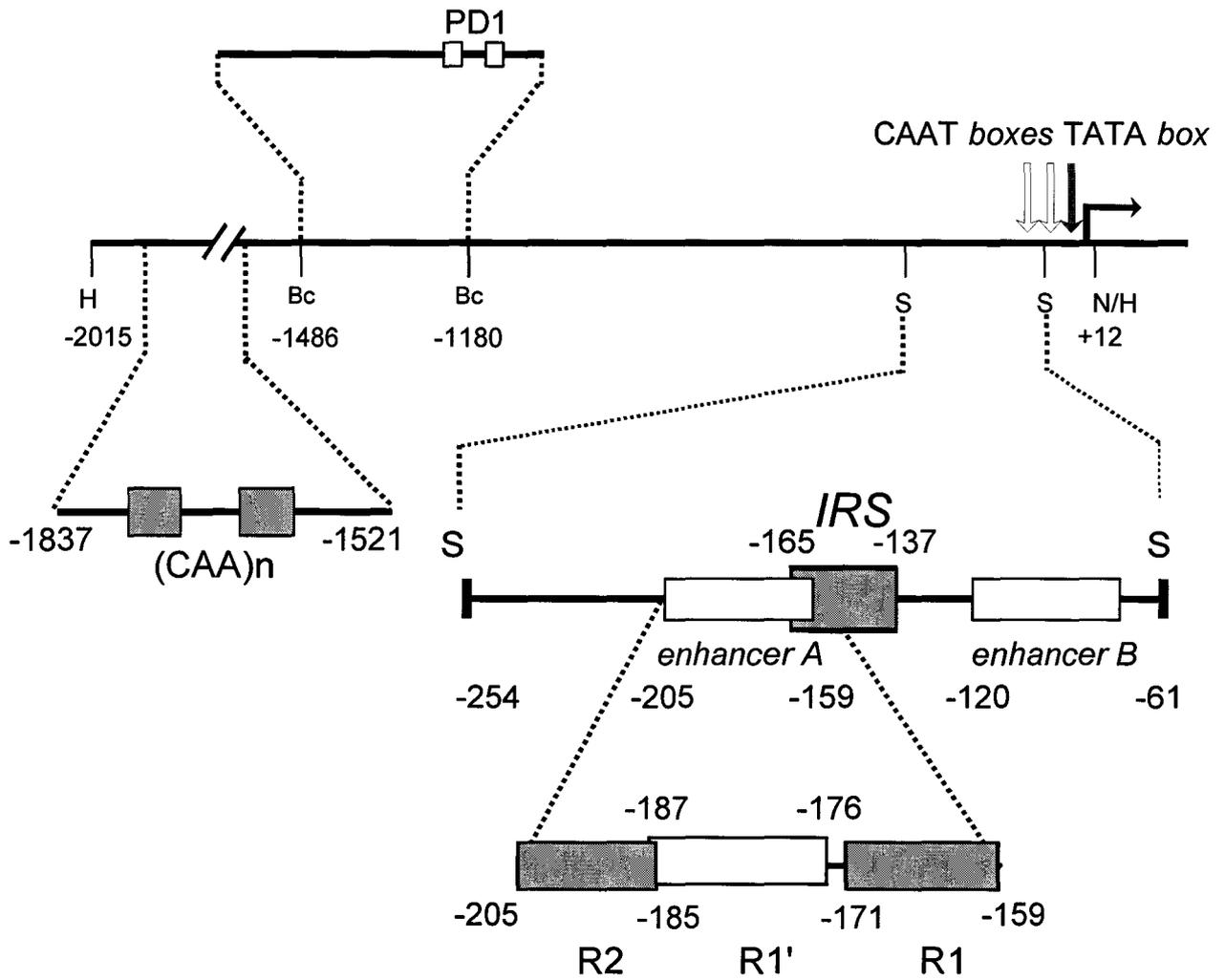
#### V - 6 - a - $\alpha$ - *Enhancer B*.

Cet élément est caractérisé par la présence d'une CAAT *box* inversée entre -75 et -71. SHARP et ses collaborateurs, en 1988, ont démontré que cette séquence pentanucléotidique (CCAAT) constitue un site de liaison à haute affinité pour une protéine, présente dans les extraits nucléaires de cellules HeLa, appelée CP2 (pour *CAAT binding Protein 2*). Celle-ci est également capable d'interagir fortement avec la CAAT *box* située plus en aval qui s'avère, quant à elle, être aussi reconnue par une protéine apparentée mais distincte, dénommée CP1 (CHODOSH *et al.*, 1988). Les travaux de DRIGGERS *et al.* en 1992 semblent indiquer, au contraire, qu'aucune interaction n'a lieu au niveau de cette CAAT *box* inversée. Selon ces auteurs, un site NF-1 situé juste en aval de celle-ci interagirait avec un facteur nucléaire et fonctionnerait donc comme activateur transcriptionnel.

En plus de cette séquence, l'*enhancer B* contient un site très proche du consensus AP-1 entre -100 et -94, relativement bien conservé parmi les gènes murins du CMH-I (KIMURA *et al.*, 1986). Ce site est capable d'interagir *in vitro* avec le facteur de transcription AP-1 purifié à partir de cellules HeLa (KORBER *et al.*, 1988). Par ailleurs, un élément de réponse à l'AMPc (CRE) a été mis en évidence dans la région comprise entre -109 et -84. Les protéines interagissant *in vivo* avec cet élément appartiennent à la famille de facteurs de transcription CREB/ATF (ISRAËL *et al.*, 1989a) (fig. G14).

#### V - 6 - a - $\beta$ - *Enhancer A*.

Cet *enhancer* est caractérisé par l'existence d'une série de palindromes se chevauchant qui constituent des sites de liaison pour différents facteurs de transcription (ISRAËL *et al.*, 1989a). Le cœur de l'*enhancer* est un palindrome parfait dénommé (ab) situé entre -171 et -159.



**Figure G13** : Représentation schématique du promoteur H-2K<sup>b</sup> et cibles de la régulation négative par E1A de l'Ad12.

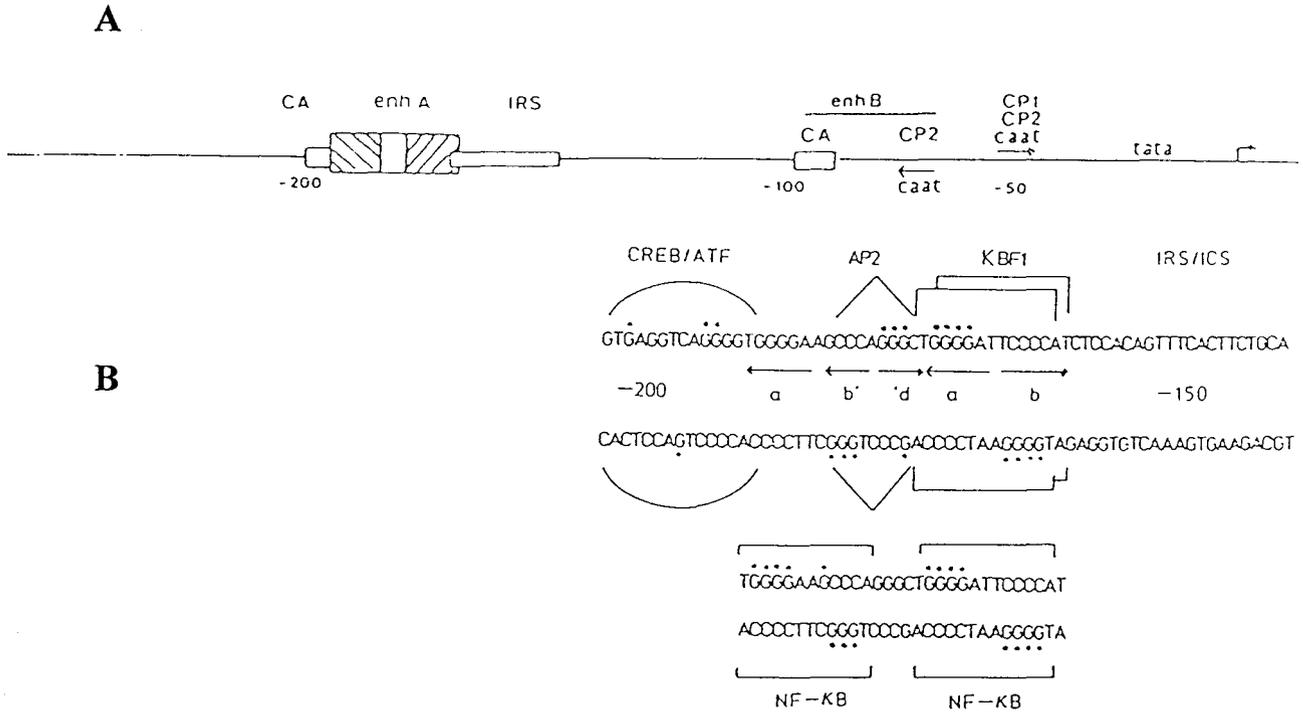
Bc : *Bcl* I, H : *Hind* III, N : *Nru* I, S : *Sau*3A I.

Une copie imparfaite de celui-ci (ab') se trouve quelques nucléotides plus en amont entre -187 et -176. Enfin, ces deux palindromes sont séparés par une courte séquence, appelée ('d) puisque symétrique à (b') et donc un peu analogue à (a). En conséquence un troisième palindrome parfait, dénommé (b'd) recouvre en partie (ab') (fig. G14). Dans la division de l'*enhancer* A selon SHIRAYOSHI *et al.* (1987), le palindrome (ab) correspond plus simplement à la région R1, tandis que (ab') pourrait être référencé comme R1'. La région R2 correspond, quant à elle, à des séquences localisées du côté 5' de l'*enhancer* entre -205 et -185 (fig. G13).

Les travaux du groupe de KOURILSKY, en 1987, ont permis d'identifier, à partir de thymocytes de souris, un premier facteur nucléaire interagissant avec l'*enhancer* A et qui régule positivement la transcription des gènes du CMH-I. Ce facteur, appelé KBF1 et d'un poids moléculaire de 48 kDa, interagit, en tant que dimère, fortement avec la région R1, plus faiblement avec R1' mais également avec l'*enhancer* du gène de la  $\beta$ 2-m (ISRAËL *et al.*, 1987; YANO *et al.*, 1987). Un autre facteur, KBF2 se lie aussi à ces différentes séquences. C'est une protéine de 58 kDa détectée dans différents extraits nucléaires mais qui, contrairement à KBF1, n'interagit qu'en tant que monomère en contactant seulement la moitié du palindrome. Les activités KBF1 et KBF2 sont présentes dans la plupart des cellules différenciées où les Ag du CMH-I sont exprimés. En revanche, l'activité KBF1 est absente dans les cellules de carcinome embryonnaire indifférenciées où les gènes du CMH-I et de la  $\beta$ 2-m sont silencieux. Lors de la différenciation cette activité est induite et les séquences palindromiques deviennent alors actives en tant qu'*enhancer*, suggérant que l'activité KBF1 est régulée durant la différenciation (ISRAËL *et al.*, 1989b). A l'heure actuelle, la fonction de KBF2 et sa relation à KBF1, si elle existe, est encore inconnue.

A partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa, BALDWIN et SHARP, en 1987, ont mis en évidence un troisième facteur: H2TF1 (pour *H-2 Transcription Factor 1*). Ce facteur ubiquitaire interagit également avec la région R1, en contactant les mêmes nucléotides que ceux impliqués lors de l'interaction avec KBF1. Néanmoins, H2TF1 a un poids moléculaire de 110 kDa contre 48 kDa seulement pour KBF1, ce qui laisse penser que ces deux facteurs sont distincts (BALDWIN, communication personnelle).

D'autres travaux ont démontré que deux facteurs nucléaires supplémentaires sont également capables d'interagir avec la région R1: le premier, EBP-1, a été isolé à partir de cellules HeLa et possède une masse moléculaire apparente de 60 kDa (CLARK *et al.*, 1988), le second, MBP-1 (ou PRDIIBF1) est une protéine de 300 kDa possédant deux domaines de liaison à l'ADN du type doigt de zinc (BALDWIN *et al.*, 1990; FAN and MANIATIS, 1990).



**Figure G14:** Eléments de contrôle du promoteur H-2K<sup>b</sup>.

A: Région proximale du promoteur avec les séquences fonctionnelles et les sites de fixation pour différentes protéines nucléaires.

CA: site de fixation pour la famille de facteurs CREB/ATF.

B: Séquences palindromiques et sites de liaison de facteurs de transcription au niveau de l'*enhancer* A.

Les points de contact sur les résidus guanidyles sont indiqués.

En haut: avec un extrait de cellules contrôle HeLa.

En bas: avec un extrait de cellules HeLa traitées au TNF- $\alpha$ .

(D'après DAVID-WATINE *et al.*, 1990).

Enfin, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, identifié à l'origine par sa capacité à se lier à l'*enhancer* du gène de la chaîne légère  $\kappa$  des Ig (SEN and BALTIMORE, 1986), est également capable d'interagir avec les mêmes séquences que KBF1 (BALDWIN and SHARP, 1988). En fait, ces deux facteurs appartiennent à la même famille de facteurs de transcription Rel/NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B correspond à un hétérodimère de protéines de 50 et 65 kDa (BAEUERLE and BALTIMORE, 1989) alors que KBF1 est un homodimère de deux molécules de 50 kDa (KIERAN *et al.*, 1990). Tandis que l'activité KBF1 est présente de façon constitutive dans le noyau de la plupart des cellules différenciées (ISRAËL *et al.*, 1989b), l'activité NF- $\kappa$ B ne l'est que dans les cellules B matures. Dans les cellules pré-B et dans les cellules non-B, cette activité est séquestrée dans le cytoplasme sous forme d'un complexe ternaire avec la protéine inhibitrice I- $\kappa$ B $\alpha$  (BAEUERLE and BALTIMORE, 1988). La forme cytoplasmique peut être activée par différents stimuli comme les lipopolysaccharides bactériens (LPS), les esters de phorbol et le TNF- $\alpha$ . En 1989, KOURILSKY et collaborateurs ont démontré que l'activité NF- $\kappa$ B est induite dans les cellules traitées par le TNF- $\alpha$  et se lie aux régions R1 et R1' en déplaçant KBF1 de la région R1 et AP-2 de la région interpalindromique (b''d) (ISRAËL *et al.*, 1989a) (fig. G14).

En ce qui concerne la région R2 (-205 à -185) (fig. G13), celle-ci est le siège d'interactions beaucoup moins nombreuses. Cette région semble d'ailleurs ne pas contribuer significativement à l'activité basale de l'*enhancer*, tout au moins dans les cellules testées jusqu'à présent (BURKE *et al.*, 1989). Sa séquence rappelle à la fois les sites de liaison consensus pour la famille de facteurs de transcription CREB/ATF (ISRAËL *et al.*, 1989a) mais aussi les sites de reconnaissance des membres de la superfamille des récepteurs d'hormones nucléaires (HAMADA *et al.*, 1989).

Il a été montré en 1988 par KORBER *et al.* que le facteur AP-1 purifié est capable d'interagir *in vitro* avec cette région. Les travaux d'HAMADA *et al.* (1989) ont permis, quant à eux, de mettre en évidence l'interaction d'un facteur dénommé H-2RIIBP (plus communément connu comme le récepteur aux rétinoïdes RXR $\beta$  (MANGELSDORF *et al.*, 1990)) avec cette région. Ce récepteur est d'ailleurs capable de transactiver un gène *reporter* contenant la région R2 quand celui-ci est transfecté dans des cellules de carcinome embryonnaire indifférenciées traitées par l'acide rétinoïque (NAGATA *et al.*, 1992).

### V - 6 - a - $\gamma$ - IRS.

L'élément de réponse à l'IFN (IRS) a été mis en évidence la première fois dans le promoteur H-2K<sup>b</sup> et dans bien d'autres gènes du CMH-I par KIMURA *et al.* en 1986. Il est localisé entre -165 et -137 et recouvre donc en partie la région R1 de l'*enhancer* A (fig. G13 ).

Les travaux d'ISRAËL *et al.* en 1986 ont permis de démontrer que l'IRS est actif avec chacun des types d'IFN ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) mais seulement en conjonction avec l'*enhancer* A. Les résultats obtenus par d'autres groupes semblent indiquer, au contraire, que dans certains types cellulaires l'IRS seul suffit à conférer une réponse aux trois types d'IFN (SUGITA *et al.*, 1987; KORBER *et al.*, 1987).

Par analyses de retard en gel et interférence à la méthylation, SHIRAYOSHI *et al.* (1988) ont mis en évidence l'interaction d'un facteur constitutif et de deux facteurs induits après traitement aux IFN de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) avec l'IRS du gène H-2L<sup>d</sup>. Ces auteurs ont également montré que l'un de ces facteurs peut être induit en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique et doit donc probablement être responsable de l'induction rapide de la transcription de la classe I observée après traitement à l'IFN, tandis que l'autre s'avère sensible à ces inhibiteurs. Le groupe de P. SHARP, l'année suivante, a détecté dans les cellules HeLa l'induction d'une protéine d'environ 59 kDa capable d'interagir avec l'IRS après traitement par l'IFN $\gamma$ . Cette activité de liaison à l'ADN, dénommée IBP-1 est également sensible à la cycloheximide (BLANAR *et al.*, 1989). Enfin, deux facteurs supplémentaires capables de se lier à la fois au promoteur du gène de l'IFN $\beta$  et à celui du gène H-2K<sup>b</sup> ont été mis en évidence par HARADA *et al.* en 1989. Le premier, IRF-1, fonctionne comme activateur transcriptionnel, le second, IRF-2, comme répresseur. Récemment, il a été montré qu'IRF-1 (induit par traitement à l'IFN $\gamma$ ) interagit physiquement avec NF- $\kappa$ B (induit par traitement au TNF- $\alpha$ ) et coopère avec celui-ci pour l'activation de la transcription des gènes du CMH-I (DREW *et al.*, 1995).

### V - 6 - b - Mécanismes de dérégulation induits par E1A d'Ad12.

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études ont été entreprises en vue d'identifier les cibles de la répression de la transcription par E1A d'Ad12 au niveau du promoteur H-2K<sup>b</sup>. Nous évoquerons dans ce paragraphe certains des travaux réalisés dans ce but sans entrer

néanmoins dans les détails puisqu'ils seront rediscutés après présentation de nos résultats personnels.

Plusieurs groupes ont suggéré que l'*enhancer* A pouvait être impliqué dans ce mécanisme de répression. Selon MEIJER *et al.* (1992) et SCHOUTEN *et al.* (1995), la région R1 seule suffirait à la régulation négative de la transcription du gène H-2K<sup>b</sup>. Pour ces deux groupes de recherche, le mécanisme implique une réduction de la liaison des facteurs KBF1 et NF- $\kappa$ B à l'élément R1 dans les cellules transformées par l'Ad12 comparées aux cellules transformées par l'Ad5.

Pour d'autres auteurs, en revanche, il s'agirait plutôt d'un mécanisme actif de répression contrôlé par la région R2. Les travaux d'ACKRILL et BLAIR, dès 1989, ont en effet permis de noter l'existence d'un facteur capable d'interagir avec cette région présent uniquement dans les cellules transformées par l'Ad12. Sans en déterminer la nature et le rôle fonctionnel précis, ces auteurs ont néanmoins démontré que ce facteur est distinct des facteurs AP-1, ATF et CREB. De la même façon, MEIJER *et al.* (1991; 1992) ont également observé une activité de liaison à cet élément fortement augmentée dans les cellules transformées exprimant le produit de l'ARNm 13S de E1A d'Ad12. En 1992, les travaux de GE *et al.* et ceux de KRALLI *et al.* ont pu alors clairement démontrer que la région R2 fonctionne comme élément négatif dans les cellules transformées par l'Ad12 au travers de l'interaction avec un facteur reconnaissant la même séquence que la protéine H-2RIIBP. En fait, le répresseur, R2BF, présentant une spécificité de liaison et une masse moléculaire apparentes similaires à celles des membres de la famille de récepteurs TR/RAR (récepteur d'hormones thyroïdiennes/récepteur à l'acide rétinoïque), interférerait avec la fonction de facteurs de transcription se liant à l'élément R1 avoisinant, compromettant ainsi l'activité de l'*enhancer* (KRALLI *et al.*, 1992). Par ailleurs, les travaux réalisés par GE *et al.* en 1994 ont permis de démontrer, par l'utilisation de cellules hybrides provenant de la fusion de cellules transformées par l'Ad5 avec des cellules transformées par l'Ad12, que ce mécanisme de répression est inaffecté par l'expression des protéines E1A d'Ad5. Ceci va à l'encontre d'un certain nombre d'études publiées antérieurement arguant que la répression de la transcription des gènes du CMH-I dans les cellules de rat transformées par l'Ad12 peut être contrecarrée par l'expression de E1A d'Ad5 (BERNARDS *et al.*, 1983; VAESSEN *et al.*, 1986). Pour KRALLI *et al.* (1992), l'activité de liaison à l'élément R2 contient au moins une protéine de 55-60 kDa ce qui semble exclure certains des récepteurs nucléaires orphelins caractérisés comme ceux de la famille COUP-TF dont les masses moléculaires vont de 42 à 46 et de 66 à 72 kDa (WANG *et al.*, 1991). En 1994, le même groupe de recherche a

cependant apporté la preuve que le complexe se liant à R2 est composé d'un dimère contenant au moins un des membres de cette famille. Son interaction avec la région R2 s'effectue au travers d'un demi-site consensus de type  $A/GGGTCA$  (AGGTCA au niveau du promoteur H-2K<sup>b</sup>) et d'un demi-site dégénéré localisé juste en 3' (GGGTGG) (fig. G14) (LIU *et al.*, 1994).

Enfin, il a été montré plus récemment que les régions R1 et R2 participent ensemble à ce mécanisme de répression. Ce dernier associerait à la fois l'augmentation de facteurs COUP-TF liés à R2 et la diminution de facteurs NF- $\kappa$ B liés à R1 dans les cellules transformées par l'Ad12 (KUSCHNER *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 1996). En ce qui concerne la diminution de facteurs NF- $\kappa$ B liés à R1, ces auteurs ont démontré qu'elle n'est pas due à une interférence dans la maturation du précurseur p105 de la sous-unité p50 de NF- $\kappa$ B comme proposé par SCHOUTEN *et al.* (1995) mais résulte probablement de l'existence d'un inhibiteur nucléaire bloquant la liaison de NF- $\kappa$ B à R1.

En désaccord avec ces différents travaux, ROTEM-YEHUDAR *et al.* (1994b) suggèrent au contraire que la région R2 est la seule à posséder une activité *enhancer* et que celle-ci est supprimée dans les cellules transformées par l'Ad12. Dans ce cas, le mécanisme n'implique pas de différences quantitatives ou qualitatives dans l'interaction de facteurs avec cet élément entre les cellules transformées par l'Ad5 et par l'Ad12 mais fait intervenir un élément *silencer* situé plus en amont.

Si l'*enhancer* A et les éléments qui le composent constituent, pour un certain nombre de groupes de recherche, la cible de l'inhibition par E1A d'Ad12, les travaux de KIMURA *et al.* en 1986 indiquent au contraire qu'il est aussi actif dans les cellules transformées par l'Ad12 que dans celles qui sont transformées par l'Ad5. Les études réalisées par KATOH *et al.* (1990) sur le promoteur du gène H-2K<sup>bm1</sup> (variant du gène H-2K<sup>b</sup> par délétion d'un seul nucléotide de type cytidylique à la position -456) ont permis de montrer, au contraire, que l'*enhancer* A et l'IRS sont les cibles d'une régulation positive par E1A dans les cellules transformées par l'Ad12. Pour ces auteurs, l'élément en *cis* responsable de l'inhibition de la transcription du gène est localisé beaucoup plus en amont entre -1837 et -1521. Un facteur spécifique des cellules transformées par l'Ad12 interagit d'ailleurs avec cette région. Plus récemment, des travaux réalisés par le même groupe de recherche ont permis de définir que deux motifs CAA répété (CAA(A)CAA) situés entre -1725 et -1705 et entre -1591 et -1568 (fig. G13) sont responsables, ensemble, de l'inhibition de la transcription du gène H-2K<sup>b</sup> dans les cellules transformées par l'Ad12. Des expériences de retard en gel ont par ailleurs démontré que des protéines similaires sont impliquées dans les complexes se fixant à chacun de ces motifs (OZAWA *et al.*, 1993). Une

séquence très ressemblante à la TATA *box*, localisée entre -1773 et -1767, pourrait également contribuer au mécanisme de répression en conjonction avec au moins l'un des deux motifs CAA répété. Dans les cellules transformées exprimant le produit de l'ARNm 13S de E1A d'Ad12, des complexes incluant la TBP sont capables d'interagir à la fois avec cette séquence TATA et avec la TATA *box* du promoteur basal (TANG *et al.*, 1995). Pour PROFFITT *et al.* (1994), la région s'étendant de -2000 à -1590 renfermant les différents éléments que nous venons d'évoquer n'est pas réprimée dans les cellules transformées par l'Ad12. Les études menées par ce groupe ont identifié la cible dans une région localisée plus en aval entre -1440 et -1180. Le mécanisme de répression semble faire intervenir la coopération de plusieurs éléments contenus dans cette région. Certains complexes protéiques interagissant avec ceux-ci correspondent à des protéines cellulaires activées dans les cellules transformées par l'Ad12 puisque ces complexes ont été mis en évidence aussi avec les extraits nucléaires préparés à partir de cellules primaires. Deux séquences présentant environ 50% d'identité avec un élément *cis*-répresseur impliqué dans la régulation transcriptionnelle du gène du CMH-I de porc PD1 (WEISSMAN and SINGER, 1991) ont été identifiées entre -1257 et -1226 et entre -1237 et -1206 (fig. G13). Il a été montré qu'un oligonucléotide comportant l'élément répresseur PD1 est capable d'entrer en compétition pour la liaison d'un facteur protéique avec une région chevauchant la séquence située entre -1237 et -1206 (PROFFITT *et al.*, 1994).

## VI - Cellules *natural killer*.

(Revue : RITZ *et al.*, 1988; GOPAS *et al.*, 1989; YOKOYAMA, 1993; MORETTA *et al.*, 1994; TRINCHIERI, 1994; RAULET and HELD, 1995).

### VI - 1 - Définition et caractéristiques.

Comme les CTL, les cellules NK font partie de la classe des grands lymphocytes granuleux (LGL pour *Large Granular Lymphocyte*). Elles représentent entre 4 et 10% des cellules lymphoïdes de l'organisme et ont été identifiées dans de nombreuses espèces de vertébrés. Ces cellules ont été, à l'origine, définies par leur capacité à induire spontanément, sans sensibilisation préalable, la lyse d'une variété de cibles cellulaires, principalement des cellules tumorales et des cellules infectées par des virus ou des bactéries, mais aussi dans certains cas des

cellules normales (TRINCHIERI, 1989). Leur action cytotoxique emprunte deux voies différentes: la cytotoxicité dite naturelle et la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC). Ces cellules sont surtout impliquées dans la surveillance à des stades précoces de l'infection ou du développement tumoral et se distinguent des autres lymphocytes par l'absence de récepteur de l'Ag de la cellule T (TCR) et B (Immunoglobuline, Ig).

Bien que leur mécanisme de cytotoxicité ne soit pas restreint au CMH, les cellules NK ont de nombreux points communs avec les lymphocytes T. Ces effecteurs de la réponse immune dérivent en effet d'un même progéniteur (SANCHEZ *et al.*, 1994), expriment certains Ag de surface communs (comme la molécule CD2, par exemple), utilisent une machinerie cytolitique dépendante de la perforine et de sérine-protéases (HUDIG *et al.*, 1993; KÄGI *et al.*, 1994) et sont responsables de la production de certaines cytokines (TRINCHIERI, 1989). Parmi les cytokines produites par les cellules NK, citons l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$  et l'IL-2 (revue par NAUME et ESPEVIK, 1994).

Le développement des cellules NK peut se réaliser en absence de thymus. En conséquence, une maturation phénotypique et fonctionnelle normale de ces cellules a lieu chez les souris *nude* et les souris SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*, souris présentant un défaut génétique correspondant à l'incapacité de combiner correctement les segments des gènes des TCR).

## **VI - 2 - Récepteurs des cellules NK.**

Un contact physique entre la cellule cible et la cellule effectrice est nécessaire au mécanisme de cytotoxicité. L'élucidation des bases moléculaires des mécanismes d'activation du programme cytolitique repose donc sur la caractérisation des structures réceptrices, exprimées par les cellules NK, qui engagent les molécules de surface exprimées par les cellules cibles. Des études récentes suggèrent l'existence, non seulement de molécules capables d'activer le processus de cytotoxicité naturelle, mais également d'inhiber son déclenchement.

### **VI - 2 - a - Récepteurs impliqués dans l'activation.**

Le récepteur de basse affinité des IgG (Fc $\gamma$ RIII ou CD16), présent au niveau des cellules NK, interagit avec le fragment Fc des anticorps recouvrant les cellules cibles. Cette interaction se

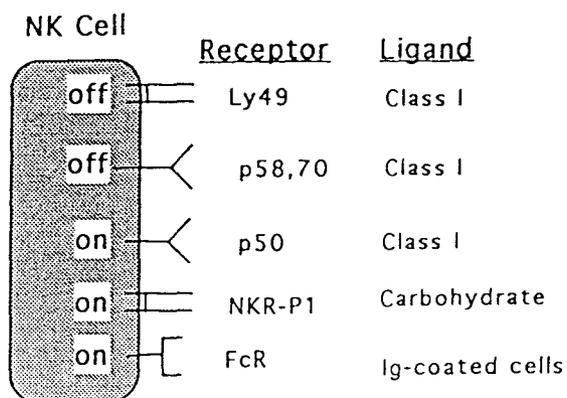
traduit par l'activation de la cellule NK et la lyse de la cellule cible par un mécanisme d'ADCC. Ce récepteur n'est cependant pas impliqué lors de la cytotoxicité naturelle. Des études récentes ont permis de mettre en évidence l'existence de molécules participant à l'activation de ce programme. Parmi celles-ci, les protéines NKR-P1, identifiées chez le rat et la souris. Ces protéines sont exprimées par toutes les cellules NK, et ce, en tant qu'homodimères. Elles interagissent avec des ligands de nature oligosaccharidique et présentent une homologie significative (22% d'identité) avec les membres de la superfamille des lectines de type C (BEZOUSKA *et al.*, 1994) (fig. G15).

#### ***VI - 2 - b - Récepteurs responsables de l'inhibition.***

Au milieu des années 80, plusieurs observations ont permis de remettre en question certains concepts bien établis concernant les cellules NK. Ainsi, bien que la lyse par ces cellules ait été considérée longtemps comme non restreinte au CMH, les travaux de LJUNGGREN et KÄRRE, 1985, PIONTEK *et al.*, 1985 et ceux de KÄRRE *et al.*, 1986 suggèrent un rôle important pour les Ag du CMH-I, exprimés à la surface des cellules cibles, dans le déclenchement du programme de cytolysse. Ces auteurs ont en effet remarqué que des cellules tumorales variantes d'origine murine ayant perdu l'expression de ces molécules sont plus facilement lysées par les NK que les cellules tumorales parentales qui expriment des taux normaux d'Ag du CMH-I. Cette observation est à l'origine de l'hypothèse du "*missing self*" postulée par KÄRRE en 1985. Cette corrélation inverse entre l'expression des molécules du CMH-I et la susceptibilité à la lyse NK a été démontrée, peu de temps après, également chez l'homme (HAREL-BELLAN *et al.*, 1986 ; VERSTEEG *et al.*, 1989). Enfin, confortant l'hypothèse de KÄRRE, les travaux de STORKUS *et al.* (1989a) ont montré que la transfection de gènes HLA de classe I, dans des cellules tumorales humaines sensibles, conférait à celles-ci la résistance à la lyse par les cellules NK.

Pour expliquer la nature de l'interaction entre les cellules NK et le CMH, deux modèles moléculaires ont été proposés par LJUNGGREN et KÄRRE en 1990:

- "*target interference model*": ce premier modèle propose que les Ag du CMH-I masquent des structures de la cellule cible responsables du déclenchement du programme de cytolysse par la cellule NK.



**Figure G15:** Récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK.

(D'après RAULET et HELD, 1995).

Homme		Souris	
Récepteurs des cellules NK	Allèles HLA	Récepteurs des cellules NK	Allèles H-2
p58 EB6 p58 GL183 CD94 NKB1, p70	HLA-Cw4, Cw2, Cw5, Cw6 HLA-Cw3, Cw1, Cw7, Cw8 HLA-Bw6 HLA-Bw4	Ly-49A Ly-49C	H-2D <sup>d</sup> , H-2D <sup>k</sup> H-2 <sup>d</sup> , H-2 <sup>b</sup> ?

**Tableau III:** Récepteurs NK humains et murins des molécules du CMH de classe I.

(D'après VELY et VIVIER, 1996).

- "*effector inhibition model*": dans le cadre de ce modèle, les molécules du CMH-I seraient spécifiquement reconnues par des récepteurs au niveau de la cellule effectrice, et fonctionneraient donc comme des signaux inhibiteurs pour les NK.

Des études réalisées récemment semblent accréditer plus spécialement ce dernier modèle. En effet, il a été démontré que les molécules du CMH-I n'empêchent pas la reconnaissance de la cible par les NK puisque ces molécules n'inhibent pas les événements biochimiques précoces, tels que l'augmentation de la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$  et la génération des phosphoinositols, observés après exposition des cellules NK à leurs cibles sensibles (KAUFMAN *et al.*, 1993). Enfin, des structures transmembranaires assurant le rôle de récepteur des Ag du CMH-I ont été identifiées à la surface des cellules NK, à la fois chez l'homme et la souris.

Dans le système murin, la molécule Ly-49A définit une sous-population (10 à 20%) de cellules NK. Elle interagit avec les Ag du CMH-I codés par les allèles H-2D<sup>d</sup> et H-2D<sup>k</sup> et transmet donc des signaux négatifs inhibant globalement l'activation des NK (KARLHOFER *et al.*, 1992). Ce récepteur appartient à une famille de lectines dimériques dont la partie carboxy-terminale est extracytoplasmique. Les gènes codant ces glycoprotéines appartiennent à un complexe multigénique (NKC pour *NK gene Complex*) porté par la portion distale du chromosome 6. A ce jour, au moins cinq membres de la famille Ly-49 ont été identifiés chez la souris C57BL/6 (SMITH *et al.*, 1994). Les membres de cette famille présentent des spécificités distinctes pour les molécules de classe I.

Chez l'homme, les récepteurs identifiés appartiennent à des familles distinctes. Parmi ceux-ci, la famille de molécules p58 reconnue par les anticorps EB6 et GL183 et qui interagit avec les allèles HLA-C. Les gènes codant ces molécules appartiennent à la superfamille des gènes des Ig et sont portés par le chromosome 19. Un autre exemple est celui des molécules Kp43 (CD94) qui constituent les structures réceptrices de certains allèles HLA-B. Ces molécules présentent, quant à elles, des caractéristiques structurales similaires à celles des protéines Ly-49A (Revue par YOKOYAMA, 1995) (fig. G15 , Tableau III).

Par ailleurs, des travaux ont montré que ce sont les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  de la molécule de classe I, impliqués dans la liaison du peptide (fig. G11), qui sont nécessaires à la reconnaissance par les cellules NK (STORKUS *et al.*, 1989b; SENTMAN *et al.*, 1994). Il a donc été suggéré que les peptides eux-mêmes contribuent à la spécificité de cette reconnaissance. En 1992, les expériences de STORKUS *et al.* ont conforté cette hypothèse. Ces auteurs ont en effet montré que la sensibilité aux NK pouvait être restaurée en fournissant de façon exogène des peptides

étrangers aux cellules cibles dans la mesure où ces peptides s'avéraient capables de se lier aux molécules du CMH-I. Les cellules NK seraient donc affectées non seulement par la présence ou l'absence des Ag du CMH-I mais aussi par la nature de l'équipement peptidique lié à ces molécules. A l'heure actuelle, il reste à savoir si les cellules NK, de façon similaire aux CTL, reconnaissent des combinaisons spécifiques peptide-CMH ou plus simplement des changements dans les conformations moléculaires des Ag du CMH-I induits par la liaison du peptide.

Si de nombreux travaux ont effectivement clairement démontré une corrélation entre le défaut d'expression des molécules du CMH-I et la sensibilité des cibles à la cytotoxicité naturelle, ce n'est en aucun cas un phénomène général. En effet, dans certains systèmes tumoraux (d'origine hématopoïétique ou non) cette corrélation inverse n'a jamais été établie (CHERVENAK and WOLCOTT, 1988; STAM *et al.*, 1989; BERTSCHMANN *et al.*, 1990; PENA *et al.*, 1990). Dans une lignée de cellules de mélanome murin, une augmentation de la sensibilité aux cellules NK après transfection avec des gènes H-2K a même été décrite (GORELIK *et al.*, 1990). Cette corrélation ne s'applique pas non plus au modèle des cellules de rongeurs transformées par les adénovirus humains. Comme nous l'avons évoqué précédemment, les cellules transformées par les Ad du sous-groupe C (Ad2, Ad5) expriment de hauts niveaux d'Ag du CMH-I et s'avèrent très sensibles à la lyse par les NK, tandis que les cellules transformées par les Ad du sous-groupe A (Ad12) présentant un déficit dans l'expression de ces molécules sont, quant à elles, très résistantes.

### **VI - 3 - Influence de E1A sur la détermination du phénotype cytolytique des cellules transformées.**

L'analyse de cellules de rongeurs transformées par des virus mutants, des virus recombinants Ad5/Ad12 ou par introduction de plasmides a permis de démontrer que c'est la région E1A qui régit la sensibilité/résistance à la cytotoxicité par les NK (SAWADA *et al.*, 1985; KENYON and RASKA, 1986; COOK *et al.*, 1986; KAST *et al.*, 1989). Dans le modèle des cellules de rat infectées par les adénovirus, COOK *et al.* en 1987 ont également impliqué cette région. En outre, il a été montré en 1991 par WALKER *et al.* que l'expression stable des oncoprotéines E1A d'Ad5 suite à la transfection de cellules de sarcome de hamster hautement tumorigènes suffisait à induire leur sensibilité à la cytotoxicité par les NK et éliminait ainsi leur capacité à former des tumeurs. Il est intéressant de remarquer à ce propos, que les cellules

immortalisées par *c-myc* s'avèrent, quant à elles, insensibles à la lyse par les NK bien qu'une similarité fonctionnelle ait été établie entre E1A et cet oncogène dans le processus d'immortalisation (COOK *et al.*, 1989a).

En utilisant des virus mutants dans E1A n'exprimant que l'un ou l'autre des messagers majeurs de E1A, COOK *et al.* en 1987 ont montré que chacun des polypeptides (289R et 243R) d'Ad2 ou d'Ad5 peut induire ce phénotype cytolytique. Ces auteurs ont, par ailleurs, noté l'existence d'une corrélation entre l'accumulation des produits du gène E1A dans les cellules infectées par l'Ad5 et le niveau de sensibilité de ces cellules à la lyse par les NK. En fait, le niveau auquel les produits de E1A sont exprimés est un paramètre important dans l'induction du phénotype sensible. Les travaux de WALKER et ses collègues ont d'ailleurs permis de déterminer que le niveau d'expression des produits du gène E1A nécessaire à l'induction de ce phénotype excède celui requis pour obtenir une transformation morphologique des cellules (COOK *et al.*, 1989b; COOK *et al.*, 1993).

Des résultats expérimentaux obtenus dans le modèle des cellules de rat Fischer transformées ont, en outre, apporté la preuve que l'expression du premier exon de E1A ne suffit pas à l'induction de la sensibilité aux NK (COOK *et al.*, 1989a) et que des séquences contenues dans le second exon sont également requises pour l'induction de ce phénotype (KRANTZ *et al.*, 1996).

A l'heure actuelle, le mécanisme par lequel les cellules transformées par les Ad s'avèrent sensibles ou résistantes à la lyse par les NK n'est toujours pas élucidé. Il est possible que les peptides antigéniques dérivés des protéines E1A soient, par exemple, impliqués directement dans le déclenchement du programme de cytolysse à moins que les protéines E1A elles-mêmes n'interviennent qu'indirectement en influençant l'expression de certains gènes cellulaires. Quoiqu'il en soit, il est clair que la différence de sensibilité des cellules transformées est totalement indépendante du taux d'expression des Ag du CMH-I à la surface de ces cellules. Il a été montré, en effet, qu'un traitement à l'IFN restaurant le niveau d'expression de ces molécules à la surface de cellules de rat (KENYON and RASKA, 1986) ou de souris (KAST *et al.*, 1989) transformées par E1A d'Ad12 n'avait en aucun cas pour résultat d'augmenter leur sensibilité à la cytotoxicité naturelle. D'autre part, en exprimant le gène E1A d'Ad5 dans des cellules de souris transformées par l'Ad12, SODDU et LEWIS, en 1992, ont observé une augmentation de leur sensibilité à la lyse par les NK sans que l'expression des Ag du CMH-I n'en soit pour autant affectée.

**RESULTATS**

Les travaux présentés dans ce mémoire sont regroupés en deux chapitres :

- le premier concerne l'étude de la régulation de la transcription du gène H2-K<sup>b</sup> dans les cellules transformées par l'Ad2 et l'Ad12. Cette étude a pour objectifs :

1) la détermination des séquences importantes pour le niveau de transcription du gène dans ces cellules.

2) l'établissement de la relation existant entre l'inhibition de la transcription du gène H2K<sup>b</sup> et l'expression du produit du messageur 13S de E1A d'Ad12.

3) la mise en évidence d'une ou plusieurs cibles de la répression par E1A d'Ad12 au niveau du promoteur.

4) la recherche d'interactions ADN-protéine(s) pouvant contribuer aux différences d'activité du promoteur dans les deux lignées de cellules transformées.

- le second aborde le phénomène de résistance ou de sensibilité des cellules transformées par les adénovirus à la lyse par les cellules NK. Les travaux présentés dans ce chapitre ont pour buts :

1) de rechercher les domaines de E1A responsables de la résistance des cellules transformées par l'Ad12 à la lyse par les NK.

2) de déterminer la sensibilité ou la résistance des cellules transformées par l'Ad41 à cette lyse afin d'élucider le mécanisme impliqué dans la faible tumorigénicité des cellules transformées par les adénovirus entériques (Ad40, Ad41).

## CHAPITRE I

### **Etude de la régulation de la transcription du gène H-2K<sup>b</sup> dans les cellules transformées par l'Ad2 et l'Ad12.**

L'expression du gène H-2K<sup>b</sup> est régulée négativement dans les cellules transformées par l'Ad12 et s'avère in affectée voire régulée positivement dans les cellules transformées par l'Ad2. La répression de l'expression du gène H-2K<sup>b</sup> dans les cellules transformées par l'Ad12 a lieu principalement au niveau de l'initiation de la transcription (FRIEDMAN and RICCIARDI, 1988; ACKRILL and BLAIR, 1988; MEIJER *et al.*, 1989; LASSAM and JAY, 1989) et dépend de la présence du produit du messager 13S de E1A d'Ad12 (BERNARDS *et al.*, 1983; SCHRIER *et al.*, 1983; MEIJER *et al.*, 1991; LECLERE, 1993). Nous avons donc examiné l'activité du promoteur du gène H-2K<sup>b</sup> dans des lignées de cellules transformées par l'ADNc 13S de E1A d'Ad12 ou d'Ad2 en coopération avec E1B d'Ad12. Pour ce faire, la région promotrice a été délétée progressivement à partir de l'extrémité 5' et l'activité des différents fragments générés a été testée par des expériences d'expression transitoire.

#### **I - Analyse préliminaire.**

##### **I - 1 - Analyse dans les cellules transformées.**

###### ***I - 1 - a - Délétions dans le promoteur et constructions plasmidiques.***

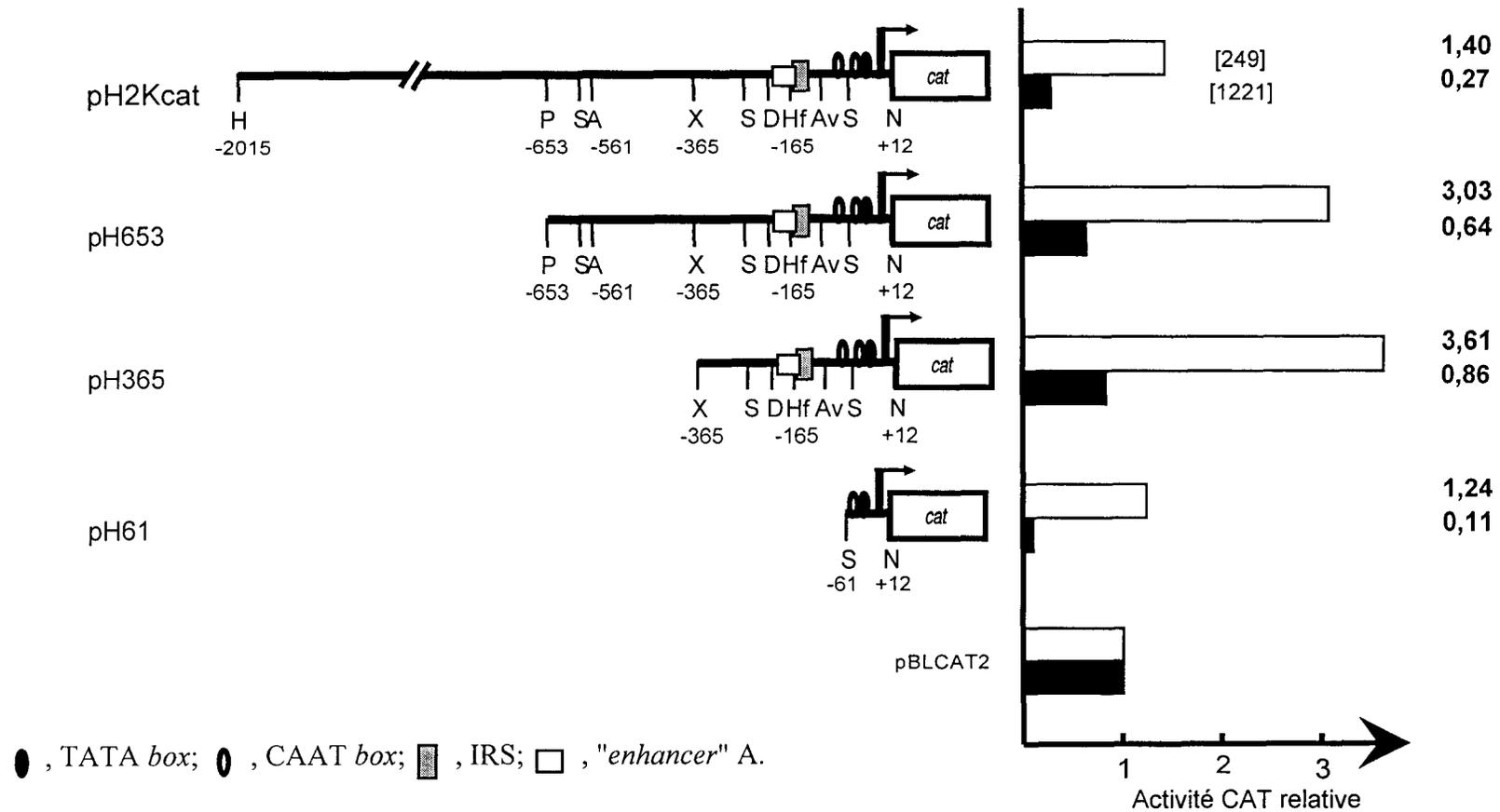
De manière à réaliser les expériences d'expression transitoire, le plasmide pKH47 SP (décrit au paragraphe IV - 3 - a dans la partie Matériels et Méthodes) a été initialement modifié par insertion de la séquence codante du gène *cat* (chloramphénicol acétyl transférase) entre les sites *Hind*III (nt 29) et *Bam*HI (nt 375). Une première construction a alors été créée en clonant le promoteur entier du gène H-2K<sup>b</sup> (nt -2015 à +12) (fig. R1) dans le site de restriction *Hind*III du vecteur précédemment obtenu. Ce clonage a nécessité au préalable le changement du site *Nru*I (+12) en site *Hind*III grâce à l'addition d'un "*linker*". Le plasmide résultant est appelé pH2Kcat. A partir de celui-ci, deux autres constructions ont été réalisées en effectuant, depuis l'extrémité 5' du promoteur, de larges délétions couvrant une grande partie de la région régulatrice. Les mutants de délétion obtenus ont été ainsi créés en utilisant les sites *Pst*I (nt -653), *Xba*I (nt -365) et les sites homologues contenus dans le Site Multiple de Clonage (SMC) du vecteur. Les



plasmides résultants ont été appelés pH653 et pH365. Un troisième mutant de délétion a ensuite été obtenu par digestion du fragment *XbaI-HindIII* (-365 à +20) d'H-2K<sup>b</sup> par l'enzyme de restriction *Sau3AI* et réintroduction du fragment généré *Sau3AI-HindIII* (-61 à +20) entre les sites, compatible (*BamHI* du SMC) et homologue, du pH2Kcat. Cette construction a été appelée pH61 (fig. R2).

### ***I - 1 - b - Etude fonctionnelle des différentes constructions plasmidiques.***

Dix µg de chacune des différentes constructions hybrides ont été transfectés dans les cellules BRK transformées par l'ADNc 13S d'Ad2 (lignée [249]) ou l'ADNc 13S d'Ad12 (lignée [1221]) (voir paragraphe III - 2 et tableau VI dans la partie Matériels et Méthodes). L'expression des Ag du CMH-I à la surface des cellules transformées des deux lignées utilisées a été au préalable analysée par immunocytofluorométrie (FACS) pour vérifier la validité du matériel cellulaire utilisé (résultats non illustrés). Les résultats des expériences d'expression transitoire sont présentés dans la figure R2. En prenant l'activité CAT des cellules transfectées avec le pBLCAT2 comme référence, puisqu'elle est approximativement équivalente dans les deux lignées, les activités enzymatiques apparaissent nettement plus élevées dans les cellules [249] que dans les cellules [1221], et ceci quelque soit la construction analysée. Avec la totalité du promoteur, l'expression de E1A d'Ad2 augmente l'activité d'un facteur 1,4 par rapport au plasmide pBLCAT2 tandis que l'expression de E1A d'Ad12 l'inhibe d'un facteur 3,7. La différence d'activité intersérotypique diminue un peu parallèlement à la longueur des séquences régulatrices présentes dans les constructions, à l'exception de celle obtenue pour le pH61 dans lequel les deux *enhancers* (A et B) sont absents. Des résultats similaires ont été observés avec deux autres lignées cellulaires établies à partir de foyers isolés de différentes expériences de transformation (résultats non présentés). Les délétions progressives dans le promoteur mettent également en évidence la présence de deux séquences légèrement inhibitrices. Celles-ci sont localisées entre -2015 et -653 et entre -653 et -365. Le fragment -365 à -61 est quant à lui activateur. Ainsi, l'activité CAT du pH365 est environ 2,9 fois supérieure à celle du pH61 dans les [249] et 7,8 fois supérieure dans les [1221].



**Figure R2** : Analyse préliminaire de l'activité transcriptionnelle du promoteur H-2K<sup>b</sup>.

Représentation schématique des constructions plasmidiques utilisées et histogramme des activités CAT relatives obtenues avec celles-ci. 10µg de chaque plasmide ont été transfectés dans les cellules transformées par l'Ad2 (lignée [249]) ou par l'Ad12 (lignée [1221]). L'activité CAT est calculée par rapport au témoin pBLCAT2 (1). L'histogramme reflète la moyenne de 5 expériences indépendantes réalisées avec des plasmides obtenus à partir de 3 préparations différentes. La valeur des écarts types ne dépasse pas 10%. A, *AccI* ; Av, *AvaII* ; D, *DdeI* ; H, *HindIII* ; Hf, *Hinfi* ; N, *NruI* ; P, *PstI* ; S, *Sau3AI* ; X, *XbaI*.

## **I - 2 - Etude de l'activité du promoteur H-2K<sup>b</sup> en cotransfection dans les cellules non transformées.**

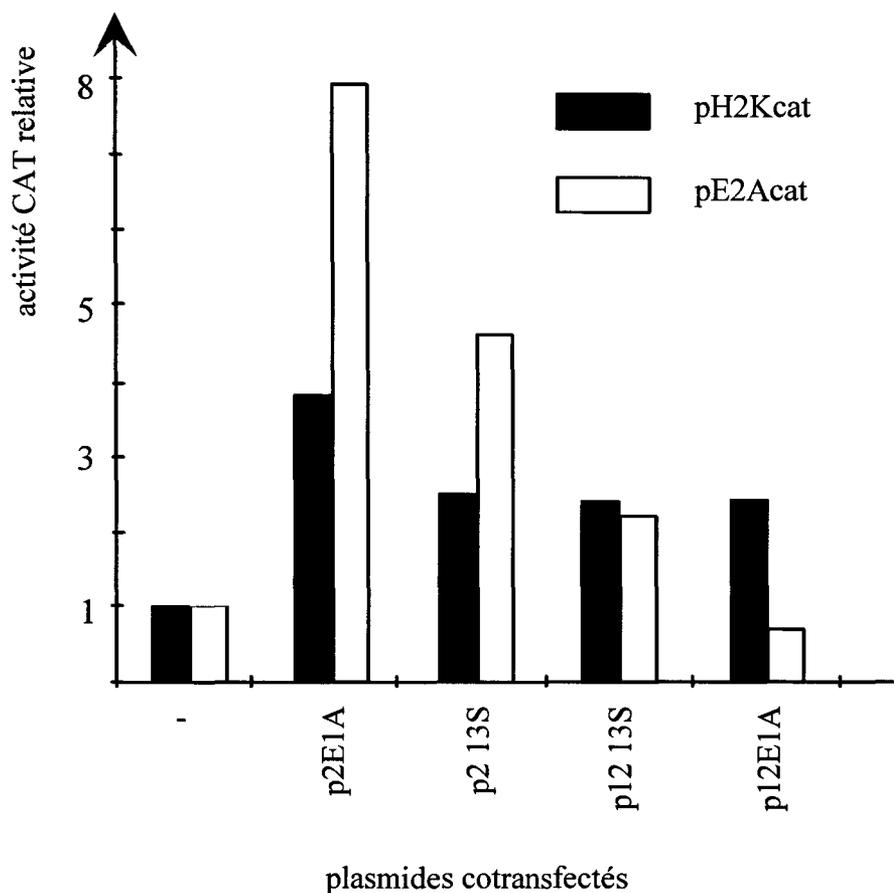
Pour mieux appréhender le mécanisme d'inhibition de la transcription des gènes du CMH-I dans les cellules transformées par l'Ad12, nous avons cherché à établir le type de relation existant entre l'expression de ces gènes et les produits de E1A. Si l'effet inhibiteur du produit du 13S de E1A d'Ad12 est de nature directe, nous devrions donc observer une répression transcriptionnelle similaire lors d'expériences de cotransfections, en cellules non transformées, du pH2Kcat avec un plasmide exprimant E1A d'Ad12.

### ***I - 2 - a - Description des plasmides utilisés.***

Les plasmides p2 E1A et p12 E1A expriment la région E1A respectivement d'Ad2 et d'Ad12 (COUSIN *et al.*, 1991). Les plasmides p2 13S et p12 13S ne contiennent quant à eux que l'ADNc 13S de E1A d'Ad2 et d'Ad12 et par conséquent n'expriment que la plus grande des protéines majeures de E1A. Le pE2Acat contient le gène *cat* sous le contrôle du promoteur précoce E2A d'Ad5 (LEITE *et al.*, 1986).

### ***I - 2 - b - Etude fonctionnelle en cotransfection.***

Cinq µg de plasmide "reporteur" ont été cotransfectés avec 5 µg de plasmide exprimant E1A ou le messenger 13S, d'Ad2 ou d'Ad12, en cellules non transformées NRK-49F (lignée établie de fibroblastes de rein de rat). L'activité CAT a été mesurée 48 h après transfection (fig. R3). En prenant comme référence l'activité obtenue par transfection simple des cellules NRK-49F avec le pH2Kcat, les résultats montrent qu'il n'existe pas d'inhibition de l'activité du promoteur H-2K<sup>b</sup> par E1A d'Ad12 dans ces cellules. En effet, un même niveau d'activité CAT est obtenu lorsque le p2 13S ou le p12 13S sont cotransfectés avec le pH2Kcat. Dans ces expériences, la cotransfection du pE2Acat avec les plasmides exprimant E1A sert de contrôle positif puisqu'en général ce promoteur est beaucoup moins activé par les produits de E1A d'Ad12 que d'Ad2 (LEITE *et al.*, 1986). La répression de l'activité du promoteur H-2K<sup>b</sup> dans les cellules transformées par l'Ad12 n'est donc pas directement induite par l'expression de E1A mais s'avère être plutôt un effet secondaire de la transformation.



**Figure R3:** Etude fonctionnelle du promoteur H-2K<sup>b</sup> en cotransfection dans les cellules NRK-49F.

Cinq  $\mu$ g de chaque plasmide "reporteur" ont été cotransfectés avec 5  $\mu$ g de plasmide exprimant E1A ou le messenger 13S d'Ad2 ou d'Ad12.

Le pourcentage d'acétylation obtenu à partir des plasmides "reporteurs" transfectés seuls est utilisé comme référence, égale à 1, pour la comparaison avec les activités obtenues par cotransfection. L'histogramme présenté reflète la moyenne de 3 expériences indépendantes, la valeur des écarts types ne dépassant pas 10%.

## II - Analyse de la région activatrice (-365 à -61).

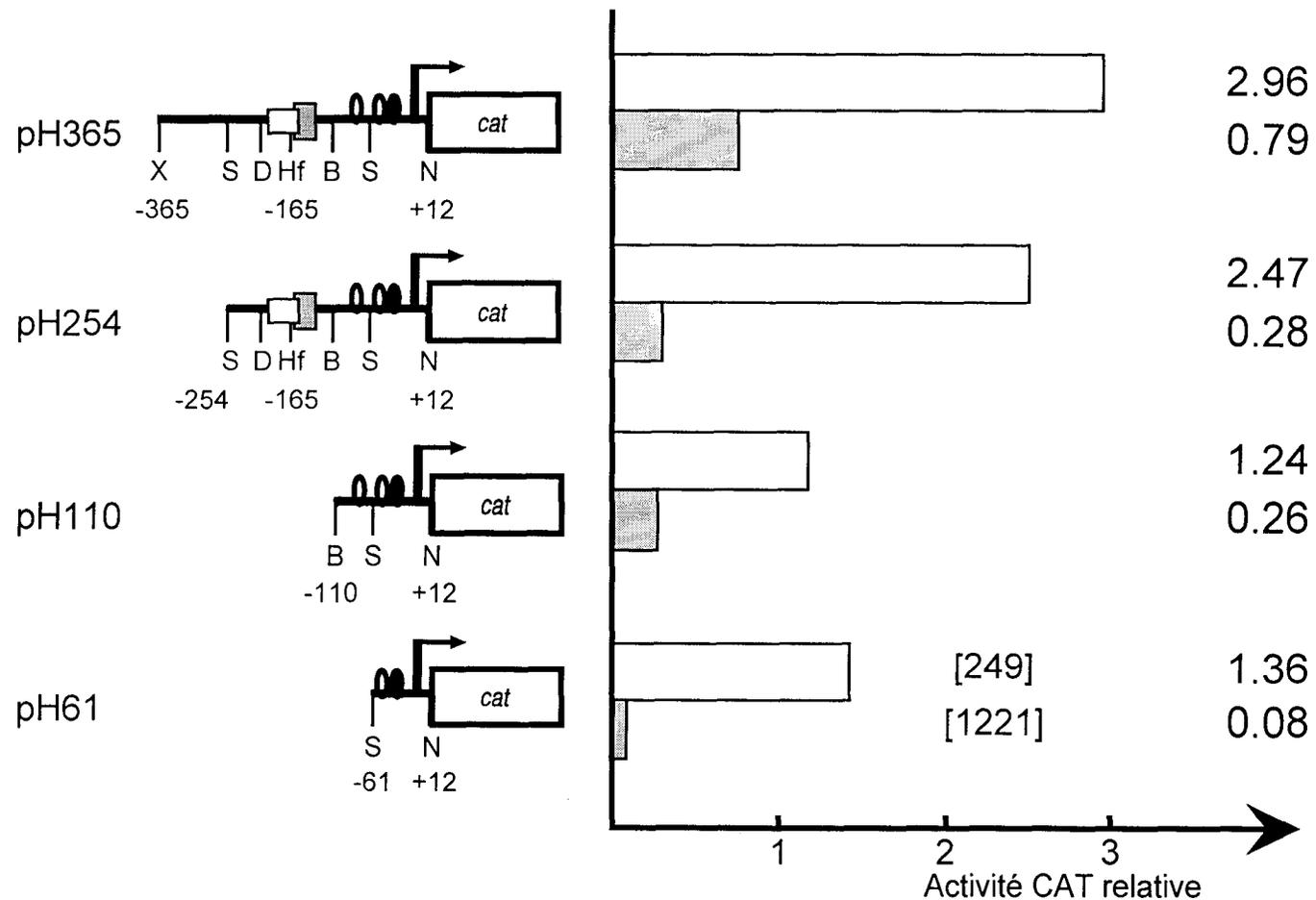
L'approche préliminaire a mis en évidence l'existence d'une région activatrice entre les nt -365 et -61. Cette région influence positivement la transcription à la fois dans les cellules transformées par l'Ad2 et dans les cellules transformées par l'Ad12. Dans ces dernières, son activité stimulatrice est d'ailleurs beaucoup plus importante. Pour cette raison, l'influence de cette région ne peut rendre compte de la différence d'activité du promoteur entier dans les deux types de lignées cellulaires transformées. Cependant, il nous a paru intéressant de l'analyser afin d'appréhender un peu mieux le mécanisme de régulation de l'expression du gène H-2K<sup>b</sup> dans des cellules transformées exprimant la région E1A de différents sérotypes. Pour déterminer la participation exacte des séquences composant cette région dans l'activation, nous avons donc construit une deuxième série de mutants de délétion dans cette portion du promoteur. Les différentes séquences délétées ont été fusionnées au gène *cat* et les constructions hybrides ainsi obtenues ont été testées lors d'expériences en expression transitoire.

### II - 1 - Obtention des mutants de délétion.

Les plasmides pH110 et pH254 ont été obtenus après sous-clonage dans le pBluescript II SK+. Pour l'obtention du premier, le promoteur H-2K<sup>b</sup> a été sous-cloné dans le site *Hind*III du vecteur puis délété entre les sites *Xba*I du SMC et *Bsp*E1 (-110). Après traitement par le fragment Klenow de l'ADN polymérase I et religature des extrémités formées, le fragment *Sac*I-*Hind*III provenant de la construction ainsi créée a été réintroduit dans le pH2Kcat. Pour l'obtention du second, c'est le fragment *Sau*3AI-*Hind*III (-254 à +20) qui a été sous-cloné dans le pBluescript II SK+ puis repris de ce vecteur et réintroduit dans le pH2Kcat de la même manière que pour le pH110 (fig. R4).

### II - 2 - Contribution respective des différentes séquences à l'activité stimulatrice de la région proximale (-365 à -61).

Les cellules transformées [249] et [1221] ont été transfectées avec 10 µg de chacun des vecteurs "reporteurs". Le profil en histogramme des activités CAT obtenues montre que, selon les sérotypes, des séquences différentes sont impliquées dans l'activité *enhancer* de cette région



**Figure R4:** Histogramme des activités CAT obtenues avec les mutants de délétion dans la région activatrice (-365 à -61).

10  $\mu$ g de chacun des vecteurs "reporteurs" schématisés à gauche ont été transfectés dans les cellules transformées [249] et [1221]. Les activités CAT sont calculées par rapport au témoin pBLCAT2 utilisé comme référence (activité égale à 1). Elles représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes réalisées avec 3 préparations de plasmides différentes, les valeurs d'écart type n'excédant pas 10%.

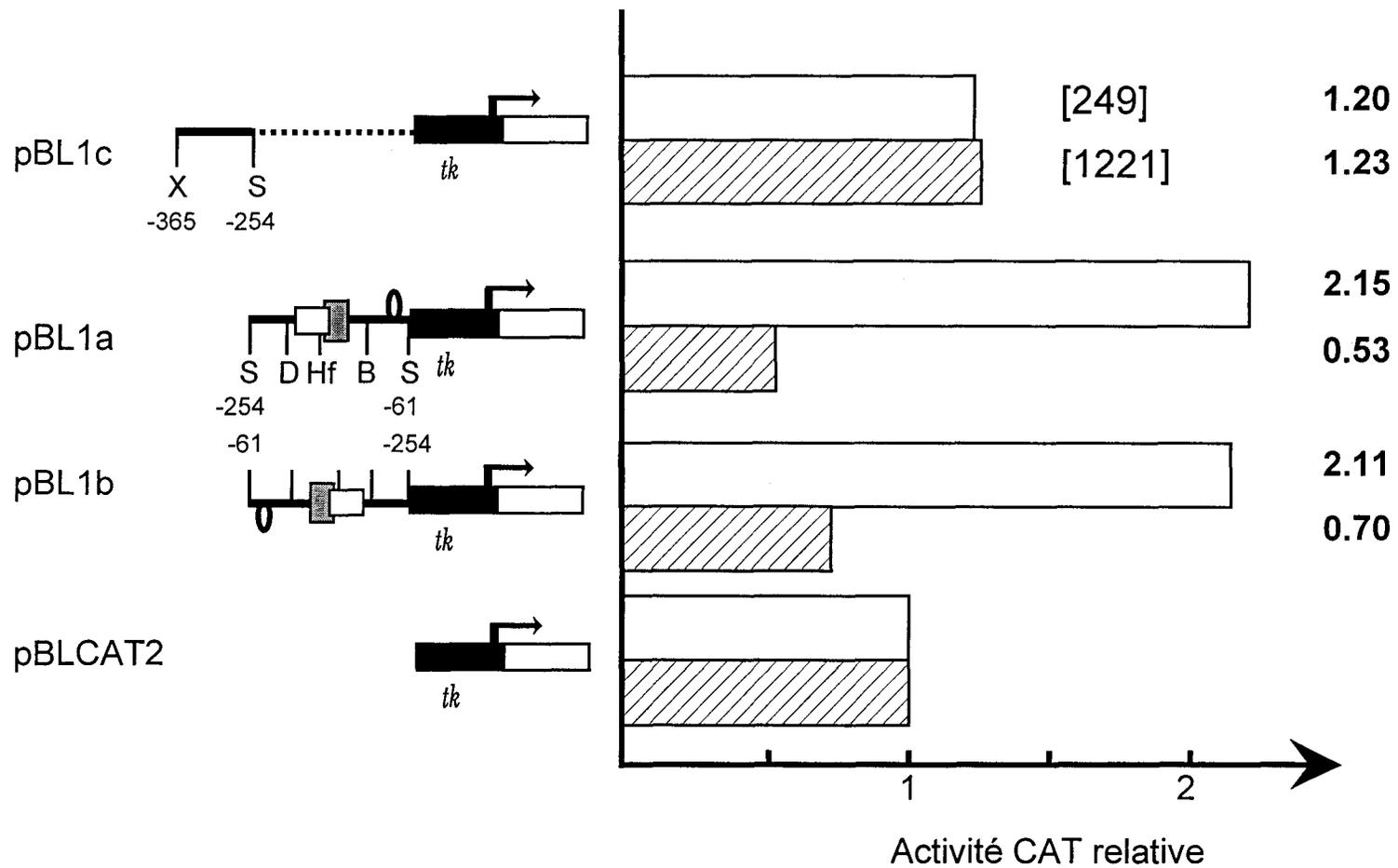
B : *BspEI*

(fig. R4). Dans les cellules transformées par l'Ad12, l'activité basale s'avère être très faible comparée à celle obtenue dans les cellules transformées par l'Ad2. Le promoteur basal contient deux éléments importants pour la transcription, une TATA *box* et une CAAT *box* consensus. La présence d'une seconde CAAT *box* (en position inversée, nt -71 à -75, fig. R1) dans le pH110 résulte en une augmentation de l'activité CAT d'un facteur 3,3 dans les cellules [1221] mais cet élément s'avère sans influence dans la lignée [249]. Dans cette dernière, la séquence *Sau3AI-BspE1* (-254 à -110), qui contient l'*enhancer* A et l'*IRS*, agit comme élément régulant positivement la transcription. Ainsi, l'activité CAT obtenue avec le pH254 est 2 fois supérieure à celle obtenue avec le pH110. Par contre, dans les cellules [1221] cet *enhancer* n'intervient pas dans l'activité transcriptionnelle. Différentes hypothèses sont envisageables; parmi celles-ci: (i) l'absence du ou des facteurs nucléaires agissant comme régulateurs positifs de la transcription dans la lignée de cellules transformées par l'Ad12, (ii) un phénomène de compétition, entre un élément répresseur (silencieux au niveau transcriptionnel) présent dans cette lignée et l'activateur, pour la fixation à l'ADN en vertu de l'existence de sites de liaison adjacents ou se chevauchant (iii) ou bien encore l'existence d'un élément négatif, actif dans cette lignée, situé à proximité et capable de compenser (ou de neutraliser) l'effet activateur de l'*enhancer*. La séquence (-365 à -254) augmente quant à elle la transcription dans la lignée [1221] (facteur 2,8) mais est sans effet significatif dans la lignée [249].

## II - 3 - Analyse détaillée de la séquence (-365 à -254).

### II - 3 - a - Influence de la séquence *XbaI-Sau3AI* sur l'activité d'un promoteur hétérologue.

Afin de vérifier que la séquence *XbaI-Sau3AI* (-365 à -254) possède intrinsèquement la propriété d'activer l'initiation de la transcription, tout au moins dans les cellules transformées par l'Ad12, nous avons étudié son rôle dans le contexte d'un promoteur basal hétérologue. Pour ce faire, ce fragment de restriction a été introduit dans le pBLCAT2, entre les sites, homologue et compatible (*Bam*HI), présents juste en amont du promoteur minimal du gène de la thymidine kinase (*tk*) du virus de l'herpès. Dix µg de la construction résultant de cette insertion (pBL1c) ont alors été transfectés dans les cellules [249] et [1221] (fig. R5). Dans ces expériences, le fragment (-365 à -254) apparaît sans influence significative sur la transcription. Seule une très faible activation est en effet observée avec la construction pBL1c dans les deux types cellulaires. Pour exercer son activité stimulatrice dans les cellules transformées par l'Ad12, ce fragment nécessite



**Figure R5:** Influence des séquences composant la région proximale (-365 à -61) dans le contexte d'un promoteur basal hétérologue. Les différentes constructions plasmidiques ont été transfectées dans les cellules [249] et [1221] et les activités CAT ont été calculées par rapport au pBLCAT2. Chaque valeur représente la moyenne de 3 expériences indépendantes (2 préparations de plasmides différentes) avec des écart types ne dépassant pas 8%.

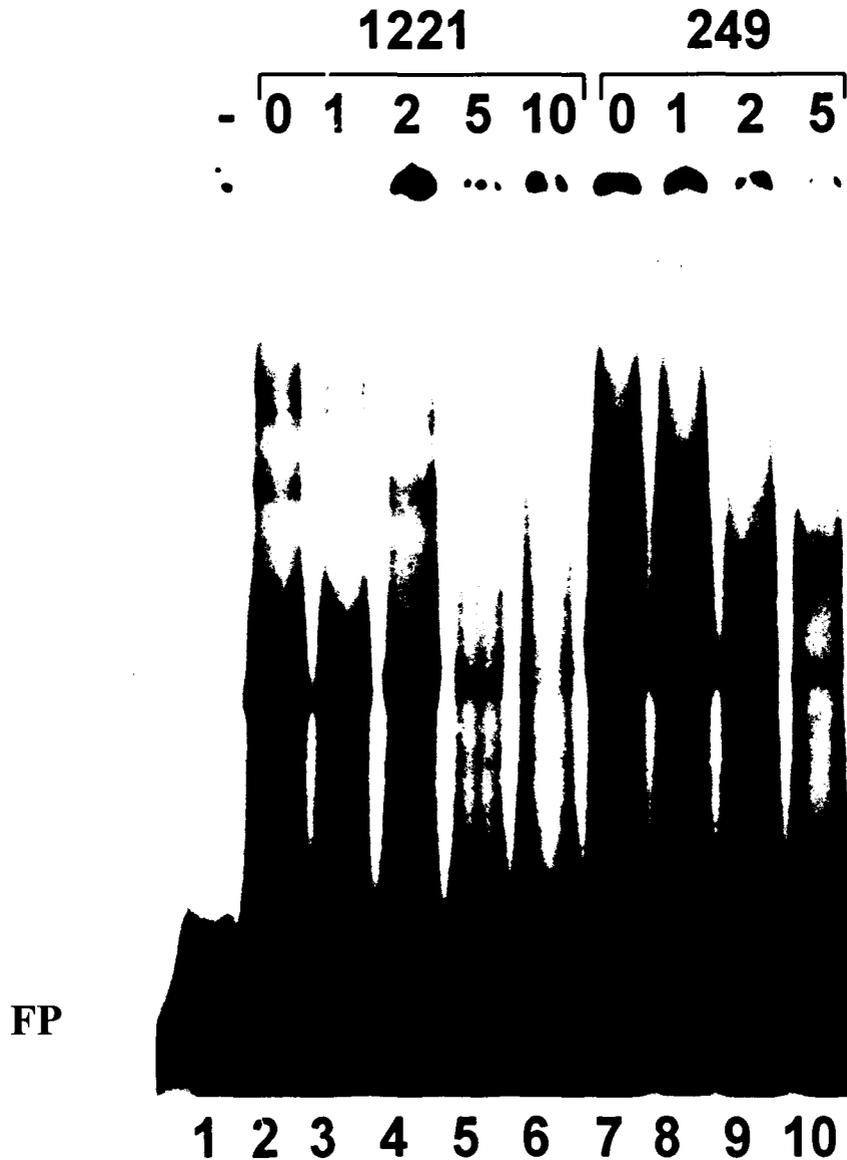
donc probablement la présence d'un ou de plusieurs éléments supplémentaires situés plus en aval dans le promoteur.

### ***II - 3 - b - Analyse par retard en gel.***

Comme approche complémentaire à l'étude en système hétérologue, nous avons également entrepris de rechercher, au niveau de cette séquence, la fixation éventuelle de facteurs nucléaires. La différence observée au niveau de l'activité transcriptionnelle de la séquence *XbaI-Sau3AI* (-365 à -254) dans le contexte du promoteur naturel peut en effet s'expliquer par des interactions ADN-facteur de transcription différentes entre les deux lignées de cellules transformées. En effet, celles-ci n'expriment pas les mêmes protéines. Au cours de la transformation, E1A d'un sérotype peut induire ou inhiber la transcription de gènes que l'autre sérotype n'affecte pas. C'est le cas, par exemple, du facteur de transcription Oct-6 dont l'expression est induite spécifiquement dans les cellules transformées par l'Ad12 (PEEPER *et al.*, 1995). De même, les protéines E1A d'Ad2 et d'Ad12 peuvent modifier ou complexer de façon différente certains de ces facteurs nucléaires avec pour résultat d'altérer leurs caractéristiques normales de fixation à l'ADN. Pour réaliser les expériences de retard en gel, la séquence *XbaI-Sau3AI* a donc été marquée à l' $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP grâce au fragment Klenow de l'ADN polymérase I puis incubée avec 12  $\mu\text{g}$  d'extrait nucléaire provenant de la lignée [1221] ou [249]. Corroborant les résultats obtenus dans le contexte du promoteur hétérologue *tk*, cette analyse révèle un seul complexe, présent à la même concentration avec chacun des types d'extraits nucléaires testés. Des expériences de compétition avec le fragment de restriction homologue non marqué prouve que cette fixation est spécifique (fig. R6). L'activité stimulatrice observée dans le cas de la lignée [1221] n'est donc pas attribuable à la formation d'un complexe, entre un facteur de transcription et cette séquence, présent uniquement dans les cellules transformées par l'Ad12. Ce résultat conforte l'hypothèse d'une coopération entre cette séquence et un élément situé plus en aval. La fixation observée pourrait en effet agir en synergie avec un complexe se formant plus en aval dans le promoteur et spécifique quant à lui de la lignée [1221].

### ***II - 3 - c - Analyse de la région (-365 à -254) par expériences de compétition.***

L'analyse informatique de la séquence *XbaI-Sau3AI* (-365 à -254) (banque de données Genbank, programme *sscan*) a révélé l'existence de deux sites potentiels de liaison pour des facteurs nucléaires : un site pour la famille de facteurs de transcription AP-1 situé entre les nt



**Figure R6:** Analyse de la séquence *XbaI-Sau3AI* (nt -365 à -254) par retard en gel.

Le fragment de restriction *XbaI-Sau3AI* marqué a été incubé avec 12 µg d'extrait de protéines nucléaires préparé à partir des cellules transformées [1221] ou [249], 3 µg de poly(dI-dC).poly(dI-dC) et en présence ou en absence (0) de fragment compétiteur homologue non marqué. Les quantités de compétiteur ajouté vont de 1 à 10 fois la quantité de sonde marquée utilisée. FP: sonde libre.

-349 et -343 et un élément de réponse à Ets-1 (site PEA3) localisé entre -325 et -320 (fig. R1). Tandis que ce dernier correspond parfaitement au site canonique PEA3 défini comme AGGAA<sup>G</sup>/<sub>A</sub>, le site pour la famille de facteurs de transcription AP-1 est dégénéré avec deux bases substituées par rapport au consensus TGA<sup>G</sup>/CT<sup>C</sup>/<sub>AA</sub> (revue: FAISST and MEYER, 1992). Il est possible que l'un d'eux soit impliqué dans l'activation de la transcription observée dans les cellules transformées par l'Ad12. Bien que dégénéré, le site pour la famille de facteurs de transcription AP-1 nous est apparu comme le candidat le plus intéressant. En effet, il a été démontré récemment que la stimulation de la transcription du gène *c-jun* dans les cellules transformées par l'Ad5 résulte d'une coopération entre deux sites de liaison pour ces facteurs relativement distants l'un de l'autre (VAN DAM *et al.*, 1993). Il est possible d'envisager une telle coopération dans le cas du fragment *XbaI-Sau3AI* d'autant qu'il existe deux sites très similaires au site consensus AP-1 en aval de cette séquence. Ces deux sites, localisés entre -199 et -191 et entre -100 et -94, sont relativement bien conservés parmi les gènes du CMH-I murin (KIMURA *et al.*, 1986) et sont capables d'interagir *in vitro* avec le facteur de transcription AP-1 purifié à partir de cellules HeLa (KORBER *et al.*, 1988). En outre, les protéines E1A interfèrent fréquemment dans le niveau d'expression et/ou dans l'activité de cette famille de facteurs (revues: ZANTEMA and VAN DER EB, 1995; BROCKMANN and ESCHE, 1995) et cette interférence est parfois spécifique de l'un des sérotypes. C'est le cas, par exemple, de l'expression du gène *junB* dont le produit constitue l'une des sous-unités d'une partie des membres de cette famille. En effet, au cours de la transformation, l'expression de ce gène est fortement réduite par E1A d'Ad12, alors qu'elle est stimulée par E1A d'Ad5 (VAN DAM *et al.*, 1990).

Afin d'estimer la contribution des sites pour AP-1 et Ets-1 à la régulation de l'initiation de la transcription du gène H-2K<sup>b</sup> dans chacune des lignées de cellules transformées, nous avons réalisé des expériences de compétition. Pour ce faire, les plasmides pBLCAT2/TRE (ANGEL *et al.*, 1987) et pBLCAT2/Ets-1 (DUTERQUE-COQUILLAUD, communication personnelle) ont été modifiés par délétion du gène *cat* et du promoteur *tk* pour donner le pBL $\Delta$ *tkcat*/TRE et le pBL $\Delta$ *tkcat*/Ets-1.

Le premier de ces plasmides renferme le consensus pour AP-1 contenu dans la séquence 5' AAGCTTGATGAGTCAGCCGGATCC 3' clonée entre les sites *HindIII* et *BamHI* du vecteur.

Le second comprend le consensus pour Ets-1 au niveau de la séquence 5' GATCTTTAAGCAGGAAGTGACTAACTGACCGCAGCTGGATC 3' (DUTERQUE-COQUILLAUD *et al.*, 1993) clonée dans le site *Bam*HI. Douze µg de plasmide contenant l'un des sites consensus ont alors été cotransfectés avec 4 µg de la construction pH365 dans chacune des lignées de cellules transformées. Le profil en histogramme des activités CAT obtenues dans ces conditions, ne s'est pas avéré significativement différent de celui obtenu par cotransfection du pH365 avec le pBLΔ*tkcat* (résultats non présentés). Ces deux sites ne semblent donc pas participer à l'activité promotrice du fragment *Xba*I- *Sau*3AI (-365 à -254).

## II - 4 - Analyse détaillée de la séquence (-254 à - 61).

### II - 4 - a - Influence dans le contexte d'un promoteur hétérologue.

Dans le contexte du promoteur naturel, le fragment de restriction *Sau*3AI (-254 à -61) est activateur dans chacune des deux lignées (facteur 1,8 et 3,5 respectivement dans les cellules [249] et [1221]). Comme pour l'analyse de la séquence précédente, nous avons cloné ce fragment en amont du promoteur minimal *tk*, au niveau du site compatible *Bam*HI du pBLCAT2.

Les plasmides pBL1a et pBL1b correspondent à l'insertion du fragment *Sau*3AI respectivement dans la même orientation que dans le promoteur H-2K<sup>b</sup> naturel et dans l'orientation inverse (fig. R5).

Dix µg de chacun de ces plasmides ont été transfectés dans les cellules [249] et [1221]. Dans ce système de promoteur basal hétérologue, ce fragment ne s'avère activateur que dans la lignée [249]. Dans les cellules [1221], il agit au contraire en régulant négativement la transcription. En outre, il est à remarquer que les mêmes valeurs d'activité CAT sont obtenues avec les deux constructions (fig. R5); l'orientation du fragment dans le pBLCAT2 a donc peu d'importance. Ces résultats nous permettent de formuler l'hypothèse que la séquence -254 à -110 est capable intrinsèquement de fonctionner comme activateur transcriptionnel dans la lignée transformée par l'Ad2. Elle présenterait donc les caractéristiques d'un véritable *enhancer* (aptitude à stimuler l'initiation de la transcription de manière indépendante de la position et de l'orientation). Cette hypothèse paraît vraisemblable puisqu'il est communément admis qu'un élément de type *enhancer* (*enhancer* A, nt -205 à -159) se trouve à son niveau. En ce qui concerne la séquence s'étendant de -110 à -61, caractérisée principalement par la présence d'une

CAAT *box* inversée, son effet activateur dans la lignée de cellules transformées par l'Ad12 n'est pas retrouvé. Plusieurs hypothèses peuvent être émises puisque, dans ce système de promoteur hétérologue, c'est l'influence transcriptionnelle du fragment -254 à -61 dans sa totalité qui a été examinée et non celle de la séquence -110 à -61 en elle-même. Ainsi, cette absence d'activation peut, par exemple, être le résultat d'une compensation par un effet négatif. L'élément répresseur pourrait alors être situé soit au sein même de la séquence renfermant l'élément activateur c'est à dire entre -110 et -61 soit plus en amont entre -254 et -110. Dans le cadre de cette hypothèse, l'influence transcriptionnelle de l'élément répresseur (et du facteur protéique qui y est associé) dépend directement de la nature du promoteur basal et des différents facteurs nucléaires pouvant interagir à son niveau. Une autre possibilité est que l'activation ne puisse tout simplement pas avoir lieu par suite d'un changement important de l'environnement de l'élément *cis*-activateur dans le contexte du promoteur hétérologue. Les interactions directes ou indirectes, entre le domaine d'activation de l'élément *trans*-régulateur positif et les composants du complexe basal de transcription, qui sont nécessaires à la fonction d'activation pourraient en effet être compromises dans ce système de promoteur. Celui-ci présente une organisation différente de celle du promoteur minimal H-2K<sup>b</sup> et plusieurs éléments peuvent donc être incriminés dans la différence d'activité transcriptionnelle observée entre la construction conservant le promoteur naturel et celles réalisées avec le promoteur minimal hétérologue. En effet, en plus d'une TATA *box*, nécessaire au positionnement correct de l'ARN polymérase II, certains éléments plus distaux du promoteur *tk* (-105 à +51) sont conservés dans le pBLCAT2 et donc à fortiori au niveau des constructions pBL1a et pBL1b. Parmi ces éléments, il est à noter la présence de deux sites consensus pour le facteur de transcription Sp1 entre les nt -103 et -98 et les nt -55 et -50 (McKNIGHT *et al.*, 1984; VAN DAM *et al.*, 1993) et celle d'une CAAT *box* inversée entre -86 et -82. Dans la construction hétérologue retenant l'orientation génomique du fragment *Sau3AI* (pBL1a), la distance entre les deux CAAT *box* (28 nt) est très peu différente de celle qui existe dans le contexte du promoteur naturel (20 nt), par contre dans le pBL1b, cette distance est fortement augmentée (197 nt). Il est possible que même une simple variation d'espacement entre ces deux éléments suffise à empêcher le phénomène d'activation, à moins que ce ne soit plutôt la distance séparant ces CAAT *box* du complexe basal de transcription qui soit importante pour leur activité. Une autre éventualité est que le facteur Sp1 soit capable d'interférer avec l'activité de la CAAT *box* incluse dans le fragment -110 à -61. En ce qui concerne la TATA *box* du promoteur *tk*, sa séquence (TATTAA) est légèrement différente mais néanmoins très proche de la

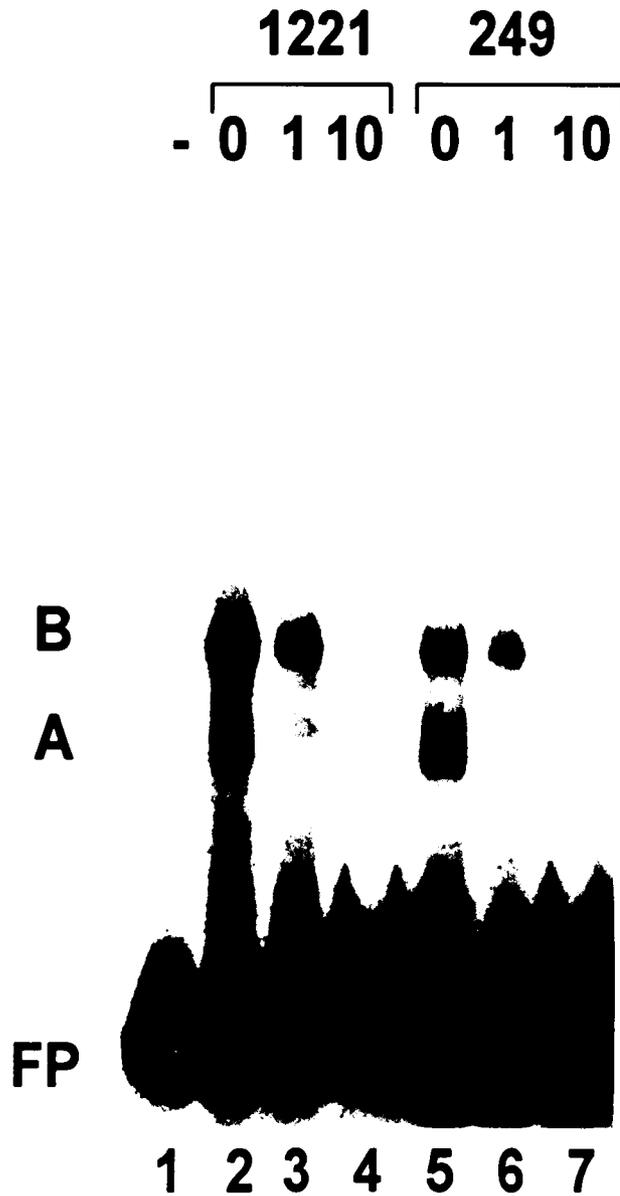
séquence consensus (TATAAA; fig. R1) présentée dans le promoteur H-2K<sup>b</sup> ; elle n'est donc probablement pas impliquée dans la différence d'activité transcriptionnelle observée.

#### ***II - 4 - b - Analyse par retard en gel.***

De manière à appréhender un peu mieux le mécanisme de régulation de la transcription par la région proximale dans chacune des lignées de cellules transformées, nous avons, comme pour l'analyse de la séquence précédente, réalisé des expériences de retard en gel. Le fragment de restriction *Sau3AI* (-254 à -61) a donc été marqué à l' $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP puis incubé avec 10  $\mu\text{g}$  d'extrait nucléaire de cellules transformées par l'Ad12 ou par l'Ad2. Dans ces conditions, deux complexes A et B sont détectés (fig. R7). Tous deux sont spécifiques puisqu'ils disparaissent lors d'expériences de compétition avec un excès du même fragment de restriction non marqué. Tandis que la ou les protéines impliquées dans la formation du complexe A existent à la même concentration dans les cellules transformées par l'Ad12 et par l'Ad2, celle(s) qui participe(nt) à la formation du complexe B semble(nt) présente(s) à plus forte concentration dans les cellules transformées par l'Ad12. Ce complexe correspond à une ou des protéines dont l'expression est activée dans les cellules transformées par l'Ad12 ou inhibée dans les cellules transformées par l'Ad2. Il pourrait être responsable de l'absence d'activité de l'*enhancer* A dans les cellules transformées par l'Ad12 ou bien encore du phénomène d'activation observé avec la séquence -110 à -61 dans ces mêmes cellules. Dans le premier cas cette activité de liaison à l'ADN assurerait donc la fonction de répresseur.

#### ***II - 4 - c - Conséquences d'un traitement à l'acide rétinoïque.***

Plusieurs études ont montré que l'inhibition de la transcription du gène H-2K<sup>b</sup> dans les cellules transformées par l'Ad12 est corrélée à une activité transcriptionnelle réduite de l'*enhancer* A (-205 à -159) (NIELSCH *et al.*, 1991; MEIJER *et al.*, 1992; GE *et al.*, 1992; SCHOUTEN *et al.*, 1995). Dans un certain nombre de cas, les mécanismes proposés impliquent un manque de transactivation dans les cellules transformées par l'Ad12 dû à une réduction de la liaison de facteurs nucléaires à l'élément R1 (-171 à -159). Nos expériences de retard en gel avec la séquence (-254 à -61) ont, quant à elles, révélé une activité de liaison renforcée dans le cas de ces cellules. Cette observation nous a donc conduit à envisager l'éventualité d'un mécanisme actif de répression. Par ailleurs, les travaux d'ACKRILL et BLAIR (1989) et ceux de MEIJER *et al.* (1992) ont permis de mettre en évidence qu'une fixation à l'élément R2 (-205 à -185) est



**Figure R7:** Mise en évidence d'interactions de protéines nucléaires avec la séquence *Sau3AI-Sau3AI* (nt -254 à -61) par retard en gel.

Le fragment de restriction *Sau3AI* marqué a été incubé avec 10 µg d'extrait nucléaire provenant des cellules transformées [1221] ou [249], en présence de 3 µg de poly(dI-dC).poly(dI-dC) et en présence ou en absence (0) de fragment compétiteur homologue non marqué. La quantité de compétiteur ajouté est égale ou 10 fois supérieure à la quantité de sonde marquée utilisée. FP: sonde libre.

fortement augmentée dans les cellules transformées par l'Ad12. Nous avons donc pensé que cet élément pouvait être impliqué dans l'absence d'activité de l'*enhancer* A comme démontrée par nos expériences d'expression transitoire. L'élément R2 contient plusieurs sites potentiels pour des facteurs de transcription. Parmi ceux-ci, un site AP-1 entre -199 et -191 (KORBER *et al.*, 1988), un élément de réponse à l'AMPc (site de fixation pour la famille de facteurs de transcription CREB/ATF entre -199 et -192) (ACKRILL and BLAIR, 1989) et un motif AGGTCA (-197 à -192) constituant une moitié de site consensus de reconnaissance pour des récepteurs nucléaires (HAMADA *et al.*, 1989). Ce dernier a retenu plus particulièrement notre attention. Il a été montré, en effet, que le facteur se liant à l'élément R2 possède des propriétés de liaison à l'ADN distinctes de celles des facteurs de transcription AP-1, ATF ou CREB (ACKRILL and BLAIR, 1989; HAMADA *et al.*, 1989; MEIJER *et al.*, 1992). De plus, KRALLI *et al.* (1992) ont identifié un facteur répresseur au niveau de l'élément R2 présentant une spécificité de liaison et une masse moléculaire apparente similaires à celles des membres de la famille de récepteurs TR/RAR (récepteur d'hormones thyroïdiennes/récepteur à l'acide rétinoïque). Ce répresseur est responsable de l'inhibition de l'activité de l'*enhancer* A dans les cellules transformées par l'Ad12. Ces auteurs ont montré qu'un traitement de ces cellules avec de l'acide rétinoïque tout *trans* élimine la répression. Afin d'appréhender le mécanisme moléculaire impliqué dans l'inhibition de la transcription observée dans les cellules [1221] avec les constructions pBL1a et pBL1b, nous avons, de la même manière, analysé les effets d'un traitement à l'acide rétinoïque. Pour ce faire, les cellules [249] et [1221] ont été transfectées par 10 µg de pBL1a ou pBL1b puis traitées 6 h après transfection avec de l'acide rétinoïque tout *trans* à la concentration finale de  $10^{-5}$  M. De manière à contrôler la présence de récepteurs cellulaires appropriés, nous avons testé en parallèle le plasmide contrôle pBLCAT2-RARE $\beta$ . Bien que cette construction ait répondu positivement au traitement par l'acide rétinoïque, aucun changement significatif dans l'activité promotrice des deux constructions testées n'a été observé dans chacun des types de cellules transformées (résultats non illustrés). Plusieurs possibilités sont donc envisageables; parmi celles-ci:

(i) la région R2 n'est pas l'élément impliqué dans l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de l'*enhancer* A dans les cellules transformées par l'Ad12.

(ii) le traitement à l'acide rétinoïque induit une nouvelle activité de liaison à l'élément R2 dans les cellules transformées par l'Ad12 mais celle-ci est incapable d'entrer en compétition avec le facteur répresseur déjà lié à cet élément.

(iii) l'activité transcriptionnelle du répresseur n'est pas modifiée par le traitement à l'acide rétinoïque.

### III - Etude de la région localisée entre -653 et -365.

L'approche préliminaire a mis en évidence une région régulatrice à activité légèrement inhibitrice entre les nt -653 et -365. Comme pour l'analyse de la séquence activatrice, nous avons construit plusieurs autres mutants de délétion dans le but d'analyser cette région en détail.

#### III - 1 - Stratégies de clonage utilisées.

L'obtention des plasmides pH472 et pH585 (fig. R8) a nécessité une stratégie de clonage en plusieurs étapes. Cette stratégie a fait intervenir :

i) la digestion du fragment de restriction *Pst*I-*Xba*I (nt -653 à -365) avec l'enzyme *Nla*IV ou *Sau*3AI.

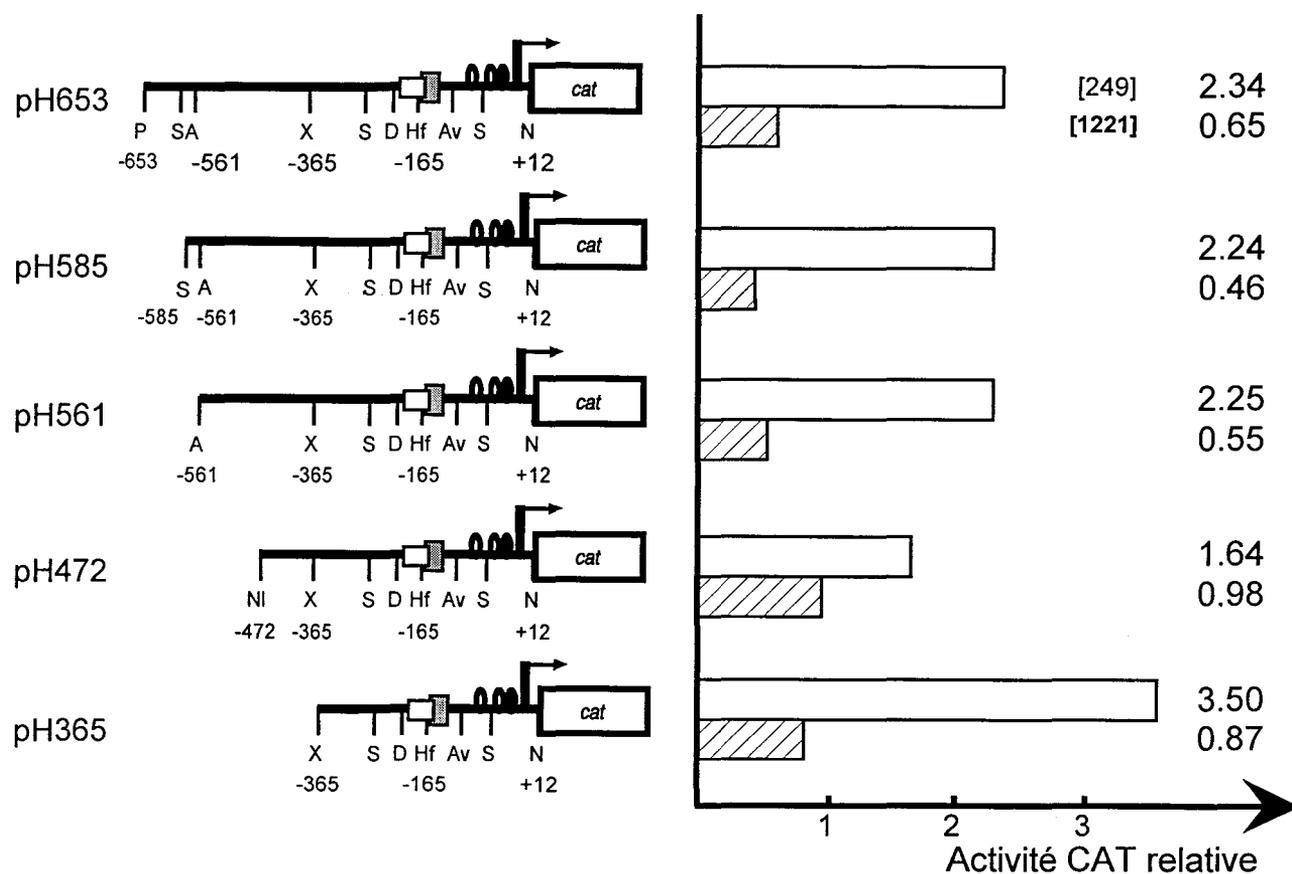
ii) le clonage du fragment *Nla*IV-*Xba*I ou *Sau*3AI-*Xba*I entre le site compatible (*Sma*I ou *Bam*HI) et le site homologue (*Xba*I) du pBluescript II SK +.

iii) l'insertion des fragments *Kpn*I-*Xba*I issus de la digestion des constructions obtenues, entre les sites compatibles du pH653.

Pour le pH561, le fragment *Pst*I-*Xba*I a été sous cloné dans le pBluescript II SK +. La construction obtenue a alors été délétée entre les sites *Acc*I et de la même manière que pour les clonages précédents, le fragment *Kpn*I-*Xba*I provenant de cette dernière construction a été réintroduit dans le pH653.

#### III - 2 - Etude fonctionnelle des mutants de délétion.

Les mutants de délétion dans cette région du promoteur ont été transfectés dans les cellules [249] et [1221]. L'activité CAT a été mesurée comme précédemment 48 h après la transfection des cellules. Comme les résultats présentés à la figure R8 le montrent, l'ensemble de cette région est aussi inhibiteur dans les cellules [249] que dans les cellules [1221]. Cependant, en fonction de la lignée cellulaire considérée, certaines des séquences constituant cette région influencent différemment la transcription du gène *cat*. Ainsi, le fragment *Nla*VI-*Xba*I (-472 à -



**Figure R8:** Histogramme des activités CAT obtenues avec les mutants de délétion dans la région -653 à -365.

Dix  $\mu$ g de chaque plasmide ont été transfectés dans les cellules [249] et [1221]. L'activité CAT est calculée par rapport au témoin pBLCAT2 (1). L'histogramme reflète la moyenne de 5 expériences indépendantes réalisées avec des plasmides provenant de 3 préparations différentes. Les écarts types ne dépassent pas 10%.

Nl: *NlaIV*.

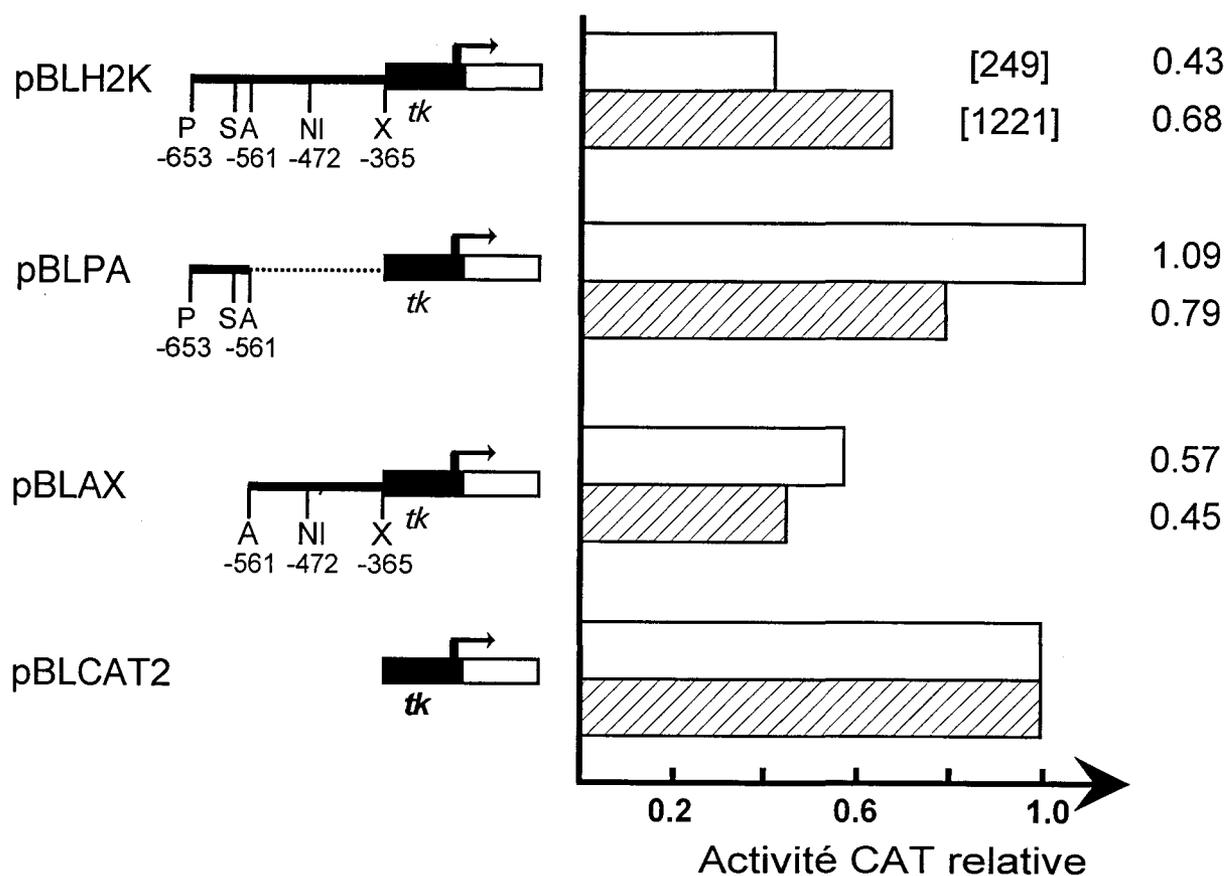
365) s'avère être sans influence significative dans la lignée [1221] mais se révèle inhibiteur dans les cellules [249]. L'activité CAT obtenue avec le pH472 est en effet 2,1 fois inférieure à celle obtenue avec le pH365. Au contraire, le fragment *AccI-NlaIV* (-561 à -472) influence la transcription de façon positive dans les cellules transformées par l'Ad2 (facteur 1,4) mais présente une activité de type *silencer* dans les cellules transformées par l'Ad12 (facteur 1,8). En outre, ces résultats montrent que la séquence comprise entre les sites *PstI* et *Sau3AI* (-653 à -585) est légèrement activatrice dans la lignée [1221]

### III - 3 - Influence de ces séquences dans le contexte d'un promoteur basal hétérologue.

Afin de vérifier que ces différentes séquences régulent l'initiation de la transcription indépendamment de la nature du promoteur, nous avons analysé leurs effets dans le contexte du promoteur basal du gène *tk*. Le fragment entier *PstI-XbaI* (-653 à -365) a donc été cloné en amont du promoteur *tk* dans le pBLCAT2 pour donner le pBLH2K (fig. R9). Les plasmides pBLPA et pBLAX ont été obtenus après digestion du fragment de restriction *PstI-XbaI* par *AccI* et insertion de chacun des fragments générés dans le pBLCAT2.

Quelque soit la lignée transformée, l'activité CAT obtenue avec la construction pBLH2K est inférieure à celle du pBLCAT2. Dans la lignée transformée par l'Ad2, l'effet inhibiteur de la région (-653 à -365) est cependant plus important. La séquence inhibe en effet d'un facteur 2,3 dans les cellules [249] contre 1,5 dans les cellules [1221]. Dans le contexte de ce promoteur hétérologue, nous retrouvons donc pour cette séquence l'activité *silencer* décrite dans le cas du promoteur naturel.

Avec le fragment s'étendant de -653 à -561, aucune différence significative n'a été observée dans le niveau de transcription du gène *cat*. Ceci est en parfait accord avec les résultats obtenus dans le contexte du promoteur homologue. Par contre, le profil en histogramme des activités CAT obtenues avec le pBLAX révèle l'existence d'une région inhibitrice entre -561 et -365. Cette région est active à la fois dans les cellules transformées par l'Ad2 et par l'Ad12. Ces résultats sont également en accord avec ceux obtenus lors des essais fonctionnels avec les mutants de délétion conservant le promoteur H-2K<sup>b</sup> naturel. L'activité inhibitrice observée est donc une propriété intrinsèque de ce fragment.



**Figure R9:** Influence des séquences comprises entre -653 et -365 dans le contexte d'un promoteur basal hétérologue.

Représentation schématique des constructions plasmidiques utilisées et histogramme des activités CAT relatives obtenues avec celles-ci. 10  $\mu$ g de chacune des constructions ont été transfectés dans les cellules [249] et [1221]. L'activité CAT est calculée par rapport au témoin pBLCAT2 (1). L'histogramme reflète la moyenne de 3 expériences indépendantes avec des écarts types ne dépassant pas 8%.

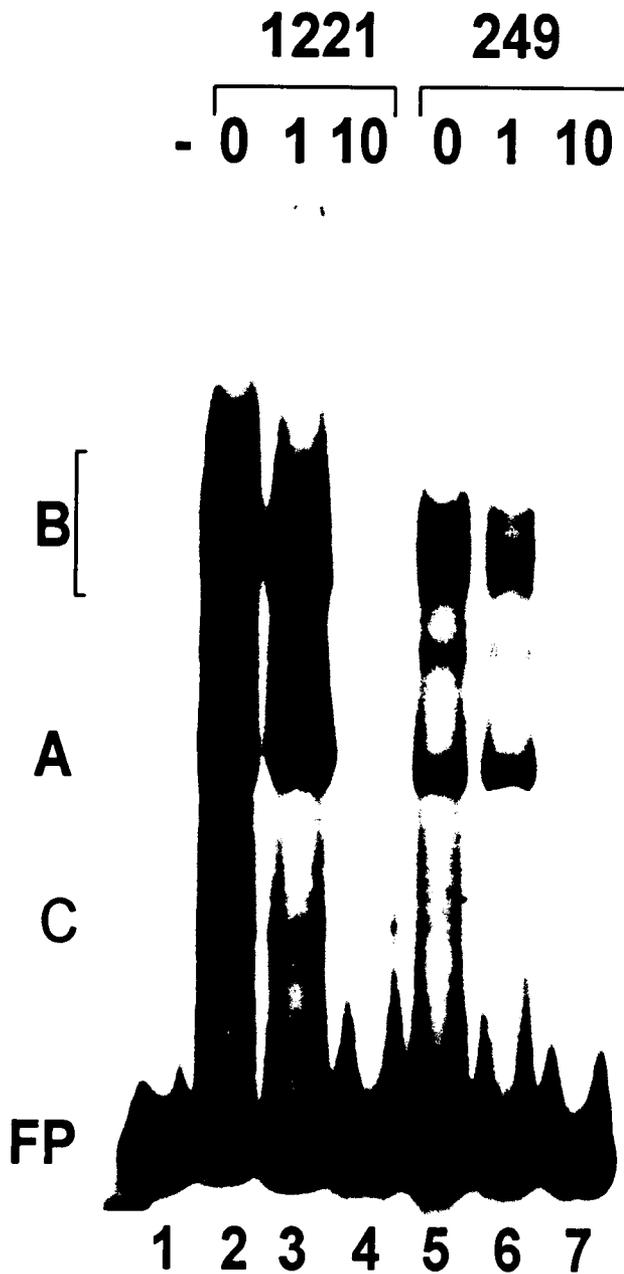
### III - 4 - Analyse par retard en gel.

Les analyses fonctionnelles, réalisées avec les constructions hybrides, ont permis de mettre en évidence l'influence positive ou négative de certaines séquences sur l'activité promotrice. Afin de mieux comprendre ces effets, nous avons entrepris des expériences de retard en gel pour rechercher et éventuellement comparer la fixation de facteurs nucléaires exprimés dans chacun des types de cellules transformées. Des différences qualitatives ou quantitatives dans les interactions ADN-protéines peuvent effectivement être responsables des effets observés.

La fixation de facteurs nucléaires au niveau de la séquence *Sau3AI-NlaIV* (-585 à -472) a d'abord été recherchée. Cette séquence nous a paru intéressante car elle influence l'activité promotrice de façon très différente dans les cellules [1221] et [249]. Ce fragment s'avère en effet être légèrement activateur dans les cellules transformées par l'Ad2 (facteur 1,4) mais se révèle significativement inhibiteur dans les cellules transformées par l'Ad12 (facteur 2,1).

Pour les expériences de retard sur gel, cette séquence a été marquée avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase I puis incubée avec 12 µg d'extrait nucléaire provenant de la lignée [1221] ou [249]. Comme le montre la figure R10, il est possible de visualiser trois complexes ADN-protéines avec les extraits préparés à partir des cellules transformées par l'Ad12. Deux de ces complexes (A et B) sont également retrouvés avec les extraits préparés à partir des cellules transformées par l'Ad2. Il semble que ces trois complexes soient spécifiques puisque leur formation est inhibée lors d'expériences de compétition avec un excès du même fragment de restriction non marqué. Les bandes A et B étant d'égale intensité (pistes 2 et 5), le complexe de plus grande mobilité (C), présent uniquement avec les extraits de cellules transformées par l'Ad12, pourrait donc être responsable de l'activité *silencer* du fragment *Sau3AI-NlaIV* dans ces cellules. Il doit donc s'agir d'un mécanisme actif d'inhibition et non d'un manque de transactivation dans les cellules transformées par l'Ad12.

Pour les deux autres fragments de restriction contenus dans la région (-653 à -365), c'est à dire les fragments *PstI-Sau3AI* (-653 à -585) et *NlaIV-XbaI* (-472 à -365), aucune différence n'a été observée entre les deux types d'extraits nucléaires utilisés. Avec chacun de ces fragments, une seule bande retardée est mise en évidence et celle-ci présente la même intensité pour chacune des lignées transformées analysées (résultats non illustrés).



**Figure R10:** Analyse par retard en gel de la séquence *Sau3AI-NlaIV* (nt -585 à -472).

Le fragment de restriction *Sau3AI-NlaIV* marqué a été incubé avec 12 µg d'extrait nucléaire préparé à partir des cellules [1221] ou [249], en présence de 3 µg de poly(dI-dC).poly(dI-dC) et en présence ou en absence (0) de fragment compétiteur homologue non marqué. La quantité de compétiteur ajouté est égale ou 10 fois supérieure à la quantité de sonde marquée utilisée. FP: sonde libre.

#### **IV - Etude de la région (-653 à -365) par mutagenèse dirigée.**

De manière à élucider plus précisément le mécanisme impliqué dans l'activité inhibitrice de la séquence (-653 à -365), nous avons effectué une analyse informatique de cette région (banque de données Genbank, programme *sscan*). Son but initial était de rechercher d'éventuels sites consensus pour des facteurs de transcription connus. Comme nous l'avons évoqué précédemment, le répertoire de facteurs de transcription actifs est différent entre les cellules transformées par l'Ad2 et les cellules transformées par l'Ad12.

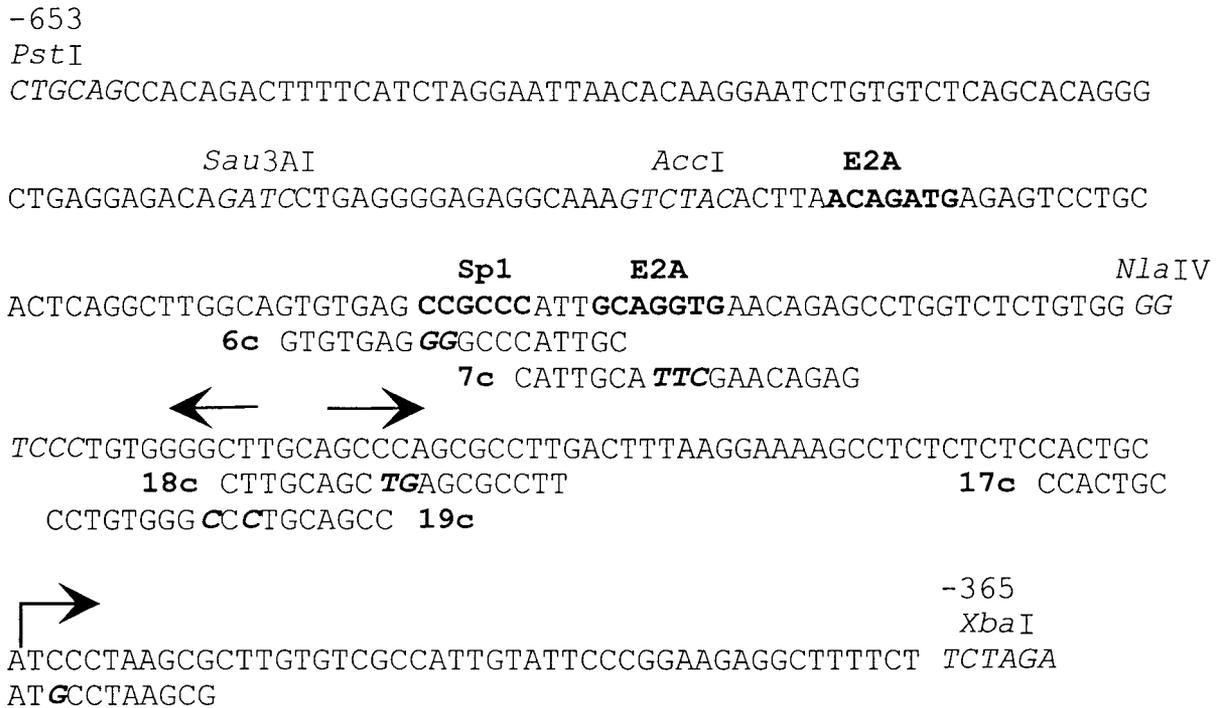
Cette analyse a révélé la présence de séquences consensus pour différents facteurs nucléaires. Parmi celles-ci, un site pour le facteur Sp1 (-515 à -510) et deux sites pour le facteur E2A (-553 à -547 et -506 à -500). E2A est un facteur de transcription ubiquitaire retrouvé dans différentes espèces de mammifères. Il a été initialement découvert de par sa fixation en tant que dimère au motif  $\kappa$ E2 situé dans l'enhancer des gènes codant les chaînes légères  $\kappa$  des Ig (revue: FAISST and MEYER, 1992).

Cette analyse a mis également en évidence la présence d'un site potentiel d'initiation de la transcription au niveau du nucléotide -416 et un examen minutieux de la région a révélé l'existence de deux séquences répétées inversées contenant 5 paires de bases entre -468 et -456 (fig. R11). Comme vérifié par le programme *hairpin* de PC/GENE, ces séquences sont susceptibles de former une structure en épingle à cheveux.

Afin d'estimer la contribution de ces différents éléments à l'activité promotrice de cette région, nous avons effectué une étude par mutagenèse dirigée.

#### **IV - 1 - Influence des mutations introduites dans les sites consensus pour les facteurs de transcription Sp1 et E2A.**

L'effet de mutations introduites dans les sites pour les facteurs Sp1 et E2A a été analysé dans le contexte du fragment *PstI-XbaI* cloné en amont du promoteur *tk*. Pour réaliser la mutagenèse, ce fragment de restriction a été sous cloné, entre les sites homologues du SMC, dans le phagemide pSelect de chez Promega. De manière à produire la matrice d'ADN simple brin nécessaire à la réaction de mutagenèse, cette construction phagemidique a été introduite en souche d'*E.coli* JM 109 puis la culture bactérienne a été infectée par des phages *helper*. Les oligonucléotides qui ont été hybridés avec cette matrice pour réaliser la mutagenèse sont



**Figure R11:** Séquence nucléotidique et "signatures" de la région promotrice -653 à -365.

Les sites potentiels pour les facteurs de transcription connus sont indiqués de même que les oligonucléotides complémentaires de ceux utilisés pour la mutagenèse dirigée. Les nucléotides qui sont modifiés après mutagenèse sont imprimés en italique. Les deux flèches opposées représentent les séquences palindromiques participant à la structure potentielle en épingle à cheveux. La flèche au nt -416 indique le site potentiel d'initiation de la transcription qui a été muté en utilisant l'oligonucléotide 17.

représentés dans le tableau IV. Ils sont complémentaires du brin 5'-3' de la séquence promotrice insérée dans le pSelect (fig. R11). Après vérification par séquençage, chacun des fragments de restriction *PstI-XbaI* mutés a été cloné dans le vecteur "reporteur" pBLCAT2. Les constructions pBL6cat et pBL7cat obtenues correspondent respectivement à la mutation du site Sp1 et à celle du site E2A localisé entre -506 et -500.

Dix µg de chacun de ces plasmides ont été transfectés dans les lignées de cellules transformées [249] et [1221]. Les résultats sont présentés à la figure R12. Dans la lignée cellulaire transformée par l'Ad2, le niveau de répression de la transcription du gène *cat* avec les séquences mutées est du même ordre de grandeur que celui obtenu avec la séquence sauvage. Par contre, dans la lignée transformée par l'Ad12, les activités CAT obtenues avec chacune de ces deux constructions sont supérieures à celle obtenue avec le pBLH2K (facteur 1,6 et 1,7 respectivement pour le pBL6cat et pour le pBL7cat). Ces résultats semblent donc indiquer que les sites E2A et Sp1 participent séparément ou ensemble à la répression de la transcription du gène H-2K<sup>b</sup> dans les cellules transformées par l'Ad12.

#### **IV - 2 - Etude de l'influence du site potentiel d'initiation de la transcription par mutagenèse.**

En plus des sites Sp1 et E2A, l'analyse informatique a révélé l'existence d'un site potentiel d'initiation de la transcription localisé au niveau du nt -416 (fig. R11). Il est possible que ce site entre en compétition avec le site majeur d'initiation. Afin de tester cette hypothèse, nous avons modifié ce site par mutagenèse dirigée comme précédemment. L'oligonucléotide 17 utilisé pour cette réaction est représenté dans le tableau IV.

Les cellules transformées par l'Ad2 et par l'Ad12 ont été transfectées avec 10 µg de la construction plasmidique obtenue après insertion du fragment *PstI-XbaI* muté dans le pBLCAT2 (fig. R12). Comme le montrent les résultats, la mutation induit une très faible activation de la transcription dans les deux types de lignées cellulaires analysées. En effet, l'activité obtenue avec le pBL17cat est approximativement 1,3 fois supérieure à celle obtenue avec le plasmide pBLH2K dans chacune des deux lignées. Ce site potentiel d'initiation est donc très légèrement inhibiteur. Comme le profil obtenu avec cette construction mutée est globalement identique à celui obtenu avec la construction sauvage pBLH2K, ce site n'intervient probablement pas dans la

**Tableau IV** : Oligonucléotides utilisés dans cette étude.

	oligonucléotide <sup>a</sup>	localisation <sup>b</sup>	specificité <sup>c</sup>	plasmide <sup>d</sup>
5	5' -GGACTCT <b>GACGT</b> TCTTAAG-3'	-557 -540	E2A	-
6	5' -GCAATGGG <b>CCC</b> CTCACAC-3'	-522 -505	Sp1	pBL6cat
7	5' -CTCTGTT <b>CGAA</b> TGCAATG-3'	-510 -493	E2A	pBL7cat
17	5' -CGCTTAGGCATGCAGTGG-3'	-423 -406	CS	pBL17cat
18	5' -AAGGCGCT <b>CAG</b> CTGCAAG-3'	-465 -448	H	pBL18cat
19	5' -GGCTGCAG <b>GG</b> CCCCACAGG-3'	-474 -457	H	pBL19cat
mH2K <sup>e</sup>	5' -GGTCAAGGCGCTGGGCTGCAAGCCCCACAGGGACC-3'	-444 -478	H	EMSA
pH2K	5' -GGGGTCCCTGTGGGGCTTGCAGCCCAGCGCCTTGA-3'	-480 -446	-	-
m18	5' -GGTCAAGGCGCTCAGCTGCAAGCCCCACAGGGACC-3'	-444 -478	-	-
p18	5' -GGGGTCCCTGTGGGGCTTGCAGCTGAGCGCCTTGA-3'	-480 -446	-	-
m19	5' -GGTCAAGGCGCTGGGCTGCAAGGGCCCCACAGGGACC-3'	-444 -478	-	-
p19	5' -GGGGTCCCTGTGGGCCCTTGCAGCCCAGCGCCTTGA-3'	-480 -446	-	-
13	5' -GGTGTTTCTTACAGCAACAAAACAAAACCTAACACA-3'	-1735 -1699	(CAA) <sub>n</sub>	-
14	5' -GGGTGTGTTAGTTTTGGTTTTGTTGCTGTGAAGAAACA-3'	-1696 -1733	-	-

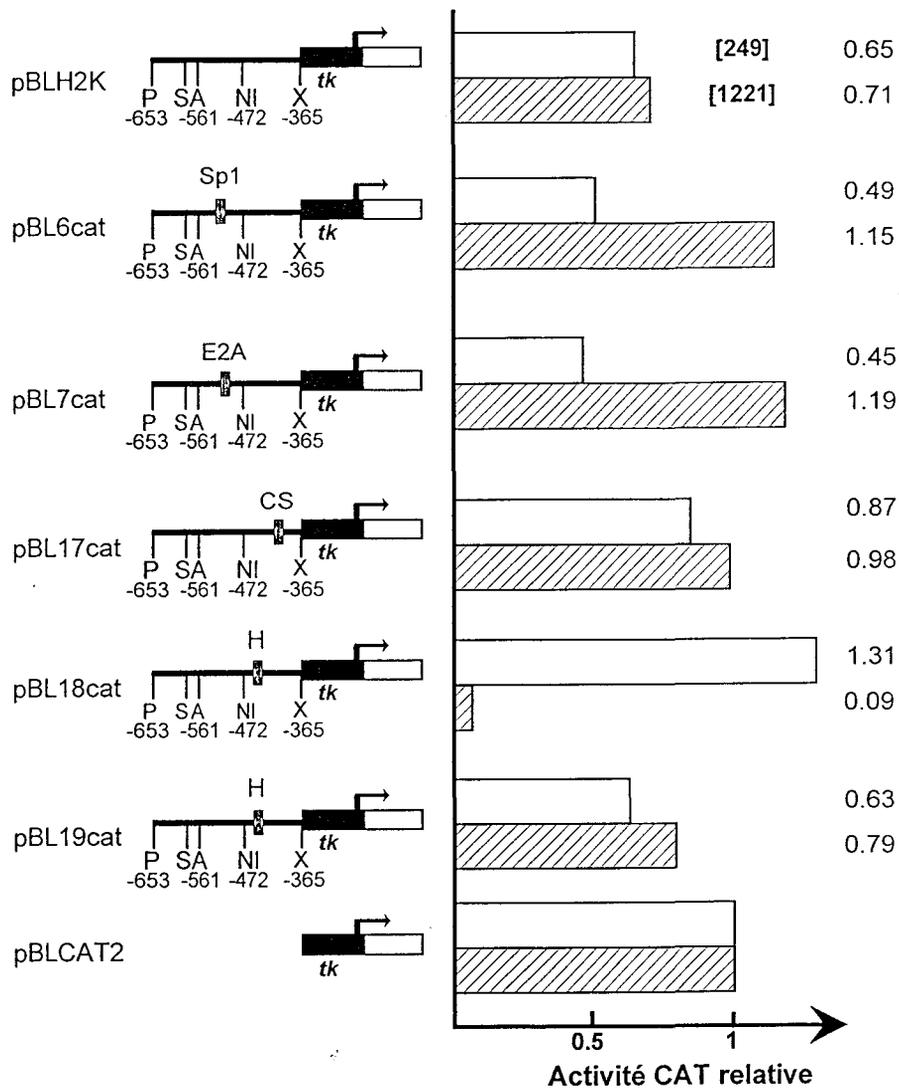
<sup>a</sup> : séquences des oligonucléotides; nt en gras, nt modifiés lors de la mutagenèse.

<sup>b</sup> : localisation dans le promoteur H-2K<sup>b</sup> par rapport au site d'initiation de la transcription.

<sup>c</sup> : E2A et Sp1 sont les sites consensus pour les facteurs de transcription E2A et Sp1 respectivement, CS est le site potentiel d'initiation de la transcription et H, la structure potentielle en épingle à cheveux.

<sup>d</sup> : dénomination du plasmide, obtenu après mutagenèse dirigée avec l'oligonucléotide, utilisé dans les expériences d'expression transitoire.

<sup>e</sup> : oligonucléotides utilisés dans les expériences de retard en gel; m : brin (-); p : brin (+).



**Figure R12:** Influence des mutations introduites dans la séquence -653 à -365 clonée en amont d'un promoteur hétérologue.

Représentation schématique des constructions réalisées dans le pBLCAT2 avec la séquence sauvage et les différentes séquences mutées.

10 µg de chaque plasmide "reporteur" ont été transfectés dans les lignées [249] et [1221]. L'activité CAT est calculée par rapport au témoin pBLCAT2 (1). L'histogramme reflète la moyenne de 5 expériences indépendantes réalisées avec des plasmides obtenus à partir de 3 préparations différentes. Les écarts types ne dépassent pas 12%.

CS: site potentiel d'initiation de la transcription; H: structure potentielle en épingle à cheveux.

différence d'activité transcriptionnelle du fragment *NlaIV-XbaI* (-472 à -365) observée entre les deux types de lignées transformées dans le contexte du promoteur naturel.

#### **IV - 3 - Contribution de la structure potentielle en épingle à cheveux à l'activité transcriptionnelle du fragment -653 à -365.**

La séquence promotrice du gène H-2K<sup>bm1</sup> (variant du gène H-2K<sup>b</sup>) diffère de celle du gène H-2K<sup>b</sup> par une délétion d'un seul nucléotide, de type cytidylique, à la position -456. Le fragment variant (-533 à -408) cloné en amont de la région, allant du nt -367 jusqu'au site d'initiation, déjà contenue dans un plasmide "reporteur", induit une augmentation du taux de transcription d'un facteur 3 comparé au fragment provenant d'H-2K<sup>b</sup> (OZAWA *et al.*, 1990). L'analyse de la séquence (-653 à -365) a révélé la présence d'une structure potentielle en épingle à cheveux entre -468 et -456 (fig. R11). Dans le cas du variant H-2K<sup>bm1</sup>, la stabilité de cette structure est fortement réduite ( $\Delta G$  supérieur à -2 kcal/mol contre  $\Delta G = -7,4$  kcal/mol pour celle du promoteur H-2K<sup>b</sup>). Afin d'étudier l'influence de cette structure potentielle sur la transcription du gène H-2K<sup>b</sup>, nous avons entrepris, ici encore, une approche fonctionnelle par mutagenèse dirigée.

##### **IV - 3 - a - Etude fonctionnelle par mutagenèse dirigée.**

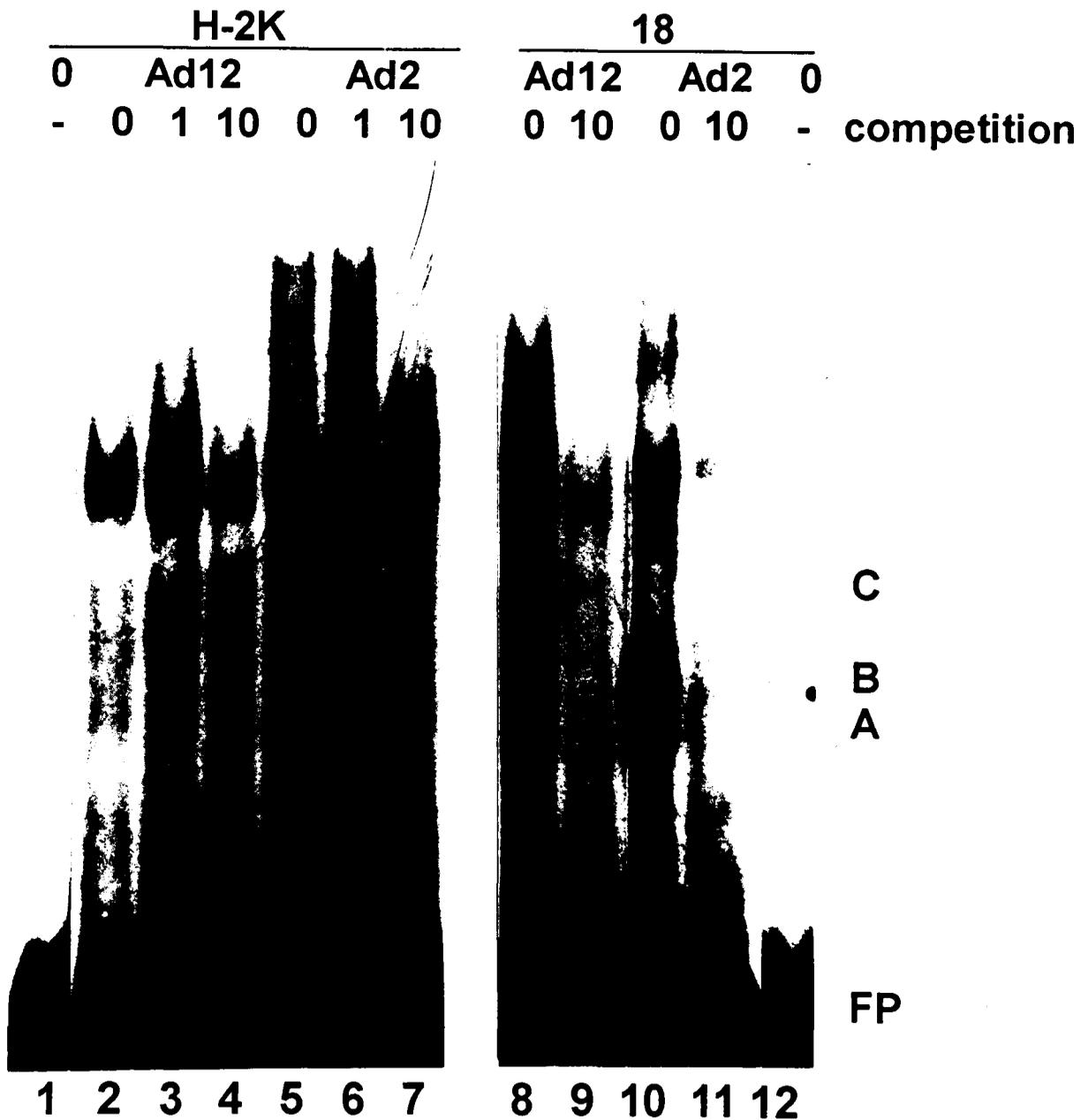
Deux mutations ont été introduites au niveau de la séquence nucléotidique impliquée dans cette structure en épingle. La première réduit sa stabilité ( $\Delta G > -2$  kcal/mol) tandis que l'autre la renforce ( $\Delta G = -11,4$  kcal/mol). La réaction de mutagenèse a été effectuée de la même manière que pour les sites E2A et Sp1. Les oligonucléotides utilisés sont représentés dans le tableau IV. La suppression de la structure en épingle à cheveux a été obtenue grâce à l'oligonucléotide 18 et le renforcement de sa stabilité grâce à l'oligonucléotide 19. Les plasmides résultants sont schématisés à la figure R12. Dix  $\mu\text{g}$  de chaque construction ont été transfectés dans les cellules [249] et [1221]. Dans ces deux lignées cellulaires, les activités CAT obtenues avec la construction augmentant la stabilité de l'épingle sont similaires à celles obtenues avec la forme sauvage (fig. R12). Par contre avec la construction ayant perdu cette structure, une augmentation de l'activité d'un facteur 2 est observée dans les cellules transformées par l'Ad2, tandis qu'une forte inhibition apparaît dans les cellules transformées par l'Ad12 (facteur 8). En

ce qui concerne l'activation observée dans les cellules [249] avec cette dernière construction, nos résultats sont en parfait accord avec ceux d'OZAWA *et al.* (1990). Comme vérifié par analyse informatique, les mutations introduites dans cette structure en épingle à cheveux, en principe, ne créent pas de nouveaux sites pour des facteurs de transcription connus. Cette épingle pourrait donc être responsable de l'inhibition observée dans les cellules [249] avec le fragment *NlaIV-XbaI*. Dans le contexte du promoteur hétérologue, elle semble également jouer un rôle important sur le taux de transcription dans les cellules transformées par l'Ad12.

#### ***IV- 3 - b - Analyse par retard en gel.***

Afin d'analyser le mode d'action sur la transcription de cette structure en épingle, nous avons réalisé une étude par retard en gel. La fixation de protéines nucléaires au niveau de la séquence impliquée dans cette structure a été comparée entre les deux types de cellules transformées et en utilisant des sondes marquées correspondant à la séquence sauvage ou à la séquence abolissant la structure.

Les oligonucléotides ayant permis de constituer les sondes sont représentés dans le tableau IV. Ces sondes ont été incubées avec 10 µg d'extrait nucléaire provenant des cellules transformées par l'Ad12 ou par l'Ad2. Comme le montre la figure R13, deux complexes (A et B) sont détectés avec les extraits de cellules transformées par l'Ad2 en utilisant comme sonde la séquence mutée ayant perdu l'épingle. Ces deux activités de liaison à l'ADN sont également présentes dans les cellules transformées par l'Ad12, mais à des concentrations beaucoup plus faibles. Dans cette lignée, une autre activité est observée (C). Ces trois complexes sont spécifiques puisqu'ils disparaissent lors d'expériences de compétition avec un excès d'oligonucléotide homologue non marqué. Avec la sonde correspondant à la séquence naturelle, des complexes présents à de très faibles concentrations sont observés à la fois dans les cellules [1221] et [249]. Ces complexes à faible mobilité sont mis en évidence aussi avec la sonde mutée et ne semblent pas correspondre à des activités de liaison à l'ADN très spécifiques. Confortant les résultats obtenus lors des expériences d'expression transitoire, l'analyse par retard en gel de la sonde correspondant à la séquence mutée stabilisant la structure en épingle (oligonucléotides 19, tableau IV) a révélé un profil identique à celui obtenu avec la sonde contenant la séquence sauvage (résultats non présentés).



**Figure R13:** Analyse par retard en gel de la séquence impliquée dans la structure en épingle à cheveux.

Les oligonucléotides double brin marqués ont été incubés avec 10  $\mu\text{g}$  d'extrait nucléaire provenant de la lignée [1221] ou [249], 3  $\mu\text{g}$  de poly(dI-dC).poly(dI-dC) et en présence ou non d'oligonucléotide compétiteur. Les quantités de compétiteur homologue correspondent à 1 fois ou 10 fois la quantité de sonde utilisée.

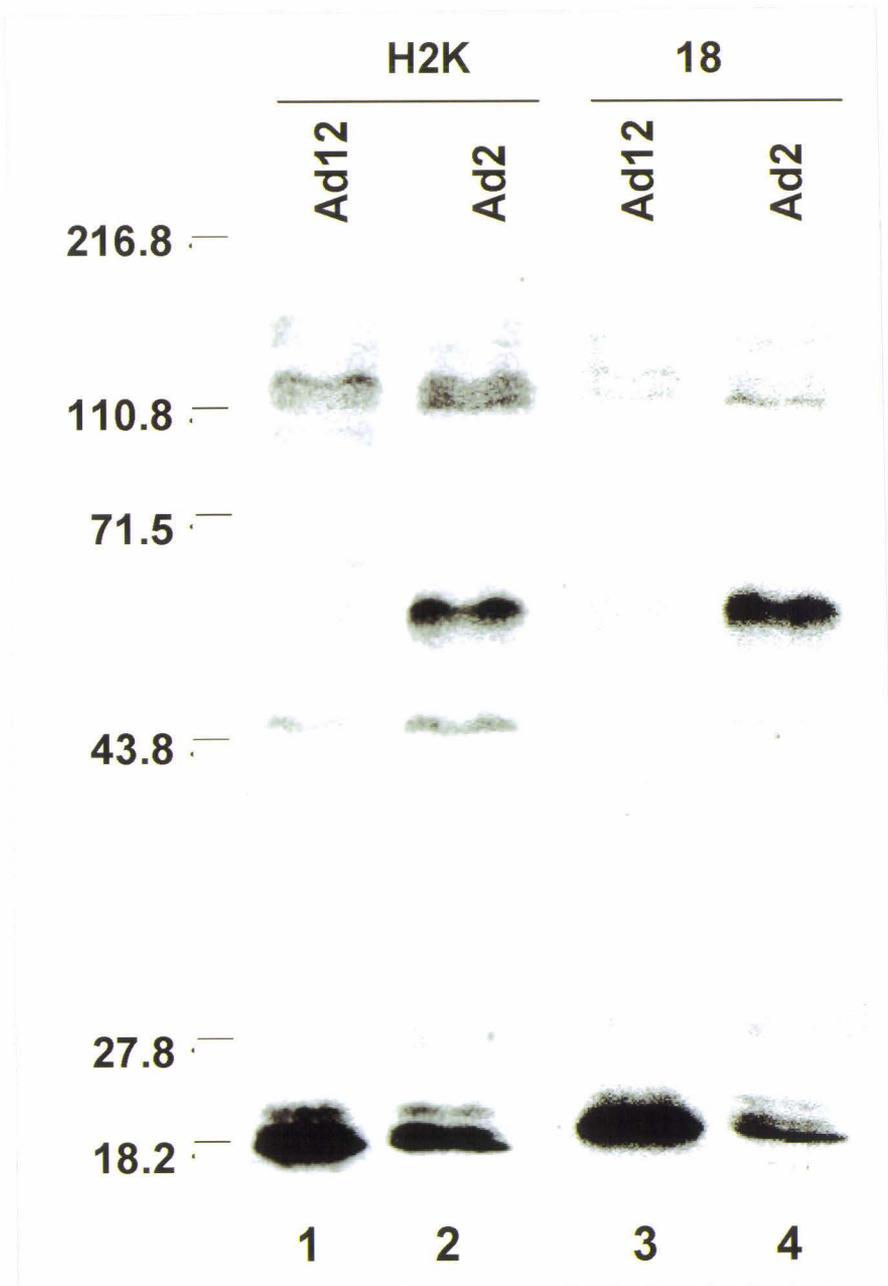
FP: sonde libre; H2K: sonde correspondant à la séquence (-480 à -444) sauvage; 18: sonde correspondant à la séquence (-480 à -444) abolissant la structure en épingle à cheveux.

#### ***IV - 3 - c - "Southwestern blotting".***

De manière à caractériser les protéines impliquées dans les complexes détectés précédemment par retard en gel, nous avons réalisé une analyse par *Southwestern*. Cette technique met en évidence les protéines nucléaires capables d'interagir spécifiquement avec une séquence d'ADN donnée. Elle peut donc permettre l'estimation de la masse moléculaire apparente des protéines participant à la formation des complexes retardés en gel et éventuellement renseigner sur la nature de ces complexes. Ceux-ci peuvent en effet être constitués d'une seule protéine ou de l'association de plusieurs d'entre elles.

Pour cette analyse, les protéines des extraits nucléaires préparés à partir de cellules transformées par l'Ad12 ou par l'Ad2 ont été séparées par électrophorèse puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Cette membrane a alors été mise au contact des sondes marquées utilisées lors des expériences de retard en gel (fig. R14). La sonde H2K correspond à la séquence sauvage et la sonde 18 à la séquence abolissant la structure en épingle à cheveux (tableau IV).

Dans les conditions expérimentales utilisées, il est possible de détecter au moins 6 interactions spécifiques de protéines présentes dans les cellules transformées par l'Ad2 avec la sonde H2K. Des protéines de masse moléculaire apparente similaire ont été révélées également avec la sonde 18. Cependant certaines de ces protéines semblent beaucoup moins affines pour cette séquence mutée. C'est le cas en particulier pour deux protéines de haut poids moléculaire apparent (110 et 120 kDa). Au contraire, la protéine majeure d'environ 55 kDa apparaît beaucoup plus affine pour la sonde 18. Avec les extraits nucléaires de cellules transformées par l'Ad12, on peut également détecter la fixation de cette protéine à chacune des deux sondes. L'intensité des bandes observées étant beaucoup plus faible, cette protéine est probablement moins exprimée dans les cellules transformées par l'Ad12. Par ailleurs, par cette technique telle qu'elle a été réalisée, il n'a pas été possible de visualiser de protéine affine pour la sonde 18 et spécifique uniquement de la lignée cellulaire transformée par l'Ad12. Le complexe C, visualisé par retard en gel, est donc sans doute constitué de plusieurs protéines incapables de se fixer à l'ADN indépendamment les unes des autres. De même, les complexes A et B mis en évidence par retard en gel avec la sonde 18 et qui sont présents en grande quantité dans les cellules transformées par l'Ad2 n'ont pas été retrouvés.



**Figure R14:** Mise en évidence d'interactions spécifiques de protéines nucléaires avec les sondes H2K et 18 par la technique du *Southwestern blotting*.

60  $\mu$ g de protéines nucléaires provenant des lignées de cellules BRK transformées par l'Ad12 ([1221]) ou par l'Ad2 ([249]) ont été séparées sur gel de polyacrylamide-SDS puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Deux transferts équivalents ont été réalisés et chacune des membranes a été mise au contact d'une des sondes radiomarquées H2K ou 18 (tableau IV).

Les poids moléculaires témoins sont donnés en kDa.

## V - Analyse de la région la plus en amont dans le promoteur (-2015 à -653).

Afin de délimiter plus finement la ou les séquences impliquées dans l'activité inhibitrice (de type *silencer*) de la région la plus distale du site d'initiation, nous avons construit une série supplémentaire de mutants de délétion dans cette portion du promoteur. Les différentes séquences délétées ont été fusionnées au gène *cat* et les constructions hybrides ainsi obtenues ont été testées lors d'expériences en expression transitoire.

### V - 1 - Obtention des différentes constructions hybrides.

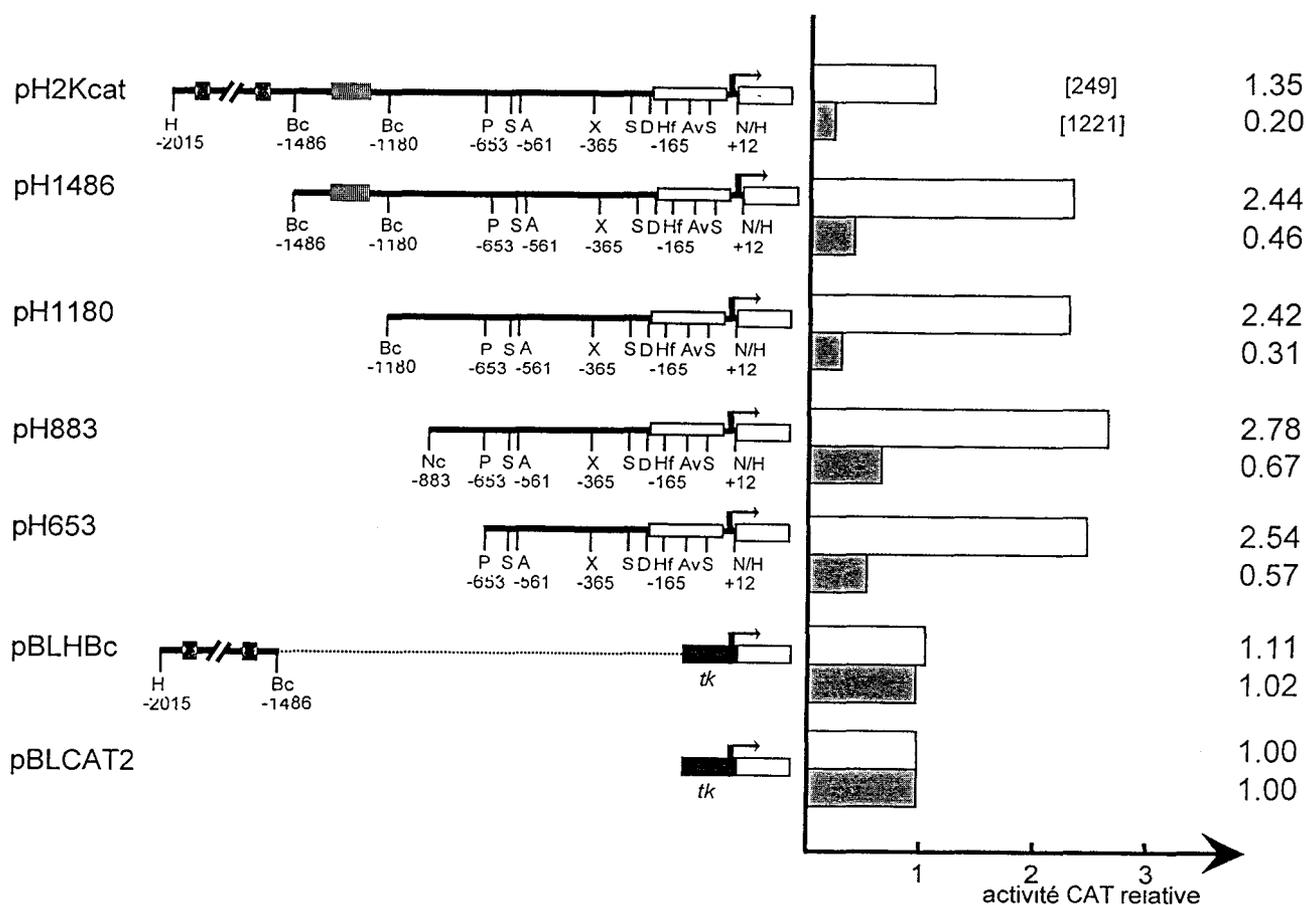
Pour réaliser les délétions facilement en évitant les digestions partielles multiples dans le pH2Kcat, le promoteur entier H-2K<sup>b</sup> a été sous-cloné dans le pBluescript II SK +. Une digestion contrôlée par *BclI* (-1486 et -1180) et par *BamHI* (situé dans le SMC) a alors permis de fournir, après réintroduction des fragments délétés dans le pH2Kcat, les plasmides pH1486 et pH1180.

Le pH883 a été obtenu en délétant le pH2Kcat de la séquence comprise entre *SmaI* du SMC et *NcoI* (-883) puis en rendant franche l'extrémité *NcoI* par le fragment Klenow de l'ADN polymérase I.

Le pBLHBc résulte de l'insertion du fragment *HindIII-BclI* (-2015 à -1486) dans le pBLCAT2 entre les sites homologue et compatible (*BamHI*) présents juste en amont du promoteur minimal du gène *tk* (fig. R15).

### V - 2 - Contribution respective des différentes séquences à l'activité inhibitrice de la région distale.

Les cellules transformées [249] et [1221] ont été transfectées avec chacun des vecteurs "reporteurs" (fig. R15). L'ensemble de la région distale (-2015 à -653) est un peu plus inhibiteur dans les cellules [1221] que dans les cellules [249] (facteur 2,8 contre 1,9). Le profil en histogramme des activités CAT obtenues avec les diverses constructions ne fait pas apparaître de différence significative pour la lignée [249] hormis pour la région la plus distale. Les délétions effectuées ont donc peu d'influence sur l'expression du gène *cat* dans cette lignée. En ce qui concerne la région la plus en amont, celle-ci présente une activité *silencer* nette. L'activité CAT obtenue, dans les cellules transformées par l'Ad2, avec la construction pH1486 est en effet 1,8



**Figure R15:** Influence des délétions introduites dans la région distale du promoteur H-2K<sup>b</sup>.

Représentation schématique des vecteurs "reporteurs" utilisés et histogramme des activités CAT obtenues avec ceux-ci.

10 µg de chaque plasmide ont été transfectés dans les cellules transformées [249] et [1221]. L'activité CAT est calculée par rapport au témoin pBLCAT2 (1). L'histogramme reflète la moyenne de 4 expériences indépendantes réalisées avec des constructions obtenues à partir de trois préparations différentes. La valeur des écarts types ne dépasse pas 10%.

Les différentes boîtes représentent successivement de gauche à droite: le motif CAA répété décrit par OZAWA *et al.* (1993); la séquence cible de l'inhibition par E1A d'Ad12 décrite par PROFFITT *et al.* (1994), homologue de l'élément répresseur PD1; et la région proximale englobant la TATA box, les deux CAAT box et les *enhancers* A et B.

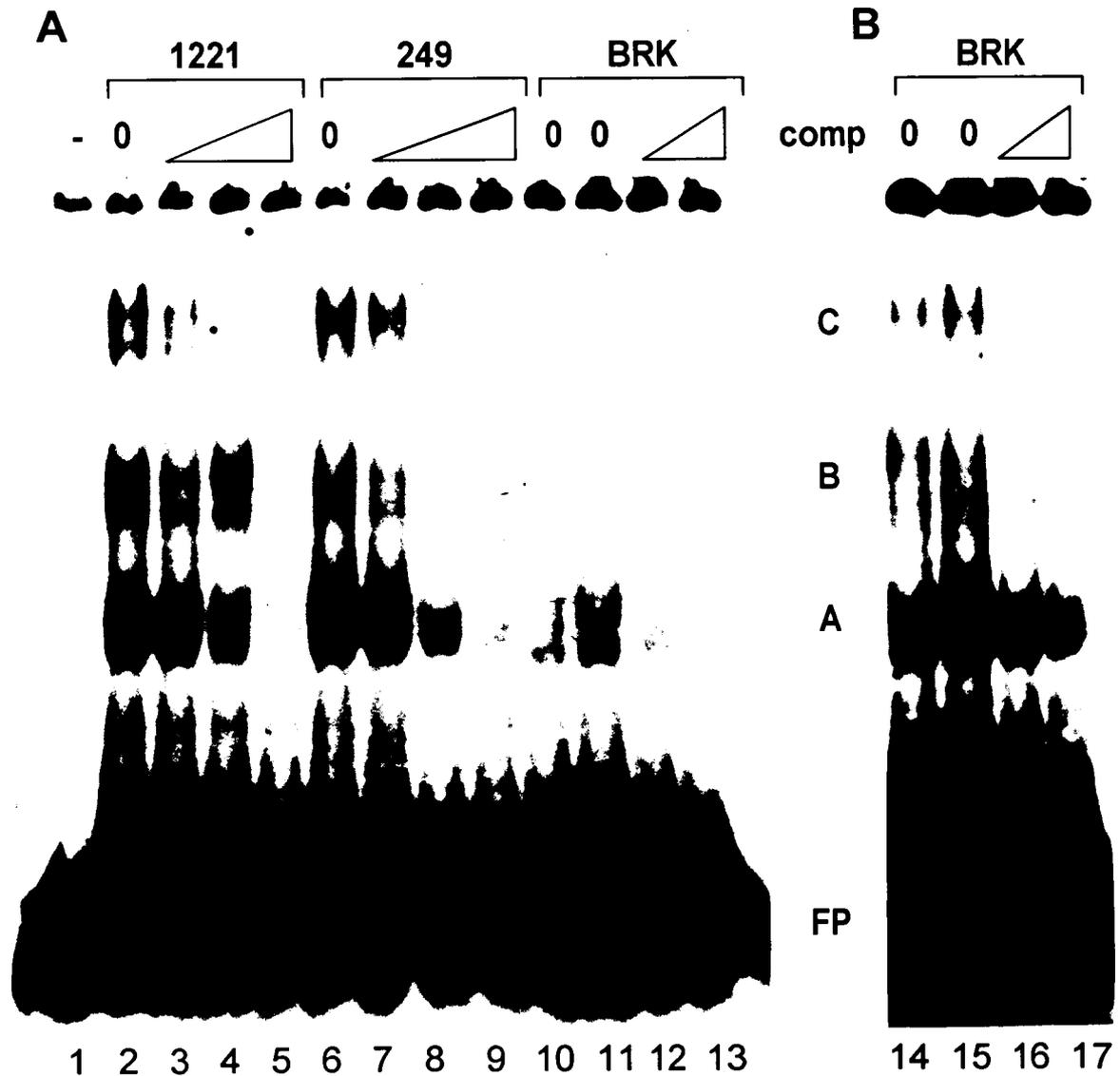
B, *BclI*.

fois supérieure à celle du pH2Kcat. Dans la lignée [1221], cette région inhibe quant à elle d'un facteur 2,3. Dans ces cellules, une seconde région présente également une activité de type *silencer*. Celle-ci est située entre les sites *BclI* (-1180) et *NcoI* (-883). Ainsi l'activité CAT obtenue avec le pH1180 est 2,2 fois inférieure à celle obtenue avec le pH883.

En 1993, OZAWA *et al.* ont montré que deux séquences du promoteur du gène H-2K<sup>b</sup>, contenant un motif CAA répété, sont responsables, ensemble, de l'inhibition induite par E1A d'Ad12. Ces deux séquences sont localisées dans la région comprise entre -1735 et -1535 (fig. R1). La répression est observée à la fois dans le promoteur naturel et lorsque ces éléments sont présents en amont d'un promoteur minimal comme le promoteur *tk*. Cet effet inhibiteur serait le résultat de la liaison d'un nouveau facteur nucléaire, présent dans les cellules transformées par l'Ad12, comme ces auteurs l'ont montré par expériences de retard en gel.

Afin de vérifier que la séquence la plus distale (-2015 à -1486) possède intrinsèquement la propriété de réprimer l'initiation de la transcription, nous avons, de la même manière que ces auteurs, étudié son influence dans le contexte d'un promoteur basal hétérologue. Pour ce faire, le plasmide pBLHbc, dans lequel cette séquence a été clonée en amont du promoteur *tk*, a été transfecté à la fois dans les cellules transformées par l'Ad2 et par l'Ad12. Les résultats présentés à la figure R15 montrent que le niveau de transcription du gène *cat* n'est pas modifié en présence de ce fragment contenant les deux séquences à motif CAA répété. La région la plus distale ne fonctionne donc pas, à elle seule, comme élément régulateur négatif dans le contexte du promoteur homologue. Son activité *silencer* nécessite probablement la présence d'un autre élément situé plus en aval dans le promoteur.

Afin d'expliquer les différences existant entre nos résultats et ceux d'OZAWA *et al.* (1993), nous avons effectué également une étude par retard en gel. Un oligonucléotide double brin (13 hybridé avec 14, Tableau IV) correspondant au motif CAA répété le plus en amont (-1725 à -1705) a été marqué et incubé avec des extraits nucléaires préparés à partir de cellules transformées [1221], [249] et de cellules BRK primaires. Le profil en retard sur gel (fig. R16A) est identique avec les extraits provenant de chacune des lignées transformées. La figure révèle en effet trois mêmes bandes retardées A, B et C pour ces deux types de cellules. En utilisant les extraits nucléaires préparés à partir des cellules primaires, seul le complexe A est détectable. Des expériences de compétition avec l'oligonucléotide homologue non marqué, prouvent que la fixation de ces différents complexes est spécifique. De manière à s'assurer que les bandes B et C sont spécifiques des cellules transformées et donc correspondent à des facteurs ou des complexes protéiques nucléaires présents uniquement dans ces cellules, le gel a été soumis à une



**Figure R16:** Analyse par retard en gel des oligonucléotides 13 et 14 hybridés correspondant à la séquence (-1735 à -1696) contenant l'un des motifs CAA répété décrits par OZAWA *et al.* (1993).

Les oligonucléotides marqués ont été incubés avec 15  $\mu\text{g}$  d'extrait de protéines nucléaires provenant des lignées [1221] et [249] et de cellules BRK primaires (pistes 10 et 14: 10 $\mu\text{g}$ ), en présence de 3  $\mu\text{g}$  de poly(dI-dC).poly(dI-dC) et en présence ou non d'oligonucléotide double brin compétiteur. Les triangles indiquent des concentrations croissantes en compétiteur homologue non marqué (comp). Quantités correspondant à 1 fois, 10 fois ou 50 fois la quantité d'oligonucléotide marqué utilisé. FP: sonde libre.

**A:** autoradiographie durant 16 h

**B:** autoradiographie durant 4 jours.

autoradiographie plus longue (4 jours au lieu de 16 heures). Dans ces conditions, comme le montre la figure R16B, il est possible de détecter également les bandes B et C. Les protéines nucléaires impliquées dans ces fixations sont donc vraisemblablement similaires à celles qui sont présentes dans les cellules transformées. Dans ces dernières, il existe donc très probablement des modifications de l'expression et/ou de l'affinité de ces protéines mais qui sont identiques dans les deux types de lignées de cellules transformées. Il est possible qu'un ou plusieurs de ces facteurs soient impliqués dans la répression transcriptionnelle observée avec le fragment distal.

## CHAPITRE II

### **Etude du phénomène de résistance/sensibilité des cellules transformées par les adénovirus à la lyse par les cellules NK.**

Schématiquement, les mécanismes de défense immunitaire anti-tumoraux de l'hôte qui aboutissent à la lyse de la cellule anormale peuvent être regroupés en deux systèmes. Le premier est spécifique de l'antigène immunogène de la cellule cible et met en jeu les CTL restreints aux molécules du CMH-I. Le second est aspécifique et implique l'intervention des cellules NK responsables d'une cytotoxicité spontanée.

#### **I - Détermination des domaines de E1A d'Ad12 impliqués dans le phénomène de résistance des cellules transformées à la lyse par les cellules NK.**

En plus d'une expression réduite des Ag du CMH-I en surface, les cellules transformées par l'Ad12 sont très peu sensibles ou résistantes à la lyse par les cellules NK (COOK *et al.*, 1982; RASKA and GALLIMORE, 1982). Ce phénomène de résistance est associé à l'expression de la région E1A d'Ad12 (SAWADA *et al.*, 1985; KENYON and RASKA, 1986).

##### **I - 1 - Etude préliminaire.**

Afin de déterminer le ou les domaines de E1A responsables de la fonction de résistance, nous avons réalisé des essais de cytotoxicité par les cellules NK sur différentes lignées cellulaires transformées. Une étude préliminaire a été effectuée pour savoir si chacune des protéines majeures de E1A d'Ad12 est capable de conférer la résistance. Des lignées de cellules BRK transformées par E1B d'Ad12 en coopération avec la région E1A génomique d'Ad2 ou d'Ad12 ou avec l'ADNc 13S ou 12S d'Ad2 ou d'Ad12 (LECLERE *et al.*, 1993) ont donc été analysées pour leur sensibilité. Pour ce faire, environ 20 000 cellules provenant de chacune des lignées établies ont été marquées à la thymidine tritiée puis incubées avec une fraction enrichie en cellules NK. Après 16 h d'incubation, les cellules ayant résisté à la lyse ont été séparées des surnageants de culture. La quantité de [<sup>3</sup>H] incorporé dans l'ADN acido-précipité a été mesurée

en compteur à émission  $\beta$  ce qui a alors permis d'estimer le pourcentage de cellules résistantes à la cytolysse (tableau V). Comme l'illustre la figure R17, chacun des deux produits de E1A d'Ad2 peut conférer une sensibilité comparable à celle obtenue avec la lignée cellulaire transformée par la région E1A sauvage. Inversement, chacun des deux produits de E1A d'Ad12 est capable d'induire le phénomène de résistance. Nous avons alors envisagé de tester des lignées de cellules BRK transformées suite à la cotransfection de plasmides exprimant des protéines E1A hybrides entre l'Ad2 et l'Ad12 (fig. R18) avec un plasmide contenant E1B d'Ad12. Les sites de restriction, créés par mutagenèse dirigée au niveau de l'ADNc 13S d'Ad12, ayant permis d'échanger des fragments homologues entre les deux sérotypes pour la construction des régions E1A hybrides sont représentés à la figure R19 (LECLERE *et al.*, 1993).

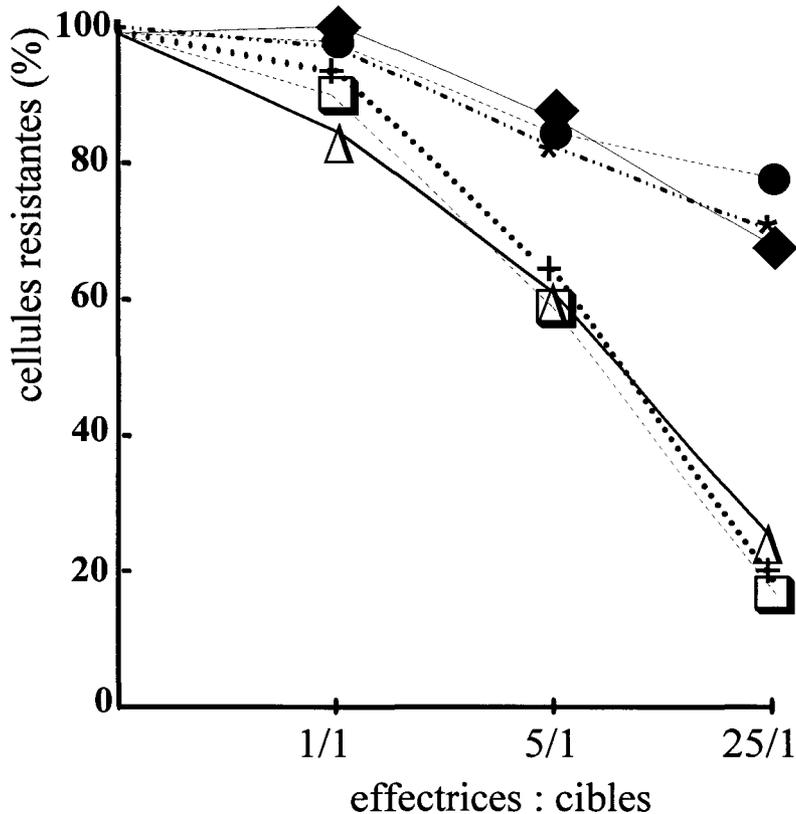
## I - 2 - Analyse par "Northern blotting".

Avant d'effectuer les essais de cytotoxicité sur les lignées cellulaires transformées par les régions E1A hybrides, nous avons vérifié l'expression du gène E1A pour chacune d'entre elles par la technique du *Northern blotting*. Le niveau d'expression de ce gène est en effet un paramètre important puisque des travaux récents ont montré que de bas niveaux d'expression des oncoprotéines E1A d'Ad2, obtenus après transfection stable de cellules de sarcome de hamster, ne suffisent pas pour induire une sensibilité de ces cellules à la cytolysse (COOK *et al.*, 1993). Trente  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux préparés à partir de chacune des lignées transformées hybrides ont donc été séparés sur gel d'agarose dénaturant, transférés sur membrane de nitrocellulose puis hybridés avec  $10^7$  cpm d'un mélange de sondes marquées à l' $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP correspondant aux régions E1A entières d'Ad2 et d'Ad12. Comme contrôle, le "*blot*" a également été mis au contact d'une sonde  $\beta$  actine (ADNc complet de 2,1 kb, Clontech Laboratories). En prenant comme référence la lignée HEK-293 qui présente des taux d'ARN correspondant à la région E1A d'Ad5 relativement élevés, aucune des lignées hybrides ne présente de réel bas niveau d'expression d'ARN 13S (fig. R20). Dans le cas des lignées [p2C12] et [p12C2], ces niveaux d'expression sont plus faibles mais restent néanmoins acceptables si on les compare à celui observé pour la lignée de cellules transformées par l'ADNc 13S d'Ad2 (p2E1A) qui s'avère très sensible à la lyse par les NK (fig. R17).

Plasmides	lignées	résistance à la lyse par les NK <sup>c</sup>
p2E1A	250-a	24,3 (±3,5)
	250-b	22,9 (±4,1)
p2E1A-13S	251-a	21,7 (±5,4)
	251-c	26,3 (±3,1)
p2E1A-12S	252-d	18,2 (±4,3)
	252-f	20,7 (±5,1)
p12E1A	1201-b	72,6 (±3,8)
	1201-c	79,8 (±4,5)
p12E1A-13S	1221-a	82,8 (±3,0)
	1221-g	74,8 (±3,9)
p12E1A-12S	1222-b	69,6 (±4,5)
	1222-c	76,2 (±4,3)
p2C12	1229-a	56,9 (±3,6)
	1229-b	52,7 (±4,2)
	1229-d	59,1 (±5,4)
p2S12	1228-a	24,0 (±5,2)
	1228-c	19,7 (±6,2)
p12C2	1232-b	15,3 (±3,8)
	1232-c	17,8 (±4,5)
	1232-d	16,4 (±3,1)
p12S2	1231-a	13,5 (±4,7)
	1231-e	12,9 (±2,9)
p2C12S2	1230-a	23,7 (±5,5)
	1230-b	19,7(±4,8)
	1230-d	24,3 (±3,4)

**Tableau V :** Pourcentage de cellules transformées résistantes à la lyse par les cellules NK.

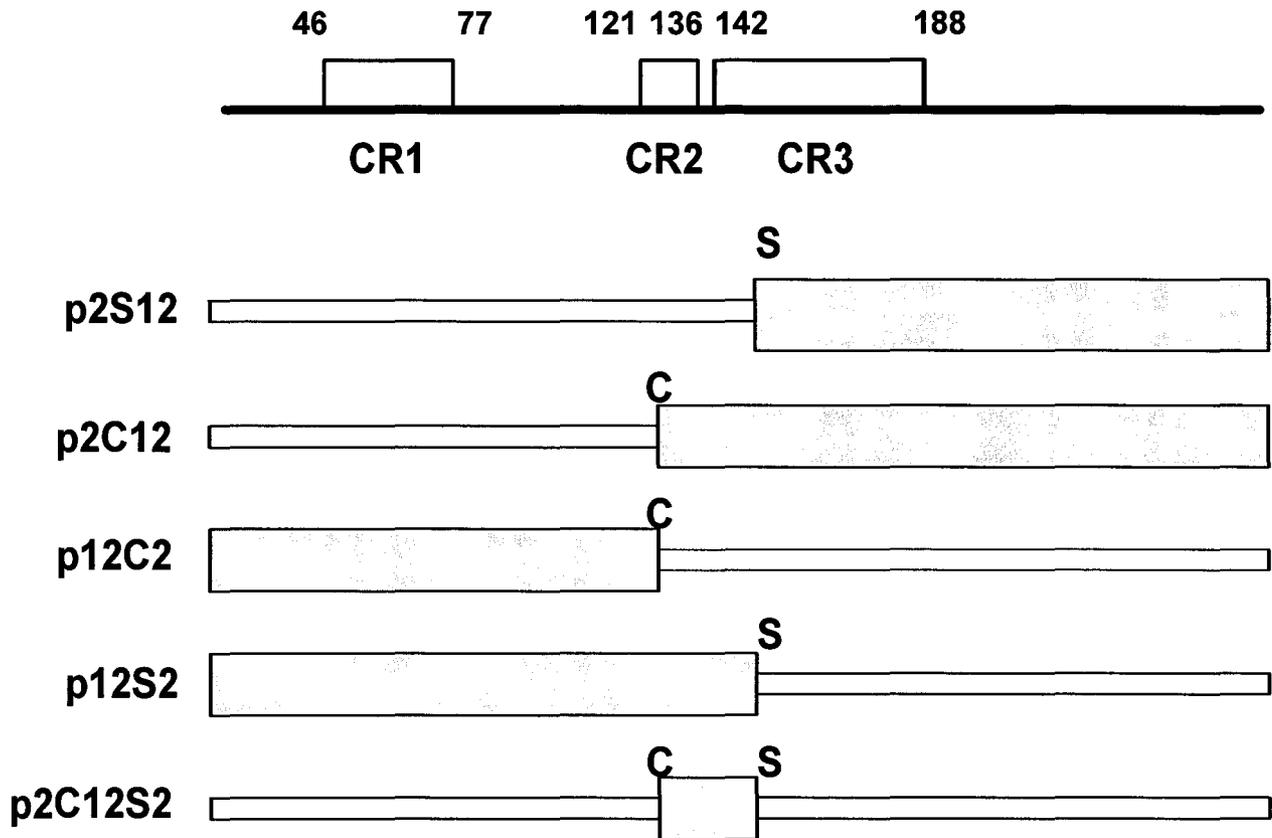
Les chiffres entre parenthèse représentent les écarts types. Les mesures ont été effectuées pour un rapport cellule cible/ cellules effectrices de 1/25.



**Figure R17:** Degré de sensibilité des lignées transformées par chacune des protéines majeures de E1A d'Ad2 ou d'Ad12 à la lyse par les cellules NK.

Les cellules ont été marquées à la thymidine tritiée puis incubées avec les cellules NK pendant 16 h. Le pourcentage de cellules résistantes a été estimé par comptage de la fraction marquée acido-précipitable après lyse des cellules. Les courbes de survie représentent la moyenne de trois expériences indépendantes avec chacune des combinaisons cellule cible:cellules effectrices réalisée en triple.

Lignée de cellules BRK transformées par E1B d'Ad12 en coopération avec: \* E1A génomique d'Ad12 (lignée [1201-b]); ● E1A(ADNc 13S) d'Ad12 (lignée [1221-a]); ◆ E1A(ADNc 12S) d'Ad12 (lignée [1222-b]); △ E1A génomique d'Ad2 (lignée [250-a]); + E1A(ADNc 13S) d'Ad2 (lignée [251-a]); □ E1A(ADNc 12S) d'Ad2 (lignée [252-d]).



**Figure R18:** Représentation schématique des plasmides exprimant les protéines E1A hybrides entre l'Ad2 et l'Ad12.

Première ligne: ADNc 13S d'Ad2 et localisation des domaines conservés CR1, CR2 et CR3.

Barres fines: séquences nucléotidiques provenant de l'ADNc 13S d'Ad2.

Barres épaisses: séquences nucléotidiques provenant de l'ADNc 13S d'Ad12.

C: *Clal*

S: *SmaI*

Ad12	- MR-TEMTPLVLSYQEADDILEHLVDNF-FNEVPSDDDLVPSLYELYDLD	48
Ad2	- MRHIICHGGVITEEMAASLLDQLIEEVLADNLPSSHFEPPTLHELYDLD	50
<b>CR1</b>		
Ad12	- VESAGEDNNEQAVNEFFPESLILAASEGLFL-PEPPV-----LSPVC	89
Ad2	- V-TAPEDPNEEAVSQIFPDSVMLAVQEGIDLLTFPPAPGSPEPPHLSRQP	99
<b>I      CR2</b>		
Ad12	- E-----PIGGECMPQLHPED <b>MDLL</b> CYEMGFPCSDSEDEQDENGMAHVSAS	134
Ad2	- EQPEQRALGPVSMPNLVPEV <b>IDL</b> TCHEAGFPSPDDEDEEGE-----	140
	<i>Cl</i> I	↑
↓		
<b>CR3</b>		
Ad12	- AAAAAADREREEFQLDHP <b>ELPG</b> HNCSCHEHHRNSTGNTDLMCSLCYLRA	184
Ad2	- -----EFVLDYVEH <b>PG</b> HGCRSCHYHRNTGDPDIMCSLCYMRTC	179
	<i>Sma</i> I	
↓		
Ad12	- NMFIYSPVSDNEPEPNSTL-----	203
Ad2	- GMFVYSPVSEPEPEPEPEPEPARPTRRPKLVPAILRRPTSPVSRECNSST	229
	↑	
Ad12	- ---DGDERPSPPKLGSAVPEGVIKVPQRTGRRRCAVESILDLIQEEER	250
Ad2	- DSCDSGPSNTTPPEIHPVVPLCPKPVAVRVGGRRQ-AVECIEDLLNESGQ	278
Ad12	- EQTVPVDLSVKRPRCN	266
Ad2	- ----PLDLCKRPR-P	289

<b>I</b>				
ATC	GAT	CCC	GGG	
ATG	GAT	CCC	GGA	Ad12
<b>M</b>	<b>D</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	
<b>I</b>	<b>D</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	
ATC	GAT	CCC	GGG	Ad2
<i>Cl</i> I		<i>Sma</i> I		

**Figure R19:** Comparaison des séquences en acides aminés de la plus grande des protéines E1A d'Ad12 et d'Ad2 et sites de restriction créés par mutagenèse dirigée au niveau de l'ADNc 13S d'Ad12.

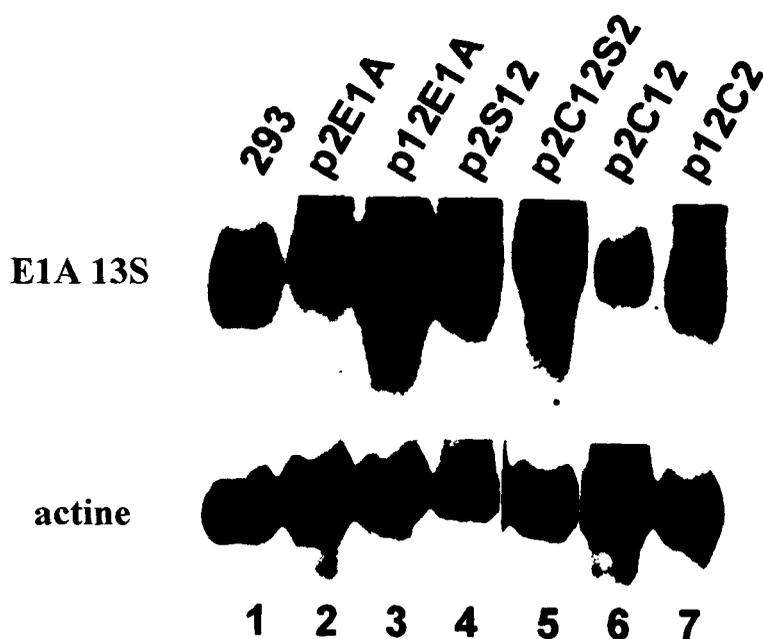
CR1, CR2, CR3: domaines conservés entre les sérotypes.

Les séquences comprises entre les flèches sont uniquement présentes dans les protéines E1A codées par l'ARN 13S.

La modification apportée dans la séquence protéique de E1A d'Ad12 par création du site de restriction *Cl*I est indiquée.

### I - 3 - Essais de cytotoxicité sur les lignées hybrides.

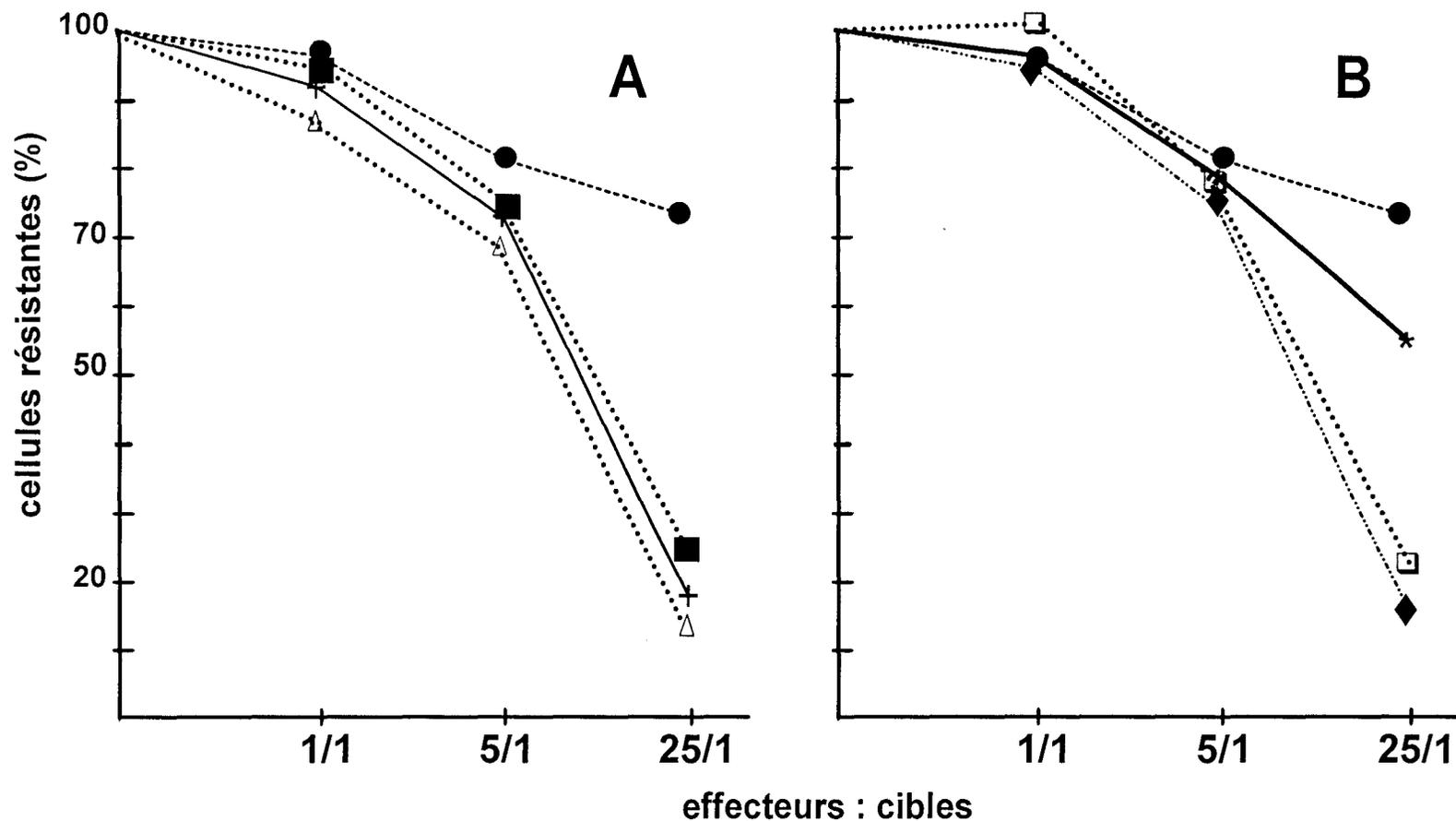
Les cellules provenant de chacune des lignées transformées hybrides ont été marquées puis exposées aux cellules NK dans les proportions de 1 contre 1, 5 ou 25 de la même manière que lors de l'analyse préliminaire. Comme le montrent la figure R21 et le tableau V, la plupart des lignées cellulaires hybrides se révèlent aussi sensibles à la lyse par les cellules NK que la lignée transformée par l'ADNc 13S de E1A d'Ad2 (p2E1A). Seules les cellules transformées par la région E1A hybride p2C12 en coopération avec la région E1B d'Ad12 présentent une sensibilité intermédiaire entre celle des cellules transformées par l'ADNc 13S d'Ad2 et celle des cellules transformées par l'ADNc 13S d'Ad12 (p12E1A). La protéine E1A hybride p2C12 contient la partie N-terminale, le domaine CR1 et le premier tiers du CR2 de E1A d'Ad2, le reste de la séquence protéique provenant de la région E1A d'Ad12 (fig. R18). Le segment riche en résidus alanine (*spacer*) situé entre le CR2 et le CR3 dans les protéines majeures de E1A d'Ad12 (aa 124 à 143) est également présent dans cette protéine (fig. R19). La séquence de E1A d'Ad12 comprise entre les aa 105 (site *ClaI* au niveau de la séquence nucléotidique) et 155 (site *SmaI*) contient les deux tiers C-terminaux du CR2, le *spacer*, de même que le premier tiers du CR3. Cette séquence est essentielle pour conférer aux cellules transformées le phénotype de résistance à la cytolyse comme le démontrent les résultats obtenus avec la lignée hybride [p2S12]. Cette dernière exprime en effet une protéine E1A recombinante identique à celle qui est exprimée dans la lignée [p2C12] mais dont la séquence protéique codée par le fragment de restriction *ClaI-SmaI* provient de l'Ad2. Cette protéine est par conséquent dépourvue de *spacer*. Cependant, bien que nécessaire, la séquence *ClaI-SmaI* ne suffit pas à elle seule à l'induction de la résistance. En effet, la lignée cellulaire [p2C12S2] s'avère être sensible aux NK lors des essais de cytotoxicité. Or cette lignée a été établie après transformation de BRK primaires avec une région E1A hybride ne contenant comme portion de E1A d'Ad12 que cette séquence. Nous pouvons donc considérer qu'au moins deux domaines des protéines E1A d'Ad12 sont impliqués dans le phénomène de résistance des cellules transformées. L'un d'eux est contenu dans la région codée par le fragment de restriction *ClaI-SmaI*, l'autre est localisé dans la région codée par la séquence nucléotidique située en aval du site *SmaI*. D'autre part, puisque les essais réalisés lors de l'analyse préliminaire ont montré que chacun des produits majeurs de E1A d'Ad12 est capable d'induire ce phénotype, ces domaines sont inclus dans deux régions non contiguës de la plus grande des protéines de E1A d'Ad12. La première comporte la partie



**Figure R20:** Etude comparative de l'expression des régions E1A hybrides dans les cellules transformées par la technique du *Northern blotting*.

Pour chacune des lignées établies, 30  $\mu$ g d'ARN totaux ont été séparés sur gel d'agarose dénaturant, transférés sur membrane de nitrocellulose puis hybridés avec un mélange de sondes spécifiques correspondant aux régions E1A génomiques d'Ad2 et d'Ad12. La même membrane a été hybridée avec une sonde correspondant à l'ADNc de la  $\beta$  actine.

293: lignée HEK-293; [p2E1A]: lignée [250-b] transformée par l'ADNc 13S d'Ad2; [p12E1A]: lignée [1201-b] transformée par l'ADNc 13S d'Ad12; [p2S12]: lignée [1228-a], [p2C12S2]: lignée [1230-a], [p2C12]: lignée [1229-a] et [p12C2]: lignée [1232-b] transformées par les régions E1A hybrides construites à partir des ADNc 13S d'Ad2 et d'Ad12.



**Figure R21:** Résistance des cellules BRK transformées par les régions E1A hybrides entre l'Ad2 et l'Ad12 à la lyse par les NK.

Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes avec chacune des combinaisons cellule cible:cellule effectrices réalisées en triple. Par commodité, les courbes de survie sont présentées sur deux schémas (A et B).

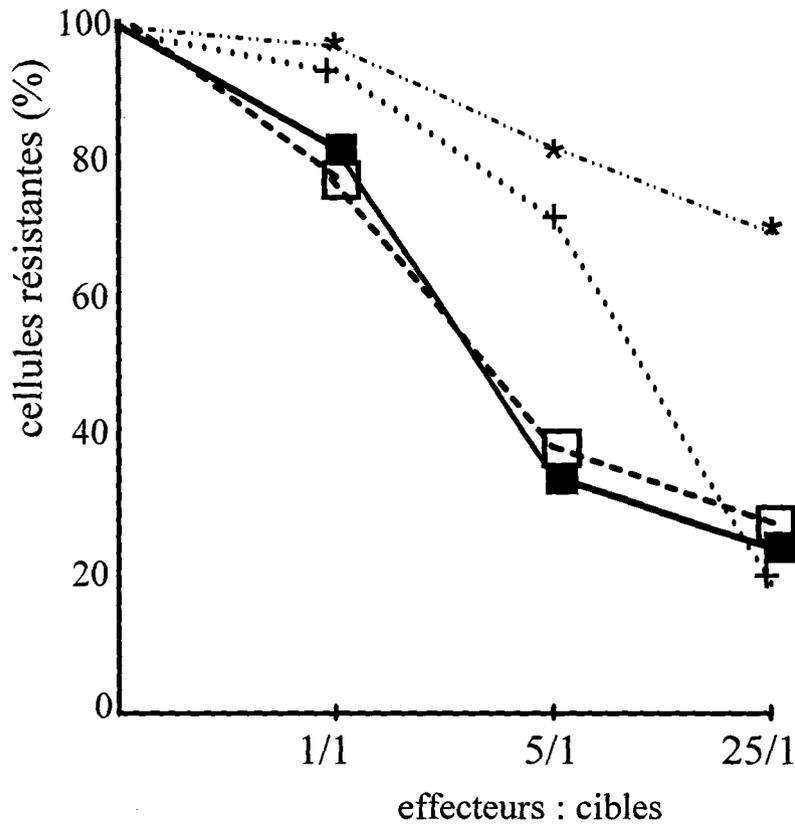
Lignée de cellules BRK transformées par E1B d'Ad12 en coopération avec: ● p12E1A (lignée [1201-b]); ■ p2S12 (lignée [1228-a]); + p2E1A (lignée [250-b]); Δ p12S2 (lignée [1231-a]); \* p2C12 (lignée [1229-a]); □ p2C12S2 (lignée [1230-a]); ◆ p12C2 (lignée [1232-b]).

C-terminale du CR2, le *spacer* et le premier tiers du CR3, tandis que la seconde correspond au second exon.

## **II - Sensibilité des cellules transformées par les adénovirus entériques à la lyse par les cellules NK.**

Les adénovirus entériques (Ad40, Ad41) transforment les cellules BRK primaires avec une très faible efficacité (VAN LOON *et al.*, 1985 ; COUSIN *et al.*, 1991) et les cellules transformées par ces sérotypes, ainsi que les particules virales elles-mêmes, n'induisent pas de tumeur quand elles sont injectées à des animaux immunocompétents (WADELL *et al.*, 1980 ; DE JONG *et al.*, 1983). Ces cellules présentent néanmoins, en surface, de bas niveaux d'expression d'Ag du CMH-I tout comme les cellules transformées par l'Ad12 (COUSIN *et al.*, 1991). Afin d'élucider le mécanisme impliqué dans la faible tumorigénicité des cellules transformées par les adénovirus entériques, nous avons analysé leur sensibilité à la lyse par les NK.

Pour les essais de cytotoxicité, deux lignées distinctes de cellules BRK transformées par la région E1 d'Ad41, [41-1] et [41-2] ont été étudiées en parallèle avec les lignées [249] et [1221]. Ces essais ont été réalisés de la même manière que lors de la détermination des domaines de E1A d'Ad12 impliqués dans le phénomène de résistance des cellules transformées. Comme illustré dans la figure R22, chacune des lignées de cellules transformées par l'Ad41 s'avère être très sensible à la lyse par les cellules NK. Cette sensibilité est d'ailleurs beaucoup plus prononcée que dans le cas des cellules transformées par l'Ad2 (lignée [249]). En effet, dans la proportion de 5 cellules effectrices pour une cellule cible, 30 % seulement des cellules transformées par l'Ad2 se révèlent sensibles à la lyse contre plus de 60 % pour les cellules transformées par l'Ad41. Ce résultat pourrait expliquer l'absence d'oncogénicité des cellules transformées par les adénovirus entériques chez l'animal immunocompétent et ceci malgré une expression réduite d'Ag du CMH-I.



**Figure R22:** Degré de sensibilité des lignées transformées par les adénovirus entériques à la lyse par les cellules NK.

Après marquage à la thymidine tritiée, les cellules provenant des différentes lignées établies ont été incubées 16 h en présence des cellules NK. Le pourcentage de cellules résistantes a été estimé par comptage de la fraction marquée acido-précipitable après lyse des cellules. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes avec chacune des combinaisons cellule cible:cellules NK réalisée en triple et avec des valeurs d'écart type n'excédant pas 15%.

Lignées de cellules BRK transformées: [1221] \*; [249] +; [41-1] □; [41-2] ■.

**DISCUSSION**

## **I - L'activité du promoteur H-2K<sup>b</sup> est régulée par de nombreux éléments dans les cellules transformées.**

**L'inhibition de l'activité transcriptionnelle du promoteur H-2K<sup>b</sup> n'est pas directement corrélée à l'expression du produit du messager 13S de E1A d'Ad12.**

Des travaux menés au laboratoire ont permis de démontrer que l'expression des Ag du CMH-I est réprimée en surface des cellules BRK primaires transformées par le produit de l'ARNm 13S de E1A d'Ad12 (LECLERE, 1993). Les travaux présentés dans ce mémoire montrent que l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène exogène H-2K<sup>b</sup>, introduit de manière transitoire, est significativement plus faible (facteur 5,2) dans les cellules BRK primaires transformées par l'Ad12 que dans celles qui le sont par l'Ad2 (fig. R2).

Des résultats contradictoires ont été publiés en ce qui concerne la relation existant entre l'expression de E1A d'Ad12 et l'inhibition de la transcription des gènes du CMH-I. Ainsi, certains groupes ont observé cette répression en utilisant des cellules, établies en lignées, "transformées" par l'Ad12 (KATOH *et al.*, 1990; OZAWA *et al.*, 1993; TANG *et al.*, 1995) ou encore en cotransfectant ces cellules ou même des cellules primaires avec E1A d'Ad12 (PROFFITT *et al.*, 1994). Les travaux réalisés par d'autres groupes indiquent, au contraire, que cette répression est restreinte aux cellules primaires transformées par l'Ad12 (VAESSEN *et al.*, 1986; NIELSCH *et al.*, 1991; MEIJER *et al.*, 1991; GE *et al.*, résultats non publiés, cités par GE *et al.*, 1992; SCHOUTEN *et al.*, 1995). En accord avec ces derniers, nous n'avons pu mettre en évidence de répression par E1A d'Ad12 lors de la cotransfection de cellules NRK-49F (lignée établie de fibroblastes de rein de rat) (fig. R3). Au contraire, une stimulation de la transcription a même été observée lors de ces études. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par ROSENTHAL *et al.* (1985) qui ont montré que la transcription du gène H-2K<sup>b</sup> est initialement augmentée au cours de l'infection de cellules d'embryon de souris par l'Ad12. La relation entre les gènes du CMH-I et le produit de l'ARNm 13S de E1A d'Ad12 est donc probablement complexe et ne s'explique pas simplement par un effet inhibiteur des protéines E1A comme observé par BORRELLI *et al.* (1984), VELCICH et ZIFF (1985) et CHEN *et al.* (1992) sur plusieurs *enhancers* viraux. Au contraire, dans nos expériences, cette répression s'avère être plutôt un effet secondaire de la transformation par E1A d'Ad12.

**La région distale (-2015 à -653) est globalement aussi inhibitrice dans les cellules transformées par l'Ad12 que dans les cellules transformées par l'Ad2.**

L'analyse par délétions successives du promoteur H-2K<sup>b</sup> à partir de l'extrémité 5' a permis de démontrer que la région distale (-2015 à -653) agit négativement sur la transcription à la fois dans les cellules transformées par l'Ad12 et dans les cellules transformées par l'Ad2. L'effet inhibiteur de cette région est globalement équivalent dans les deux types de cellules transformées (fig. R2). Une dissection plus fine de cette région a révélé que, dans le cas des cellules transformées par l'Ad2, seul le fragment le plus distal (-2015 à -1486) intervient dans cet effet. Par contre, dans le cas des cellules transformées par l'Ad12, deux fragments sont impliqués. Le premier correspond, comme pour les cellules transformées par l'Ad2, au fragment distal, le second est localisé entre -1180 et -883. En ce qui concerne ce dernier, son effet inhibiteur est partiellement compensé par la présence d'au moins un élément *enhancer*, actif dans les cellules transformées par l'Ad12, situé dans le fragment présent juste en amont (entre -1486 et -1180) (fig. R15). En 1994, les travaux de PROFFITT *et al.* ont permis d'identifier au niveau de celui-ci plusieurs éléments cibles de la régulation négative par E1A d'Ad12. Ces éléments sont compris entre -1440 et -1180 et semblent fonctionner de façon additive dans l'effet inhibiteur. Ces auteurs ont remarqué l'existence, dans ce fragment, de deux séquences présentant une homologie avec le site de liaison d'un facteur *trans*-répresseur du promoteur de porc PD1 mis en évidence par WEISSMAN et SINGER (1991) (fig. D1). L'une de ces séquences fixe d'ailleurs une protéine exprimée de façon spécifique dans les cellules transformées par l'Ad12. Nos résultats sont donc en contradiction avec ceux obtenus par cette équipe. Une explication possible pour cette divergence de résultats pourrait être que les cellules transformées utilisées dérivent de cellules issues de rats de lignées différentes ou bien encore que les vecteurs plasmidiques utilisés pour les constructions hybrides sont différents.

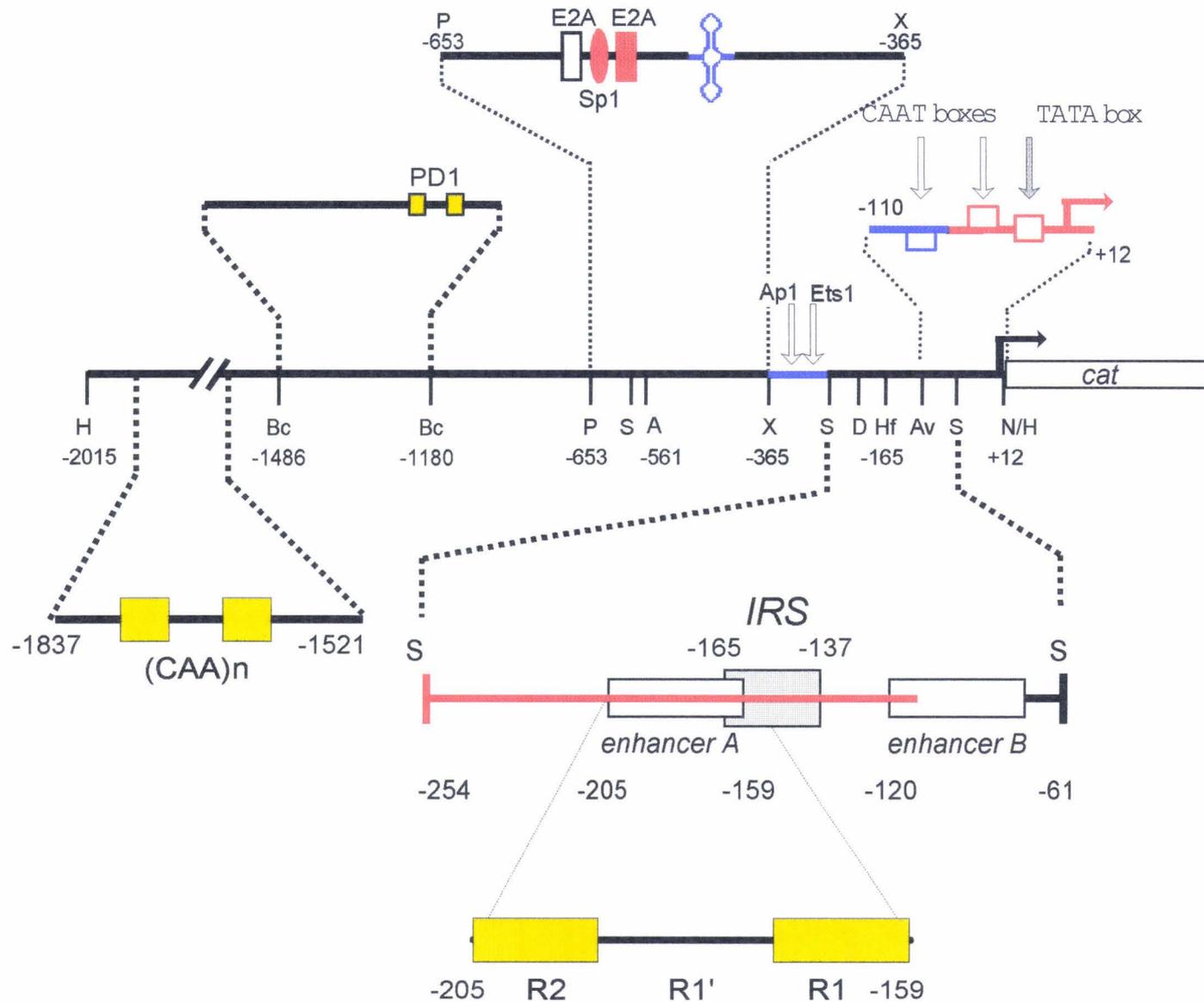
Quant au fragment le plus distal (-2015 à -1486), réprimant la transcription de façon à peu près égale dans nos deux types de lignées transformées, il a également été impliqué dans la différence d'activité transcriptionnelle observée entre les cellules transformées par l'Ad12 et celles transformées par l'Ad2. Les travaux réalisés par YOKOYAMA et collaborateurs ont en effet localisé la cible de l'inhibition par E1A d'Ad12 au niveau d'une région comprise entre -1837 et -1521 (KATOH *et al.*, 1990). Cette région renferme deux motifs CAA répété entre -1725 et -1568 (fig. D1) nécessaires à l'obtention de l'effet répresseur au travers de la liaison de

facteurs nucléaires spécifiques des cellules transformées par l'Ad12 (OZAWA *et al.*, 1993). Plus récemment, TANG *et al.* (1995) ont montré qu'au niveau de cette région une séquence de type TATA *box* présente juste en amont des deux motifs CAA répété (fig. R1) est également un élément clé de la régulation négative par le produit du message 13S de E1A d'Ad12. Cette séquence TATA est active uniquement en conjonction avec au moins l'un des deux CAA répété et ce à la fois dans le contexte du promoteur naturel et dans le contexte de promoteurs hétérologues. Dans les cellules transformées par l'Ad12, un complexe multiprotéique incluant la protéine E1A de 266R, la TBP et des facteurs nucléaires se liant aux motifs CAA interagirait avec cette région suggérant que le mécanisme de répression fait intervenir un phénomène de compétition pour le démarrage de la transcription entre cette région et le promoteur basal.

Nos expériences d'expression transitoire avec le fragment distal (-2015 à -1486) cloné en amont du promoteur minimal *tk* n'ont reproduit la répression ni dans les cellules transformées par l'Ad12 ni dans les cellules transformées par l'Ad2 (fig. R15). Le mécanisme de répression par ce fragment fait donc intervenir d'autres éléments situés plus en aval dans le promoteur ou dépend plus simplement de la nature du promoteur basal. Afin de trancher entre ces deux possibilités, il serait intéressant d'estimer l'activité de ce fragment en le clonant en amont du promoteur minimal naturel.

Par ailleurs, les expériences de retard en gel réalisées avec un oligonucléotide double brin correspondant au motif CAA localisé juste en aval de la séquence de type TATA n'ont pas non plus permis d'observer de différence dans la fixation de facteurs nucléaires entre les deux types de cellules transformées contrairement à ce qui avait été observé par OZAWA *et al.* en 1993. Nous avons, en effet, observé trois complexes, présents sous forme de doublet, avec les extraits nucléaires préparés avec chacun des types de cellules transformées mais également à plus faible concentration avec les extraits nucléaires préparés à partir de cellules BRK primaires (fig. R16). Ces complexes correspondent donc à des protéines cellulaires dont l'expression et/ou l'affinité pour l'ADN est augmentée dans les cellules transformées.

Ces résultats ne permettent pas de conclure quant à l'effet inhibiteur de ce motif. L'analyse de l'activité transcriptionnelle du promoteur délété spécifiquement de chacun des motifs CAA et/ou de la séquence de type TATA pourrait nous permettre d'estimer leur implication éventuelle dans la répression observée dans chacun des types de cellules transformées.



**Figure D1** : Eléments régulateurs de la transcription du promoteur H-2Kb dans les cellules transformées par les adénovirus 2 et 12. , élément préalablement identifié comme régulateur négatif dans les cellules transformées par l'Ad12; , élément de régulation positive; , élément de régulation négative dans les cellules [1221].

**La région (-561 à -365) inhibe la transcription mais des séquences différentes sont impliquées dans chacun des types de cellules transformées.**

Lors de l'analyse préliminaire du promoteur H-2K<sup>b</sup>, nous avons montré que la région (-653 à -365) présente une activité transcriptionnelle légèrement inhibitrice. L'analyse plus fine de cette région a permis de démontrer que c'est essentiellement la région (-561 à -365) qui est impliquée dans cette inhibition (fig. R8). Dans les cellules transformées par l'Ad12, la répression de la transcription est corrélée à la présence de la séquence (-561 à -472), tandis que dans les cellules transformées par l'Ad2 c'est la séquence (-472 à -365) qui en est responsable. Les analyses réalisées dans le contexte du promoteur hétérologue *tk* ont permis de reproduire cet effet (fig. R9) ce qui suggère que les mécanismes de répression mis en jeu dans chacun des types de lignées de cellules transformées sont indépendants de la nature du promoteur basal. Néanmoins cette analyse a été effectuée en plaçant la séquence (-561 à -365) en globalité en amont du promoteur *tk*. Il faudrait donc confirmer ce résultat en la subdivisant en deux fragments.

Par expériences de retard en gel avec la séquence (-585 à -472), qui renferme donc le ou les sites responsables de l'inhibition de la transcription dans les cellules transformées par l'Ad12, nous avons mis en évidence l'existence de trois complexes retardés avec les extraits nucléaires préparés à partir de cellules transformées par l'Ad12. Deux de ces complexes sont également retrouvés avec les extraits nucléaires préparés à partir de cellules transformées par l'Ad2 (fig. R10). Le complexe spécifique des cellules transformées par l'Ad12 pourrait être responsable de l'activité inhibitrice de ce fragment. Il s'agirait donc alors d'un mécanisme actif de répression. Cependant, nous ne pouvons exclure la possibilité que ce complexe corresponde à un facteur interagissant avec un site localisé plus en amont, entre -585 et -561 puisque le fragment utilisé comme sonde correspond à la séquence (-585 à -472). Dans ce cas, la répression par la région (-561 à -472) s'opérerait par un mécanisme différent. Il est donc essentiel de réitérer ces expériences en prenant comme sonde le fragment (-561 à -472).

Par ailleurs, le fragment (-561 à -472) renferme un site consensus pour le facteur Sp1 et deux sites pour le facteur E2A (fig. R11). E2A est un facteur ubiquitaire de type hélice-boucle-hélice à domaine basique (bHLH pour *basic Helix-Loop-Helix*) capable d'homodimérisation ou d'hétérodimérisation avec d'autres facteurs de type bHLH (MURRE *et al.*, 1989a ; b). Lors d'expériences d'expression transitoire dans le contexte du promoteur *tk*, la mutation du site Sp1 ainsi que celle d'un site E2A a montré qu'ils sont impliqués dans la répression (fig. R12). Il

serait intéressant d'analyser l'effet du double mutant afin de déterminer leur action synergique potentielle (bien qu'il soit très peu probable que les deux sites sont la cible d'interactions simultanées). Nous avons alors essayé de corréler ces résultats avec ceux obtenus lors des analyses de retard en gel. Le complexe retardé C, spécifique des cellules transformées par l'Ad12, ne peut correspondre ni à la fixation du facteur Sp1 ni à celle du facteur E2A. En effet, d'une part ces deux facteurs de transcription, de par leur caractère ubiquitaire, sont sans aucun doute exprimés sous forme active dans chacun des types de cellules transformées, d'autre part, le profil de migration du complexe C reflète l'interaction d'un facteur possédant une masse moléculaire relativement réduite qui ne peut correspondre à des facteurs ayant des masses moléculaires aussi importantes que celles des facteurs Sp1 (95 ou 105 kDa) et E2A (67 kDa).

Le mécanisme de répression pourrait mettre en jeu la fixation d'un inhibiteur, présent dans les cellules transformées par l'Ad12, et son interaction avec le complexe basal de transcription, interaction qui serait facilitée par une topologie particulière de l'ADN induite par la liaison de facteurs au(x) site(s) Sp1 et/ou E2A. Lors de la mutation de l'un ou l'autre de ces sites, l'interaction de l'inhibiteur avec le complexe basal de transcription ou même sa fixation à l'ADN pourrait être compromise, levant alors la répression. Des études de retard en gel avec des fragments correspondant à la séquence (-561 à -472) contenant l'un et/ou l'autre des sites mutés pourraient peut-être nous permettre de vérifier cette hypothèse.

Au niveau de la séquence (-472 à -365) qui inhibe la transcription dans les cellules transformées par l'Ad2 quelque soit la nature du promoteur basal, un seul et même complexe retardé a été mis en évidence dans chacun des types de cellules transformées. Cette séquence renferme un site potentiel d'initiation de la transcription (INR pour *initiator*) mais aussi deux séquences répétées inversées susceptibles de former une structure en épingle à cheveux entre -468 et -456 (fig. R11). Des expériences de mutagenèse réalisées avec l'INR ont permis de montrer que cet élément n'intervient pas dans la répression. Par contre, les mutations qui ont pour résultat de supprimer/réduire la stabilité de l'épingle à cheveux (construction pBL18cat) ont démontré son implication dans l'inhibition (fig. R12). Ce résultat nous a fortement surpris d'autant que l'énergie de cette épingle est relativement élevée ( $\Delta G = -7,4$  kcal/mol) et qu'aucune interaction protéique spécifique capable de la stabiliser ne semble exister à son niveau (fig. R13). En 1990, OZAWA *et al.* ont montré que le promoteur du gène H-2K<sup>bm1</sup>, qui diffère du gène H-2K<sup>b</sup> par une délétion d'un seul nucléotide en position -456, est plus actif que le promoteur H-2K<sup>b</sup>. Dans le cas de ce promoteur variant la stabilité de l'épingle est fortement réduite ( $\Delta G$  supérieur à

-2 kcal/mol) comme celle du mutant pBL18cat. Nos résultats dans la lignée de cellules transformées par l'Ad2 sont donc en accord avec ceux obtenus par cette équipe. Le seul mécanisme qui puisse expliquer la répression de la transcription observée dans les cellules transformées par l'Ad2 serait que cette structure perturbe une coopération existant entre le complexe spécifique, mis en évidence par les expériences de retard en gel avec la séquence (-472 à -365) et un complexe spécifique des cellules transformées par l'Ad2 se formant au niveau des promoteurs basaux H-2K<sup>b</sup> et *tk*. Les expériences de retard en gel avec la sonde (18) ont permis de mettre en évidence de nouvelles interactions à la fois dans les cellules transformées par l'Ad2 et par l'Ad12. Dans les deux types cellulaires, les complexes sont différents (fig. R13). La suppression de l'épingle à cheveux permet donc de nouvelles interactions à moins qu'elles ne soient induites par la création de nouveaux sites de fixation suite aux mutations créées. Dans cette optique, il serait intéressant d'effectuer des mutations différentes dans l'épingle à cheveux afin de trancher entre ces deux possibilités. Nos expériences de *Southwestern blotting* n'ont apporté aucune information intéressante à propos des complexes impliqués dans ces interactions si ce n'est qu'ils sont constitués de plusieurs protéines incapables d'interagir seules (fig. R14). Une technique plus appropriée pour déterminer la masse moléculaire apparente des facteurs impliqués dans ces interactions serait le pontage aux UV.

**La région (-365 à -61) agit positivement sur la transcription dans les deux types de cellules transformées.**

L'analyse préliminaire du promoteur H-2K<sup>b</sup> a permis de démontrer que la région proximale (-365 à -61) agit positivement sur la transcription dans les cellules transformées par l'Ad12 et par l'Ad2 (fig. R2). Dans ces dernières, c'est essentiellement la séquence (-254 à -110) qui en est responsable, tandis que dans les cellules transformées par l'Ad12 ce sont les séquences (-365 à -254) et (-110 à -61) qui sont impliquées (fig. R4 ; fig. D1).

Lors d'expériences d'expression transitoire dans le contexte du promoteur hétérologue *tk*, l'effet activateur de la séquence (-365 à -254) n'a pas été retrouvé (fig. R5). Ce résultat a été conforté par des expériences de retard en gel qui n'ont pu mettre en évidence de complexe spécifique des cellules transformées par l'Ad12 (fig. R6). Il est donc très probable que l'élément *in cis* responsable de l'activation par ce fragment coopère avec un ou plusieurs éléments situés plus en aval dans le promoteur. La présence d'un site consensus pour le facteur de transcription Ets-1 (-325 à -320) et celle d'un site dégénéré pour le facteur AP-1 (-349 à -343) nous a conduit à

rechercher leur éventuelle implication dans le phénomène d'activation. Les expériences de compétition réalisées en expression transitoire avec des plasmides renfermant ces sites ont montré qu'aucun des deux n'est impliqué dans l'activité promotrice du fragment (-365 à -254). Cependant, il paraît nécessaire de confirmer ce résultat par une approche différente. Celle-ci pourrait consister, par exemple, en la mutation de chacun de ces sites. Dans le cas où cette seconde approche ne permettrait pas d'impliquer l'un ou l'autre de ces sites, des études complémentaires seraient alors nécessaires pour localiser plus précisément l'élément en *cis* responsable. Dans cette optique, il serait intéressant de diviser la séquence (-365 à -254) en fragments de taille plus restreinte et de tester chacun d'eux en les fusionnant à la construction pH254. Après avoir délimité plus précisément cet élément, il faudrait alors rechercher quelle est ou quelles sont les séquences contenues entre -254 et le site d'initiation de la transcription qui sont nécessaires à son activité.

L'interprétation des résultats obtenus lors de l'analyse des deux autres séquences contenues dans la région (-365 à -61) c'est à dire les séquences (-254 à -110) et (-110 à -61) s'est avérée plus difficile compte tenu du fait qu'elles ont été étudiées ensemble, à la fois dans le contexte du promoteur hétérologue *tk* et par retard en gel. Ainsi, en fusionnant le fragment (-254 à -61) en amont de ce promoteur, nous avons retrouvé l'effet activateur observé dans le contexte du promoteur naturel avec la lignée de cellules transformées par l'Ad2 (fig. R5) mais avons mis en évidence une inhibition de la transcription dans les cellules transformées par l'Ad12. Ces résultats nous ont permis d'émettre l'hypothèse que l'*enhancer* A (-205 à -159) inclus dans la séquence (-254 à -110) est actif dans les cellules transformées par l'Ad2, d'autant que l'activation transcriptionnelle est aussi observée lorsque cette séquence est clonée dans l'orientation inverse de celle existant dans le promoteur naturel. Par contre, dans les cellules transformées par l'Ad12, cet *enhancer* n'a pas d'effet stimulateur. Ces résultats sont en accord avec ceux de NIELSCH *et al.* (1991), MEIJER *et al.* (1992), GE *et al.* (1992), ROTEM-YEHUDAR *et al.* (1994b), SCHOUTEN *et al.* (1995), KUSCHNER *et al.* (1996) et LIU *et al.* (1996) mais vont à l'encontre de ceux de KATOH *et al.* (1990) et de PROFFITT *et al.* (1993) qui indiquent que cet *enhancer* est plutôt la cible d'une régulation positive par E1A d'Ad12.

Les expériences de retard en gel avec le fragment (-254 à -61) ont mis en évidence l'existence de deux complexes retardés au niveau de cette séquence dans chacun des types de cellules transformées. L'un d'eux (complexe B) est présent en concentration plus importante

avec les extraits nucléaires préparés à partir des cellules transformées par l'Ad12 (fig. R7). Différents mécanismes sont donc envisageables :

- L'inhibition de l'activité de l'*enhancer* n'implique pas la réduction de la fixation de facteurs à l'élément R1 dans les cellules transformées par l'Ad12 comme proposé par MEIJER *et al.* (1992), SCHOUTEN *et al.* (1995), KUSCHNER *et al.* (1996) et LIU *et al.* (1996) mais fait intervenir un facteur *trans*-répresseur se fixant à l'élément R2 comme cela a été démontré par les travaux de GE *et al.* (1992), KRALLI *et al.* (1992) et LIU *et al.* (1994).

- Des facteurs différents interagissent avec l'élément R1 dans les cellules transformées par l'Ad2 et dans les cellules transformées par l'Ad12 mais le profil de migration en gel des complexes ainsi formés est identique dans les deux types cellulaires. Ces facteurs pourraient être NF- $\kappa$ B (hétérodimère p50/p65) dans les cellules transformées par l'Ad2 et KBF1 (homodimère p50) dans le cas des cellules transformées par l'Ad12. En effet, tandis que le premier est fortement transactivateur puisque c'est la p65 qui porte la fonction de transactivation, le second, au contraire, est inactif ou très faiblement actif au niveau transcriptionnel (SCHMITZ and BAEUERLE, 1991 ; BALLARD *et al.*, 1992). Cette hypothèse est tout à fait plausible étant donné la taille importante (193 pb) du fragment utilisé comme sonde dans les expériences de retard en gel. Ces facteurs correspondraient alors au complexe B mis en évidence lors de nos études, tandis que le complexe A concernerait la séquence (-110 à -61).

Nous écartons volontiers le premier mécanisme pour les raisons suivantes :

- (i) l'activité transcriptionnelle des constructions pBL1a et pBL1b (contenant la séquence -254 à -61 en amont du promoteur *tk*) est restée inchangée après traitement des cellules transformées par l'Ad12 avec l'acide rétinoïque alors que les travaux de KRALLI *et al.* (1992) ont montré que ce traitement permet de supprimer la répression par l'élément R2.

- (ii) le mécanisme de répression par R2 dépend de la présence des facteurs interagissant au niveau de l'élément R1. Dans ce cas nous aurions dû observer, par retard en gel, au moins trois interactions au niveau de la séquence -254 à -61. Deux d'entre elles impliqueraient le fragment -254 à -110, la troisième, le fragment -110 à -61. En effet, ce dernier s'est avéré agir positivement dans les cellules transformées par l'Ad12 ce qui implique forcément l'existence d'une fixation tout au moins dans ces cellules.

Si la séquence (-110 à -61) est active dans les cellules transformées par l'Ad12, au contraire dans celles qui sont transformées par l'Ad2, elle est sans influence. Cette séquence contient une CAAT *box* inversée et un site de fixation pour la famille de facteurs de transcription

AP-1/CREB/ATF (KORBER *et al.*, 1988; ISRAËL *et al.*, 1989a). Nous n'avons pas identifié l'élément en *cis* responsable, néanmoins ce pourrait être la CAAT *box*. En effet, un mécanisme possible rendant compte de la différence d'activité transcriptionnelle de la séquence (-110 à -61) existant entre les deux types de cellules transformées pourrait faire intervenir des protéines interagissant au niveau de ce type de séquence. Les CAAT *box* sont des sites de liaison pour différentes familles de protéines dont la famille de facteurs C/EBP (LANDSCHULZ *et al.*, 1988). Ces protéines sont capables d'activer la transcription en interagissant à la fois avec la TBP et avec TFIIB (NERLOV and ZIFF, 1995). Il est possible d'imaginer que ces interactions sont permises dans les cellules transformées par l'Ad12, mais non dans les cellules transformées par l'Ad2. Toutefois, cette hypothèse peut être émise aussi pour les facteurs se liant à l'autre élément.

**La différence d'activité transcriptionnelle du promoteur H-2K<sup>b</sup> dans les cellules transformées par l'Ad2 et par l'Ad12 est aussi déterminée par le promoteur basal.**

Lors de l'analyse du promoteur H-2K<sup>b</sup>, nous avons constaté que la différence d'activité transcriptionnelle observée entre les deux types de cellules transformées implique également le promoteur minimal (-61 à +12) (fig. R2). En effet, avec la totalité du promoteur une différence d'activité d'un facteur 5,2 est observée entre les deux lignées tandis que pour le promoteur minimal (pH61) cette différence est de 11,3. Au contraire, le promoteur basal *tk* n'a pas montré de différence significative entre les deux lignées de cellules transformées. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par SCHOUTEN *et al.* (1995) mais sont en parfait accord avec ceux de GE *et al.* (1992). Ce groupe a en effet montré que la construction retenant les séquences comprises entre -37 et +12 présente invariablement une activité CAT 4 à 5 fois plus élevée dans les cellules transformées par l'Ad5 que dans celles qui le sont par l'Ad12. Par expériences de mutagenèse dirigée, ces auteurs ont également montré que la conversion de la TATA *box* d'H-2K<sup>b</sup> en d'autres TATA *box*, comme celle du promoteur précoce du SV40, ne permet pas de restaurer, dans les cellules transformées par l'Ad12, de niveau de transcription identique à celui obtenu dans les cellules transformées par l'Ad5. Dans leur système d'étude, la TATA *box* ne serait donc pas l'élément impliqué dans la répression ce qui suggère qu'une autre séquence comprise entre -37 et +12 en est responsable. En ce qui nous concerne, ce que nous avons appelé promoteur minimal contient les séquences présentes jusqu'au nucléotide -61. En conséquence, nous ne pouvons exclure la possibilité que cette répression est attribuable à d'autres éléments comme la CAAT

*box* localisée entre -51 et -47. Il s'avère donc nécessaire de comparer l'activité du fragment *SacII-HindIII* (-37 à +12) dans les deux types de cellules transformées. Dans le cas où cette inhibition n'impliquerait pas ce fragment mais celui situé juste en amont (-61 à -37), une analyse par *Northern blotting* de l'expression des différents membres de la famille de protéines capables de se fixer à la CAAT *box*, couplée à des expériences de retard en gel avec des anticorps dirigés contre ces différentes protéines pourrait nous renseigner sur son éventuelle implication dans l'inhibition.

Les résultats présentés dans ce mémoire ont été obtenus dans les cellules transformées par l'ADNc 13S de E1A, dont le produit, dans le cas de l'Ad12, est responsable de l'inhibition de l'expression des Ag de classe I à la surface des cellules. Les premières expériences avec le promoteur H-2K<sup>b</sup> dans sa totalité nous avaient montré que la différence d'activité transcriptionnelle observée dans les cellules transformées par les régions E1A génomiques d'Ad2 et d'Ad12 est également retrouvée dans les cellules transformées par les ADNc 13S de E1A. Ce résultat nous a donc permis de valider l'utilisation de ces dernières pour les analyses d'activité transcriptionnelle. A ce stade de notre étude, et compte tenu de la grande diversité des éléments régulant positivement ou négativement la transcription, nous ne pouvons pas exclure que certaines différences observées entre nos résultats et ceux obtenus par d'autres groupes proviennent de l'utilisation de cellules transformées par l'ADN 13S de E1A *versus* cellules transformées par la région E1A génomique. Enfin, il serait sans doute intéressant de savoir si les effets attribués au produit de l'ARNm 13S sont tous dépendants du domaine CR3.

## **II - Deux domaines des protéines E1A confèrent la résistance à la lyse par les cellules NK.**

**La tumorigénicité des cellules transformées par les Ad résulte essentiellement de leur résistance à la lyse par les NK.**

Les cellules transformées par l'Ad12 sont plus tumorigènes que celles qui sont transformées par les adénovirus du sous groupe C (Ad2, Ad5) (GALLIMORE and PARASKEVA, 1979 ; MAK *et al.*, 1979). Cette différence résulte essentiellement de la diminution de l'expression des antigènes de classe I du CMH à la surface des cellules transformées par l'Ad12 et de la résistance de ces cellules à la lyse par les NK. Il a été proposé

que la tumorigénicité des cellules transformées par les adénovirus n'est pas en relation avec le taux d'expression des antigènes de classe I du CMH à la surface des cellules mais résulte principalement de leur résistance à la lyse par les cellules NK (HADDADA *et al.*, 1986). Cette proposition est confirmée par nos études réalisées avec les cellules transformées par l'Ad41. En effet, ces cellules, non tumorigènes (WADELL *et al.*, 1980; DE JONG *et al.*, 1983), présentent un taux très réduit d'antigènes de classe I en surface (COUSIN *et al.*, 1991) mais sont très sensibles à la lyse par les cellules NK (fig. R22). Elles sont d'ailleurs beaucoup plus sensibles que les cellules transformées par l'Ad2, en particulier pour les faibles rapports cellules effectrices/ cellules cibles. Ceci peut expliquer que les cellules transformées par l'Ad41 ne sont pas tumorigènes même chez la souris *nude* (revue: MAUTNER *et al.*, 1995) au contraire de certaines cellules transformées par les Ad du sous-groupe C (Ad2, Ad5) (GALLIMORE *et al.*, 1977).

**Au moins deux domaines des protéines E1A sont nécessaires pour conférer le phénotype résistant.**

Chaque protéine E1A d'Ad12 est capable d'induire et de maintenir la transformation de cellules primaires de rein de rat, avec la même efficacité (LECLERE *et al.*, 1993), cependant seules les cellules transformées par l'ADNc 13S présentent un taux réduit d'antigènes de classe I en surface. Au contraire, les cellules transformées à l'aide de chacun des ADNc E1A d'Ad12 s'avèrent être résistantes à la lyse par les cellules NK, de façon identique à celle des cellules transformées par la région E1A génomique (fig. R17). Les domaines de E1A impliqués dans l'inhibition de l'expression des antigènes de classe I du CMH et dans la résistance à la lyse par les cellules NK sont donc différents : la partie carboxy-terminale du CR3 (LECLERE, 1993) et un ou plusieurs domaine(s) de la protéine codée par l'ARN 12S, respectivement.

Le ou les domaines de E1A d'Ad12 impliqués dans la résistance à la lyse par les cellules NK ont été identifiés en utilisant des cellules transformées par des hybrides de la région E1A des sérotypes 2 et 12. Les cellules transformées par un hybride (p12S2) exprimant l'extrémité N-terminale de l'Ad12, jusque l'aa 155 (site *SmaI*), sont sensibles à la lyse par les NK. Il en est de même des cellules transformées par la région E1A hybride (p2S12) dont le C-terminal du CR3 et le second exon proviennent de l'Ad12. Par contre, celles qui sont transformées par l'hybride contenant de l'Ad12 pour la région s'étendant des deux tiers C-terminaux du CR2 jusqu'au second exon sont résistantes à la cytolyse par les NK. Deux domaines, non contigus, de la grande

protéine E1A de l'Ad12 sont donc au moins nécessaires pour conférer aux cellules transformées le phénotype résistant. Il serait sans doute intéressant de confirmer ce résultat en utilisant des hybrides construits à partir de l'ADNc 12S de chaque sérotype.

L'un des domaines est inclus dans le second exon. Il est intéressant de noter que très récemment, cet exon a été impliqué dans l'induction de la sensibilité des cellules transformées par l'Ad5 à la lyse par les cellules NK (KRANTZ *et al.*, 1996). L'autre domaine est compris, quant à lui, dans une région s'étendant des acides aminés 105 (site *Clal*) à 155. Cette région comprend la fin du CR2, le premier tiers du CR3 et une séquence de 20 aa (*spacer*), riche en alanine, présente entre le CR2 et le CR3 de E1A de l'Ad12. Ce domaine à lui seul n'est pas suffisant pour conférer le phénotype de résistance à la lyse par les cellules NK (fig. R21).

Le *spacer* est présent dans les deux protéines majeures de E1A (fig. R19). L'alignement de séquences des protéines E1A de différents sérotypes montre que cette séquence est présente uniquement chez les adénovirus oncogéniques comme le SA7 (adénovirus simien sérotype 7) (Fig. D2) (KIMELMAN *et al.*, 1985). Cette homologie de séquence (plus de 55%), entre l'Ad12 et le SA7, deux sérotypes d'espèces différentes, suggère que ce domaine est très important pour les propriétés oncogéniques des adénovirus. Cependant, il n'intervient pas dans l'inhibition de l'expression des antigènes de classe I du CMH (MEIJER *et al.*, 1989, LECLERE, 1993). En utilisant une approche similaire à la nôtre, les groupes de GRAHAM et WILLIAMS ont montré que le *spacer* influence la tumorigénicité des cellules transformées par l'Ad12 (JELINEK *et al.*, 1994 ; TELLING and WILLIAMS, 1994). Contrairement aux résultats de MEIJER *et al.*, (1989) et de LECLERE, (1993) plus récemment le premier groupe a démontré que cette séquence intervient en fait dans l'inhibition de l'expression des antigènes de classe I (PEREIRA *et al.*, 1995).

Le *spacer*, séquence de 20 acides aminés riche en résidus alanine, pourrait interrompre ou perturber un domaine impliqué dans l'interaction entre E1A et le facteur de transcription ATF. En effet, LIU et GREEN (1990, 1994) ont montré que le CR3, responsable des propriétés transactivatrices de E1A, peut être divisé en deux sous-domaines : le domaine C-terminal, impliqué dans les associations avec des facteurs de transcription, comme ATF (DYNLACHT *et al.*, 1991) et un autre domaine en N-terminal, entre les aa 139 et 149, présentant 4 aa acides potentiellement transactivateurs (LILLIE and GREEN, 1989). C'est ce second sous-domaine qui pourrait être interrompu ou perturbé au niveau conformationnel dans la grande protéine E1A de l'Ad12 (fig. R19).

```

Ad2  DLTCHEAGFPPSDDEDE-----EGEE-----FVL-DYVEHPGHGCRSC
Ad7  DLRCYEEGFPPSDDEEDG-----ETEQSIHTAVNEGVKAAS----DVFKL-DCPELPGHGCKSC
Ad4  DLRCYEECLPPSDDED-----EQAIQNAASHGVQAVS----ESFAL-DCPPLPGHGCKSC
Ad12 DLLCYEMGFPCSDSEDEQD-----ENGMAHVSASAAAAADREREEFQL-DHPELPGHNCKSC
SA7  DLFCYEDGFPPSDSEEGEHSQVETERKMAEAAAAGAAAAAREQDDFRL-DCPSVPGHGCSSC
Ad41 DLKCYEEGLPPSGSEADEAEERAEETAVSNYVNIAEGAS----QLVL-DCPENPGRGCRAC
Ad40 DLKCYEDGLPPSDPETDEATE--AEEEEAAPTYVN--ENEN----ELVL-DCPENPGRGCRAC
TAd  -----EEVEAASGLAFETNEEV-----EGFVFPDCPERPGQECRSC

```

**CR2**

**CR3**

**Fig. D2:** Alignement des protéines E1A de différents sérotypes.

Cette séquence pourrait aussi agir intrinsèquement. En effet, sa richesse en résidus alanine l'apparente à certains répresseurs transcriptionnels comme celui de la protéine Krüppel de *Drosophile* (LICHT *et al.*, 1990).

Il serait donc intéressant d'analyser le rôle respectif de ce domaine de même que celui du second exon dans la résistance à la lyse. Dans un premier temps, il serait utile de subdiviser le second exon puisque celui-ci est très peu conservé entre les sérotypes (35% d'identité entre l'Ad2 et l'Ad12) (fig. R19).

Les résultats obtenus avec les cellules transformées par les adénovirus sont en conflit apparent avec les modèles proposés dans les relations entre le niveau d'expression des antigènes de classe I et la sensibilité à la lyse par les cellules NK. En effet, en règle générale, un taux élevé d'antigènes du CMH-I favorise une résistance à la lyse, les antigènes de classe I délivrant un signal négatif (*off*) aux cellules NK, en particulier l'haplotype H-2D<sup>d</sup> (MORETTA *et al.*, 1994 ; RAULET, 1994).

## **CONCLUSION**

Si tous les sérotypes d'Ad humains sont capables de transformer *in vitro* les cellules primaires de rongeurs, seules les cellules transformées par les sérotypes du sous-groupe A (Ad12) et B (Ad3, Ad7) peuvent induire des tumeurs quand elles sont injectées à des animaux syngéniques immunocompétents. La tumorigénicité des cellules transformées dans ces animaux immunocompétents reflète le potentiel oncogénique des sérotypes d'Ad utilisés pour la transformation. La différence d'oncogénicité s'explique en partie par la résistance des cellules transformées par l'Ad12 à la lyse par les NK mais aussi par la diminution du taux d'Ag du CMH-I en surface de ces cellules, ce qui leur permet d'échapper à l'élimination par les lymphocytes T cytotoxiques. C'est la région E1A de l'Ad12 qui régit ces deux mécanismes. Tandis que l'inhibition de l'expression en surface des Ag du CMH-I est contrôlée par la partie carboxy-terminale du CR3 spécifique du produit du messenger 13S de E1A, la résistance à la cytolyse par les NK est une fonction associée à au moins deux autres domaines des protéines E1A.

Bien que d'autres étapes de l'expression des Ag du CMH-I en surface (maturation des ARNm, transport des molécules) puissent être impliquées dans la répression, c'est principalement au niveau transcriptionnel qu'a lieu l'inhibition.

L'étude détaillée du promoteur du gène de souris codant les molécules de classe I H-2K<sup>b</sup> nous a permis de montrer que différents éléments régulent son activité dans les cellules transformées par l'Ad12. Nous avons mis également en évidence l'importance des séquences du promoteur basal dans la différence d'activité du promoteur dans les deux types de cellules transformées. La situation semble cependant être particulièrement complexe puisqu'un nombre important de cibles différentes ont été identifiées au cours de la dernière décennie.

La diminution de l'expression des Ag du CMH-I en surface de cellules tumorales d'origines diverses est une situation fréquemment rencontrée dans les cancers humains. Une connaissance approfondie de la régulation des promoteurs des gènes codant ces molécules pourrait donc permettre de moduler l'expression de ces gènes en situation pathologique. De même, les cellules tumorales sont dans certains cas résistantes à la cytolyse par les NK. Appréhender les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la reconnaissance des cellules anormales par ces effecteurs s'avère donc être du plus grand intérêt. Dans cette optique, il est intéressant de noter que de nouvelles approches thérapeutiques comme la thérapie génique ou l'immunothérapie font l'objet actuellement d'un nombre important d'études.

## **MATERIELS ET METHODES**

## **I - Techniques électrophorétiques appliquées à l'ADN.**

### **I - 1 - Electrophorèse en gel d'agarose.**

#### ***I - 1 - a - Séparation électrophorétique.***

Le gel d'agarose est utilisé pour la séparation des fragments d'ADN. Sa concentration varie de 0,6 à 2,5 % en fonction de la taille des fragments à séparer ou à purifier. La migration se fait en tampon TBE (Tris-HCl 134 mM; acide orthoborique 44 mM; EDTA 2,5 mM; pH 8,3). L'ADN est mélangé V/V avec une solution de BBØ (bleu de bromophénol 0,25 %; saccharose 40 %; EDTA 10 mM) avant d'être déposé. L'électrophorèse est effectuée sous une tension de 90 V pendant 2 à 3 h. L'ADN est visualisé sous rampe UV (366 nm) grâce au bromure d'éthidium (BrEt) contenu dans le gel (0,9 µg/ml).

#### ***I - 1 - b - DEAE - élution.***

Les fragments d'ADN intéressants sont élués du gel d'agarose par insertion, en aval de la bande à récupérer, d'une membrane de DEAE-Cellulose (NA 45, Schleicher & Schuell) et migration pendant 15 mn à 90 V.

L'élution de l'ADN adsorbé à la membrane est alors réalisée par ajout de 500 µl d'une solution fortement saline (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 20 mM pH 7,5; EDTA 1 mM) et incubation 20 mn à 68° C. L'éluat est ensuite précipité 15 mn à -70° C par ajout de 2,5 volumes d'éthanol absolu. Après centrifugation 10 mn à 12 000 g, puis séchage sous vide, l'ADN est repris par 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8) et dialysé sur micro-filtre (Millipore, porosité : 0,025 µm) contre du TE.

### **I - 2 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide.**

#### ***I - 2 - a - Séparation électrophorétique.***

La concentration des gels de séparation varie de 3,5 à 12 % (rapport acrylamide/bisacrylamide : 29/1) selon la taille des fragments d'ADN. La polymérisation des gels est assurée par un mélange TEMED 0,1 % et persulfate d'ammonium 2 %. L'électrophorèse est conduite en tampon TBE, une nuit sous une tension constante de 30 V, avec pour témoin de

migration une solution de BBØ contenant du xylène cyanol 0,005 %. Après électrophorèse, l'immersion du gel dans une solution de TBE additionnée de BrEt (0,9 µg/ml) suivie de l'examen sous rampe UV ou l'autoradiographie (dans le cas de fragments d'ADN marqués au  $^{32}\text{P}$ ) permet de visualiser les fragments d'ADN.

### ***I - 2 - b - Isolement et purification de fragments d'ADN contenus dans les gels de polyacrylamide.***

La portion de gel de polyacrylamide contenant le fragment d'intérêt est broyée finement et recouverte de tampon d'éluion (acétate d'ammonium 500 mM, acétate de magnésium 10 mM, EDTA 1 mM pH 8). Les fragments de taille réduite (inférieure à 500 pb) sont élués en 3 à 4 h sous agitation, les fragments plus grands en une nuit. Après centrifugation 10 mn à 12 000 g en tube de microfiltration (Costar, acétate de cellulose 0,22 µm), l'éluat est précipité 15 mn à - 70° C par addition de 2,5 volumes d'éthanol en présence d'un dixième de volume en acétate de sodium 3 M.

## **II - Marquage des sondes d'ADN à l' $\alpha$ $^{32}\text{P}$ .**

### **II - 1 - Marquage en 5' des fragments de restriction.**

50 µg de plasmide représentant un volume de 100 µl sont digérés par des enzymes de restriction dont l'une au moins génère une extrémité 5' sortante. Après digestion sont ajoutés, à l'ensemble de la solution d'ADN, 5 µl d'un mélange de dATP, dGTP, dTTP 5 mM, 4 µl d' $\alpha$   $^{32}\text{P}$  dCTP (3000 Ci/mmmole, Amersham), 2 unités d'ADN polymérase I fragment de Klenow et 12µl de tampon 10X de l'enzyme. La réaction de marquage s'effectue alors par incubation du mélange à 37 °C durant 20 mn. La réaction est arrêtée ensuite par dénaturation de l'enzyme en plaçant le mélange réactionnel 5 mn à 70 °C. Les fragments d'ADN sont alors purifiés par électrophorèse en gel d'agarose 2,5 % ou en gel de polyacrylamide 5 % puis visualisés par autoradiographie pour leur élution. Après précipitation de l'éluat par 2,5 volumes d'éthanol absolu 15 mn à - 70 °C, l'ADN est centrifugé à 12 000 g, 10 mn puis séché sous vide avant d'être repris par 100 µl d'eau déminéralisée. La concentration en ADN de la sonde ainsi obtenue est estimée par mesure de la densité optique à 260 nm et un aliquot est compté par effet Cerenkov de manière à déterminer son activité spécifique.

## **II - 2 - Marquage en 5' des oligonucléotides double brin.**

Les oligonucléotides simple brin complémentaires (Eurogentec) ont été appariés à la concentration de 0,1 mg/ml dans du tampon TE en amenant le mélange réactionnel à ébullition puis en le laissant refroidir doucement à température ambiante. Les oligonucléotides double brin obtenus présentant des extrémités 5' protubérantes constituées de désoxyguanines, la réaction de marquage a également été réalisée par le fragment Klenow de l'ADN polymérase I mais en présence uniquement d' $\alpha$   $^{32}\text{P}$  dCTP. Pour ce faire, un volume de 20  $\mu\text{l}$  au total comprenant 2  $\mu\text{l}$  d'oligonucléotide double brin (200 ng), 2  $\mu\text{l}$  d' $\alpha$   $^{32}\text{P}$  dCTP, 2  $\mu\text{l}$  de tampon Klenow 10X, 1 unité d'enzyme et 13  $\mu\text{l}$  d'eau déminéralisée, a été incubé 20 mn à 37 °C. De la même manière que pour le marquage des fragments de restriction, l'enzyme est inactivée en plaçant le mélange 5 mn à 70 °C. La purification des oligonucléotides marqués est réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 12 %. Après élution, précipitation, centrifugation et séchage, le culot d'ADN obtenu est repris par 50  $\mu\text{l}$  d'eau déminéralisée et comme précédemment, la concentration et l'activité spécifique de la sonde sont déterminées.

## **III - Culture cellulaire.**

### **III - 1 - Culture primaire et caractéristiques des cellules non transformées utilisées.**

Les cellules primaires de rein de rat Fischer 344 (haplotype RT-1<sup>l</sup>) nouveau-né (BRK) sont mises en culture après traitement à la trypsine - PSA (2,5  $\mu\text{g/ml}$  - KCl 5,4 mM; NaCl 137 mM; NaHCO<sub>3</sub> 4,2 mM; glucose 5,5 mM; rouge de phénol 5 mg/l; pH 7,5; pénicilline 75 000 U/ml; streptomycine 50 mg/ml; fungizone 5  $\mu\text{g/ml}$ ) sous agitation. Après complète dissociation, les cellules sont centrifugées 5 mn à 1 000 g, 20 °C, puis reprises dans 20 ml de milieu MEM (Milieu Essentiel Minimum) contenant 20 % de sérum de cheval pour être mises en culture dans des flacons (Falcon de 75 cm<sup>2</sup>). Les flacons sont incubés à 37 °C et le milieu de culture est remplacé au bout de 24 h par du milieu DF10 (Dulbecco (Flow) additionné de 10 % de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté).

La lignée cellulaire NRK-49F est une lignée continue établie à partir d'un mélange de cellules de rein de rat normaux (NRK: Normal Rat Kidney) mis en culture. Cette lignée est cultivée à 37°C dans du milieu DF10 et les cellules sont divisées deux fois par semaine.

### **III - 2 - Caractéristiques et origine des lignées de cellules transformées utilisées.**

Les lignées cellulaires utilisées ont été établies à partir de foyers isolés de cellules BRK transformées par la région E1 des adénovirus (tableau VI) (COUSIN *et al.*, 1991; LECLERE *et al.*, 1993). Les régions E1A hybrides ayant servi à l'établissement des lignées transformées recombinantes sont représentées figure R18.

La lignée cellulaire HEK-293 est une lignée établie de cellules HEK (Human Embryonary Kidney) transformées par les 11,5 % gauches du génome de l'Ad5 (nt 270-4123) (GRAHAM *et al.*, 1977).

Les lignées cellulaires transformées par les Ad et la lignée HEK-293 sont cultivées à 37 °C dans du milieu DF10 et sont divisées deux fois par semaine.

### **III - 3 - Transfection des cellules.**

La transfection s'effectue sur des cellules à 70-80 % de confluence. La méthode utilisée fait intervenir la Lipofectamine (Gibco-BRL), solution composée d'un mélange de sels de lipides polycationiques et de lipides neutres. La mise en présence d'ADN et de Lipofectamine entraîne la formation de liposomes dont la cavité interne contient les molécules d'ADN. La vésicule lipidique fusionne avec les membranes plasmiques permettant ainsi la pénétration de l'ADN à l'intérieur des cellules.

Les complexes ADN-liposomes sont préparés en diluant d'une part entre 5 et 10 µg d'ADN plasmidique dans 300 µl de milieu Dulbecco et d'autre part 14 µl de Lipofectamine dans 300 µl de ce même milieu, puis en mélangeant doucement ces deux solutions. Après 45 mn d'incubation à température ambiante, ce qui permet aux complexes ADN-liposomes de se former, cette suspension est additionnée de 2,4 ml de milieu puis versée directement sur les boîtes de culture de cellules (60 mm de Ø) préalablement rincées dans 3 ml de milieu sans sérum. Les

Lignée cellulaire	Sérotypage de la région E1A	Plasmides utilisés pour la transformation
<b>Sauvage:</b>		
[1221]	12	p12E1A (ADNc 13S) + p12E1B
[249]	2	p2E1A (ADNc 13S) + p12E1B
[41-1]	41	p41 E1
[41-2]	41	p41 E1
<b>Hybride:</b>		
(#)		
[p2S12]	Hybride 2/12	p2S12E1A + p12E1B
[p2C12]	Hybride 2/12	p2C12E1A + p12E1B
[p12C2]	Hybride 12/2	p12C2E1A + p12E1B
[p12S2]	Hybride 12/2	p12S2E1A + p12E1B
[p2C12S2]	Hybride 2/12/2	p2C12S2E1A + p12E1B

**Tableau VI:** Lignées de cellules BRK transformées par les adénovirus humains.

(#) Les régions E1A hybrides ont été construites à partir des ADNc 13S de la région E1A d'Ad2 et d'Ad12 et sont représentées à la figure R18.

boîtes sont alors incubées durant 5 à 12 heures dans une étuve à 37° C sous 5 % de CO<sub>2</sub> puis le milieu est renouvelé par du milieu DF 10 et les cellules sont à nouveau incubées pendant 22 à 36 heures avant d'être récoltées pour être lysées en vue des études enzymatiques.

### **III - 4 - Dosage de l'activité Chloramphénicol Acétyl Transférase.**

48 heures après transfection, les cellules sont décollées au Versène (EDTA 3 mM; NaCl 137 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 mM; KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM; pH 7,2), lavées dans 4 ml de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM) et centrifugées 10 mn à 800 g. Les culots sont repris par 100 µl de Tris-HCl 0,25 M, pH 7,7 et les cellules sont alors lysées par traitement aux ultra-sons pendant 20 secondes. Les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation 10 mn à 12 000 g.

Un volume compris entre 0 et 30 µl de surnageant de lysat cellulaire (après correction en fonction de la concentration en protéines totales, déterminée par dosage spectrophotométrique à 280 nm) est incubé 1 h 30 à 37° C en présence de 20 µl d'acétyl coenzyme A 4 mM, 1 µl de <sup>14</sup>C-dichloroacétyl 1,2 chloramphénicol à 1mCi/ml (ICN), 35 µl d'eau distillée, le volume final d'incubation étant porté à 156 µl avec du Tris-HCl 0,25 M, pH 7,7. La réaction est arrêtée par addition de 800 µl d'acétate d'éthyle froid et le mélange homogénéisé est centrifugé 10 mn à 12 000 g. La phase organique est alors prélevée puis séchée sous vide. Le culot sec est remis en suspension dans 15 µl d'acétate d'éthyle puis déposé sur couche mince de gel de silice (20x20 cm, Polygram). La concentration du dépôt est assurée par une pré-migration dans l'acétone et la séparation des formes acétylées du substrat initial est réalisée par une migration de 45 mn dans un solvant chloroforme/méthanol (95/5).

Les couches minces sont alors mises en autoradiographie pendant 3 jours, puis la plaque est découpée de manière à déterminer le pourcentage d'acétylation par comptage en scintillation liquide des différentes formes acétylées ou non du substrat.

## **IV- Transformation bactérienne.**

### **IV - 1- Souches bactériennes.**

Les cultures sont réalisées à 37°C. La croissance bactérienne est suivie en estimant la turbidité de la culture à la longueur d'onde de 580 nm.

Les génotypes des souches d'*Escherichia coli* utilisées sont :

HB 101: *hsdS20* (rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>), *supE44*, *ara14*, *galK2*, *lacY1*, *proA2*, *rspL20*, *xyl-5*, *mtl-1*, *recA13*, *mcrB*, *mcrA*, *mrr*.

Dans la plupart des cas, l'amplification des plasmides est réalisée sur cette souche.

JM 110 : *rspL*, *thr*, *leu*, *thi-1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *supE44*,  $\Delta(lac-proAB)$ , [F' *traD36*, *proAB*, *lacIq* Z $\Delta$ M15].

Les digestions de plasmides faisant intervenir des enzymes de restriction sensibles à la méthylation nécessitent une amplification plasmidique en souches bactériennes dam<sup>-</sup>. Dans ce cas, c'est cette souche qui est utilisée. En outre, son utilisation comme celle de la suivante, permet une ségrégation des clones recombinants par leur couleur.

JM 109 : *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, (rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>), *supE44*, *relA1*,  $\Delta(lac-proAB)$ , [F' *traD36*, *proAB*, *lacIq* Z $\Delta$ M15].

Utilisée pour la production d'ADN simple brin à partir de phagemide, cette souche offre de surcroît la possibilité d'une sélection des plasmides recombinants positifs reposant sur la couleur des colonies (blanches ou bleues). Elle implique par conséquent l'utilisation de vecteurs contenant une portion du gène *lacZ* (segment d' $\alpha$ -complémentation) interrompue par un site de clonage multiple. Ainsi après transformation, les colonies bleues renferment les plasmides non recombinants, agents indispensables à la production d'une  $\beta$ -galactosidase fonctionnelle, tandis les colonies blanches renferment quant à elles les plasmides avec insert.

BMH 71-18 mut S : *thi*, *supE*,  $\Delta(lac-proAB)$ , [*mut S* :: *Tn10*] [F', *proAB*, *lac Iq* Z $\Delta$ M15].

Cette souche *minus repair* est indispensable à la transformation des phagemides obtenus après mutagenèse dirigée par oligonucléotide. Son utilisation empêche en effet la réparation du brin néoformé non encore méthylé.

#### IV - 2 - Milieux de culture et milieux de conservation.

Toutes les souches bactériennes sont cultivées en milieu LB (Bacto-tryptone 10 g/l; extrait sec de levure Difco 5 g/l; NaCl 86 mM; pH 7,5).

Les cultures bactériennes obtenues à l'issue de la transformation sont étalées sur boîtes de Pétri contenant du LB gélosé (milieu LB avec 15 g d'agar/l) additionné du ou des antibiotiques

de sélection et éventuellement d'IPTG 0,4 mM et de Blu-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, 80  $\mu$ g/ml, BRL).

La conservation des bactéries HB101 s'effectue à -20°C dans un milieu riche 2XTY+MC (Bacto-tryptone 18 g/l; extrait sec de levure 10 g/l; NaCl 86 mM; extrait sec de viande 8 g/l) contenant 30 à 40% de glycérol.

Les souches de bactéries JM109, JM110 et BMH 71-18 mut S sont conservées quant à elles en milieu M9 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O 34 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22 mM; NaCl 9 mM; NH<sub>4</sub>Cl 20 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM; MgSO<sub>4</sub> 2 mM; glucose 0,2%; vitamine B<sub>1</sub> 9  $\mu$ M; pH 7,5) de manière à conserver l'épisode F'.

### **IV - 3 - Clonage moléculaire.**

#### ***IV - 3 - a - Vecteurs de clonage.***

Les mutants de délétion du promoteur H-2K<sup>b</sup> ont été clonés dans un dérivé du plasmide pKH47 (pBR 322 modifié) (HAYASHI, 1980). Ce dérivé correspond au pBR 322 tronqué de la région comprise entre les sites *SalI* (nt 651) et *NdeI* (nt 2297) (LEITE, 1988), et auquel a été ajouté un site multiple de clonage (*EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*) entre les sites *EcoRI* (nt 4361) et *HindIII* (nt 29) pour fournir le pKH47 SP.

Le plasmide pBLCAT2 (LUCKOW and SCHUTZ, 1987) a été utilisé pour les expériences de transfection avec des fragments de la région régulatrice de la transcription du gène H-2K<sup>b</sup> ne contenant pas les séquences promotrices basales. Ce vecteur contient le gène *cat* (codant la chloramphénicol acétyl transférase) sous le contrôle du promoteur basal du gène de la thymidine kinase (*tk*) du virus de l'herpès (HSV).

La plupart des sous-clonages nécessaires à la construction des plasmides utilisés dans les expériences de transfection ou à l'obtention des sondes radiomarquées ont été réalisés dans le vecteur pBluescript II SK+ (Stratagene). Ce vecteur est un phagemide contenant un site multiple de clonage interrompant la portion du gène *lacZ* fournissant l' $\alpha$ -complémentation. Il permet donc une sélection aisée des clones recombinants par leur couleur.

Pour la mutagenèse dirigée, c'est le phagemide pSelect (Promega) qui a été utilisé. Ce vecteur contient un site multiple de clonage situé également dans le fragment de gène codant le peptide  $\alpha$  de *lacZ*. Il contient deux gènes de résistance aux antibiotiques : le premier conférant la résistance à la tétracycline est toujours fonctionnel, tandis que le second, pour la résistance à

l'ampicilline, est inactivé par mutation ponctuelle dans le site *Pst*I (LEWIS and THOMPSON, 1990). Au cours de la réaction de mutagenèse, cette résistance est restaurée ce qui permet une sélection rapide des clones mutés. En plus d'une origine de répllication plasmidique (*ori*), ce vecteur possède également une origine de répllication phagique (*f1*) ce qui permet l'obtention d'ADN simple brin après surinfection des bactéries renfermant les phagemides par des phages *helper* non lytiques.

#### ***IV - 3 - b - Digestions enzymatiques des plasmides et clonage des fragments d'ADN.***

Les plasmides sont digérés par des endonucléases de restriction à raison d'une unité enzymatique par  $\mu\text{g}$  d'ADN. L'incubation est généralement réalisée à 37 °C pendant 1 h en présence du tampon salin approprié. Pour les digestions partielles, la quantité d'enzyme et le temps d'incubation sont diminués. Quand l'obtention d'extrémités franches à partir de fragments présentant des extrémités 5' protubérantes s'avère nécessaire au clonage, une incubation des fragments générés après digestion est réalisée 20 mn à 37 °C en présence de désoxyribonucléotides 0,2 mM, du fragment Klenow de l'ADN polymérase I d'*E.coli* et du tampon approprié à l'enzyme. La réaction est ensuite arrêtée en amenant la solution à 70 °C pendant 5 mn.

Après séparation par électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide, les fragments d'ADN intéressants sont élués du gel et la réaction de ligation est effectuée par addition à la solution d'ADN d'une à trois unités d'ADN ligase du phage T4, pendant 4 h à 16 °C.

#### **IV - 4 - Mutagenèse dirigée par oligonucléotide.**

Approche supplémentaire pour démontrer l'implication de certaines séquences d'ADN dans le contrôle de l'expression d'un gène, la mutagenèse dirigée par oligonucléotide a été réalisée en utilisant un système commercialisé par Promega (Altered Site™ Mutagenesis System).

Ce système repose sur l'hybridation, à une matrice d'ADN circulaire simple brin, d'un oligonucléotide synthétique complémentaire de cette matrice, excepté pour la région contenant la, ou les bases à muter. En présence d'ADN polymérase et des quatre précurseurs nucléotidiques de l'ADN, l'élongation de ces courts segments imparfaitement hybridés est rendue possible.

Après ligation des extrémités du brin néoformé par l'ADN ligase, cette structure double brin est introduite en souche d'*E. coli* exempte d'activité réparatrice, de manière à amplifier cette construction. Un second tour de transformation en souche JM 109 permet ensuite une ségrégation des molécules mutantes et sauvages.

#### ***IV - 4 - a - Préparation de la matrice d'ADN simple brin.***

Une culture de bactéries JM 109 contenant le phagemide est inoculée dans 30 ml de milieu LB contenant de la tétracycline à raison de 15 µg/ml et mise en agitation une nuit à 37° C. Cinq ml de cette culture sont alors dilués dans 200 ml de milieu LB additionné de tétracycline et agités jusqu'à obtention d'une DO<sub>580</sub> de 0,3. La culture obtenue est ensuite infectée par des phages *helper* R408 (phage M13 mutant) à raison de 10 pfu par bactérie puis mise en agitation vigoureuse durant 20 heures. Après centrifugation 15 mn à 12 000 g, le surnageant de culture est récolté puis clarifié par une seconde centrifugation réalisée dans des conditions identiques. Les phages sont alors précipités par addition de 50 ml de PEG (PM : 6 000) à 20 % dans l'acétate d'ammonium 3,75 M pH 7,5 et incubation 30 mn dans la glace. Une centrifugation 15 mn à 12 000 g permet ensuite de reprendre le culot de phages dans 400 µl de TE puis de les lyser par ajout de 400 µl d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Après centrifugation 5 mn à 12 000 g, la phase aqueuse supérieure contenant l'ADN du phage *helper* et l'ADN de phagemide est transférée dans un tube Eppendorf et une extraction au phénol est réalisée de manière à éliminer les protéines. L'ADN est alors précipité par 2 volumes d'éthanol additionné de 0,5 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M, 30 mn à - 20° C. Après centrifugation 5 mn à 12 000 g, le culot d'ADN est rincé par de l'éthanol à 70 %, puis séché sous vide avant d'être repris par 20 µl d'eau déminéralisée. La quantité d'ADN obtenu est estimée par électrophorèse en gel d'agarose 1 % de 2 µl de solution.

#### ***IV - 4 - b - Réaction de mutagenèse.***

A environ 0,05 picomole (100 ng) d'ADN simple brin sont ajoutés 0,25 picomole (2,2 ng) d'oligonucléotide restaurant la résistance à l'ampicilline et 1,25 picomoles (7,6 ng pour un 18 mer) d'oligonucléotide de mutagenèse en présence de tampon d'hybridation (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM). L'hybridation est réalisée par incubation du mélange 5 mn à 70° C suivie d'un refroidissement lent jusqu'à température ambiante. La synthèse du brin mutant

et la ligation de ses extrémités sont alors effectuées grâce à l'ajout au mélange d'ADN polymérase et d'ADN ligase du phage T4 dans du tampon de synthèse (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; ATP 1 mM; DTT 2 mM; dNTP 0,5 mM) et incubation à 37° C durant 90 mn. L'hétéroduplex d'ADN obtenu est ensuite introduit dans la souche BMH 71-18 mut S et le phagemide des colonies résistantes à l'ampicilline est extrait puis réintroduit dans la souche JM 109.

#### **IV - 5 - Transformation bactérienne.**

Cette opération consiste à faire pénétrer un ADN plasmidique dans une cellule bactérienne en vue de permettre sa réplication et donc son amplification.

La méthode utilisée pour rendre les bactéries "compétentes" à la transformation a été décrite par COHEN *et al.* (1973). Les bactéries sont cultivées à 37° C sous agitation dans du milieu LB jusqu'à obtention d'une DO<sub>580</sub> comprise entre 0,5 et 0,7. Les bactéries sont alors centrifugées à 7 000 g 10 mn à 4° C. Le culot est lavé par 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M froid, puis resuspendu dans 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M et laissé 20 mn dans la glace. Les bactéries sont enfin centrifugées une dernière fois puis reprises dans 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M. Ces bactéries, "compétentes" à l'issue de ce traitement, peuvent être conservées à 4° C jusqu'à 24 heures avant la transformation.

Pour réaliser celle-ci, 100 µl de bactéries sont mis en contact avec 25 µl d'une solution d'ADN transformant (généralement de l'ordre de 10 ng à 1 µg de plasmide). Après 20 mn dans la glace, cinq chocs thermiques sont effectués en plaçant alternativement les bactéries pendant 30 secondes au bain-marie à 37° C puis durant le même temps dans la glace. La suspension est ensuite laissée 20 mn dans la glace, puis 1,5 ml de milieu 2XTY (Extrait sec de levure Difco 10 g/l; tryptone Difco 16 g/l; NaCl 86 mM) sont ajoutés et l'ensemble est mis à incuber sous agitation à 37° C pour 45 mn. 0,2 et 0,8 ml de cette culture sont alors étalés sur des boîtes de Pétri contenant du LB gélosé et l'antibiotique comme agent de sélection (ampicilline 50 µg/ml ou tétracycline 15 µg/ml). Après 18 heures d'incubation à 37° C, les clones résistants sont isolés. Les boîtes de LB-ampicilline peuvent être complétées avec de l'IPTG 0,4 mM et du Bluo-Gal (80 µg/ml, BRL) dans le cas où le vecteur plasmidique et la souche bactérienne utilisés permettent une sélection des clones par leur couleur.

#### **IV - 6 - Sélection des clones recombinants.**

Les méthodes utilisées ont pour but d'obtenir rapidement, à partir des clones isolés après transformation, un ADN plasmidique suffisamment pur pour être analysé à l'aide d'enzymes de restriction ou par séquençage.

##### ***IV - 6 - a - Méthode de dénaturation par la chaleur.***

Dix ml d'une culture en milieu sélectif (LB + antibiotique) inoculée la veille avec un des clones isolés sont centrifugés à 7 000 g pendant 10 mn à 4° C. Le culot de bactéries repris par 350 µl d'une solution STET (saccharose 8 %; Triton X100 à 5 %; EDTA 50 mM; Tris-HCl 50 mM; pH8) et traité par 40 µl d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml est porté 2 mn à ébullition. Une centrifugation 5 mn à 12 000 g permet d'enlever le culot de protéines et d'ADN bactérien dénaturé, et les acides nucléiques en solution dans le surnageant sont alors précipités par un volume d'isopropanol 15 mn à - 70° C. Le précipité est ensuite centrifugé puis séché sous vide avant d'être repris dans 50 µl d'eau additionnée de RNase A à 50 µg/ml et incubé 10 mn à 37° C. L'ADN est alors dialysé et analysé à l'aide d'endonucléases de restriction par électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide.

##### ***IV - 6 - b - "Mini - préparation".***

Initialement décrite par SERGHINI *et al.* (1989), cette méthode consiste à reprendre un culot de bactéries, représentant environ 10 ml d'une culture, par 200 µl d'une solution TNE (Tris-HCl 10 mM pH 8; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM) puis à réaliser la purification de l'ADN plasmidique par addition d'un volume d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). Après centrifugation 10 mn à 12 000 g, la phase aqueuse est précipitée 15 mn à - 70° C par addition de 2,5 volumes d'éthanol absolu froid en présence d'acétate d'ammonium 2 M final. Après centrifugation 10 mn à 12 000 g, le culot est lavé par 1 volume d'éthanol à 70 % puis séché sous vide avant d'être repris pour analyse par 50 µl d'eau additionnée de RNase A.

##### ***IV - 6 - c - Séquençage de l'ADN plasmidique.***

La séquence de certains mutants de délétion obtenus par clonage et des mutants réalisés par mutagenèse dirigée a été vérifiée en utilisant la technique de séquençage reposant sur la

méthode de terminaison de chaîne (SANGER *et al.*, 1977). Le kit sequenase version 2.0 (USB : United States Biochemical) fournit un protocole aisé et rapide pour cette analyse. La première étape consiste en une dénaturation de l'ADN double brin. Environ 5 µg (0,5 pmole) de plasmide à séquencer qsp 20 µl d'H<sub>2</sub>O déminéralisée auxquels sont ajoutés 2 µl d'une solution NaOH 2M, EDTA 2 mM, sont incubés 30 mn à 37° C. Le mélange est ensuite neutralisé par addition de 0,1 volume en acétate de sodium 3M (pH 5) et précipité par 2,5 volumes d'éthanol absolu, 15 mn à -80° C. Après centrifugation 10 mn à 12 000 g puis lavage par 3 volumes d'éthanol à 70 %, l'ADN est séché sous vide et repris par 7 µl d'H<sub>2</sub>O déminéralisée. L'hybridation est alors réalisée par addition de 2 µl de tampon de séquence et d'1 µl d'amorce appropriée, correspondant à 1 pmole, suivie d'une incubation 2 mn à 65° C et d'un refroidissement très lent jusqu'à température ambiante. Pendant que la réaction d'hybridation refroidit, 2,5 µl de mélange (dNTP totaux + ddNTP spécifique) pour chacune des quatre terminaisons G, A, T, C, sont placés dans les puits d'une microplaque et mis en incubation à 37° C. Parallèlement, la sequenase (variant génétique de l'ADN polymérase du bactériophage T7 exempte d'activité 3'-5' exonucléasique) est diluée au 1/8 dans le tampon de dilution de l'enzyme. La réaction de marquage est effectuée en mélangeant les 10 µl de mélange d'hybridation ("matrice simple brin - amorce") avec 1 µl de DTT 0,1 M, 2 µl de tampon de marquage dilué au 1/5 (7,5 µM dCTP; 7,5 µM dGTP; 7,5 µM dTTP), 0,5 µl d'ATP [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] (1 000 Ci/mmole) et 2 µl de sequenase diluée. Après une incubation de 5 mn à 37° C, 3,5 µl de réaction de marquage sont transférés dans chacun des puits de terminaison G, A, T et C. L'incubation est prolongée 7 mn à 37° C puis la réaction est stoppée par addition de 4 µl de solution d'arrêt dans chaque puits (20 mM EDTA; 0,05 % bleu de bromophénol (P/V); 0,05 % xylène cyanol (P/V); 95 % formamide désionisée (V/V)). Les échantillons sont dénaturés 2 mn à 85° C puis placés dans la glace avant d'être déposés sur un gel de séquence dénaturant à 6 % (rapport acrylamide/bisacrylamide 19/1) préalablement équilibré en tampon TBE (Tris 100 mM; acide orthoborique 100 mM; EDTA 2 mM) pendant 30 mn. L'électrophorèse est conduite à 2 000 V pendant 90 mn à 2 h 30 selon la région à visualiser. Le gel est ensuite séché sous vide et mis en autoradiographie pendant une nuit.

#### **IV- 7 - Purification de plasmides en gradient de chlorure de césium.**

Quand l'obtention d'un ADN plasmidique de haut degré de pureté s'avère nécessaire (cas des expériences de transfection, de la préparation des sondes) c'est généralement cette méthode qui est retenue.

Une préculture des bactéries contenant le plasmide à amplifier est réalisée en diluant 1 ml de culture bactérienne dans 30 ml de milieu LB additionnés d'ampicilline à raison de 50 µg/ml, puis en incubant l'ensemble 3 heures à 37° C sous agitation. Dix ml de cette suspension sont alors ajoutés à 200 ml de milieu LB contenant l'antibiotique, puis incubés dans les mêmes conditions jusqu'à obtention d'une DO<sub>580</sub> de 1. Un ml d'une solution de chloramphénicol à 4mg/ml est alors ajouté et la culture est laissée 18 h sous agitation.

La suspension est ensuite centrifugée 10 mn à 6 000 g, 4° C. Le culot resuspendu dans 2,5 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8, saccharose 25 % est placé dans la glace et 1 ml de lysozyme à 10 mg/ml dilué en tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 y est ajouté. Après 5 mn d'incubation dans la glace, le mélange est traité par 1 ml d'EDTA 0,2 M pH 8, puis la lyse des bactéries est achevée par addition de 5 ml d'une solution Tris-HCl 50 mM pH8, EDTA 20 mM, Triton X100 0,1 %. Les débris cellulaires sont sédimentés par une centrifugation à 150 000 g pendant 45 mn à 4° C. Neuf grammes de chlorure de césium sont alors dissous dans 9 ml de surnageant préalablement traités par 25 µg de RNase A. Le mélange obtenu est additionné de 90 µl de bromure d'éthidium (5 mg/ml) puis soumis à une centrifugation à 300 000 g pendant 20 h et à 16° C. La bande contenant l'ADN plasmidique, exempte d'ARN et visualisable grâce au BrEt est alors ponctionnée. Deux à trois extractions à l'isopropanol ajouté V/V permettent ensuite l'élimination du BrEt puis les plasmides sont dialysés contre du tampon TE pendant quelques heures. La mesure de la densité optique à 260 nm permet alors d'évaluer la concentration en ADN.

#### **V - Interactions ADN - protéines**

##### **V - 1 - Préparation d'extrait de protéines nucléaires.**

Les extraits de protéines nucléaires ont été préparés soit à partir de cultures de cellules primaires (BRK) soit à partir de cultures de lignées (cellules BRK transformées par l'Ad2 ou l'Ad12).

Toutes les solutions utilisées au cours de cette préparation sont conservées à 4° C et contiennent les inhibiteurs de protéases suivants : PMSF 0,5 mM, EGTA 0,1 mM, butyrate de sodium 10 mM,  $\beta$ -glycérophosphate 10 mM, benzamidine 0,5 mM, bestatine (1 $\mu$ g/ml), leupeptine (1mg/ml), pepstatine A (1 mg/ml), aprotinine (1 $\mu$ g/ml).

Les cellules (environ 10<sup>10</sup>) sont récupérées dans du PBS et centrifugées à 1 500 g pendant 15 mn à 4° C. Le culot de cellules est lavé par 200 ml de TMS (saccharose 0,25 M; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,9) et centrifugé dans les mêmes conditions. La même procédure est répétée avec 200 ml de TMS / 0,25 % Triton X-100. Les noyaux sont ensuite rincés deux fois avec 200 ml de TMS puis une fois avec 100 ml de TMS.

Un aliquot de 100  $\mu$ l est alors prélevé avant centrifugation et complété par 900  $\mu$ l d'eau, puis 9 ml de NaOH 1M sont ajoutés. Après passage aux ultra-sons de ces 10 ml, la détermination de la concentration en acides nucléiques est rendue possible par dosage spectrophotométrique à 260 nm.

Cette mesure indirecte permet une évaluation de la quantité de noyaux présents dans la préparation.

Suite à ce troisième lavage au TMS, les noyaux sont remis en suspension dans du TMS à une concentration en acides nucléiques de 5 à 10 mg/ml. De manière à extraire des noyaux les protéines non-histones, 1/10 du volume en NaCl 4M est ajouté goutte à goutte sous agitation magnétique et dans la glace. Après 10 mn, le surnageant est clarifié par centrifugation à 20 000 g pendant 15 mn, puis à 100 000 g pendant 1 h à 4° C. La précipitation des protéines est alors réalisée par ajout de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à raison de 0,35 g/ml sous agitation dans la glace pendant 20 mn. Celles-ci sont ensuite centrifugées à 20 000g pendant 20 mn à 4°C.

Le culot de protéines est resuspendu ensuite dans 5 ml de tampon E50 ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM; Hépès 20 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; EDTA 0,1 mM; dithiothréitol 1 mM; glycérol 20 % (V/V); Brij 35 0,1 %; pH 7,9), et dialysé une nuit à 4° C contre du tampon SB (*storage buffer* : NaCl 50 mM; Hépès 20 mM pH 7,9; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; EDTA 0,1 mM; glycérol 20 % (V/V); dithiothréitol 1 mM).

Les protéines nucléaires sont clarifiées une dernière fois par centrifugation à 100 000 g pendant 1 h à 4° C. Le surnageant est aliquoté et stocké à - 80° C. La concentration en protéines

des extraits est déterminée par un dosage colorimétrique reposant sur la méthode de BRADFORD (1976), grâce à un "kit" commercialisé par Biorad.

## **V - 2 - Retard en gel.**

Cette technique fournit un excellent outil pour la détection de facteurs se liant à des séquences spécifiques. Or ces facteurs sont généralement impliqués dans des activités cellulaires importantes telles que la réplication, la transcription ou la recombinaison. Pour cette raison, elle s'avère d'une grande utilité dans l'étude des promoteurs, et en particulier, pour la recherche des protéines s'y liant.

La méthode repose sur le fait que des complexes de protéines et d'ADN radiomarqué peuvent être détectés par une mobilité en gels de polyacrylamide non dénaturants différente de celle de l'ADN seul. Ainsi, plus "lourde" est la protéine, plus grand est le retard de migration au niveau du gel.

La technique utilisée est une version modifiée de celle initialement décrite par GARNER et REVZIN (1981).

Le volume total de réaction est de 20  $\mu$ l avec 10 000 cpm de sonde double brin radiomarquée auxquels sont ajoutés : 2 à 4  $\mu$ g de poly (dI-dC), poly (dI-dC), 300  $\mu$ g/ml final de sérum albumine bovine, 1  $\mu$ l de glycérol, 10 à 15  $\mu$ g d'extrait protéique et éventuellement des quantités variables de compétiteur froid (quantités allant de 1 à 50 fois la quantité de sonde utilisée). Dans ce dernier cas, le compétiteur est ajouté au mélange avant la sonde. L'ajustement de volume à 20  $\mu$ l est réalisé par l'addition de tampon SB précédemment utilisé dans la préparation des extraits nucléaires. Le mélange de réaction est incubé 20 mn à 30° C. Les complexes ADN-protéines sont alors séparés de la sonde libre par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 4 % (rapport acrylamide/bisacrylamide : 80/1) polymérisé à basse force ionique en tampon Tris-HCl 6,75 mM pH 7,9, EDTA 1 mM pH 7,9, AcONa 3,3 mM, glycérol 2,5 % (V/V).

Le gel est préalablement équilibré pendant 90 mn à 100 V puis les échantillons sont déposés et la migration est conduite pendant 2 à 3 h à 250 V, sous courant constant de 35 mA, dans un tampon TAE (Tris-HCl 6,7 mM pH 7,5; AcONa 3,3 mM; EDTA 1 mM). Le gel est ensuite séché sous vide et autoradiographié durant 16 h à - 80° C.

### **V - 3 - "Southwestern blotting".**

Cette technique est une variante de la technique traditionnelle du *Western blotting*. Elle permet la détection de protéines ayant la capacité de se lier à certaines séquences désoxyribonucléiques, et par conséquent l'estimation de leur masse moléculaire. Elle repose sur le fait qu'après séparation en gel de polyacrylamide-SDS, suivie d'un transfert sur membrane de nitrocellulose, un grand nombre de protéines conservent leur capacité de liaison à l'ADN.

#### ***V - 3 - a - Electrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide - SDS.***

Environ 60 µg d'extrait nucléaire sont mélangés V/V à une solution de dénaturation (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 2 %; β-mercaptoéthanol 25 mM; glycérol 20 %; BBØ 0,001 %) puis chauffés 2 mn à 100° C. Les protéines dénaturées sont alors déposées sur un gel de concentration à 5 % d'acrylamide (rapport acrylamide/bisacrylamide: 50/1,33) dans du Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 contenant 0,1 % de SDS. Après tassement, les échantillons pénètrent dans le gel de séparation à 15 % de polyacrylamide (rapport acrylamide/bisacrylamide: 50/0,235) dans du Tris-HCl 375 mM; pH 8,9; SDS 0,1 %. L'électrophorèse est réalisée en tampon Tris 0,025 M pH 8,9; glycolcolle 0,192 M; SDS 1 % durant 15 h sous une tension de 60 V.

#### ***V - 3 - b - Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose.***

Après électrophorèse, les protéines contenues dans le gel sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Protran BA 85, porosité 0,45 µm, Schleicher & Schuell). Ce transfert est réalisé en système semi-sec commercialisé par Millipore (MilliBlot-Graphite Electroblotter System) sous courant constant de 250 mA pendant 1 h 30 à 4° C.

#### ***V - 3 - c - Incubation sonde - protéine(s).***

La technique utilisée est une version modifiée de celle décrite par LI et DESIDERIO (1993).

Avant incubation avec la sonde radiomarquée, la membrane de nitrocellulose où les protéines sont immobilisées est lavée deux fois 5 mn dans 50 ml de tampon TNE-50 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 ; NaCl 50 mM ; EDTA 1 mM; DTT 1 mM) puis saturée 1 h à 45°C dans 100 ml de BLOTTO (lait écrémé 5%; Tris-HCl 50 mM, pH7,5; NaCl 50 mM; EDTA 1 mM; DTT 1

mM). Après cette étape, la membrane est lavée deux fois dans 50 ml de TNE-50 puis mise au contact de la sonde double brin marquée à l' $\alpha$   $^{32}\text{P}$  dCTP dans le même tampon à raison de 1 à  $2.10^6$  cpm/ml en présence de 10  $\mu\text{g/ml}$  d'ADN de sperme de hareng soniqué. L'incubation se déroule à température ambiante durant 1 h et est suivie de trois, voire quatre lavages 5 à 10 mn dans du TNE-50. La membrane est ensuite séchée dans une étuve à 45° C avant d'être mise en autoradiographie à -70° C durant une nuit.

## **VI - "Northern blotting".**

### **VI - 1 - Extraction des ARN totaux.**

La préparation des ARN totaux a été réalisée par la technique au RNazol B. Mise au point dans les laboratoires CINNA/BIOTECX, cette méthode permet l'extraction et la purification des ARN en une seule étape (CHOMCZYNSKI and SACCHI, 1987). Les cellules cultivées en boîtes de Pétri sont rincées avec du PBS. Le RNazol B (Bioprobe Systems) est ajouté directement dans la boîte à raison de 0,2 ml pour  $10^6$  cellules et les ARN sont alors solubilisés par plusieurs passages du lysat dans une pipette Pasteur. Après transfert en tube Eppendorf, du chloroforme est ajouté à raison de 0,2 ml pour 2 ml d'homogénat et l'ensemble est agité vigoureusement pendant 15 secondes puis laissé dans la glace 5 mn. Une centrifugation à 12 000 g, 4 °C, pendant 15 mn permet de séparer l'homogénat en deux phases : une phase inférieure organique de couleur bleue et une phase supérieure aqueuse incolore. Les ARN se trouvent dans cette dernière, tandis que l'ADN et les protéines sont dans la phase organique et à l'interface. La phase aqueuse est alors transférée dans un tube préalablement traité au DEPC (Diéthyl pyrocarbonate) et les ARN sont précipités par addition d'un volume égal d'isopropanol. Après 30 mn à - 70 °C, les ARN sont centrifugés 15 mn à 12 000 g, 4 °C, puis rincés avec de l'éthanol à 75 %. Après un bref séchage sous vide, le culot d'ARN est repris par 500  $\mu\text{l}$  d'eau déminéralisée exempte également d'activité ribonucléasique. Un aliquot est alors prélevé de manière à estimer la concentration en ARN et le degré de pureté de la préparation par mesure de la densité optique à 260 et 280 nm. Un rapport  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$  compris entre 1,8 et 2 atteste d'une préparation d'ARN exempte de contaminants protéiques. Aliquotés par 30  $\mu\text{g}$ , les ARN sont précipités par 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'éthanol absolu puis conservés à - 70 °C.

## VI - 2 - Electrophorèse en gel d'agarose et transfert sur membrane.

Après centrifugation à 12 000 g, 4 °C durant 45 mn, les culots d'ARN sont repris par 20 µl d'un tampon de dénaturation (formamide désionisée 50 %; formaldéhyde désionisée 17,8 %; MOPS 0,02 M; acétate de sodium 5 mM; EDTA 1 mM; DEPC 0,03 %; pH 7) puis chauffés 5 mn à 68 °C. Pour le dépôt sur gel, 6 µl d'une solution de BBØ (glycérol 50 %; EDTA 4 mM; bleu de bromophénol 0,1 %; Ficoll 400 (Pharmacia) 0,2 g/l; DEPC 0,1 %) sont ajoutés à chacun des tubes. L'électrophorèse est effectuée sur gel d'agarose dénaturant (agarose 12 g/l; MOPS 0,02 M; acétate de sodium 5 mM; EDTA 1 mM; formaldéhyde désionisée 17 %; DEPC 0,1 %) et la migration est réalisée en tampon MOPS 1X (MOPS 0,02 M; acétate de sodium 5 mM; EDTA 1 mM; DEPC 0,1 %) durant une nuit avec agitation et sous une tension de 25 V. Après électrophorèse le gel est lavé 1 h dans du tampon SSC 10X (NaCl 1,5 M; citrate trisodique 150 mM; pH 7,2) puis découpé de manière à séparer le couloir témoin contenant les ARN ribosomaux des ARN à hybrider avec la sonde radiomarquée. Le couloir témoin est incubé dans du tampon SSC 10X additionné de BrEt (5 µg/ml) de manière à visualiser les ARNr, tandis que les ARN contenus dans le gel sont transférés sur membrane de nitrocellulose (Hybond-C extra, porosité 0,45 µm, Amersham). Le transfert est effectué par un flux de SSC 20X provoqué par capillarité. Après séchage 2 h à 80 °C, la membrane de nitrocellulose est ensuite incubée 2 h à 42 °C sous agitation dans une solution de préhybridation SSPE pH 7,4 (NaCl 750 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O 50 mM; EDTA 5 mM; formamide 50 %; Ficoll 400 0,1 g/l; polyvinylpyrrolidone 0,1 g/l; sérum albumine bovine 0,1 g/l; ADN de sperme de saumon dénaturé 20 mg/l; SDS 0,1 %) avant addition de la sonde.

## VI - 3 - Synthèse de la sonde et hybridation avec la membrane.

La synthèse de la sonde d'ADN radiomarquée est réalisée par la technique de polyamorçage au hasard en utilisant un système commercialisé par Amersham (*rediprime* DNA labelling system). Environ 25 ng d'ADN représentant un volume de 45 µl sont dénaturés 5mn à 100 °C puis refroidis brusquement dans la glace. L'ADN dénaturé est alors transféré dans un tube prêt à l'emploi contenant le mélange de marquage (dATP, dGTP, dTTP, fragment Klenow de l'ADN polymérase I et nonamers aléatoires servant d'amorces) et l'ensemble est homogénéisé doucement avant ajout de 5 µl d' $\alpha$  <sup>32</sup>P dCTP. La solution est mise à incuber à 37 °C pour 15 mn

puis la réaction de polymérisation est arrêtée par addition de 5  $\mu\text{l}$  d'EDTA 0,2 M. De manière à réduire le bruit de fond, dû aux nucléotides libres, durant l'hybridation, une purification de la sonde ainsi obtenue est effectuée par chromatographie sur colonne Sephadex G-50 (Quick Spin™ Columns, Boehringer Mannheim). La radioactivité spécifique de la sonde est ensuite déterminée par comptage d'un aliquot en scintillation liquide dans des fioles contenant 4 ml d'Aqualyte (J.T. Baker, Hollande).

Avant addition au tampon de préhybridation dans lequel baigne la membrane, la sonde est dénaturée par traitement à la soude. Environ 10 millions de cpm de sonde sont ajoutés à la solution et l'hybridation est réalisée une nuit à 42 °C sous agitation. Deux à trois lavages de la membrane sont ensuite effectués par des bains dans du SSC 2X, SDS 0,1 % puis le "blot" est mis à sécher à 42 °C avant d'être soumis à autoradiographie pour 24 h à -70 °C.

## **VII - Techniques immunologiques.**

### **VII - 1 - Dosage des antigènes cellulaires de surface.**

L'analyse par FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*) a été utilisée pour la détermination de la densité des antigènes de classe I du CMH à la surface des cellules provenant des différentes lignées transformées utilisées dans cette étude.

Les cellules d'un flacon de 75  $\text{cm}^2$  (environ  $10^7$  cellules) sont décollées au Versène et centrifugées 10 mn à 500 g. Après deux lavages en tampon PBS, le culot est repris par 300  $\mu\text{l}$  du même tampon et réparti en 3 tubes.

Au premier des tubes sont ajoutés 2  $\mu\text{l}$  d'anticorps monoclonal dirigé contre le déterminant RT-IA des antigènes de classe I du CMH de rat (Biosys). Après incubation dans la glace 30 mn, les cellules sont lavées 3 fois dans 2 ml de tampon PBS et centrifugées 10 mn à 500 g de manière à éliminer l'excès de sérum. Le culot est alors repris par 500  $\mu\text{l}$  de PBS et 400  $\mu\text{l}$  de ce même tampon sont ajoutés au deuxième des tubes. La visualisation du complexe anticorps-antigène se fait alors grâce à l'addition de 0,5  $\mu\text{l}$  du second anticorps (anti-IgG de souris) couplé à la fluorescéine (Pasteur Production). Après incubation dans la glace 30 mn, les cellules marquées sont à nouveau lavées 3 fois dans du tampon PBS et le culot de chacun des 3 tubes est enfin repris par 500  $\mu\text{l}$  de PBS. Les cellules sont ensuite analysées pour la fluorescence de surface sur un EPICS (Coulter Electronics, Inc, FL).

## VII- 2 - Essais de cytotoxicité.

### VII - 2 - a - Marquage des cellules cibles.

Environ  $10^5$  cellules cibles sont réparties la veille du marquage par boîte de Pétri de 60 mm de diamètre dans 5 ml de milieu Dulbecco (Flow) additionné d'antibiotiques (pénicilline 75 000 U/ml; streptomycine 50 mg/ml; fungizone 5 µg/ml) et de 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté et préalablement dialysé contre de l'eau physiologique. Le marquage est alors réalisé, après incubation 14 heures à 37° C sous 5 % de CO<sub>2</sub>, sur des cellules à environ 30 % de confluence par ajout au milieu de culture de 10 µCi de thymidine tritiée ([méthyl-<sup>3</sup>H]-thymidine, 70 Ci/mmmole; Amersham) et incubation 20 heures dans des conditions identiques. Après changement de milieu, la thymidine tritiée est "chassée" en incubant les cellules durant 16 h dans du milieu contenant  $1.10^{-5}$  M de thymidine froide.

### VII - 2 - b - Préparation d'une fraction riche en cellules NK.

La rate d'un rat Fischer 344 (haplotype RT-1<sup>l</sup>) est prélevée de l'animal puis immergée dans 25 ml de milieu RPMI 1640 (ICN) contenant 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté.

Après dilacération fine de l'organe, le broyat est filtré sur membrane de nylon stérile (porosité 200 µm) et la dissociation des cellules est achevée par environ 20 passages du filtrat au travers d'une aiguille 21G x 1 1/2.

La séparation des lymphocytes et des monocytes est alors réalisée sur gradient de Ficoll. Pour ce faire, 25 à 28 ml de broyat filtré sont ajoutés délicatement à 16 ml de LSM (Lymphocyte Separation Medium; Boehringer), solution aqueuse contenant du Ficoll de densité 1,077 g/ml. Après centrifugation 40 mn à 350 g et à température ambiante, l'anneau blanchâtre situé à l'interface de la couche échantillon et de la solution de Ficoll est récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur. Les lymphocytes (70 à 100 % de récupération) sont ensuite lavés deux fois dans 20 ml de milieu RPMI 1640 sans SVF préalablement incubé dans la glace. Les deux cycles de lavage sont effectués 10 mn à 300 g, 20° C de manière à enlever toute trace de Ficoll.

Le culot de cellules est alors remis en suspension dans environ 4 ml de RPMI 1640 sans SVF puis le comptage des cellules est réalisé après dilution d'un aliquot au 1/100 en cellule de Nageotte.

Environ 80 millions de cellules sont réparties par boîte de Pétri de 60 mm de diamètre dans du milieu RPMI additionné de 5 % de SVF décomplémenté. Après incubation 2 heures à

37° C en étuve sous 5 % de CO<sub>2</sub>, il est possible de collecter le milieu de culture contenant les cellules non adhérentes (lymphocytes) tandis que les monocytes restent fixés au support plastique de la boîte de Pétri. Après cette étape un nouveau comptage est effectué.

### ***VII - 2 - c - Coculture des lymphocytes de rate et des cellules cibles marquées.***

Il s'agit dans cet essai de cytotoxicité de mesurer indirectement la libération de thymidine tritiée à partir de cellules cibles cultivées en présence de la fraction lymphocytaire de rate contenant les cellules NK.

Avant répartition en plaques multipuits (Plaque Microtest III, 96 puits, Falcon) et addition de la fraction riche en cellules NK, les cellules cibles sont lavées deux fois dans du milieu RPMI 1640 additionné de 5 % de SVF décomplémenté.

Un traitement au Versène est réalisé de manière à collecter les cellules cibles en vue de leur numération et de leur répartition dans les puits. A ces cellules, dont le nombre est maintenu constant (environ 20 000 cellules/puits) sont ajoutés les lymphocytes de rate, dans des rapports variables : 1:1, 5:1, 25:1. L'ajustement du volume de chaque puits est obtenu par ajout de RPMI 1640 additionné de 5 % de SVF décomplémenté. Chacune des combinaisons cellules lymphocytaires:cellules cibles est réalisée en triple. Le temps d'exposition des cellules cibles aux cellules de rate est de 16 heures en étuve à 37° C sous 5 % de CO<sub>2</sub>. Comme contrôle, sont réalisées en parallèle d'une part une culture de cellules cibles marquées et d'autre part une culture de cellules cibles non marquées, et ce en absence de lymphocytes.

Après incubation, la plaque multipuits est centrifugée à 500 g durant 15 minutes à température ambiante, et les surnageants de chaque puits sont transférés en tubes Eppendorf pour un comptage ultérieur tandis qu'aux culots cellulaires sont ajoutés 200 µl de Versène, de manière à décoller les cellules. Après décollement et transfert en tubes Eppendorf, les cellules sont à nouveau centrifugées 10 mn à 500 g, température ambiante, et les culots cellulaires sont alors traités par 0,2 ml de NaOH 0,3 M durant 30 mn à température ambiante de manière à lyser les cellules. L'ADN macromoléculaire des lysats est ensuite précipité par environ 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20 % à 0° C pour 10 mn au minimum. Les précipités sont déposés sur filtres en microfibrilles de verre (GF/C, 2,5 cm de diamètre, Whatman) préalablement imbibés au TCA 5 % et filtrés à l'aide d'une trompe à vide. A l'issue de la filtration, deux lavages sont effectués, le premier par une solution de TCA 5 %, le second par de l'eau déminéralisée. Un rinçage à l'éthanol absolu permet ensuite de sécher rapidement les filtres à l'air en vue de les

compter. Le comptage est réalisé en scintillation liquide dans des fioles contenant 4 ml d'Aqualyte.

De manière à confirmer les résultats obtenus avec les culots cellulaires, les surnageants sont également précipités par du TCA à la concentration finale de 10 % sur glace 10 mn puis filtrés et lavés de manière identique pour le comptage.

**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 nononcogenic adenovirus-transformed rat cells.

*Virology* **172**, 643-646.

ACKRILL, A.M., FOSTER, G.R., LAXTON, C.D., FLAVELL, D.M., STARK, G.R. & KERR, I.M. (1991).

Inhibition of the cellular response to interferons by products of the adenovirus type 5 E1A oncogene.

*Nucl. Acids Res.* **19**, 4387-4393.

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.

AHLUWALIA, N., BERGERON, J.J.M., WADA, I., DEGEN, E. & WILLIAMS, D.B. (1992).

The p88 molecular chaperone is identical to the endoplasmic reticulum membran protein, calnexin.

*J. Biol. Chem.* **267**, 10914-10918.

ANGEL, P., IMAGAWA, M., CHIU, R., STEIN, B., IMBRA, R.J., RAHMSDORF, H.J., JONAT, C., HERRLICH, P. & KARIN, M. (1987).

Phorbol ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated *trans*-acting factor.

*Cell* **49**, 729-739.

ARANY, Z., NEWSOME, D., OLDREAD, E., LIVINGSTON, D.M. & ECKNER, R. (1995).  
A family of transcriptional adaptator proteins targeted by the E1A oncoprotein.  
*Nature* **374**, 81-84.

BABISS, L.E. & GINSBERG, H.S. (1984).

Adenovirus type 5 early region 1B gene product is required for efficient shut off of host protein synthesis.

*J. Virol.* **50**, 202-212.

BABISS, L.E., FISHER, P.B. & GINSBERG, H.S. (1984).

Effect on transformation of mutations in the early region 1b-encoded 21- and 55-kilodalton proteins of adenovirus 5.

*J. Virol.* **52**, 389-395.

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.

BAEUERLE, P.A. & BALTIMORE, D. (1988).

I $\kappa$ B : a specific inhibitor of the NF $\kappa$ B transcription factor.

*Science* **242**, 540-546.

BAEUERLE, P.A. & BALTIMORE, D. (1989).

A 65-kd subunit of active NF- $\kappa$ B is required for inhibition of NF- $\kappa$ B by I- $\kappa$ B.

*Genes Dev.* **3**, 1689-1699.

BALDWIN, A.S., Jr. & SHARP, P.A. (1987).

Binding of a nuclear factor to a regulatory sequence in the promoter of the mouse *H-2K<sup>b</sup>* class I major histocompatibility gene.

*Mol. Cell. Biol.* **7**, 305-313.

BALDWIN, A.S. & SHARP, P.A. (1988).

Two transcription factors, NF- $\kappa$ B and H2TF1, interact with a single regulatory sequence in the class I major histocompatibility complex promoter.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 723-727.

BALDWIN, A.S., LECLAIR, K.P., SINGH, H. & SHARP, P.A. (1990).

A large protein containing zinc finger domains binds to related sequence elements in the enhancers of the class I major histocompatibility complex and kappa immunoglobulin genes.

*Mol. Cell. Biol.* **10**, 1406-1414.

BALLARD, D.W., DIXON, E.P., PEFFER, N.J., BOGERD, H., DOERRE, S., STEIN, B. & GREENE, W.C. (1992).

The 65-kDa subunit of human NF- $\kappa$ B functions as a potent transcriptional activator and a target for v-Rel-mediated repression.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1875-1879.

BARBEAU, D., CHARBONNEAU, R., WHALEN, S.G., BAYLEY, S.T. & BRANTON, P.E. (1994).

Functional interactions within adenovirus E1A protein complexes.

*Oncogene* **9**, 359-373.

BAUTISTA, D.S., HITT, M., McGRORY, J. & GRAHAM, F.L. (1991).

Isolation and characterization of insertion mutants in E1A of adenovirus type 5.

*Virology* **182**, 578-596.

BAYLEY, S.T. & MYMRYK, J.S. (1994).

Adenovirus E1A proteins and transformation.

*Intern. J. Onc.* **5**, 425-444.

BELLET, A.J. (1983).

Adenovirus-induced alterations of the cell growth cycle : a requirement for expression of E1A but not of E1B.

*J. Virol.* **45**, 192-199.

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

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

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

BERK, A.J. (1986).

Functions of adenovirus E1A.

*Cancer Surveys* **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 1 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.

BERTSCHMANN, M., KÄSERMANN, D. & KELLER, R. (1990).

MHC class-I antigen deficiency, malignancy and susceptibility of P815 mastocytoma to NK and macrophage killing.

*Int. J. Cancer* **46**, 739-744.

BEZOUSKA, K., VLAHAS, G., HORVATH, O., JINCHAVA, G., FISEROVA, A., GIORDA, R., CHAMBERS, W.H., FEIZI, T. & POSPISIL, M. (1994).

Rat natural killer cell antigen, NKR-P1, related to C-type animal lectins is a carbohydrate-binding protein.

*J. Biol. Chem.* **269**, 16945-16952.

BJORKMAN, P., SAPER, M., SAMRAOUI, B., BENNETT, W., STROMINGER, J. & WILEY, D. (1987).

The foreign antigen-binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens.

*Nature* **329**, 512-518.

BLANAR, M.A., BALDWIN, A.S., Jr., FLAVELL, R.A. & SHARP, P.A. (1989).

A gamma-interferon-induced factor that binds the interferon response sequence of the MHC class I gene, H-2K<sup>b</sup>.

*EMBO J.* **8**, 1139-1144.

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., WAZYLYK, B. & 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 interactions of human adenovirus oncoproteins.

*Biochem. J.* **275**, 281-299.

BRADFORD, M.M. (1976).

A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

*Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

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

Transformation by human adenoviruses.

*Biochem. Biophys. Acta* **780**, 67-94.

BROCKMANN, D., TRIES, B. & ESCHE, H. (1990).

Isolation and characterization of novel adenovirus type 12 E1A mRNAs by cDNA PCR technique.

*Virology* **179**, 585-590.

BROCKMANN, D. & ESCHE, H. (1995).

Regulation of viral and cellular gene expression by E1A proteins encoded by the oncogenic adenovirus type 12.

In "The Molecular Repertoire of Adenoviruses III". W. DOERFLER and P. BÖHM (Eds), pp. 81-103.

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

Cellular proteins implicated in transformation by adenovirus and other DNA tumor viruses.

Common Mechanisms of Transformation by Small DNA Tumor Viruses, Ed. L. P. Villarreal. **4**, 51-63.

BURKE, P.A., HIRSCHFELD, S., SHIRAYOSHI, Y., KASIK, J.W., HAMADA, K., APPELLA, E. & OZATO, K. (1989).

Developmental and tissue-specific expression of nuclear proteins that bind the regulatory element of the major histocompatibility complex class I gene.

*J. Exp. Med.* **169**, 1309-1321.

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.

CHEN, S.T., SU, H. & YEE, J.K. (1992).

Repression of liver-specific hepatitis B virus enhancer 2 activity by adenovirus E1A proteins.  
*J. Virol.* **66**, 7452-7460.

CHERVENAK, R. & WOLCOTT, R.M. (1988).

Target cell expression of MHC antigens is not (always) a turn-off signal to natural killer cells.  
*J. Immunol.* **140**, 3712-3716.

CHINNADURAI, G. (1983).

Adenovirus 2 lp+ locus codes for a 19 Kd tumor antigen that plays an essential role in cell transformation.  
*Cell* **33**, 759-766.

CHODOSH, L.A., BALDWIN, A.S., CARTHEW, R.W. & SHARP, P.A. (1988).

Human CCATT-binding proteins have heterologous subunits.  
*Cell* **53**, 11-24.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987).

Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.  
*Anal. Biochem.* **162**, 156-159.

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

Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2.  
*J. Mol. Biol.* **134**, 265-303.

CLARK, L., POLLOCK, R.M. & HAY, R.T. (1988).

Identification and purification of EBP1 : a HeLa cell protein that binds to a region overlapping the 'core' of the SV40 enhancer.  
*Genes Dev.* **2**, 991-1002.

COBRINIK, D., WHYTE, P., PEEPER, D.S., JACKS, T. & WEINBERG, R.A. (1993).

Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding protein.  
*Genes & Dev.* **7**, 2392-2404.

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.

COLOMBANI, J. (1991).

Mécanismes moléculaires de présentation de l'antigène par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.

*Bull. Inst. Pasteur* **89**, 109-132.

COOK, J.L., HIBBS, J.B. & LEWIS, A.M., Jr. (1982).

DNA virus transformed hamster cell-host effector cell interactions : level of resistance to cytolysis is correlated with tumorigenicity.

*Int. J. Cancer* **30**, 795-803.

COOK, J.L., WALKER, T.A., LEWIS, A.M., Jr., RULEY, H.E., GRAHAM, F.L. & PILDER, S.H. (1986).

Expression of the adenovirus E1A oncogene during cell transformation is sufficient to induce susceptibility to lysis by host inflammatory cells.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 6965-6969.

COOK, J.L., MAY, D.L., LEWIS, A.M., Jr. & WALKER, T.A. (1987).

Adenovirus E1A gene induction of susceptibility to lysis by natural killer cells and activated macrophages in infected rodent cells.

*J. Virol.* **61**, 3510-3520.

COOK, J.L., MAY, D.L., WILSON, B.A. & WALKER, T.A. (1989a).

Differential induction of cytolytic susceptibility by E1A, *myc*, and *ras* oncogenes in immortalized cells.

*J. Virol.* **63**, 3408-3415.

COOK, J.L., MAY, D.L., WILSON, B.A., HOLSKIN, B., CHEN, M.-J., SHALLOWAY, D. & WALKER, T.A. (1989b).

Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in E1A oncogene-induced susceptibility of neoplastic cells to lysis by natural killer cells and activated macrophages.

*J. Immunol.* **142**, 4527-4534.

COOK, J.L., WILSON, B.A., WOLF, L.A. & WALKER, T.A. (1993).

E1A oncogene expression level in sarcoma cells: an independent determinant of cytolytic susceptibility and tumor rejection.

*Oncogene* **8**, 625-635.

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

Cellular transformation by E1 genes of enteric adenoviruses.

*Virology* **181**, 277-287.

DAVID-WATINE, B., ISRAËL, A. & KOURILSKY, P. (1990).

The regulation and expression of MHC class I genes.

*Immunol. Today* **11**, 286-292.

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 regulatory element.

*Cell* **58**, 1085-1095.

DEGEN, E. & WILLIAMS, D.B. (1991).

Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules.

*J. Cell Biol.* **112**, 1099-1115.

DE JONG, J.C., WIGAND, R., KIDD, A.H., WADELL, G., KAPSENBERG, J.G., MUZERIE, A.G., WERMENBOL, A.G. & FIRTZLAFF, R.-G. (1983).

Candidate adenoviruses 40 and 41 : fastidious adenoviruses from human infant stool.

*J. Med. Virol.* **11**, 215-231.

DEMANT, P., OOMEN, L.C.J.M. & OUDSHOORN-SNOEK, M. (1989).

Genetics of tumor susceptibility in the mouse : MHC and non-MHC genes.

*Adv. Cancer Res.* **53**, 117-179.

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.

DOWDY, S.F., HINDS, P.W., LOUIE, K., REED, S.I., ARNOLD, A. & WEINBERG, R.A. (1993).

Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins.

*Cell* **73**, 499-511.

DREW, P.D., FRANZOSO, G., BECKER, K.G., BOURS, V., CARLSON, L.M., SIEBENLIST, U. & OZATO, K. (1995).

NF $\kappa$ B and Interferon Regulatory Factor 1 physically interact and synergistically induce major histocompatibility class I gene expression.

*J. Interferon Cytokine Res.* **15**, 1037-1045.

DRIGGERS, P.H., ELENBAAS, B.A., AN, J.-B., LEE, I.J. & OZATO, K. (1992).

Two upstream elements activate transcription of a major histocompatibility complex class I gene *in vitro*.

*Nucl. Acids Res.* **20**, 2533-2540.

DUTERQUE-COQUILLAUD, M., NIEL, C., PLAZA, S. & STEHELIN, D. (1993).

New human *erg* isoforms generated by alternative splicing are transcriptional activators.

*Oncogene* **8**, 1865-1873.

DYNLACHT, B.D., HOEY, T. & TJIAN, R. (1991).

Isolation of co-activators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation.

*Cell* **66**, 563-576.

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

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

*Science* **243**, 934-937.

DYSON, N., GUIDA, P., MUNGER, K. & HARLOW, E. (1992).

Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins.

*J. Virol.* **66**, 6893-6902.

DYSON, N., DEMBSKI, M., FATTAEY, A., NGWU, C., EWEN, M. & HELIN, K. (1993).

Analysis of p107-associated proteins : p107 associates with a form of E2F that differs from pRB-associated E2F-1.

*J. Virol.* **67**, 7641-7647.

EAGER, K.B., WILLIAMS, J., BREIDING, D., PAN, S., KNOWLES, B., APPELA, 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.

ECKNER, R., EWEN, M.E., NEWSOME, D., GERDES, M., DE CAPRIO, J.A., LAWRENCE, J.B. & LIVINGSTON, D.M. (1994).

Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor.

*Genes & Dev.* **8**, 869-884.

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.

EGAN, C., BAYLEY, S.T. & BRANTON, P.E. (1989).

Binding of the RB-1 protein to E1A products is required for adenovirus transformation.

*Oncogene* **4**, 383-388.

ELLIOTT, B.E., CARLOW, D.A., RODRICKS, A.-M. & WADE, A. (1989).

Perspectives on the role of MHC antigens in normal and malignant cell development.

*Adv. Cancer Res.* **53**, 181-245.

ENGEL, D.A., HARDY, S. & SHENK, T. (1988).

c-AMP acts in synergy with E1A protein to activate transcription of the adenovirus early genes E4 and E1A.

*Genes & Dev.* **2**, 1517-1528.

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**, 87-90.

FAHA, B., HARLOW, E. & LEES, E. (1993).

The adenovirus E1A-associated kinase consists of cyclin E-p33<sup>cdk2</sup> and cyclin A-p33<sup>cdk2</sup>.

*J. Virol.* **67**, 2456-2465.

FAISST, S. & MEYER, S. (1992).

Compilation of vertebrate-encoded transcription factors.

*Nucl. Acids Res.* **20**, 3-26.

FALK, K., RÖTZSCHKE, O., STEVANOVIC, S., JUNG, G. & RAMMENSEE, H.-G. (1991).

Allele specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules.

*Nature* **351**, 290-296.

FAN, C.M. & MANIATIS, J. (1990).

A DNA-binding protein containing two widely separated zinc fingers motifs that recognize the same DNA sequence.

*Genes Dev.* **4**, 29-42.

FARROW, S.N., WHITE, J.H.M., MARTINOU, I., RAVEN, T., PUN, K.-T., GRINHAM, C.J., MARTINOU, J.C. & BROWN, R. (1995).

Cloning of a *bcl-2* homologue by interaction with adenovirus E1B 19K.

*Nature* **374**, 731-733.

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.

FREEMAN, A.E., BLACK, P.H., VANDERPOOL, E.A., HENRY, P.H., AUSTIN, J.B. & HUEBNER, R.J. (1967).

Transformation of primary rat embryo cells by adenovirus type 2.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **58**, 1205-1212.

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., McDOUGALL, J.K. & CHEN, L.B. (1977).

In vitro traits of adenovirus-transformed cell lines and their relevance to tumorigenicity in nude mice.

*Cell* **10**, 669-678.

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 12.

*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **44**, 703-713.

GARNER, M.M. & REVZIN, A. (1981).

A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: applications to components of the *Escherichia coli* lactose operon system.

*Nucl. Acids Res.* **9**, 4047-4060.

GE, R., KRALLI, A., WEINMANN, R. & RICCIARDI, R.P. (1992).

Down-regulation of the major histocompatibility complex class I enhancer in adenovirus type 12-transformed cells is accompanied by an increase in factor binding.

*J. Virol.* **66**, 6969-6978.

GE, R., LIU, X. & RICCIARDI, R.P. (1994).

E1A oncogene of adenovirus-12 mediates *trans*-repression of MHC class I transcription in Ad5/Ad12 somatic hybrid transformed cells.

*Virology* **203**, 389-392.

GEISBERG, J.V., LEE, W.S., BERK, A.J. & RICCIARDI, R.P. (1994).

The zinc finger region of the adenovirus E1A transactivating domain complexes with the TATA box binding protein.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 2488-2492.

GIORDANO, A., WHYTE, P., HARLOW, E., FRANZA, B.R., BEACH, D. & DRAETTA, G. (1989).

A 60 kd cdc2-associated polypeptide complexes with the E1A proteins in adenovirus-infected cells.

*Cell* **58**, 981-990.

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.

GOPAS, J., RAGER-ZISMAN, B., BAR-ELI, M., HAMMERLING, G.J. & SEGAL, S. (1989).

The relationship between MHC antigen expression and metastasis.

*Adv. Cancer Res.* **53**, 89-115.

GORELIK, E., JAY, G., KWIATKOWSKI, B. & HERBERMAN, R.B. (1990).

Increased sensitivity to MHC-non-restricted lysis of BL6 melanoma cells by transfection with class I H-2K<sup>b</sup> gene.

*J. Immunol.* **145**, 1621-1632.

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

Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5.

*Virology* **54**, 536-539.

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

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

*Virology* **52**, 456-467.

GRAHAM, F.L., SMILEY, J., RUSSEL, W.C. & NAIRN, R. (1977).

Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.

*J. Gen. Virol.* **36**, 59-72.

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

Transformation by human adenoviruses.

*J. 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 subcellular localization and protein-protein interactions.

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

GUTCH, M.J. & REICH, N.C. (1991).

Repression of the interferon signal transduction pathway by the adenovirus *E1A* oncogene.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 7913-7917.

HADDADA, H., LEWIS, A.M., Jr., SOGN, J.A., COLIGAN, J.E., COOK, J.L., WALKER, T.A. & LEVINE, A.S. (1986).

Tumorigenicity of hamster and mouse cells transformed by adenovirus types 2 and 5 is not influenced by the level of class I major histocompatibility antigens expressed on the cells.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 9684-9688.

HAGMEYER, B.M., KONIG, H., HERR, I., OFFRINGA, R., ZANTEMA, A., VAN DER EB, A., HERRLICH, P. & ANGEL, P. (1993).

Adenovirus E1A negatively and positively modulates transcription of AP-1 dependent genes by dimer-specific regulation of the DNA binding and transactivation activities of Jun.

*EMBO J.* **12**, 3559-3572.

HAMADA, K., GLEASON, S.L., LEVI, B.-Z., HIRSCHFELD, S., APPELLA, E. & OZATO, K. (1989).

H-2RIIBP, a member of the nuclear hormone receptor superfamily that binds to both the regulatory element of major histocompatibility class I genes and the estrogen response element.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8289-8293.

HARADA, H., FUJITA, T., MIYAMOTO, M., KIMURA, Y., MARUYAMA, M., FURIA, A., MIYATA, T. & TANIGUCHI, T. (1989).

Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes.

*Cell* **58**, 729-739.

HAREL-BELLAN, A., QUILLET, A., MARCHIOL, C., DEMARS, R., TURSZ, T. & FRADELIZI, D. (1986).

Natural killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**, 5688-5693.

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.

HAYASHI, K. (1980).

A cloning vehicle suitable for strand preparation.

*Gene* **11**, 109-115.

HAYASHI, H., TANAKA, K., JAY, F., KHOURY, G. & JAY, G. (1985).

Modulation of the tumorigenicity of human adenovirus-12-transformed cells by interferon.

*Cell* **43**, 263-267.

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. (1986).

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

*Cell* **46**, 229-236.

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**, 8747-8760.

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

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

*Science* **230**, 1391-1394.

HIEBERT, S.W., LIPP, M. & NEVINS, J.R. (1989).

E1A-dependent trans-activation of the human *MYC* promoter is mediated by E2F factor.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 3594-3598.

HIGASHINO, F., YOSHIDA, K., FUJINAGA, Y., KAMIO, K. & FUJINAGA, K. (1993).

Isolation of a cDNA encoding the adenovirus E1A enhancer binding protein : a new human member of the *ets* oncogene family.

*Nucl. Acids Res.* **21**, 547-553.

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

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

*Cell* **70**, 993-1006.

HOOD, L., STEINMETZ, M. & MALLISEN, B. (1983).

Genes of the MHC of mouse.

*Annu. Rev. Immun.* **1**, 529-568.

HORWITZ, M.S. (1990).

Adenoviruses.

In "Virology" (B.N. FIELDS, D.M. KNIPE *et al.*, eds.), 2nd ed., pp. 1679-1742. Raven Press, New-York.

HOUWELING, A., VAN DEN ELSEN, P.J. & VAN DER EB, A.J. (1980).

Partial transformation of primary rat cells by the left most 4.5 % fragment of adenovirus 5 DNA.  
*Virology* **105**, 537-550.

HOWE, J.A. & BAYLEY, S.T. (1992).

Effects of Ad5 E1A mutant viruses on the cell cycle in relation to the binding of cellular proteins including the retinoblastoma protein and cyclin A.  
*Virology* **186**, 15-24.

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., 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.

HUDIG, D., EWOLDT, G.R. & WOODARD, S.L. (1993).

Proteases and lymphocyte cytotoxic killing mechanisms.  
*Curr. Opin. Immunol.* **5**, 90-96.

HUEBNER, R.J., CASEY, M.J., CHANOCK, R.M. & SCHELL, K. (1965).

Tumors induced in hamsters by a strain of adenovirus type 3. Sharing of tumors antigens and "neoantigens" with those produced by adenovirus type 7 tumors.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **54**, 381-388.

ISHINO, M., OHASHI, Y., EMOTO, T., SAWADA, Y. & FUJINAGA, K. (1988).

Characterization of adenovirus type 40 E1 region.

*Virology* **165**, 95-102.

ISRAËL, A., KIMURA, A., FOURNIER, A., FELLOUS, M. & KOURILSKY, P. (1986).

Interferon response sequence potentiates activity of an enhancer in the promoter region of a mouse *H-2* gene.

*Nature* **322**, 743-746.

ISRAËL, A., KIMURA, A., KIERAN, M., YANO, O., KANELLOPOULOS, J., LE BAIL, O. & KOURILSKY, P. (1987).

A common positive trans-acting factor binds to enhancer sequences in the promoters of mouse *H-2* and  $\beta 2$ -microglobulin genes.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2653-2657.

ISRAËL, A., LE BAIL, O., HATAT, D., PIETTE, J., KIERAN, M., LOGEAT, F., WALLACH, D., FELLOUS, M. & KOURILSKY, P. (1989a).

TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF $\kappa$ B-like enhancer binding activity which displaces constitutive factors.

*EMBO J.* **8**, 3793-3800.

ISRAËL, A., YANO, O., LOGEAT, F., KIERAN, M. & KOURILSKY, P. (1989b).

Two purified factors bind to the same sequence in the enhancer of mouse MHC class I genes : one of them is a positive regulator induced upon differentiation of teratocarcinoma cells.

*Nucl. Acids Res.* **17**, 5245-5257.

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

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

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

JELINEK, T., PEREIRA, D.S. & GRAHAM, F.L. (1994).

Tumorigenicity of adenovirus-transformed rodent cells is influenced by at least two regions of adenovirus type 12 early region 1A.

*J. Virol.* **68**, 888-896.

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.

JONES, N. (1995).

Transcriptional modulation by the adenovirus E1A gene.

In "The Molecular Repertoire of Adenoviruses III". W. DOERFLER & P. BÖHM (Eds), pp. 59-80.

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.

KÄGI, D., LEDERMANN, B., BÜRKI, K., SELLER, P., ODERMATT, B., OLSEN, K.J., PODACK, E.R., ZINKERNAGEL, R.M. & HENGARTNER, H. (1994).

Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice.

*Nature* **369**, 31-37.

KALVAKOLANU, D.V.R., BANDYOPADHYAY, S.K., HARTEK, M.L. & SEN, G.C. (1991).

Inhibition of interferon-inducible gene expression by adenovirus E1A proteins: Block in transcriptional complex formation.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 7459-7463.

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.

KARLHOFFER, F.M., RIBAUDO, R.K. & YOKOYAMA, W.M. (1992).

MHC class I alloantigen specificity of Ly-49<sup>+</sup> IL-2-activated natural killer cells.

*Nature* **358**, 66-70.

KÄRRE, K. (1985).

Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and a hypothesis.

In "Mechanisms of Cytotoxicity by NK Cells". R.B. HERBERMAN and D.M. CALLEWAERT (Eds), Academic Press, Orlando, FL. 81-92.

KÄRRE, K., LJUNGGREN, H.-G., PIONTEK, G. & KIESSLING, R. (1986).

Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy.

*Nature* **319**, 675-678.

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

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

*Cell* **59**, 603-614.

KATOH, S., OZAWA, K., KONDOH, S.-I., SOEDA, E.-I., ISRAËL, A., SHIROKI, K., FUJINAGA, K., ITAKURA, K.-I., GACHELIN, G. & YOKOYAMA, K. (1990).

Identification of sequences responsible for positive and negative regulation by E1A in the promoter of H-2K<sup>bm1</sup> class I MHC gene.

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

KAUFMAN, D.S., SCHOON, R.A. & LEIBSON, P.J. (1993).

MHC class I expression on tumor targets inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity without interfering with target recognition.

*J. Immunol.* **150**, 1429-1436.



KENYON, D.J. & RASKA, K. (1986).

Region E1A of highly oncogenic adenovirus 12 in transformed cells protects against NK but not LAK cytotoxicity.

*Virology* **155**, 644-654.

KIDD, A.H., BANATVALA, J.E. & DE JONG, J.C. (1983).

Antibodies to fastidious faecal adenoviruses (species 40 and 41) in sera from children.

*J. Med. Virol.* **11**, 333-341.

KIDD, A.H., CHROBOCZEK, J., CUSACK, S. & RUIGROK, R.W.H. (1993).

Adenovirus type 40 virions contain two distinct fibers.

*Virology* **192**, 73-84.

KIERAN, M., BLANK, V., LOGEAT, F., VANDEKERCKHOVE, J., LOTTSPREICH, F. LE BAIL, O., URBAN, M.B., KOURILSKY, P., BAEUERLE, P.A. & ISRAËL, A. (1990).

The DNA binding subunit of NF- $\kappa$ B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product.

*Cell* **62**, 1007-1018.

KIMELMAN, D., MILLER, J.S., PORTER, D. & ROBERTS, B.E. (1985).

E1a regions of the human adenoviruses and of the highly oncogenic simian adenovirus 7 are closely related.

*J. Virol.* **53**, 399-409.

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

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

*Cell* **44**, 261-272.

KORBER, B., HOOD, L. & STROYNOWSKI, I. (1987).

Regulation of murine class I genes by interferons is controlled by regions located both 5' and 3' to transcription initiation site.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3380-3384.

KORBER, B., MERMOD, N., HOOD, L. & STROYNOWSKI, I. (1988).

Regulation of gene expression by interferons: control of H-2 promoter responses.

*Science* **239**, 1302-1306.

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

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

*Cell* **45**, 219-228.

KOZLOWSKI, S., TAKESHITA, T., BOEHNCKE, W.-H., TAKAHASHI, H., BOYD, L.F., GERMAIN, R.N., BERZOFKY, J.A. & MARGULIES, D.H. (1991).

Excess  $\beta 2$  microglobulin promoting functional peptide association with purified soluble class I MHC molecules.

*Nature* **349**, 74-77.

KRALLI, A., GE, R., GRAEVEN, U., RICCIARDI, R.P. & WEINMANN, R. (1992).

Negative regulation of the major histocompatibility complex class I enhancer in adenovirus type 12-transformed cells via a retinoic acid response element.

*J. Virol.* **66**, 6979-6988.

KRANTZ, C.K., ROUTES, B.A., QUINLAN, M.P. & COOK, J.L. (1996).

E1A second exon requirements for induction of target cell susceptibility to lysis by natural killer cells: implications for the mechanism of action.

*Virology* **217**, 23-32.

KRIPPL, B., FERGUSON, B., ROSENBERG, M. & WESTPHAL, H. (1984).

Functions of purified E1A protein microinjected into mammalian cells.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6988-6992.

KUPPUSWAMY, M.N. & CHINNADURAI, G. (1987).

Relationship between the transforming and transcriptional regulatory functions of adenovirus 2 E1a oncogene.

*Virology* **159**, 31-38.

KUSHNER, D.B., PEREIRA, D.S., LIU, X., GRAHAM, F.L. & RICCIARDI, R.P. (1996).

The first exon of Ad12 E1A excluding the transactivation domain mediates differential binding of COUP-TF and *NF- $\kappa$ B* to the MHC class I enhancer in transformed cells.

*Oncogene* **12**, 143-151.

LAND, H., PARADA, L.F. & WEINBERG, R.A. (1983).

Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes.

*Nature* **304**, 596-602.

LANDSCHULZ, W.H., JOHNSON, P.F., ADASHI, E.Y., GRAVES, B.J. & McKNIGHT, S.L. (1988).

Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP.

*Genes Dev.* **2**, 786-800.

LASSAM, N. & JAY, G. (1989).

Suppression of MHC class I RNA in highly oncogenic cells occurs at the level of transcription initiation.

*J. Immunol.* **143**, 3792-3797.

LE, A.V. & DOYLE, D. (1982).

Differential regulation of mouse H-2 alloantigens.

*Biochemistry* **21**, 5730-5738.

LECLERE, V. (1993).

Domaines de E1A impliqués dans le pouvoir transformant et l'oncogénicité des adénovirus humains.

Thèse de l'Université de Lille I.

LECLERE, V., HUVENT, I., VERWAERDE, P., COUSIN, C. & D'HALLUIN, J.C. (1993).

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

*Arch. Virol.* **132**, 343-357.

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.

LEES, J.A., SAITO, M., VIDAL, M., VALENTINE, M., LOOK, T., HARLOW, E., DYSON, N. & HELIN, K. (1993).

The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors.

*Mol. Cell. Biol.* **13**, 7813-7825.

LEITE, J.P.G., NIEL, C. & D'HALLUIN, J.C. (1986).

Expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in human cells under the control of early adenovirus subgroup C promoters: Effect of E1A gene products from other subgroups on gene expression.

*Gene* **41**, 207-215.

LEITE, J.P.G. (1988).

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.

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

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

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

LI, M. & DESIDERIO, S. (1993).

Physical characterization of DNA-binding proteins in crude preparations.

Transcription Factors : A Practical Approach, (ed. D.S. LATCHMAN), IRL PRESS, Oxford, 181-196.

LICHT, J.D., GROSSEL, M.J., FIGGE, J. & HANSEN, U.M. (1990).

*Drosophila* Krüppel protein is a transcriptional repressor.

*Nature* **346**, 76-79.

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.

LIU, X., GE, R., WESTMORELAND, S., COONEY, A.J., TSAI, S.Y., TSAI, M.-J. & RICCIARDI, R.P. (1994).

Negative regulation by the R2 element of the MHC class I enhancer in adenovirus-12 transformed cells correlates with high levels of COUP-TF binding.

*Oncogene* **9**, 2183-2190.

LIU, X., GE, R. & RICCIARDI, R.P. (1996).

Evidence for the involvement of a nuclear NF- $\kappa$ B inhibitor in global down-regulation of the major histocompatibility complex class I enhancer in adenovirus type 12-transformed cells.

*Mol. Cell. Biol.* **16**, 398-404.

LIU, F. & GREEN, M.R. (1990).

A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by the adenovirus E1a protein.

*Cell* **61**, 1217-1224.

LIU, F. & GREEN, M.R. (1994).

Promoter targeting by adenovirus E1a through interaction with different cellular DNA-binding domains.

*Nature* **368**, 520-525.

LJUNGGREN, H.-G. & KÄRRE, K. (1985).

Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants: analysis of the mechanism.

*J. Exp. Med.* **162**, 1745-1759.

LJUNGGREN, H.-G. & KÄRRE, K. (1990).

In search of 'missing self': MHC molecules and natural killer cell recognition.

*Immunol. Today* **11**, 237-244.

LJUNGGREN, H.-G. (1992).

Role of  $\beta$ 2-microglobulin in cancer.

*Cancer J.* **5**, 308-315.

LUCKOW, B. & SCHUTZ, G. (1987).

CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements.

*Nucl. Acids Res.* **15**, 5490.

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.

LUNDBLAD, J.R., KWOK, R.P.S., LAURANCE, M.E., HARTER, M.L. & GOODMAN, R.H. (1995).

Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP.

*Nature* **374**, 85-88.

MAK, S., MAK, I., SMILEY, I.R. & GRAHAM, F.L. (1979).

Tumorigenicity and viral expression in rat cells transformed by Ad12 virions or by *EcoRI* C fragments of Ad12 DNA.

*Virology* **98**, 456-460.

MANGELSDORF, D.J., ONG, E.S., DYCK, J.A. & EVANS, R.M. (1990).

Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway.

*Nature* **345**, 224-229.

MAUTNER, V., STEINTHORSDDOTTIR, V. & BAILEY, A. (1995).

Enteric adenoviruses.

In "The Molecular Repertoire of Adenoviruses III". W. DOERFLER and P. BÖHM (Eds), pp. 229-282.

McFADDEN, G. & KANE, K. (1994).

How DNA viruses perturb functional MHC expression to alter immune recognition.

*Adv. Cancer Res.* **63**, 117-209.

McKNIGHT, S.L., KINGSBURY, R., SPENCE, A. & SMITH, M. (1984).

The distal transcription signals of the herpes virus tk gene share a common hexanucleotide control sequence.

*Cell* **37**, 253-262.

MEIJER, I., JOCHEMSEN, A.G., 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.

MEIJER, I., VAN DAM, H., BOOT, A.J.M., BOS, J.L., ZANTEMA, A. & VAN DER EB, A.J. (1991).

Co-regulated expression of junB and MHC class I genes in adenovirus-transformed cells.

*Oncogene* **6**, 911-916.

MEIJER, I., BOOT, A.J.M., MAHABIR, G., ZANTEMA, A. & VAN DER EB, A.J. (1992).

Reduced binding activity of transcription factor NF- $\kappa$ B accounts for MHC class I repression in adenovirus type 12 E1-transformed cells.

*Cell. Immunol.* **145**, 56-65.

MIHARA, K., CAO, X.R., YEN, A., CHANDLER, S., DRISCOLL, B., MURPHREE, A.L., TANG, A. & FUNG, Y.K. (1989).

Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product.

*Science* **246**, 1300-1303.

MITTNACHT, S., LEES, J.A., DESAI, D., HARLOW, E., MORGAN, D.O. & WEINBERG, R.A. (1994).

Distinct sub-populations of the retinoblastoma protein show a distinct pattern of phosphorylation.

*EMBO J.* **13**, 118-127.

MIYAZAKI, J.-I., APPELLA, E. & OZATO, K. (1986).

Negative regulation of the major histocompatibility class I gene in undifferentiated embryonal carcinoma cells.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9537-9541.

MÖLLER, P. & HÄMMERLING, G.J. (1992).

The role of surface HLA-A, B, C molecules in tumour immunity.

*Cancer Surveys* **13**, 101-127.

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.

MORETTA, L., CICCONE, E., MINGARI, M.C., BIASSONI, R. & MORETTA, A. (1994).

Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors.

*Adv. Immunol.* **55**, 341-380.

MUDRYJ, M., DEVOTO, S.H., HIEBERT, S.W., HUNTER, T., PINES, J. & NEVINS, J.R. (1991).

Cell cycle regulation of the E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A.

*Cell* **65**, 1243-1253.

MURRE, C., SCHONLEBER McCRAW, P. & BALTIMORE, D. (1989a).

A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD*, and *myc* proteins.

*Cell* **56**, 777-783.

MURRE, C., SCHONLEBER McCRAW, P., VAESSIN, H., CAUDY, M., JAN, L.Y., JAN, Y.N., CABRERA, C.V., BUSKIN, J.N., HAUSCHKA, S.D., LASSAR, A.B., WEINTRAUB, H. & BALTIMORE, D. (1989b).

Interactions between heterologous Helix-Loop-Helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence.

*Cell* **58**, 537-544.

MYMRYK, J.S., LEE, R.W.H. & BAYLEY, S.T. (1992).

Ability of adenovirus 5 E1A proteins to suppress differentiation of BC3H1 myoblasts correlates with their binding to a 300-kDa cellular protein.

*Mol. Biol. Cell* **3**, 1107-1115.

MYMRYK, J.S. & BAYLEY, S.T. (1993).

Multiple pathways for gene activation in rodent cells by the smaller adenovirus 5 E1A protein and their relevance to growth and transformation.

*J. Gen. Virol.* **74**, 2131-2141.

NAGATA, T., SEGARS, J.H., LEVI, B.-Z. & OZATO, K. (1992).

Retinoic acid-dependent transactivation of major histocompatibility complex class I promoters by the nuclear hormone receptor H-2RIIBP in undifferentiated embryonal carcinoma cells.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 937-941.

NAUME, B. & ESPEVIK, T. (1994).

Immunoregulatory effects of cytokines on natural killer cells.

*Scand. J. Immunol.* **40**, 128-134.

NEEFJES, J.J. & MOMBURG, F. (1993).

Cell biology of antigen presentation.

*Curr. Opin. Immunol.* **5**, 27-34.

NERLOV, C. & ZIFF, E.B. (1995).

CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  amino acid motifs with dual TBP and TFIIB binding ability co-operate to activate transcription in both yeast and mammalian cells.

*EMBO J.* **14**, 4318-4328.

NEVINS, J.R. (1992).

E2F; a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins.

*Science* **258**, 424-429.

NIELSCH, U., ZIMMER, S.G. & BABISS, L.E. (1991).

Changes in NF- $\kappa$ B and ISGF3 DNA binding activities are responsible for differences in MHC and  $\beta$ -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., ZWARTS, R., STEIN, B., BOS, J.L., VAN DER EB, A. & HERRLICH, P. (1990).

A novel function of the transforming domain of E1a : repression of AP-1 activity.

*Cell* **62**, 527-538.

OZATO, K., WAN, Y. & ORRISON, B. (1985).

Mouse major histocompatibility class I gene expression begins at mid-sumite stage and is inducible in earlier stage embryos by interferon.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 2427-2431.

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<sup>b</sup> and H-2K<sup>bm1</sup> class I MHC genes.

*Nucl. Acids Res.* **18**, 4185-4190.

OZAWA, K., HAGIWARA, H., TANG, X., SAKA, F., KITABAYASHI, I., SHIROKI, K., FUJINAGA, K., ISRAEL, A., GACHELIN, G. & YOKOYAMA, K. (1993).

Negative regulation of the gene for H-2K<sup>b</sup> class I antigen by adenovirus 12-E1A is mediated by a CAA repeated element.

*J. Biol. Chem.* **268**, 27258-27268.

PÄÄBO, S., NILSSON, T. & PETERSON, P.A. (1986).

Adenoviruses of subgenera B, C, D and E modulate cell-surface expression of major histocompatibility complex class I antigens.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 9665-9669.

PEEPER, D.S., SCHOUTEN, G.J., TOEBES, M., MEIJER, D., ZWART, R., VAN DE WOUDE, I., VAN SCHAİK, H., VAN DER EB, A.J. & ZANTEMA, A. (1995).

Induction of differentiation-regulated transcription factor Oct-6 specifically accompanies major histocompatibility complex class I down-regulation by E1A of oncogenic adenovirus type 12.

*Cell Growth Diff.* **6**, 977-984.

PENA, J., ALONSO, C., SOLANA, R., SERRANO, R., CARRACEDO, J. & RAMIREZ, R. (1990).

Natural killer susceptibility is independent of HLA class I antigen expression on cell lines obtained from human solid tumors.

*Eur. J. Immunol.* **20**, 2445-2449.

PEREIRA, D.S., ROSENTHAL, K.L. & GRAHAM, F.L. (1995).

Identification of adenovirus E1A regions which affect MHC class I expression and susceptibility to cytotoxic T lymphocytes.

*Virology* **211**, 268-277.

PERRICAUDET, M., AKUSJARVI, G., VIRTANEN, A. & PETTERSSON, U. (1979).

Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses.

*Nature* **281**, 694-696.

PERSSON, H., KATZE, M.G. & PHILIPSON, L. (1982).

Purification of a native membrane-associated adenovirus tumour antigen.

*J. Virol.* **42**, 905-917.

PERSSON, H. & PHILIPSON, L. (1982).

Regulation of adenovirus.

*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **97**, 157-203.

PETERSON, D.O., BEIFUSS, K.K. & MORLEY, K.L. (1987).

Context-dependent gene expression : cis-acting negative effects of specific prokaryotic plasmid sequences on eukaryotic genes.

*Mol. Cell. Biol.* **7**, 1563-1567.

PETTERSSON, U. & WADELL, G. (1985).

Antigenic structure of adenoviruses. *Immunochemistry of viruses*.

The basis of serodiagnosis and vaccines, pp 295-319, ed M. H. V.

van Reggenmortel, and A.R. Neurath, Elsevier Sciences Publishers B.V.

PILDER, S., MOORE, M., LOGAN, J. & SHENK, T. (1986).

The adenovirus E1B-55 K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs.

*Mol. Cell. Biol.* **6**, 470-476.

PINA, M. & GREEN, M. (1965).

Biochemical studies on adenovirus multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenoviruses.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **54**, 547-551.

PINES, J. & HUNTER, T. (1990).

Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B.

*Nature* **346**, 760-763.

PIONTEK, G.E., TANIGUCHI, K., LJUNGGREN, H.-G., GRONBERG, A., KIESSLING, R., KLEIN, G. & KÄRRE, K. (1985).

YAC-1 MHC class I variants reveal an association between decreased NK sensitivity and increased H-2 expression after interferon treatment or *in vivo* passage.

*J. Immunol.* **135**, 4281-4288.

PROFFITT, J.L., SHARMA, E. & BLAIR, G.E. (1994).

Adenovirus 12-mediated down-regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I promoter : identification of a negative regulatory element responsive to Ad12 E1A.

*Nucl. Acids Res.* **22**, 4779-4788.

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.

RAMMENSEE, H.-G., FALK, K. & RÖTZSCHKE, O. (1993).

MHC molecules as peptides receptors.

*Curr. Opin. Immunol.* **5**, 35-44.

RASKA, K., Jr. & GALLIMORE, P.H. (1982).

An inverse relation of the oncogene potential of adenovirus-transformed cells and their sensitivity to killing by syngeneic natural killer cells.

*Virology* **123**, 8-18.

RAULET, D.H. (1994).

MHC class I-deficient mice.

*Adv. Immunol.* **55**, 381-421.

RAULET, D.H. & HELD, W. (1995).

Natural killer cell receptors: the offs and ons of NK cell recognition.

*Cell* **82**, 697-700.

RAYCHAUDHURI, P., BAGCHI, S., DEVOTO, S.H., KRAUS, V.B., MORAN, E. & NEVINS, J.R. (1991).

Domains of the adenovirus E1A protein required for oncogenic activity are also required for dissociation of E2F transcription factor complexes.

*Genes & Dev.* **5**, 1200-1211.

REICHEL, R., NEILL, S.D., KOVESDI, I., SIMON, M.C., RAYCHAUDHURI, P. & NEVINS, J.R. (1989).

The adenovirus E4 gene, in addition to the E1A gene, is important for *trans*-activation of E2 transcription and for E2F activation.

*J. Virol.* **63**, 3643-3650.

RIKITAKE, Y. & MORAN, E. (1992).

DNA-binding properties of the E1A-associated 300-kilodalton protein.

*Mol. Cell. Biol.* **12**, 2826-2836.

RITZ, J., SCHMIDT, R.E., MICHON, J., HERCEND, T. & SCHLOSSMAN, S.F. (1988).

Characterization of functional surface structures on human natural killer cells.

*Adv. Immunol.* **42**, 181-211.

ROSENTHAL, A., WRIGHT, S., QUADE, K., GALLIMORE, P., CEDAR, H. & GROSVELD, F. (1985).

Increased MHC *H2-K* gene transcription in cultured mouse embryo cells after adenovirus infection.

*Nature* **315**, 579-581.

ROTEM-YEHUDAR, R., WINOGRAD, S., SELA, S., COLIGAN, J.E. & EHRLICH, R. (1994a).

Down regulation of peptide transporter genes in cell lines transformed with the highly oncogenic adenovirus 12.

*J. Exp. Med.* **180**, 477-488.

ROTEM-YEHUDAR, R., SHECHTER, H. & EHRLICH, R. (1994b).

Transcriptional regulation of class-I major histocompatibility complex genes transformed in murine cells is mediated by positive and negative regulatory elements.

*Gene* **144**, 265-270.

ROUTES, J.M., BELLGRAU, D., McGRORY, W.J., BAUTISTA, D.S., GRAHAM, F.L. & COOK, J.L. (1991).

Anti-adenovirus type 5 cytotoxic T lymphocytes : immunodominant epitopes are encoded by the E1A gene.

*J. Virol.* **65**, 1450-1457.

ROWE, W. P., HUEBNER, R.J., GILMORE, L.K., PARROTT, R.H. & WARD, T.G. (1953).

Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture.

*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **84**, 570-573.

ROWE, D.T. & GRAHAM, F.L. (1983).

Transformation of rodent cells by DNA extracted from transformation-defective adenovirus mutants.

*J. Virol.* **46**, 1039-1044.

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. (1984).

Establishment and characterization of hamster cell lines transformed by restriction endonuclease fragments of adenovirus 5.

*J. Virol.* **49**, 162-170.

RUIGROK, R.W.H., BARGE, A., ALBIGES-RIZO, C. & DAYAN, S. (1990).

Structure of adenovirus fibre. II. Morphology of single fibres.

*J. Mol. Biol.* **215**, 589-596.

RULEY, H.E. (1983).

Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture.

*Nature* **304**, 602-606.

SANCHEZ, M.J., MUENCH, M.O., RONCAROLO, M.G., LANIER, L.L. & PHILLIPS, J.H. (1994).

Identification of a common T/Natural Killer Cell progenitor in human fetal thymus.

*J. Exp. Med.* **180**, 569-576.

SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977).

DNA sequencing with chain-termination inhibitors.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.

SARNOW, P., HO, Y.S., WILLIAMS, J. & LEVINE, A.J. (1982).

Adenovirus E1B-58 kD tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kD cellular protein in transformed cells.

*Cell* **28**, 387-394.

SARNOW, P., HEARING, P., ANDERSON, C.W., HALBERT, D.N., SHENK, T. & LEVINE, A. (1984).

Adenovirus E1B-55 K tumor antigen is physically associated with an E4-25 K protein in productively infected cells.

*J. Virol.* **49**, 692-700.

SAWADA, Y., FÖHRING, B., SHENK, T.E. & RASKA, K. (1985).

Tumorigenicity of adenovirus-transformed cells: region E1a of adenovirus 12 confers resistance to natural 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.

SAWADA, Y., RASKOVA, J., FUJINAGA, K. & RASKA, K., Jr. (1994).

Identification of functional domains of adenovirus tumor-specific transplantation antigen in types 5 and 12 by viable viruses carrying chimeric E1A genes.

*Int. J. Cancer* **57**, 598-603.

SCHMITZ, M.L. & BAEUERLE, P.A. (1991).

The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF- $\kappa$ B.

*EMBO J.* **10**, 3805-3817.

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.

SCHOUTEN, G.J., VAN DER EB, A.J. & ZANTEMA, A. (1995).

Downregulation of MHC class I expression due to interference with p105-NF $\kappa$ B1 processing by Ad12E1A.

*EMBO J.* **14**, 1498-1507.

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.

SEN, R. & BALTIMORE, D. (1986).

Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequence.

*Cell* **46**, 705-716.

SENEAR, A.W. & LEWIS, J.B. (1986).

Morphological transformation of established rodent cell lines by high-level expression of the adenovirus type 2 E1A gene.

*Mol. Cell. Biol.* **6**, 1253-1260.

SENTMAN, C.L., OLSSON, M.Y., SALCEDO, M., HÖGLUND, P., LENDAHL, U. & KÄRRE, K. (1994).

H-2 allele-specific protection from NK cell lysis in vitro for lymphoblasts but not tumor targets.

Protection mediated by  $\alpha 1/\alpha 2$  domains.

*J. Immunol.* **153**, 5482-5490.

SERGHINI, M.A., RITZENTHALER, C. & PINCK, L. (1989).

A rapid and efficient "miniprep" for isolation of plasmid DNA.

*Nucl. Acids Res.* **17**, 3604.

SHEIL, J.M., GALLIMORE, P.H., ZIMMER, S.G. & SOPORI, M.L. (1984).

Susceptibility of Adenovirus 2-transformed rat cells lines to natural killer (NK) cells : direct correlation between NK resistance and in vivo tumorigenesis.

*J. Immun.* **132**, 1578-1582.

SHEMESH, J., ROTEM-YEHUDAR, R. & EHRLICH, R. (1991).

Transcriptional and posttranscriptional regulation of class I major histocompatibility complex genes following transformation with human adenoviruses.

*J. Virol.* **65**, 5544-5548.

SHENK, T. (1989).

Oncogenesis by DNA viruses : Adenovirus.

Oncogenes and the molecular origins of cancer. Cold Spring Harbor Laboratory Press **9**, 239-257.

SHENK, T. & FLINT, J. (1991).

Transcriptional and transforming activities of the adenovirus E1A proteins.

*Adv. Cancer Res.* **57**, 47-85.

SHIMOJO, H. & YAMASHITA, T. (1968).

Induction of DNA synthesis by adenoviruses in contact-inhibited hamster cells.

*Virology* **36**, 422-433.

SHIRAYOSHI, Y., MIYAZAKI, J.-I., BURKE, P.A., HAMADA, K., APPELLA, E. & OZATO, K. (1987).

Binding of multiple nuclear factors to the 5' upstream regulatory element of the murine major histocompatibility class I gene.

*Mol. Cell. Biol.* **7**, 4542-4548.

SHIRAYOSHI, Y., BURKE, P.A., APPELLA, E. & OZATO, K. (1988).

Interferon-induced transcription of a major histocompatibility class I gene accompanies binding of inducible nuclear factors to the interferon consensus sequence.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5884-5888.

SHIROKI, K., HANDA, H., SHIMOJO, H., YANO, S., OJIMA, S. & FUJINAGA, K. (1977).  
Establishment and characterization of rat cell lines transformed by restriction fragments of  
adenovirus-12 DNA.

*Virology* **82**, 462-471.

SHIROKI, K., SHIMOJO, H., SAWADA, Y., VEMIZU, Y. & FUJINAGA, K. (1979).  
Incomplete transformation of rat cells by a small fragment of adenovirus 12 DNA.

*Virology* **95**, 127-136.

SMITH, H.R.C., KARLHOFFER, F.M. & YOKOYAMA, W.M. (1994).

The Ly-49 multigene family expressed by IL-2-activated natural killer cells.

*J. Immunol.* **153**, 1068-1079.

SODDU, S. & LEWIS, A.M., Jr. (1992).

Driving adenovirus type 12-transformed BALB/c mouse cells to express high levels of class I  
major histocompatibility complex proteins enhances, rather than abrogates, their tumorigenicity.

*J. Virol.* **66**, 2875-2884.

SPECTOR, D.J., Mc GROGAN, M. & RASKAS, H.J. (1978).

Regulation of the appearance of cytoplasmic RNAs from region 1 of the adenovirus 2 genome.

*J. Mol. Biol.* **126**, 395-414.

SPINDLER, K.R. & BERK, A.J. (1984).

Rapid intracellular turnover of adenovirus 5 early region 1A proteins.

*J. Virol.* **52**, 706-710.

STABEL, S., ARGOS, P. & PHILIPSON, L. (1985).

The release of growth arrest by microinjection of adenovirus E1A DNA.

*EMBO J.* **4**, 2329-2336.

STAM, N.J., KAST, W.M., VOORDOUW, A.C., PASTOORS, L.B., VAN DER HOEVEN,  
F.A., MELIEF, C.J. & PLOEGH, H.L. (1989).

Lack of correlation between levels of MHC class I antigen and susceptibility to lysis of small cellular lung carcinoma (SCLC) by natural killer cells.

*J. Immunol.* **142**, 4113-4117.

STEIN, R.W. & ZIFF, E.B. (1987).

Repression of insulin gene expression by adenovirus type 5 E1a gene products.

*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 Surveys* **5**, 389-403.

STORKUS, W.J., ALEXANDER, J., PAYNE, J.A., DAWSON, J.R. & CRESSWELL, P. (1989a).

Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 2361-2364.

STORKUS, W.J., ALEXANDER, J., PAYNE, J.A., CRESSWELL, P. & DAWSON, J.R. (1989b).

The  $\alpha 1/\alpha 2$  domains of class I HLA molecules confer resistance to natural killing.

*J. Immunol.* **143**, 3853-3857.

STORKUS, W.J., SALTER, R.D., CRESSWELL, P. & DAWSON, J.R. (1992).

Peptide-induced modulation of target cell sensitivity to natural killing.

*J. Immunol.* **149**, 1185-1190.

SUGITA, K., MIYAZAKI, J., APPELLA, E. & OZATO, K. (1987).

Interferons increase transcription of a major histocompatibility class I gene via a 5' interferon consensus sequence.

*Mol. Cell. Biol.* **7**, 2625-2630.

TANAKA, K., ISSELBACHER, K.J., KHOURY, G. & JAY, G. (1985).

Reversal of oncogenesis by the expression of a major histocompatibility complex class I gene.

*Science* **228**, 26-30.

TANAKA, Y. & TEVETHIA, S.S. (1988).

Differential effect of adenovirus 2 E3/19K glycoprotein on the expression of H2-K<sup>b</sup> and H-2D<sup>b</sup> class I antigens and H2-K<sup>b</sup>- and H-2D<sup>b</sup>-restricted SV40-specific CTL-mediated lysis.

*Virology* **165**, 357-366.

TANG, X., LI, H.-O., SAKATSUME, O., OHTA, T., TSUTSUI, H., SMIT, A.F.A., HORIKOSHI, M., KOURILSKY, P., ISRAËL, A., GACHELIN, G. & YOKOYAMA, K. (1995).

Cooperativity between an upstream TATA-like sequence and a CAA repeated element mediates E1A-dependent negative repression of the H-2K<sup>b</sup> class I gene.

*J. Biol. Chem.* **270**, 2327-2336.

TELLING, G.C. & WILLIAMS, J. (1994).

Constructing chimeric type 12/type 5 adenovirus E1A genes and using them to identify an oncogenic determinant of adenovirus type 12.

*J. Virol.* **68**, 877-887.

THALMEIER, K., SYNOVZIK, H., MERTZ, 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.

TIEMESSEN, C.T. & KIDD, A.H. (1995).

The subgroup F adenoviruses.

*J. Gen. Virol.* **76**, 481-497.

TING, J.P.-Y. & BALDWIN, A.S. (1993).

Regulation of MHC gene expression.

*Curr. Opin. Immunol.* **5**, 8-16.

TOOZE, J. (1980).

Molecular biology of tumor viruses: DNA tumor viruses. 2<sup>e</sup> éd. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.

TREMBLAY, M.L., McGLADE, C.J., GERBER, G.E. & BRANTON, P.E. (1988).

Identification of the phosphorylation sites in early region 1A proteins of adenovirus type 5 by amino acid sequencing of peptide fragments.

*J. Biol. Chem.* **263**, 6375-6383.

TRENTIN, J.J., YABE, Y. & TAYLOR, G. (1962).

The quest for human cancer viruses.

*Science* **137**, 835-849.

TRINCHIERI, G. (1989).

Biology of natural killer cells.

*Adv. Immunol.* **47**, 187-376.

TRINCHIERI, G. (1994).

Recognition of major histocompatibility complex class I antigens by natural killer cells.

*J. Exp. Med.* **180**, 417-421.

TROWSDALE, J. (1993).

Genomic structure and function in the MHC.

*TIG* **9**, 117-122.

ULFENDHAL, P.J., LINDER, S., KREIVI, J.P., NORDQVIST, K., SEVENSSON, C., HULTBERG, H. & AKUSJARVI, G. (1987).

A novel adenovirus-2 E1A mRNA encoding a protein with transcription activation properties.  
*EMBO J.* **6**, 2037-2044.

URBANELLI, D., SAWADA, Y., RASKOVA, J., JONES, N.C., SHENK, T. & RASKA, K., Jr. (1989).

C-terminal domain of the adenovirus E1A oncogene product is required for induction of cytotoxic T lymphocytes and tumor-specific transplantation immunity.

*Virology* **173**, 607-614.

VAESSEN, R.T.M.J., HOUWELING, A., ISRAEL, A., KOURILSKY, P. & VAN DER EB, A.J. (1986).

Adenovirus E1A-mediated regulation of class I MHC expression.

*EMBO J.* **5**, 335-341.

VAESSEN, R.T.M.J., HOUWELING, A. & VAN DER EB, A.J. (1987a).

Different adenovirus E1A-controlled properties of transformed cells require different levels of E1A expression.

*Gene* **54**, 247-254.

VAESSEN, R.T.M.J., HOUWELING, A. & VAN DER EB, A.J. (1987b).

Post-transcriptional control of class I MHC mRNA expression in adenovirus 12-transformed cells.

*Science* **235**, 1486-1488.

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 factor family.

*Mol. Cell. Biol.* **10**, 5857-5864.

VAN DAM, H., DUYNDAAM, M., ROTTIER, R., BOSCH, A., DE VRIES-SMITS, L., HERRLICH, P., ZANTEMA, A., ANGEL, P. & VAN DER EB, A.J. (1993).

Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of *c-jun* by the 243 amino acid adenovirus E1A protein.

*EMBO J.* **12**, 479-487.

VAN DEN ELSEN, P.J., DE PATER, 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.J., KLEIN, B., DEKKER, B.M.M., VAN ORMONDT, H. & VAN DER EB, A.J. (1983a).

Analysis of virus-specific mRNAs present in cells transformed with restriction fragments of adenovirus type 5 DNA.

*J. Gen. Virol.* **64**, 1079-1090.

VAN DEN ELSEN, P., HOUWELING, A. & VAN DER EB, A.J. (1983b).

Expression of region E1B of human adenoviruses in the absence of region E1A is not sufficient for complete transformation.

*Virology* **128**, 377-390.

VAN DER EB, A.J., MULDER, C., GRAHAM, F.L. & HOUWELING, A. (1977).

Transformation with specific fragments of adenovirus DNAs. -I. Isolation of specific fragments with transforming activity of adenovirus 2 and 5 DNA.

*Gene* **2**, 115-132.

VAN LOON, A.E., MAAS, R., VAESSEN, R.T.M.J., REEMST, A.M.C.B., SUSSENBACH, J.S. & ROZIJN, T.H. (1985).

Cell transformation by the left terminal regions of adenovirus 40 and 41 genomes.

*Virology* **147**, 227-230.

VAN LOON, A.E., GILARDI, P., PERRICAUDET, M., ROZIJN, T.H. & SUSSENBACH, J.S. (1987).

Transcriptional activation by the E1a regions of adenovirus types 40 and 41.  
*Virology* **160**, 305-307.

VAN ORMONDT, H., MAAT, J. & DIJKEMA, R. (1980).

Comparison of nucleotide sequences of the early E1A regions for subgroups A, B, and C of human adenoviruses.

*Gene* **12**, 63-76.

VAN ORMONDT, H. & GALIBERT, F. (1984).

Nucleotide sequences of adenovirus DNAs.

*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **110**, 73-142.

VASAVADA, R., EAGER, K.B., BARBANTI-BRODANO, G., CAPUTO, A. & RICCIARDI, R.P. (1986).

Adenovirus type 12 early region E1A proteins repress class I HLA expression in transformed human cells.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 5257-5261.

VELCICH, A. & ZIFF, E. (1985).

Adenovirus E1A proteins repress transcription from the SV40 early promoter.

*Cell* **40**, 705-716.

VELCICH, A. & ZIFF, E. (1988).

Adenovirus E1A *ras* cooperation activity is separate from its positive and negative transcription regulatory functions.

*Mol. Cell. Biol.* **8**, 2177-2183.

VELY, F. & VIVIER, E. (1996).

Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité des cellules NK.

*Médecine/Sciences* **12**, 458-464.

VERSTEEG, R., PELTENBURG, L.T.C., PLOMP, A.C. & SCHRIER, P.I. (1989).

High expression of the *c-myc* oncogene renders melanoma cells prone to lysis by natural killer cells.

*J. Immunol.* **143**, 4331-4337.

WADELL, G., HAMMARSKJÖLD, M.L., WINBERG, G., VARSANYI, T.M. & SUNDELL, G. (1980).

Genetic variability of adenoviruses.

*Ann. NY Acad. Sci.* **354**, 15-42.

WALKER, T.A., WILSON, B.A., LEWIS, A.M., Jr. & COOK, J.L. (1991).

E1A oncogene induction of cytolytic susceptibility eliminates sarcoma cell tumorigenicity.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 6491-6495.

WANG, L.-H., ING, N.H., TSAI, S.Y., O'MALLEY, B.W. & TSAI, M.-J. (1991).

The COUP-TFs compose a family of functionally related transcription factors.

*Gene Expression* **1**, 207-216.

WANG, H.-G.H., YACIUK, P., RICCIARDI, R.P., GREEN, M., YOKOYAMA, K. & MORAN, E. (1993).

The E1A products of oncogenic adenovirus serotype 12 include amino-terminally modified forms able to bind the retinoblastoma protein but not p300.

*J. Virol.* **67**, 4804-4813.

WATANABE, H., IMAI, T., SHARP, P.A. & HANDA, H. (1988).

Identification of two transcription factors that bind to specific elements in the promoter of the adenovirus early-region 4.

*Mol. Cell. Biol.* **8**, 1290-1300.

WEBSTER, K.A., MUSCAT, G.E.O. & KEDES, L. (1988).

Adenovirus E1A products suppress myogenic differentiation and inhibit transcription from muscle-specific promoters.

*Nature* **332**, 553-557.

WEBSTER, L.C. & RICCIARDI, R.P. (1991).

*Trans*-dominant mutants of E1A provide genetic evidence that the zinc finger of the *trans*-activating domain binds a transcription factor.

*Mol. Cell. Biol.* **11**, 4287-4296.

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.

WEISSMAN, J.D. & SINGER, D.S. (1991).

A complex regulatory DNA element associated with a major histocompatibility complex class I gene consists of both a silencer and an enhancer.

*Mol. Cell. Biol.* **11**, 4217-4227.

WHITE, E., GRODZICKER, T. & STILLMAN, B.W. (1984).

Mutations in the gene encoding the adenovirus early region 1B 19,000-molecular-weight tumor antigen cause the degradation of chromosomal DNA.

*J. Virol.* **52**, 410-419.

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  $\alpha$ .

*Mol. Cell. Biol.* **12**, 2570-2580.

WHYTE, P., BUCHKOVICH, K.J., HOROWITZ, J.M., FRIEND, S.H., RAYBUCK, M., WEINBERG, R.A. & HARLOW, E. (1988a).

Association between an oncogene and an anti-oncogene : the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product.

*Nature* **334**, 124-129.

WHYTE, P., RULEY, H.E. & HARLOW, E. (1988b).

Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation.

*J. Virol.* **62**, 257-265.

WHYTE, P., WILLIAMSON, N.M. & HARLOW, E. (1989);

Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins.

*Cell* **56**, 67-75.

WOLD, W.S. & GOODING, L.R. (1991).

Region E3 of Adenovirus : A cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions.

*Virology* **184**, 1-8.

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.

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**, 5389-5397.

YANO, O., KANELLOPOULOS, J., KIERAN, M., LE BAIL, O., ISRAËL, A. & KOURILSKY, P. (1987).

Purification of KBF1, a common factor binding to both H-2 and  $\beta$ 2-microglobulin enhancers.

*EMBO J.* **6**, 3317-3324.

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.

YEW, P.R. & BERK, A.J. (1992).

Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein.

*Nature* **357**, 82-85.

YOKOYAMA, W.M. (1993).

Recognition structures on natural killer cells.

*Curr. Opin. Immunol.* **5**, 67-73.

YOKOYAMA, W.M. (1995).

Natural killer cell receptors.

*Curr. Opin. Immunol.* **7**, 110-120.

YOSHIDA, K., NARITA, M. & FUJINAGA, K. (1989).

Binding sites of HeLa nuclear proteins on the upstream region of adenovirus type 5 E1A gene.

*Nucl. Acids Res.* **17**, 10015-10034.

ZANTEMA, A. & VAN DER EB, A.J. (1995).

Modulation of gene expression by adenovirus transformation.

In "The Molecular Repertoire of Adenoviruses III". W. DOERFLER and P. BÖHM (Eds), pp. 1-16.

ZERLER, B., MORAN, E., MARUZAMA, K., MOOMAW, J., GRODZICKER, T. & RULEY, H.E. (1986).

Analysis of adenovirus E1A coding sequences which enable *ras* and pMT oncogenes to transform cultured primary cells.

*Mol. Cell. Biol.* **6**, 887-899.

ZINKERNAGEL, R.M. & DOHERTY, P.C. (1974).



Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system.

*Nature* **248**, 701-702.