



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Canadian Theses Service

Service des thèses canadiennes

Ottawa, Canada
K1A 0N4

NOTICE

The quality of this microform is heavily dependent upon the quality of the original thesis submitted for microfilming. Every effort has been made to ensure the highest quality of reproduction possible.

If pages are missing, contact the university which granted the degree.

Some pages may have indistinct print especially if the original pages were typed with a poor typewriter ribbon or if the university sent us an inferior photocopy.

Reproduction in full or in part of this microform is governed by the Canadian Copyright Act, R.S.C. 1970, c. C-30, and subsequent amendments.

AVIS

La qualité de cette microforme dépend grandement de la qualité de la thèse soumise au microfilmage. Nous avons tout fait pour assurer une qualité supérieure de reproduction.

S'il manque des pages, veuillez communiquer avec l'université qui a conféré le grade.

La qualité d'impression de certaines pages peut laisser à désirer, surtout si les pages originales ont été dactylographiées à l'aide d'un ruban usé ou si l'université nous a fait parvenir une photocopie de qualité inférieure.

La reproduction, même partielle, de cette microforme est soumise à la Loi canadienne sur le droit d'auteur, SRC 1970, c. C-30, et ses amendements subséquents.

Utilisation de systèmes de vecteurs plasmidiques
aux fins d'identification de promoteurs géniques

par

Benoît Leclair

Thèse déposée à
l'Ecole des études supérieures et de la recherche
en vue de l'obtention du diplôme de
doctorat ès sciences en biologie



Benoît Leclair, Ottawa, Canada, 1990



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Canadian Theses Service Service des thèses canadiennes

Ottawa, Canada
K1A 0N4

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-62298-9

Canada



UNIVERSITÉ D'OTTAWA
UNIVERSITY OF OTTAWA

à Valérie, Geneviève et Christiane.

L'Université d'Ottawa requiert la signature de toutes personnes utilisant ou photocopiant cette thèse. Vous êtes priés de signer ci-dessous en indiquant votre adresse et la date de consultation de cette thèse.

Remerciements

Je me dois de remercier les collègues et les organisations dont les noms apparaissent ci-dessous, pour l'aide apportée à la réalisation des travaux de recherche qui ont conduit à la présentation de cette thèse:

Mon superviseur de thèse, **Michael McBurney**, à qui j'adresse ma gratitude pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Sa tutelle, souple mais rigoureuse, a contribué à faire de moi, je l'espère, un meilleur scientifique.

Les membres du corps professoral qui ont siégé à mon Comité Aviseur, les docteurs **Thor Arnason**, **Robert Hawley**, **Donal Hickey**, **Douglas Johnson** et **Jim Neelin**, pour le temps qu'ils ont investi et le souci qu'ils ont démontré envers la progression de ce projet; un merci spécial à **Robert Hawley** pour son plasmide Tag-1.

Mes nombreux collègues de laboratoire, à qui je dois d'avoir travaillé dans un environnement critique et constructif. Plus particulièrement, je remercie **Chaker Adra**, **Trevor Bladon**, **Dante Morassutti** et **Michael Rudnicki**, pour les nombreuses discussions et les bons conseils.

Le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada et l'Université d'Ottawa, pour le support financier qu'ils m'ont apporté sous la forme de bourses d'études.

TABLE DES MATIERES

Remerciements.....	v
Table des Matières.....	vi
Liste des Figures.....	ix
Liste des Tables.....	xi
Abréviations.....	xii
Résumé.....	xiii
Abstract.....	xvi

Chapitre 1: Introduction générale. 1-35

1.1. Introduction.	1
1.2. Contrôle de la transcription.	4
1.2.1. Les promoteurs eucaryotes.	5
1.2.2. Les stimulateurs transcriptionnels.	7
1.2.2.1. Les stimulateurs transcriptionnels viraux.	8
1.2.2.2. Les stimulateurs transcriptionnels cellulaires.	13
1.2.3. Méthodes de repérage et d'identification d'éléments de contrôle de la transcription.	15
1.2.4. Le fragment Bgl II N de l'herpès simplex type 2.	20
1.2.4.1. Génétique du virus de l'herpès simplex type 2.	20
1.2.4.2. Transformation cellulaire par HSV-2.	22
1.2.5. Le stimulateur du gène pgk-1 de souris.	26
1.3. Les cellules embryonnaires carcinomateuses.	28
1.3.1. Les tératocarcinomes.	28
1.3.2. La différenciation in vitro de cellules embryonnaires carcinomateuses.	29
1.3.3. Expression génique et différenciation cellulaire.	30
1.3.3.1. Les oncogènes et la transformation cellulaire.	31
1.3.3.2. Les oncogènes et la différenciation cellulaire.	33
1.4. Le projet de thèse.	34

Chapitre 2: Matériel et méthodes. 36-54

2.1. Appareillage.	36
2.2. Fournitures, produits chimiques et biochimiques.	36
2.3. Méthodes: Biologie moléculaire.	37
2.3.1. Préparation de bactéries compétentes pour transformation.	37
2.3.2. Transformation bactérienne.	38
2.3.3. Mini-préparative d'ADN plasmidique.	38
2.3.4. Maxi-préparative d'ADN plasmidique.	39
2.3.5. Isolation d'ADN génomique eucaryote de haut poids moléculaire.	41
2.3.6. Digestion endonucléasique de l'ADN.	42
2.3.7. Déphosphorylation de l'ADN.	42
2.3.8. "Réparation" d'extrémités cohésives en 5' ou 3'.	43
2.3.9. Isolation de fragments d'ADN plasmidique.	43

2.3.10.	Ligation de fragments d'ADN.	44
2.3.11.	Isolation d'ARN total cellulaire.	45
2.3.12.	Electrophorèse d'ARN sur gel de formaldéhyde.	46
2.3.13.	Transferts Southern et Northern.	46
2.3.14.	Hybridation de transferts Southern et Northern.	47
2.3.15.	Préparation de sondes radioactives.	48
2.3.16.	Dosage de l'activité β -galactosidasique.	49
2.4.	Méthodes: Culture de tissus.	50
2.4.1.	Ensemencement des lignées cellulaires.	50
2.4.2.	Lignées cellulaires.	51
2.4.3.	Transformation de cellules mammifères avec de l'ADN.	51
2.4.4.	Sélection en présence de G418.	52
2.4.5.	Différenciation de cellules EC P19.	52
2.4.6.	Microscopie et immunofluorescence.	53

**Chapitre 3: Recherche d'éléments de contrôle
transcriptionnels chez Bgl II N
d'HSV-2. 55-89**

3.1.	Introduction.	55
3.2.	Le système de trappage fonctionnel des stimulateurs.	55
3.3.	Résultats.	62
3.3.1.	Construction et validation du système de vecteurs.	62
3.3.2.	Le fragment Bgl II N d'HSV-2 ne recèle pas de stimulateur.	63
3.3.3.	Les promoteurs du fragment transformant.	74
3.4.	Discussion.	84

**Chapitre 4: Des fragments de Bgl II N semblent
induire une intégration génomique
dirigée. 90-112**

4.1.	Introduction.	90
4.2.	Résultats: intégration d'un faible nombre de copies plasmidiques.	92
4.3.	Discussion.	108

**Chapitre 5: Activité du stimulateur du gène pgk-1 de
souris en situation d'activation
hétérologue. 113-126**

5.1.	Introduction.	113
5.2.	Résultats: stimulation hétérologue marginale par le stimulateur de pgk-1.	114
5.3.	Discussion.	124

Chapitre 6:	Effets de l'antigène grand T de SV40 sur la différenciation des cellules EC P19.	127-164
6.1.	Introduction.	127
6.2.	Résultats.	129
6.2.1.	Le gène tsT n'est pas exprimé chez les cellules P19 différenciées.	129
6.2.2.	Une corrélation entre la concentration cellulaire de grand T et le type cellulaire différencié?	137
6.2.3.	L'antigène grand T de SV40 n'est pas exprimé chez les cellules P19 différenciées avec l'acide rétinoïque.	146
6.2.4.	L'antigène grand T de SV40 est exprimé chez les cellules P19 différenciées de type cardiaque.	153
6.3.	Discussion.	158
Chapitre 7:	Conclusions d'ordre général.	165-173
7.1.	Le système de trappage fonctionnel de stimulateurs.	165
7.2.	Bgl II N d'HSV-2 et la transformation cellulaire.	166
7.3.	Le stimulateur du gène pgk-1 de souris.	168
7.4.	L'antigène grand T et la différenciation cellulaire.	169
Bibliographie		174-195

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1:

Figure 1.1:	Le promoteur précoce du virus SV40. . . .	10
Figure 1.2:	Les fragments transformants d'HSV-2. . . .	25

Chapitre 2: pas de figures.

Chapitre 3:

Figure 3.1:	Vecteurs utilisés pour la recherche d'éléments de contrôle transcriptionnel. . .	59
Figure 3.2:	Vecteurs dérivés de pVE.	61
Figure 3.3:	Validation qualitative du système de vecteurs.	66
Figure 3.4:	Validation quantitative du système de vecteurs.	68
Figure 3.5:	Immunofluorescence et analyse Northern de pVE1 et pVE3.	70
Figure 3.6:	Fragmentation de Bgl II N.	71
Figure 3.7:	Recherche de stimulateurs chez Bgl II N. .	73
Figure 3.8:	Les phases de lecture ouvertes chez Bgl II N.	75
Figure 3.9:	Recherche de PLO et séquences consensus chez la séquence de nucléotides de Bgl II N.	76
Figure 3.10:	Séquence des nucléotides en amont d'une phase de lecture ouverte non-assignée chez Bgl II N d'HSV-2.	78
Figure 3.11:	Analyse des séquences potentiellement promotrices du fragment Bgl II N. . . .	81
Figure 3.12:	Analyse Northern des clones dérivés de pHS102 et pHS102M contenant les promoteurs potentiels de Bgl II N. . . .	83

Chapitre 4:

Figure 4.1:	Résultats de sélection chez pVEneo et dérivés.	94
Figure 4.2:	Analyse Southern de populations de cellules transfectées avec pSV1neo. . . .	97
Figure 4.3:	Analyse Southern de populations de cellules transfectées avec pVE1neo. . . .	99
Figure 4.4:	Analyse Southern de populations de cellules transfectées avec pVE2neo. . . .	101
Figure 4.5:	Résumé de l'analyse Southern des populations transfectées avec pSV1neo, pVE1neo et pVE2neo.	102
Figure 4.6:	Analyse Southern de populations clonales initialement transfectées avec pSV1neo, pVEneo, pVE1neo ou pVE2neo.. . . .	105

Figure 4.7:	Résumé de l'analyse Southern de populations clonales initialement transfectées avec pSV1-, pVE-, pVE1- ou pVE2neo. . .	107
Chapitre 5:		
Figure 5.1:	Le promoteur du gène pgk-1 de souris. . .	114
Figure 5.2:	Analyse Northern des clones pVE dérivés de pgk-1.	116
Figure 5.3:	Effet stimulateur du fragment Xba-Stu de pgk-1 sur la transcription du promoteur précoce de SV40 chez des cellules HeLa et EC P19.	118
Figure 5.4:	Activité des dérivés de pVEB2 contenant des fragments du promoteur de pgk-1. . .	122
Chapitre 6:		
Figure 6.1:	Le gène tsT, sous le contrôle de divers promoteurs, produit une immunofluorescence détectable, chez les cellules HeLa.	132
Figure 6.2:	Production d'ARNm spécifique à tsT par divers promoteurs.	135
Figure 6.3:	Production d'ARNm spécifique à grand T avant et après la différenciation de clones de cellules P19 transformées avec Tag-1.	140
Figure 6.4:	Expression de GFAP et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en monocouche avec l'acide rétinoïque.	142
Figure 6.5:	Expression de NF160, B4C3 et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en monocouche avec l'acide rétinoïque.	144
Figure 6.6:	Expression de GFAP et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en suspension avec l'acide rétinoïque.	148
Figure 6.7:	Expression de NF160 et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en suspension avec l'acide rétinoïque.	150
Figure 6.8:	Expression de B4C3 et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en suspension avec l'acide rétinoïque.	152
Figure 6.9:	Expression de GFAP, NF160 et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en suspension avec DMSO.	155
Figure 6.10:	Expression de B4C3 et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en suspension avec DMSO.	157
Chapitre 7: pas de figures		

LISTE DES TABLES

Chapitre 1: pas de tables.

Chapitre 2:

Table 2.1: Anticorps utilisés en immunofluorescence. . 54

Chapitre 3: pas de tables.

Chapitre 4: pas de tables.

Chapitre 5: pas de tables.

Chapitre 6:

Table 6.1: Enchaînement des séquences chez les
dérivés de tsT. 130

Table 6.2: Test de formation de focus chez NIH 3T3
avec les plasmides tsT. 136

Table 6.3: Caractéristiques de clones de cellules EC P19
exprimant l'antigène grand T de SV40. . 138

Chapitre 7: pas de tables.

ABREVIATIONS

A	- unité d'absorbance
ABPF	- agarose à bas point de fusion
ADN	- acide désoxyribonucléique
AR	- acide rétinoïque
ARN	- acide ribonucléique
ARNm	- ARN messenger
ASTC	- anticorps spécifique à un type cellulaire
BES	- acide N,N-bis(2-hydroxyéthyle)-2-aminoéthane sulfonique
CDTA	- acide trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N-tétra acétique
Ci, mCi, μ Ci	- curie, millicurie, microcurie
DEPC	- pyrocarbonate de diéthyle
DMSO	- sulfoxyde de diméthyle
DTT	- dithiothréitol
EC	- carcinome embryonnaire
EDTA	- acide éthylène diamine tétra acétique
g	- unité de force gravitationnelle
g	- gramme
HSV	- virus de l'herpès simplex
kb	- kilobase
kd	- kilodalton
kn	- kilonucléotides
l, ml, μ l	- litre, millilitre, microlitre
lacZ	- gène bactérien de la β -galactosidase
M, mM, μ M	- molaire, millimolaire, micromolaire.
MOPS	- acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique
N	- normale
nm	- nanomètre
pb	- paire de bases
PBS	- tampon phosphate salin
PEG	- polyéthylène glycol
PLO	- phase de lecture ouverte
S	- Svedberg, unité de sédimentation
SDS	- dodécyl sulfate de sodium
TE	- Tris-EDTA
ts	- mutant sensible à la température
uc	- unité de carte
wt	- type sauvage

Résumé

L'élucidation des principes gouvernant les mécanismes de contrôle de l'expression génique constitue un échelon important vers la compréhension de la nature d'événements cellulaires tels la détermination et la différenciation cellulaires. Le contrôle de la fréquence d'initiation de la transcription est le mécanisme de contrôle de l'expression génique sur lequel nous avons concentré notre attention.

Nous avons développé un système de vecteurs plasmidiques permettant d'effectuer la recherche de promoteurs et stimulateurs transcriptionnels chez des génomes de petites tailles. Le système est conçu pour sélectionner les promoteurs et stimulateurs capables de remplacer ceux de SV40, permet d'utiliser plusieurs gènes reporteurs différents et autorise des protocoles de quantification variés.

Nous avons utilisé une partie du génome viral de l'herpès simplex type 2 comme banc d'essai pour ce système. Nous avons recherché des stimulateurs et examiné l'activité transcriptionnelle chez le fragment transformant d'HSV-2. Nous avons démontré l'absence de stimulateurs transcriptionnels chez ce fragment et donc l'impossibilité de corréler l'activité transformante avec la présence d'un stimulateur viral. Il n'y a pas de promoteurs actifs autres que celui de la seule phase de lecture ouverte (PLO) assignée. Ce dernier, régulant la transcription de la petite sous-unité de la ribonucléotide

réductase, est silencieux en l'absence de trans-activation et est activable en cis par le stimulateur de SV40. En regard du mécanisme carcinogénique, ces résultats suggèrent qu'un gène viral de classe β pourrait être stimulé par un stimulateur exogène, lors d'un événement d'intégration génomique du fragment transformant.

L'utilisation du gène codant l'antigène grand T de SV40 comme gène reporteur nous a permis d'observer la production, chez de rares cellules HeLa, d'une abondante quantité de l'antigène grand T, lorsque la transcription du gène reporteur était "stimulée" par la présence dans le vecteur de certains sous-fragments du fragment transformant. L'observation s'est répétée pour 3 sous-fragments trouvés dans les génomes de cellules transformées par HSV-2. Le phénomène n'a pas été observé avec les autres constructions.

Nous avons également démontré que chez des clones de cellules HeLa transfectées avec ces constructions herpétiques, le promoteur de une ou deux copies intégrées au génome cellulaire transcrit autant que le promoteur et le stimulateur de SV40. Une interprétation de l'ensemble des résultats propose que le matériel herpétique des trois sous-fragments dirige l'intégration des plasmides vers des sites chromosomiques transcriptionnellement actifs.

Nous avons utilisé le système de vecteurs pour caractériser davantage le stimulateur du gène de la phosphoglycérate kinase de souris. Ce stimulateur augmente de 30 fois la transcription du promoteur du gène pgk-1 chez des cellules de souris. En situation de stimulation d'un promoteur hété-

rologue, celui de la région précoce de SV40, l'amplification de transcription est marginale. Nous concluons que le stimulateur du gène pgk-1 de souris n'est pas un stimulateur à spectre large, tel celui de SV40.

Nous avons utilisé un vecteur d'expression de l'antigène grand T de SV40, sous le contrôle transcriptionnel du promoteur du gène pgk-1 de souris, chez des cellules de tératocarcinome embryonnaire P19 en cours de différenciation et ce, dans le but d'observer la capacité de grand T à perturber la progression de la différenciation.

Nous avons produit des clones de cellules P19 exprimant grand T. La différenciation en mono-couche a produit des populations différenciées homogènes, mais de phénotypes différents d'un clone à l'autre. Une interprétation de ces résultats propose que ces clones étaient pré-déterminés à produire un phénotype précis. La nature de la contribution de grand T à cet effet reste à déterminer. La différenciation d'agrégats en suspension d'un de ces clones a permis de constater une différenciation essentiellement normale. Nous avons démontré que bon nombre de cellules musculaires de type cardiaque expriment grand T. L'antigène grand T ne fut retrouvé chez aucune cellule gliale ou nerveuse. Tout comme la différenciation en mono-couche, un phénotype précis est associé à la présence nucléaire de grand T. Ces résultats nous permettent de suggérer que grand T influence la progression de la différenciation cellulaire des cellules P19 et qu'il permettra vraisemblablement d'isoler et de caractériser certains gènes impliqués dans le contrôle de la différenciation.

Abstract

The understanding of the mechanisms involved in the control of gene expression is an important step towards understanding the nature of cellular events such as cellular determination and differentiation. We have studied one of many mechanisms by which the control of gene expression is exercised, namely the control of the rate of initiation of transcription.

We have developed a plasmid-based system for the search and characterization of transcriptional promoters and enhancers within small size genomes. The system was designed to select for strong promoting and enhancing elements capable of substitution for those of the early region of SV40. It allows for the use of different reporter genes and various measurement protocols.

We have used part of the viral genome of herpes simplex type 2 to test our system. We have searched a transforming fragment of HSV-2 for the presence of transcriptional enhancers and examined the transcriptional activity on the fragment. We have found no transcriptional enhancer within the fragment, suggesting that transformation is not accomplished through the action of a viral enhancer. We have found no active promoters other than the one driving the only assigned open reading frame. This promoter regulates the transcription of the ribonucleotide reductase small sub-unit. It is silent when deprived of trans-activation but allows for efficient trans-

cription when linked in cis with the SV40 enhancer. The results suggest, as far as carcinogenesis is concerned, that a viral β -class gene would be a likely target for transcriptional enhancement by a cellular element, should an integration event place the transforming fragment near one.

The use of SV40's large T antigen as the reporter gene has allowed us to observe, in rare HeLa cells, normal level production of large T when transcription of the reporter gene is "enhanced" by the presence within the vector of certain sub-fragments of the transforming fragment. Three sub-fragments found in the cellular genome of HSV-2-transformed cells have generated a similar result.

We have also shown that within clones of HeLa cells transfected with these herpes-derived constructs, the promoter of one or two integrated copies transcribe at the same level as the promoter and enhancer of SV40. One interpretation of these results suggests that the three sub-fragments somehow direct the integration of the plasmids to transcriptionally active chromosomal locations.

We have used the vector system to further characterize an enhancer found upstream of the mouse phosphoglycerate kinase-1 gene (pgk-1). This enhancer induces a 30-fold increase in transcription activity from the pgk-1 promoter in mouse cells. When linked to the SV40 early promoter, the transcriptional enhancement is only marginal. We concluded that the mouse pgk-1 enhancer, unlike the SV40 enhancer, is unable to enhance heterologous promoters.

We have used an expression vector where SV40's large T antigen is under the transcriptional control of the mouse pgk-1 promoter to assess whether or not the presence of large T can alter the normal progression of differentiation of the teratocarcinoma cell line P19.

We have generated large T-expressing P19 clones. The differentiation of these clones as a monolayer has produced homogeneous populations of differentiated progeny, the common phenotype varying from one clone to the other. One interpretation of these results suggests that cellular determination had already been achieved within these clones. The nature of large T's contribution to this effect remains to be determined. The differentiation of aggregates in suspension of one of these clones has produced an essentially normal differentiation. We have shown that a lot of mononucleate cardiac cells express large T. Large T was not found in glial and nervous cells. As with differentiation in monolayer, a precise phenotype was associated with the nuclear presence of large T. These results allow us to suggest that large T affects cellular differentiation of P19 cells and that it will allow the isolation and characterization of certain genes involved in the control of differentiation.

Chapitre 1: Introduction générale.

1.1. Introduction.

Un ovule fécondé produira, pendant sa gestation, une descendance constituée d'une très grande variété de types cellulaires différents. Puisqu'à peu d'exceptions toutes ces cellules renferment le même bagage génétique, la variété obtenue chez la descendance ne peut donc provenir que d'une expression différentielle des gènes contrôlant la détermination et la différenciation cellulaires. Les mécanismes par lesquels s'exerce la spécificité de l'expression génique lors d'événements cellulaires majeurs, telle la différenciation cellulaire, font l'objet d'une intense activité de recherche en biologie moléculaire. L'élucidation des principes gouvernant ces mécanismes apparaît essentielle à la compréhension éventuelle du déroulement de pratiquement tous les événements cellulaires.

La spécificité de l'expression génique s'exerce à une multiplicité de niveaux de ce qu'il est convenu d'appeler le contrôle de l'expression génique. Un de ces niveaux est le contrôle de la fréquence d'initiation de la transcription; c'est le niveau où la spécificité de l'expression génique se manifeste le plus clairement. Les mécanismes contrôlant la fréquence d'initiation de la transcription mettent en présence d'une part, des facteurs spécifiques de transcription et

trans-activateurs appelés à faire partie du complexe transcriptionnel et, d'autre part, des séquences définies de nucléotides auxquelles seul un complexe transcriptionnel spécifique peut s'attacher de façon productive.

Pour étudier ce système, la stratégie d'investigation consiste souvent à procéder à l'identification des séquences de nucléotides par lesquelles s'exerce le contrôle de la fréquence d'initiation de la transcription, ainsi qu'à l'isolation et la caractérisation des facteurs transcriptionnels s'attachant à ces séquences. Ce n'est qu'une fois tous ces éléments réunis que la nature de l'interaction entre ces derniers peut être examinée. Les deux approches décrites dans ce travail se veulent des contributions à l'identification de séquences de nucléotides par lesquelles s'exerce le contrôle de la fréquence d'initiation de la transcription.

Notre première approche.

Un bon nombre des principes mécanistes gouvernant le contrôle de l'activité transcriptionnelle ont été élucidés grâce à l'étude des séquences de nucléotides retrouvées à proximité des unités transcriptionnelles. Des éléments communs à plusieurs mécanismes de contrôle de l'activité transcriptionnelle ont été identifiés; les promoteurs sont souvent constitués d'un mélange d'éléments communs et spécifiques. Nous avons voulu ajouter notre contribution à ce savoir en conceptualisant et développant un système de vecteurs plasmidiques permettant une recherche systématique d'éléments de

contrôle de l'activité transcriptionnelle. Nous avons utilisé ce système sur banc d'essai en effectuant une recherche d'éléments de contrôle chez un fragment d'ADN d'origine virale et un fragment d'ADN génomique de souris.

Notre seconde approche.

L'identification de séquences de nucléotides, dont l'atteinte à l'intégrité affecte la performance transcriptionnelle, permet d'isoler et de caractériser les autres composants de l'appareil transcriptionnel, tels les facteurs de transcription. A l'inverse, l'utilisation de facteurs de transcription ou trans-activateurs purifiés permettent souvent l'identification et la caractérisation des séquences de nucléotides par l'intermédiaire desquels leur effet est exercé. Des facteurs de transcription ou des trans-activateurs sont fréquemment utilisés dans les systèmes expérimentaux utilisés dans l'étude du développement, de par la capacité démontrée de plusieurs facteurs d'interférer avec le développement normal.

Le système de culture de cellules embryonnaires carcinomateuses P19 est intéressant à cet égard. Ces cellules embryonnaires non-différenciées peuvent être soumises à un régime de différenciation et produisent alors un spectre relativement bien caractérisé de cellules différenciées. Or, chaque type de cellule différenciée représente, dans une certaine mesure, la manifestation phénotypique de l'expression d'un ou plusieurs gènes contrôlant l'engagement de la cellule dans

cette avenue précise de différenciation. Le système P19 comporte l'avantage indéniable de permettre le suivi de l'activité d'un nombre restreint de gènes importants en regard de la détermination cellulaire et ce, grâce aux phénotypes résultants.

Dans le but d'identifier et de caractériser les séquences promotrices de gènes impliqués dans la détermination cellulaire, nous avons entrepris une étude préliminaire visant à déterminer si l'utilisation d'oncogènes viraux interfère avec le processus normal de différenciation des cellules embryonnaires carcinomateuses P19.

1.2. Contrôle de la transcription.

Le contrôle de l'expression génique s'opère à plusieurs niveaux intermédiaires dont plusieurs ont été identifiés:

- la structure de la chromatine et l'état de méthylation de son ADN peuvent affecter l'expression génique;
- le gène peut être modifié par réarrangement ou le nombre de copies du gène peut être augmenté par amplification;
- la fréquence d'initiation et la vitesse d'élongation de la transcription peuvent être la cible d'un contrôle;
- l'épissage des introns peut être modifié ou modulé;
- l'ARNm peut être emmagasiné au lieu d'être traduit;
- la stabilité ou demie-vie de l'ARNm peut être contrôlée;
- la protéine produite ainsi que sa stabilité peuvent être modifiées;

-l'activité de la protéine peut être modulée en contrôlant la présence de co-facteurs nécessaires à son fonctionnement.

Ces multiples niveaux de contrôle constituent un répertoire de moyens disponibles. La gamme de niveaux utilisables varie évidemment d'un gène et son produit à l'autre mais on peut d'ores et déjà entrevoir qu'un fort pouvoir discriminant au niveau du contrôle de l'expression génique est disponible. De la pléiade de niveaux de contrôle décrite plus haut, le contrôle de l'activité transcriptionnelle est celui dont on connaît le plus à ce jour.

1.2.1. Les promoteurs eucaryotes.

L'information recueillie sur la nature des promoteurs eucaryotes provient en grande partie de l'étude de l'interaction entre les génomes viraux et la machinerie de transcription cellulaire eucaryote. En effet, les virus à double brin d'ADN, lorsqu'ils infectent des cellules animales, dépendent fortement des fonctions enzymatiques cellulaires pour l'expression de leur programme génétique. L'étude de ces virus a également élargi nos connaissances sur un autre niveau de contrôle puisque ces virus expriment leur programme via une cascade temporelle à multiples niveaux (Tooze, 1981).

Les effets de la mutagenèse des séquences périphériques des phases de lecture ouvertes (PLO) retrouvées dans les génomes viraux ont pu être évalués: 1) en essai *in vitro*, à l'aide d'extraits cellulaires solubles fractionnés, capables de transcription précise; 2) en essai *in vivo*, à l'aide

de cellules transformées par transfection. Les résultats d'expériences de mutagenèse sur un grand nombre de gènes eucaryotes a permis de dégager des consensus au niveau des séquences d'ADN dont l'atteinte à l'intégrité affecte l'efficacité transcriptionnelle. Il semble que l'ARN-polymérase II forme un complexe avec des protéines accessoires et entre en contact, en amont de la PLO, avec une séquence d'ADN consensus, proximale et riche en A-T, la boîte TATA, située à 19-27pb du site de coiffe de la transcription. Cette séquence a un effet qualitatif sur la transcription en ce qu'elle assure un départ précis de cette dernière (Benoist et Chambon, 1981; Breathnach et Chambon, 1981; Mathis et Chambon, 1981). La boîte CAAT, une séquence consensus distale située à 70-80pb du site de coiffe, entre également en contact avec le complexe; elle a un effet quantitatif sur la transcription en ce qu'elle augmente la fréquence d'initiation de cette dernière (Dyan et Tjian, 1985; McKnight et Tjian, 1986).

Les séquences consensus ci-haut décrites sont retrouvées chez un bon nombre de promoteurs eucaryotes mais sont fréquemment absentes. Par exemple, dans le cas de l'antigène grand T de SV40, on retrouve des séquences riches en G-C qui remplacent adéquatement la boîte CAAT. Chez le promoteur précoce de SV40, les trois séquences répétitives de 21pb contiennent six exemplaires de l'hexanucléotide GGGCGG (boîte GC), site d'attachement du facteur de transcription Sp1. Contrairement à la plupart des éléments de promoteur, les boîtes GC

induisent une transcription bidirectionnelle (Vigneron et al., 1984; Gidoni et al., 1985).

Une perturbation dans la distance entre les divers éléments entrant en contact avec le complexe transcriptionnel affecte négativement la transcription. Toutefois, l'accroissement par un nombre entier de tours d'hélice d'ADN de la distance entre les éléments a un effet minimal sur le niveau d'activité transcriptionnelle, suggérant que l'alignement des divers éléments sur le même côté de l'hélice est généralement important en ce qu'il autorise un contact inter-actif entre les divers composants du complexe transcriptionnel (Takahashi et al., 1986).

Les facteurs de transcription spécifiques à un élément de promoteur sont souvent nombreux et retrouvés à travers le monde eucaryote. Les différents facteurs font la promotion de la transcription à des niveaux différents et reconnaissent des motifs différents à l'intérieur des éléments de promoteur (Gidoni et al., 1984; Dorn et al., 1987; Buratowski et al., 1988; Cavallini et al., 1988).

1.2.2. Les stimulateurs transcriptionnels.

Une autre catégorie de séquences consensus rassemblent des éléments pour lesquels la distance par rapport au site de coiffe de la transcription est peu importante (voir revues de Serfling et al., 1985 et Maniatis et al., 1987). Ces éléments amplifient en cis de façon marquée, jusqu'à 1000 fois, la fréquence d'initiation de la transcription, d'où leur

vocable de stimulateur ("enhancer"); l'amplification procède indépendamment de l'orientation de la séquence de nucléotides du stimulateur par rapport à la PLO ou de sa position par rapport à cette dernière (5'ou 3'). L'effet net produit par les stimulateurs est d'augmenter la densité d'ARN-polymérase II sur l'unité transcriptionnelle (Treisman et Maniatis, 1985; Weber et Schaffner, 1985a). Ces propriétés constituent la définition opérationnelle d'un stimulateur transcriptionnel (Banerji et al., 1981; Gruss et al., 1981; Moreau et al., 1981; Fromm et Berg, 1982.). La définition est dite opérationnelle parce que le discernement entre un élément de promoteur et un de stimulateur est parfois mince (Maniatis et al., 1987).

1.2.2.1. Les stimulateurs transcriptionnels viraux.

Des séquences de type stimulateur ont été identifiées à proximité d'un grand nombre de promoteurs viraux: SV40 (Banerji et al., 1981), polyome (deVilliers et Schaffner, 1981), adénovirus (Hearing et Shenk, 1983; Hen et al., 1983), cytomégalovirus (Boshart et al., 1985), hépatite B (Tognoni et al., 1985), herpès saimiri (Schirm et al., 1985), virus de la leucémie de Moloney (Mo-MuLV) (Speck et Baltimore, 1987), virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV) (Yamamoto, 1985), HTLV-I, II et III (Haseltine et al., 1986), entre autres. Découvertes initialement chez des génomes viraux, on crut ne les retrouver que chez les virus, ce qui s'avéra inexact.

L'un des premiers stimulateurs découverts, celui de SV40 (Banerji et al., 1981; Moreau et al., 1981) est un bon exemple du type de construction modulaire des éléments constituant les stimulateurs. Le stimulateur de SV40 est constitué d'un tandem répétitif de 72pb. Chaque membre du tandem répétitif de 72pb de SV40 est constitué de deux domaines fonctionnels, A et B. Isolés, chacun des deux domaines stimule peu mais l'effet est réactivé par la duplication de un ou l'autre des domaines; la stimulation est également maintenue après remplacement du domaine A du stimulateur de SV40 par le domaine A du stimulateur du virus de polyome (Zenke et al., 1986). Un troisième domaine, "C", éliminé dans bon nombre de constructions plasmidiques retrouvées dans la littérature, n'a pas d'effet additif sur la stimulation générée par A et B. Toutefois, en absence des domaines A et B, le domaine C produit une stimulation lorsqu'il est dupliqué (Weber et al., 1984; Swimmer et Schenk, 1984).

La raison de l'existence de cette duplication d'éléments répétitifs fait l'objet de spéculations. On note qu'un stimulateur plus puissant et un virus plus robuste sont obtenus avec le tandem plutôt que le monomère (Herr et Gluzman, 1985). L'observation fut faite, chez certains types de stimulateurs, que l'attachement d'un premier facteur de transcription facilite l'arrivée d'un second facteur (Dudler et Travers, 1984; Goodbourn et al., 1985; Tsai et al., 1988), événement qui semble lié au déclenchement de l'activité transcriptionnelle. On postule donc que la formation d'un homo- ou

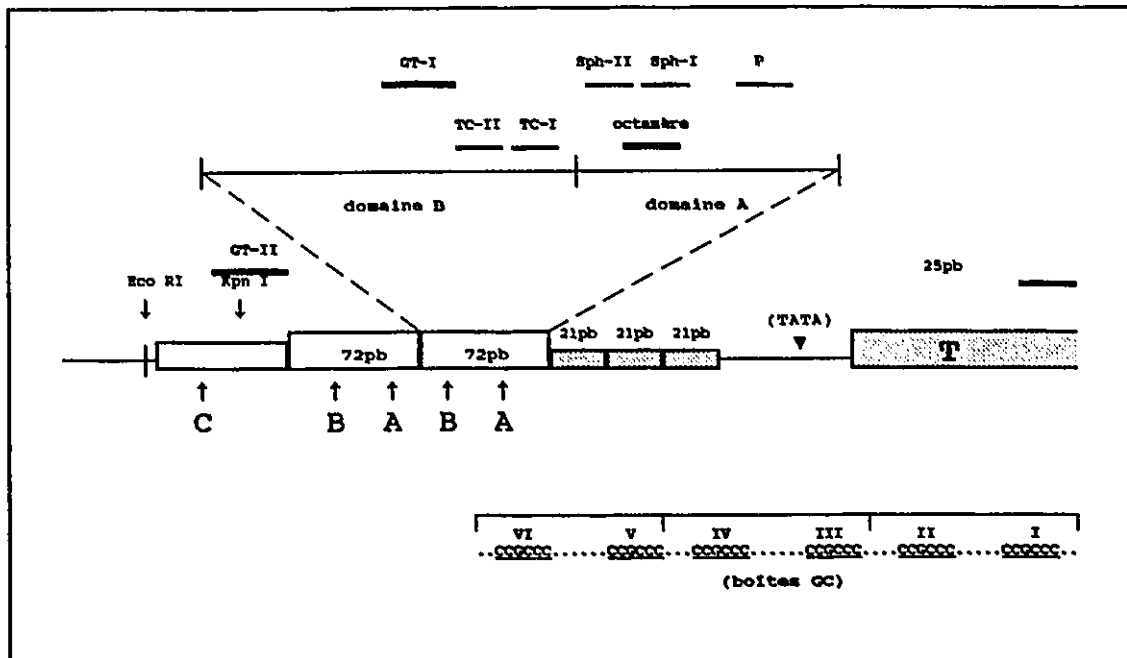


Figure 1.1: Le promoteur précoce du virus SV40.

La région du promoteur précoce de SV40 contient deux promoteurs se chevauchant: un promoteur "précoce-précoce" et un "tardif-précoce", opérant des sites de coiffe situés respectivement à 25pb en aval et 15pb en amont de la boîte TATA (Wasylyk et al., 1983a, 1983b; Baty et al., 1984). L'initiation précise, *in vivo* et *in vitro*, de la transcription précoce-précoce requiert la présence de la boîte TATA (Benoist et Chambon, 1981; Mathis et Chambon, 1981). Les 6 boîtes GC regroupées à l'intérieur des séquences répétitives de 21pb sont les sites d'attachement du facteur Sp1 (Vigneron et al., 1984; Gidoni et al., 1985). Ces boîtes GC ne sont pas redondantes et sont nécessaires à la transcription conduite par les promoteurs précoce-précoce, tardif-précoce (Baty et al., 1984) et tardif (Vigneron et al., 1984). Des relevés d'empreintes laissées par les facteurs de transcription protégeant leurs sites d'attachement de la digestion par l'ADNase ont permis d'identifier 8 motifs, identifiés sur la figure, chez chacun des 72pb constituant le stimulateur de SV40 et d'identifier, chez diverses lignées cellulaires, les facteurs transcriptionnels spécifiques à ces motifs (Davidson et al., 1986; Schirm et al., 1987). Des mutations ponctuelles chez les boîtes GC ou chez les motifs du stimulateur entraînent des baisses d'activité transcriptionnelle importantes.

hétérodimère de facteurs de transcription est nécessaire pour l'obtention d'une stimulation et qu'en présence d'un seul type de facteur cellulaire compatible avec le stimulateur, la redondance des séquences permet la formation d'un homodimère capable de stimulation (Ondek et al., 1987).

A cet égard, la multiplication du nombre de copies du stimulateur augmente significativement l'activité transcriptionnelle. Au delà de 4 copies, toutefois, l'activité transcriptionnelle décroît et à 10 copies, l'activité est minimale (Kumar et al., 1986). Bien que le départ de la transcription reste toujours précis, les modifications structurales induites affectent la performance transcriptionnelle et, dans le cas de SV40, celle de l'origine de réplication. D'autres stimulateurs présentent également de multiples copies de leur motifs de base: le virus du polyome dispose de deux stimulateurs différents (Herbomel, 1984), l'adénovirus en présente 2 similaires (Hearing et Shenk, 1983), le virus du sarcome de Moloney (MoMSV) en dispose de deux dont un est constitutif (DeFranco et Yamamoto, 1986), le gène du β -interféron en présente cinq (Goodbourn et al., 1985).

La formation d'une boucle fut proposée comme le type de modification structurale susceptible de permettre aux facteurs transcriptionnels liés aux stimulateurs de se rapprocher du promoteur et de possiblement former un complexe transcriptionnel spécifique et productif avec le promoteur et ses facteurs (Ptashne, 1986). Ce modèle permet d'expliquer la bidirectionalité des stimulateurs, la formation de la boucle

pouvant autoriser, selon sa dimension, un renversement du stimulateur, avant l'attachement à l'ARN-polymérase II. L'alternative à cette hypothèse propose que le complexe transcriptionnel se forme au stimulateur pour ensuite voyager le long du brin jusqu'à la rencontre du promoteur. Toutefois, la démonstration récente d'une stimulation en trans d'un gène de β -globine par les stimulateurs de SV40 et du cytomégalovirus via un pont protéique (Müller et al., 1989) favorise le modèle de la boucle et suggère, de plus, que la transvection (Judd, 1988) est un mécanisme de contrôle de l'expression génique certes obscur mais possiblement important.

Chaque domaine contient de multiples motifs de séquences qui représentent les points de contact avec les facteurs de transcription (Sassone-Corsi et al., 1985; Sassone-Corsi et Borrelli, 1986). L'attachement des facteurs de transcription à ces points de contact se fait généralement de façon indépendante puisqu'une mutation ponctuelle affectant un facteur de transcription n'affectera pas, à quelques exceptions près (Davidson et al., 1988), l'attachement d'un autre facteur à un site voisin (Wildeman et al., 1986). Aucune mutation ponctuelle ne fait décroître l'effet stimulateur par plus de 8 fois, suggérant que la collaboration de plus d'un motif est requise pour l'obtention d'une stimulation maximale (Zenke et al., 1986). Pour le stimulateur de SV40, la multiplicité des motifs semble être le mécanisme par lequel le virus a acquis la capacité de survivre chez une gamme variée de cellules-hôtes.

Les facteurs de transcription des cellules HeLa reconnaissent des motifs du stimulateur de SV40 différents de ceux reconnus par les facteurs des cellules lymphoïdes B (Augereau et Chambon, 1986; Davidson et al., 1986); les motifs eux-mêmes ont des niveaux d'activité différents d'une lignée cellulaire à l'autre (Nomiyama et al., 1987; Schirm et al., 1987). De plus, certains trans-activateurs comme la protéine virale E1A de l'adénovirus inhibent l'effet stimulateur d'un motif en séquestrant celui-ci ou son facteur de transcription attitré (Borrelli et al., 1984; Gorman et al., 1985; Velcich et Ziff, 1985; Mitchell et al., 1987; Young et al., 1989).

Le stimulateur de SV40 fait bande à part de par le large spectre de types cellulaires pouvant accommoder ses besoins de facteurs de transcription. Les autres stimulateurs viraux ne partagent pas cette caractéristique, les virus papova du polyome, JCV, LPV et des virus de la leucémie humaine des cellules T HTLV-I, II et III démontrant une spécificité cellulaire (Schlokot et Gruss, 1986).

1.2.2.2. Les stimulateurs transcriptionnels cellulaires.

Les stimulateurs cellulaires se regroupent sous deux rubriques: les stimulateurs inductibles; les stimulateurs spécifiques à un type cellulaire et les stimulateurs temporels.

Les stimulateurs inductibles répondent sélectivement à une variété de stimuli: hyperthermie, métaux lourds, facteurs de croissance et stéroïdes, infection virale. Structuralement, ils semblent beaucoup plus simplement constitués

que leurs homologues viraux. L'inductibilité semble consignée en de très courtes séquences d'ADN. La stimulation est généralement proportionnelle au nombre de copies de l'élément (Dudler et Travers, 1984; Goodbourn et al., 1985) et la cinétique d'attachement des facteurs de transcription démontre un phénomène de coopérativité (Tsai et al., 1988).

Une famille intéressante de stimulateurs inductibles répondent à la sollicitation de complexes stéroïde-récepteur (Cato et al., 1986; Giguère et al., 1986; Miesfield et al., 1986; Godowski et al., 1987). Le mécanisme par lequel la stimulation est induite, à savoir quelle entité s'attache au stimulateur, le récepteur vide auquel s'attachera plus tard l'hormone ou le complexe récepteur-hormone déjà formé, reste encore obscur malgré le fait que les gènes codant pour les récepteurs de l'oestrogène (Green et al., 1986), des glucocorticoïdes (Miesfield et al., 1986) et progestérone (Jeltsch et al., 1986) ont été clonés et séquencés.

L'infection virale et de l'ARN double-brin synthétique activent le stimulateur du gène du β -interféron (Goodbourn et al., 1985). Le motif de base de ce stimulateur est répété 5 fois en amont du gène et le nombre de motifs requis pour l'obtention d'une production maximale d'interféron varie d'une lignée cellulaire à l'autre. Tout comme le stimulateur MMTV, le stimulateur β -interféron est réprimé lorsque non-sollicité (Goodbourn et al., 1986).

Les stimulateurs spécifiques à un type cellulaire répertoriés jusqu'à maintenant sont nombreux: chymotrypsine,

insuline (Ohlsson et Edlund, 1986), élastase (Kruse et al., 1988), β -actine (Kawamoto et al., 1988), pour n'en nommer que quelques uns. Les stimulateurs les mieux étudiés sont de la famille des gènes des immunoglobulines à chaînes légères (κ) et lourdes (μ) (Voss et al., 1986). Le stimulateur de la chaîne lourde (IgC μ) fut retrouvé dans l'intron entre les régions connectrice et constante (Gillies et al., 1983). L'activité *in vivo* de ce stimulateur est limité aux cellules lymphoïdes B et quelques cellules T mais l'identification des facteurs de transcription s'y attachant a démontré qu'ils sont présents dans les cellules B, T et HeLa (Schlokot et al., 1986; Sen et Baltimore, 1986a). Une situation similaire a été démontrée chez les gènes de chaîne légère et un facteur, NF- κ B, a été retrouvé sous une forme inactive dans plusieurs lignées cellulaires. Ces facteurs inactifs doivent être modifiés avant de pouvoir s'attacher au stimulateur, suggérant que le contrôle de l'expression génique de ces facteurs de régulation comporte une importante composante post-traductionnelle (Sen et Baltimore, 1986b). Ainsi, les facteurs de transcription sont disponibles beaucoup plus rapidement, ayant déjà été transcrits et traduits.

1.2.3. Méthodes de repérage et d'identification d'éléments de contrôle de la transcription.

Les efforts investis dans l'étude des éléments de contrôle de l'expression génique sont justifiés puisqu'en ces éléments se retrouvent consignées une grande partie des di-

rectives régissant des événements cellulaires à grande échelle comme l'embryogenèse et la différenciation cellulaire. Mais, comment repérer ces éléments et les identifier comme tel? Plusieurs voies stratégiques sont utilisables; en voici quelques unes.

Les approches générales.

Une approche générale consiste à conceptualiser une méthode de trappage fonctionnel. Il s'agit de rechercher dans un génome des séquences de nucléotides capables de se substituer fonctionnellement à un promoteur ou un stimulateur. Un protocole, développé par le groupe de Schaffner, fait appel à l'utilisation d'un virus SV40 duquel le tandem répétitif de 72pb a été retiré (Weber et al., 1984). Le virus sans stimulateur est linéarisé et co-transfecté dans des cellules de rein de singe CV-1 avec l'ADN hétérologue investigué, sous forme soniquée ou digérée. Par un processus de ligation intracellulaire, le virus déficient est secouru par un stimulateur présent chez l'ADN hétérologue et les centres infectieux résultants sont repérés sur les mono-couches cellulaires transfectées. Le système a été utilisé avec un fragment du virus du polyome, une longue séquence répétitive terminale (LTR) du virus de Rous, la région précoce du cytomégalovirus et le génome entier soniqué d'herpès saimiri (Weber et al., 1984); tous ont produit du virus infectieux et depuis, les stimulateurs du cytomégalovirus (Boshart et al., 1985) et d'herpès saimiri (Schirm et al., 1985) ont été caractérisés. Une va-

riante de leur technique a été utilisée pour identifier un stimulateur chez le virus de l'hépatite B (Tognoni et al., 1985). Toutefois, leur tentative d'utilisation du système sur de l'ADN génomique cellulaire a été infructueuse.

Le désavantage majeur de ce système est que la cellule récipiendaire de la transfection doit accommoder la répllication de l'origine de SV40, d'où l'utilisation des cellules CV-1. Or, beaucoup de stimulateurs cellulaires décrits jusqu'à maintenant requièrent pour fonctionner des facteurs de transcription retrouvés que dans des types cellulaires bien précis. Le système de trappage fonctionnel se doit donc de pouvoir opérer dans une variété de lignées cellulaires. De plus, une limite de taille restreint la quantité d'ADN pouvant être emballé dans le manteau du virus.

Une approche similaire a été utilisée par le groupe d'Hamada. Le protocole consistait à transfecter dans des cellules humaines un plasmide contenant un gène marqueur, celui de la chloramphénicol acétyltransférase (cat) (Hamada, 1986a) ou de la xanthine-guanosine phosphoribosyltransférase (gpt) (Hamada, 1986b), en aval du promoteur démuné de son stimulateur, de l'antigène grand T de SV40. Le plasmide s'intègre dans le génome et des transformants stables GPT⁺ sont sélectionnés. Des bibliothèques génomiques sont constituées pour repêcher les plasmides intégrés et les séquences environnant leur point d'intégration dans le génome. L'approche a été utilisée dans l'isolation de stimulateurs actifs dans les cellules embryonnaires carcinomateuses P19 (Bhat et al.,

1988). Selon des travaux récents de ce groupe, ces stimulateurs seraient dérivés de l'élément de transposition ETn un rétroposon endogène actif pendant les stades embryonnaires précoces (Okamoto et al., 1990). De plus, ce système, qui fut conçu spécifiquement pour repêcher des stimulateurs cellulaires, lorsqu'utilisé avec les cellules HeLa, a repêché le stimulateur du virus du papillome humain HPV 18 dont on savait les cellules HeLa infectées (Swift et al., 1987).

Dans le cadre d'une approche générale, nous avons formulé un concept de vecteurs permettant de rechercher des éléments de contrôle de la transcription. Il sera décrit en détail dans l'introduction du chapitre 3 mais en voici le principe. Notre système comporte deux vecteurs plasmidiques contenant le gène de l'antigène grand T de SV40: chez pVE, on retrouve, en amont de l'unité transcriptionnelle, le promoteur de grand T sans stimulateur; chez pHS102, c'est l'inverse, on retrouve le stimulateur de SV40 sans promoteur, en amont de l'unité transcriptionnelle. Des fragments d'ADN provenant de digestions génomiques sont ligués dans ces vecteurs, ces derniers sont transfectés dans des cellules eucaryotes et la capacité des fragments insérés à promouvoir ou à stimuler la transcription est évaluée par visualisation de l'antigène T en immunofluorescence et par dosage des messagers par analyse Northern, lors de protocoles d'expression transitoire.

Les approches spécifiques.

Des approches plus spécifiques sont également disponibles. Par exemple, pour étudier l'attachement d'une protéine tel un facteur de transcription, il est nécessaire de la purifier, comme ce fut fait avec Sp1 (Briggs et al., 1986; Kadonaga et Tjian, 1986) et une protéine s'attachant à la séquence CAAT (Jones et al., 1987). La protéine purifiée est alors utilisée pour identifier les éléments qu'elle réussit à protéger d'une digestion à l'ADNase I (Sp1: Jones et Tjian, 1985; Ishii et al., 1986).

L'étude détaillée de la structure d'un facteur de transcription et de son mode d'action requiert le clonage du gène codant le facteur en question. La protéine disponible sert alors à produire des anticorps qui permettront, en un second temps, d'isoler des clones de bibliothèques génomiques. Le gène isolé, l'unité transcriptionnelle et sa périphérie peuvent être séquencés (Sp1: Kadonaga et al., 1987), et les éléments de contrôle identifiés par expériences de mutagenèse.

Avec la technique d'hybridation connue sous le vocable "South-Western", on peut arriver à identifier les fragments génomiques contenant des éléments de contrôle compatibles avec des facteurs de transcription immobilisés sur membrane. De là, on peut cloner et identifier l'unité transcriptionnelle que contrôle le stimulateur. Si l'unité transcriptionnelle s'avère être codante pour un nouveau facteur de transcription, comme ce serait le cas à l'intérieur d'une cascade hiérarchique de contrôle, le cycle entier peut-être

répété à nouveau jusqu'à l'identification de tous les facteurs participant à la cascade de contrôle.

Nous envisageons l'utilisation d'une stratégie de la sorte dans nos études des mécanismes de contrôle de la différenciation cellulaire. Nous comptons utiliser le produit d'un oncogène viral pour, en un premier temps, perturber la différenciation normale des cellules embryonnaires carcinomateuses P19, en un second temps, identifier les gènes et promoteurs que perturbe le produit de l'oncogène et, en un troisième temps, établir des corrélations entre les niveaux d'expression des gènes affectés et les manifestations phénotypiques, morphologiques ou immunocytologiques observées. Les expériences décrites au chapitre 6 représentent nos travaux préliminaires dans cette avenue de recherche.

1.2.4. Le fragment Bgl II N de l'herpès simplex type 2.

Le système de vecteurs que nous avons développé se devait d'être mis à l'essai sur un génome de taille réduite, tout comme l'ont fait Schaffner et Hamada. Nous avons choisi le virus de l'herpès simplex type 2 (HSV-2), pour plusieurs raisons.

1.2.4.1. Génétique du virus de l'herpès simplex type 2.

Le virus HSV-2 est un virus à double brin d'ADN linéaire de 140kb, enveloppé dans une coquille protéinique double de forme icosaédrale. L'homme est l'hôte naturel mais plusieurs autres espèces animales peuvent également être in-

fectées. Après l'infection primaire au site d'introduction, le virus peut passer à un stade prolongé de latence pendant sa résidence, présumée, dans le ganglion sensitif de la fibre nerveuse innervant le site d'introduction (Knipe, 1982). Extrêmement lytique chez des cellules en culture, HSV-2 l'est beaucoup moins *in vivo*, le système immunitaire de l'hôte étant présumément apte à faire partiellement échec à cette activité du virus (Glorioso et al., 1984). Ce génome viral, en période de latence, semble résider sous une forme linéaire, non-concatamérique et majoritairement non-intégrée (Wigdahl et al., 1984).

Les virus de l'herpès sont regroupés en trois catégories (Spear et Roizman, 1981). Les alphaherpèsvirinae, incluant entre autres HSV-1 et HSV-2, ont un cycle reproductif court, infectent une large variété de cellules et sont fortement cytopathiques. Les betaherpèsvirinae, regroupant les cytomégalovirus, affichent un cycle reproductif long et infectent un nombre limité de types cellulaires. Les gammaherpèsvirinae, auquel groupe appartient le virus Epstein-Barr et l'herpès saimiri, se répliquent surtout chez des cellules lymphoblastoïdes, l'infection étant fréquemment arrêtée à un stade prélytique.

Le cycle de croissance d'HSV-2 est donc rapide. Le nouvel ADN viral est synthétisé 3 heures après l'infection et les nouveaux virions apparaissent 6 heures après l'infection. Une cinquantaine de polypeptides viraux ont été identifiés chez des cellules infectées, et regroupés en trois groupes:

α , β et γ . La synthèse des trois groupes est régulée de façon coordonnée et se réalise dans un ordre séquentiel, à la manière d'une cascade.

Les gènes α sont transcrits entre 2 et 4 heures post-infection et sont surtout impliqués dans l'activation de la transcription de plusieurs gènes β (Persson et al., 1985). Le polypeptide d'E1A d'adénovirus peut se substituer fonctionnellement à celui de l' α -4 d'HSV-2. Les gènes β sont activés entre 5 et 7 heures post-infection. Parmi les produits de ces gènes, on retrouve l'ADN-polymérase, la ribonucléotide réductase et la thymidine kinase. Un ou plusieurs polypeptides β sont nécessaires pour réaliser la terminaison de la synthèse des polypeptides α et, concurremment, pour activer l'expression des gènes γ . Les polypeptides γ s'assemblent pour former la structure centrale du virion.

1.2.4.2. Transformation cellulaire par HSV-2.

Les virus de l'herpès, types 1 et 2, font partie de la famille des virus tumorigéniques à base d'ADN (Spear et Roizman, 1981; Knipe, 1982), tout comme l'herpès saimiri (DesRosiers et al., 1985) et le cytomégalovirus. Des stimulateurs puissants ont été identifiés chez l'herpès saimiri (Schirm et al., 1985) et le cytomégalovirus (Boshart et al., 1985). Bien que les stimulateurs en question ne soient pas co-linéaires avec les fragments transformants, celui du cytomégalovirus fait partie des séquences virales retenues à l'intérieur du génome cellulaire après la transformation (DesRosiers, 1981;

Schirm et al., 1984), d'où la suggestion que des stimulateurs sont possiblement impliqués dans le phénomène de transformation. Une séquence s'apparentant fonctionnellement à des stimulateurs a été identifiée (Lang et al., 1984) à proximité d'un gène "très précoce" ("immediate-early", pour les distinguer des gènes précoces, "early")), l' α -4, du virus d'HSV-1.

Herpès simplex type 2 démontra initialement la capacité de transformer des cellules embryonnaires (Wilkie et al., 1974). Deux groupes démontrèrent que le fragment Bgl II N (7kb; 0.58-0.62uc) de la souche 333 d'HSV-2 était capable de transformation cellulaire (Reyes et al., 1980; Galloway et al., 1980; Galloway et McDougall, 1981). Un autre groupe identifia le fragment Bgl II C (0.41-0.58uc), comme fragment transformant dans la souche S-1 (Jariwalla et al., 1979, 1980, 1983, 1986). A l'époque, aucune séquence résiduelle n'a pu être désignée comme étant maintenue dans les lignées cellulaires transformées par des fragments d'HSV-2 (Galloway et McDougall, 1981); l'hypothèse d'un "frappe-et-court" fut proposée pour expliquer l'évidence expérimentale (Galloway et McDougall, 1983). De plus, chez les lignées morphologiquement transformées, seules des protéines virales des classes β et γ ont été détectées (Spear et Roizman, 1981). Depuis, un autre groupe a démontré le maintien de deux sous-fragments de Bgl II N dans des cellules transformées (Saavedra et Kessous-Elbaz, 1985).

Les unités transcriptionnelles contenues dans le fragment Bgl II N ne codent pas pour des gènes très précoces

(Jenkins et Howett, 1984) auxquels on trouve souvent associé des stimulateurs. Le fragment Bgl II N d'HSV-2 et le fragment co-linéaire d'HSV-1 codent pour les mêmes gènes (Draper et al., 1984), bien que le fragment d'HSV-1 ne démontre pas de potentiel transformant. La délétion de séquences à partir des extrémités de Bgl II N suivi d'un protocole de formation de focus sur des cellules NIH 3T3 permit à Galloway et al. (1984) de suggérer que le fragment minimal est de 737pb, puis à Howett et Jenkins (1984) de raccourcir la longueur minimale du fragment à 227pb. Ces résultats ne constituent pas la preuve définitive de l'implication de ces fragments dans l'activité transformante puisque le nombre de focus observés est très près des valeurs représentant le bruit de fond de la technique.

Néanmoins, on identifia à l'intérieur du fragment de 737pb et du 227pb des séquences répétitives s'apparentant aux séquences d'insertion. Les séquences intervenant entre les deux séquences répétitives possèdent la complémentarité nécessaire pour former une structure secondaire en épingle à cheveux, la séquence équivalente chez HSV-1 étant incapable de le faire (Galloway et al., 1984). Une observation similaire fut rapportée pour Bgl II C (Jones et al., 1986). La littérature suggère encore d'autres hypothèses à l'égard du mécanisme par lequel le fragment Bgl II N transforme (Huszar et Bacchetti, 1983; Danovich et Frenkel, 1988; Macnab et al., 1988), mais les preuves fermes manquent toujours.

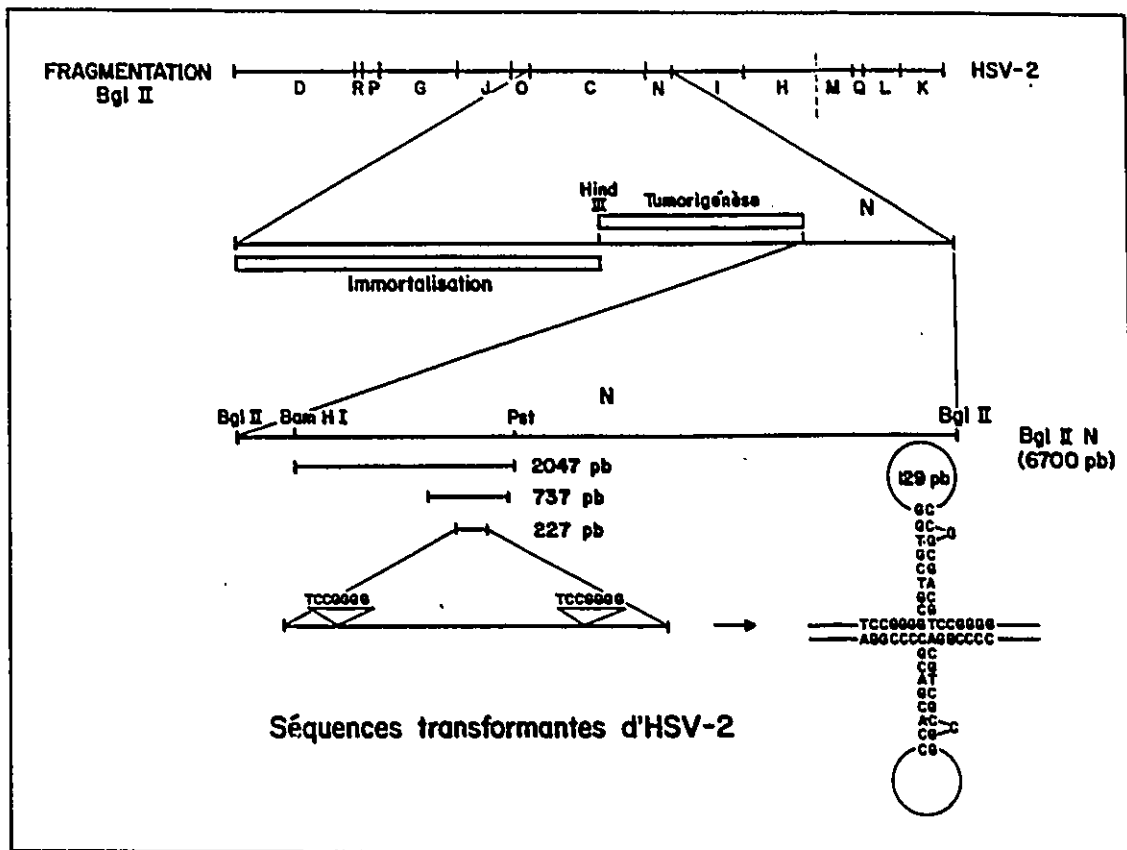


Figure 1.2.: Les fragments transformants d'HSV-2.

La partie supérieure de la figure représente la fragmentation d'HSV-2 avec l'endonucléase Bgl II, ainsi que la nomenclature des fragments résultants. Deux fragments d'HSV-2 sont présumés transformants, Bgl II C (Jariwalla et al., 1979) et Bgl II N (Galloway et al., 1980). La deuxième partie de la figure résume les données présentées par Jariwalla et al., (1979, 1980, 1983, 1986) suggérant que la moitié gauche de Bgl II C est impliquée dans l'activité d'immortalisation alors que la moitié de droite serait impliquée dans l'activité tumorigénique. La troisième partie de la figure résume les données présentées par Galloway et al. (1980, 1984), Galloway et McDougall (1981, 1983) et Howett et Jenkins (1984) suggérant que l'activité transformante de ce fragment se retrouve consignée en un court segment de Bgl II N, capable de former une structure secondaire en forme d'épingle à cheveux.

Pour les fins de notre travail, nous retenons qu'il serait intéressant de savoir: 1) si des stimulateurs sont présents chez Bgl II N; 2) si des présumés promoteurs de phases de lecture ouverte (PLO) non-assignées sont présents et peuvent être activés par un stimulateur; 3) le cas échéant, si les séquences en question sont impliqués dans le processus de transformation cellulaire. Nous avons donc effectué une recherche de séquences de type stimulateur chez Bgl II N du virus HSV-2 et examiné les promoteurs d'un sous-fragment transformant de Bgl II N avec notre système plasmidique.

1.2.5. Le stimulateur du gène pgk-1 de souris.

Le gène pgk-1 de souris présente de l'intérêt pour les embryologistes. Ce gène est localisé sur le chromosome X, et dans les cellules somatiques femelles, un des deux chromosomes X est la cible d'un phénomène d'inactivation durant les étapes initiales de l'embryogenèse (Gartler et Riggs, 1983; Monk, 1986), phénomène qui rend le chromosome inactif et hétérochromatique chez tous les descendants mitotiques de cellules somatiques. Le phénomène d'inactivation coïncide avec la différenciation (Monk et Harper, 1979). Le génome mammifère recèle deux gènes codant l'activité phosphoglycérate kinase: le gène pgk-1, situé sur le chromosome X, actif dans toutes les cellules somatiques et les cellules germinales pré-méiotiques; le gène pgk-2, localisé sur un autosome (le chromosome 17 chez la souris, Adra, 1988), est actif exclusivement chez les cellules germinales mâles post-méiotiques (Van-

deBerg, 1985). Une hypothèse du mécanisme d'inactivation propose que l'inactivation s'instaure initialement à un centre d'inactivation (Xci) pour ensuite se propager au reste du chromosome X. Des travaux impliquant l'utilisation de translocations X-autosomes chez la souris ont permis de cartographier le locus Xci; ce dernier est situé à proximité, 4-5 uc, du locus pgk-1 (Cattanach et Papworth, 1981). Plus d'un mécanisme semble impliqué dans le phénomène d'inactivation, la méthylation de l'ADN semblant être un des procédés auxquels le phénomène fait appel (Riggs, 1975; Mohandas et al., 1981; Monk, 1986).

Les mécanismes de contrôle de l'expression des gènes localisés sur le chromosome X, à proximité du Xci, présentent donc un intérêt particulier puisqu'une composante de ces mécanismes est vraisemblablement impliquée dans le phénomène d'inactivation du chromosome X.

Des collègues de mon laboratoire ont identifié, lors de l'analyse du promoteur du gène pgk-1 de souris (Adra et al., 1987), une séquence à proximité du promoteur qui agit comme un stimulateur (Adra, 1988). Le promoteur s'est avéré capable d'initier la transcription de certains promoteurs hétérologues. Comme certains stimulateurs stimulent adéquatement certains promoteurs hétérologues, il est devenu intéressant d'évaluer la capacité du stimulateur de pgk-1 d'en faire autant. Le 4.5kb de séquence en amont de pgk-1 a également été soumis à une recherche de séquences stimulatrices.

1.3. Les cellules embryonnaires carcinomateuses.

Les faibles quantités de matériel que procurent les embryons imposent des restrictions quant aux méthodes analytiques utilisables dans l'investigation des mécanismes du développement mammifère. Les systèmes de culture de tissus, comme les lignées de cellules embryonnaires carcinomateuses de souris, facilitent grandement les choses puisque, en plus de procurer amplement de matériel, elles sont différenciables en un spectre constant de types cellulaires.

1.3.1. Les tératocarcinomes.

L'utilisation de cellules embryonnaires carcinomateuses représente un système modèle intéressant pour l'étude de la détermination et différenciation cellulaires (Graham, 1977). L'évidence expérimentale justifiant cet énoncé se résume à ce qui suit.

Les tératocarcinomes sont formés de cellules différenciées et non-différenciées (Stevens, 1967). Seule la composante de cellules non-différenciées du tératome, appelée carcinome embryonnaire (EC), peut produire, après injection, des tumeurs arborant un spectre de cellules différenciées (Kleinsmith et Pierce, 1964). Les caractéristiques biochimiques (Damjanov et Solter, 1974) et morphologiques (Damjanov et al., 1971) des cellules EC sont très proches de celles des cellules pluripotentiellles retrouvées à la formation de l'embryon. Les cellules EC, lorsqu'injectées dans un blastocyste qui, à son tour, est implanté dans l'utérus d'une souris en

pseudo-grossesse, participeront à la génération d'un souris chimérique sans tumeurs, démontrant ainsi que les cellules EC participent à la formation de l'embryon (Papaioannou et al., 1975; Illmensee, 1978). Les cellules EC représentent une alternative adéquate à l'embryon en regard de l'étude des événements entourant les stades physiologiques de la péri-implantation durant lesquelles un faible nombre de cellules embryonnaires se différencient de façon extensive.

La lignée de cellules embryonnaires carcinomateuses utilisée au cours de ces travaux est la lignée P19S18 (McBurney et Rogers, 1982). Les cellules proviennent d'une tumeur solide produite par la transplantation d'un embryon de souris C3H au jour 7.5 dans le testicule d'une souris adulte de même lignée. Peu de différenciation est observée lors d'agrégation en absence d'agents inducteurs.

1.3.2. La différenciation in vitro de cellules embryonnaires carcinomateuses.

Les cellules EC en suspension se différencient en un spectre limité de types cellulaires différenciés. Par contre, lorsque les cellules soumises à un régime de différenciation sont laissées en suspension au dessus de surfaces auxquelles elles ne peuvent adhérer, le spectre de types cellulaires obtenu est plus large (Martin et Evans, 1975a, 1975b).

L'agrégation suivie d'une exposition pendant 48 heures à des concentrations d'acide rétinoïque supérieure à $10^{-7}M$ induit la différenciation en neurones, cellules gliales et

des cellules s'apparentant à des fibroblastes (Jones-Ville-neuve et al., 1983; McBurney et al., 1983). Les neurones obtenus ainsi semblent prendre de la maturité avec le temps, en acquérant la capacité de produire différents neurotransmetteurs (McBurney et al., 1988; Sharma et Notter, 1988).

L'agrégation et l'exposition, pendant 96 heures, de cellules EC à une concentration de 1% en sulfoxyde de diméthyle (DMSO) induit la différenciation en cellules musculaires striées (Edwards et al., 1983) qui représentent de 10 à 30% de la population différenciées après 10 jours. Les myocytes mononucléés observés présentent des caractéristiques cytologiques de muscles cardiaques (Smith et al., 1987). Plusieurs agents inducteurs provoquent la différenciation (Rudnicki et McBurney, 1987) bien que les mécanismes par lesquels ils opèrent ne sont pas encore élucidés. Il semble toutefois assez fermement établi que l'agrégation et la morphologie de la cellule jouent des rôles prépondérants dans la différenciation (Campione-Picardo et al., 1985; Smith et al., 1987; Watt et al., 1988).

1.3.3. Expression génique et différenciation cellulaire.

Les oncogènes sont intéressants en regard de l'étude de l'expression génique au cours de la différenciation cellulaire. Les oncogènes sont évidemment connus pour les rôles qu'ils jouent dans l'immortalisation et l'acquisition d'un phénotype transformé chez la cellule en culture et la tumo-

rigénèse *in vivo*. Une facette moins spectaculaire de leurs activités est mise en évidence par le fait que certains oncogènes sont exprimés dans des cellules différenciées non-mitotiques spécifiques, suggérant des rôles n'ayant rien à voir avec le contrôle de la croissance cellulaire.

1.3.3.1. Les oncogènes et la transformation cellulaire.

Une soixantaine d'oncogènes d'origine virale et cellulaire ont été répertoriés jusqu'à maintenant et classés selon la localisation intracellulaire de leur produit. Les oncogènes nucléaires regroupent, entre autres, *myc*, *N-myc*, *p53*, grand T de SV40, grand T de polyome, *E1A* d'adénovirus. Les oncogènes cytoplasmiques regroupent *ras*, *src*, *erbB*, *neu*, moyen T de polyome (voir revue de Weinberg, 1985).

La localisation du produit de l'oncogène semble fréquemment consigner ce dernier à certains types de fonction. Par exemple, les oncogènes nucléaires immortalisent efficacement mais sont de pauvres promoteurs de l'indépendance envers l'ancrage à un support solide, alors que la situation inverse prévaut chez les oncogènes cytoplasmiques. Il est effectivement observé qu'individuellement, les oncogènes nucléaires et cytoplasmiques n'induisent la transformation que dans des conditions spécifiques mais en utilisation conjointe, ils collaborent pour induire la transformation cellulaire chez des cellules normales, via un effet complémentaire plutôt qu'additif. Autre différence notoire, à l'instar de leurs homologues nucléaires, huit oncogènes cytoplasmiques ont démontré la ca-

pacité d'induire la sécrétion de facteurs de croissance. De plus, les oncogènes nucléaires sont activés par une dérégulation des concentrations cellulaires de leurs produits alors que les oncogènes cytoplasmiques sont activés par des mutations affectant la structure de leur produit.

La division des tâches semble relativement claire et commande d'emblée un travail coopératif de la part des oncogènes. On note toutefois certaines exception à la règle. L'antigène grand T de SV40, dans certaines conditions, est retrouvé à la fois dans le noyau et le cytoplasme (Colby et Schenk, 1982; Kriegler et al., 1984; nos propres observations, chapitre 6) et, dans ces conditions, conduit au phénotype transformé. Il semble que certaines fonctions de l'antigène petit T de SV40 (Loeken et al., 1988) complémente grand T pour la production du phénotype transformé (Choi et al., 1988).

Les produits des oncogènes viraux s'associent fréquemment, sous forme de complexes, avec des oncogènes cellulaires. L'antigène moyen T du polyome se complexe avec pp60^{c-src} (Courtneidge et Smith, 1983) et augmente l'activité tyrosine kinase de pp60 par un facteur de 30 à 50 fois (Bolen et al., 1984), E1A d'adénovirus se lie et neutralise un anti-oncogène le gène du rétinoblastome (Whyte et al., 1988), E1B d'adénovirus se lie à p53 (Sarnow et al., 1982), l'antigène grand T de SV40 augmente la stabilité métabolique de p53 par un facteur de 50 en complexant ce dernier (Reich et al., 1983). Plusieurs oncogènes se lient au même facteur cellulaire, suggérant ainsi des voies communes d'immortalisation/transformation (Dyson et

al., 1989; Ewen et al., 1989). Les produits des oncogènes sont également trouvés associés à bon nombre de protéines cellulaires non-oncogéniques.

1.3.3.2. Les oncogènes et la différenciation cellulaire.

L'évidence expérimentale suggérant que la prolifération et la différenciation cellulaires sont des processus apparentés est vaste (voir revue sur la question, Müller, 1986). La prolifération est une activité qui précède dans le temps et qui s'interrompt partiellement tout juste avant la différenciation. Certains facteurs de croissance, notamment, sont également des facteurs de différenciation (Metcalf, 1985). Par exemple, le produit de l'oncogène c-sis est similaire au facteur de croissance spécifique PDGF, ceux de c-erb-B et de c-fms semblent être des récepteurs de facteur de croissance spécifiques à des types cellulaires.

Le cas le plus clair où un proto-oncogène semble impliqué dans un phénomène de différenciation cellulaire découle de l'observation que le gène c-src est fortement exprimé dans les cellules du système nerveux chez le poussin, le rat et la drosophile, alors que ces dernières n'ont aucun besoin en termes de croissance (Sorge et al., 1984; Brugge et al., 1985). Il apparaît donc possible que c-src n'est pas impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire. De plus, on observa qu'à l'instar des astrocytes, les neurones semblent altérer structuralement la portion N-terminale de

pp60^{c-src}, modification qui augmente l'activité spécifique de la kinase par un facteur de 6 à 12 fois.

C-fos, l'analogue cellulaire de l'oncogène viral de l'ostéosarcome, démontre de son côté un patron d'expression spécifique au tissu, au type cellulaire et au stage de développement (Müller et al., 1984). De plus, l'expression forcée de c-fos dans des cellules de tératocarcinome F9 (Müller et Wagner, 1984) et d'autres lignées cellulaires non-différenciées (Leibovitch et al., 1987; Müller et al., 1985) provoque la différenciation de ces dernières en cellules de type endodermique. Un bon nombre d'autres ont l'effet contraire, bloquant, à des degrés divers, la différenciation (Coppola et Cole, 1986; Falcone et al., 1985; Freytag, 1988; Olson et al., 1987; Payne et al., 1987; Prochownik et Kukowska, 1986; Webster et al., 1988). Si une augmentation des niveaux d'expression de certains oncogènes cellulaires accompagne le déroulement de la différenciation, le niveau d'expression de certains autres est supprimé, comme c'est le cas de c-myc et c-myb pendant la différenciation des cellules HL60 (Mitchell et al., 1985; Müller et al., 1985).

1.4. Le projet de thèse.

Nous avons utilisé plusieurs approches expérimentales dans notre étude des mécanismes de contrôle de l'expression génique. Dans le chapitre 3, nous avons validé notre système de vecteurs plasmidiques permettant l'identification

de séquences comportant des éléments de contrôle de la transcription. L'utilisation du système sur le fragment Bgl II N d'HSV-2 a permis de démontrer l'absence de stimulateur puissant auquel l'activité transformante du fragment ne peut conséquemment être relié. De plus, le fragment transformant ne possède pas de phase de lecture ouverte non-assignée activable.

Le chapitre 4 examine de plus près la limite de détection du système de vecteurs décrits au chapitre 3. Cette étude a généré de l'évidence expérimentale permettant de suggérer un modèle de transformation cellulaire pour Bgl II N selon lequel ce dernier contient des séquences dirigeant l'intégration au génome cellulaire à proximité de puissants éléments de contrôle de la transcription.

Au chapitre 5, nous examinons le promoteur du gène pgk-1 de souris. Nous démontrons que le promoteur de pgk-1 est transcriptionnellement deux à trois fois plus actif que celui de SV40 chez les cellules P19. De plus, le stimulateur de pgk-1 ne stimule pas efficacement le promoteur de SV40.

Au chapitre 6, nous examinons l'effet de la présence de l'antigène grand T de SV40 pendant la différenciation de cellules P19. Nous démontrons que grand T affecte différemment les cellules différenciées en suspension et en mono-couche. Nos observations suggèrent une influence probable de grand T sur le mécanisme de détermination cellulaire. Nous croyons que grand T sera un outil utile dans l'étude de la détermination et la différenciation cellulaires.

Chapitre 2: Matériel et méthodes.

2.1. Appareillage.

Les principaux appareils utilisés dans l'exécution des travaux de cette thèse sont les suivants:

Centrifugeuse Beckman J2-21;

Spectrophotomètre Beckman DU-7;

Compteur à scintillation Beckman LS7800;

Densitomètre au laser LKB Ultrosan XL.

Pulvérisateur (polytron) Kinematica, modèle PT 10-35.

2.2. Fournitures, produits chimiques et biochimiques.

Les fournitures et les réactifs chimiques furent obtenus des Produits Chimiques BDH (Toronto, Ontario), Fisher Scientifique Ltée (Montréal, Québec), et de Sigma Chemical Company (St-Louis, Missouri), à moins d'indication contraire. Les réactifs biochimiques furent obtenus de Boehringer-Mannheim Canada (Dorval, Québec), GIBCO-BRL (Burlington, Ontario), Pharmacia-LKB (Montréal, Québec) et New-England Biolabs (Beverly, Massachusetts), à moins d'indication contraire. L'anticorps NF160 provient de Boehringer-Mannheim Canada. Les radionucléotides et les membranes Hybond-N furent obtenus d'Amersham Canada Ltée (Oakville, Ontario). Les ensembles de réactifs pour la production de ribosondes provenaient de Promega.

2.3. Méthodes: Biologie Moléculaire.

Une bonne partie des protocoles décrits ci-dessous est inspirée de procédures décrites dans Maniatis et al., (1982).

2.3.1. Préparation de bactéries compétentes pour transformation.

L'hôte utilisé pour la transformation est l'*Escherichia coli*, de souche DH5. La procédure de transformation est une méthode au chlorure de rubidium décrite par Hanahan (1985). Essentiellement, les bactéries décongelées sont rayées sur de l'agar 0.75% dans du bouillon SOB (tryptone 2%, extrait de levure 0.5%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM) et incubées pour la nuit à 37°C. Une vingtaine de colonies sont dispersées dans 200ml de milieu SOB pré-réchauffé à 37°C, dans un flasque de 2l. Le bouillon est incubé à 37°C, avec agitation vigoureuse, jusqu'à obtention d'une lecture turbidimétrique de 0.5 à 550nm. Le flasque est alors plongé dans un mélange glace-eau et agité pendant 5 minutes, après quoi le bouillon est centrifugé à 5000 × g, à 4°C, pendant 10 minutes. Le culot est repris dans 1/3 du volume initial (70ml) de solution RF1 glacée (RbCl 100mM, MnCl₂ 50mM, AcOK 30mM, CaCl₂ 10mM, glycérol 15% (p/v), pH 5.8). Le mélange est maintenu sur glace pendant une heure puis centrifugé à 5000 × g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est repris dans 1/12 du volume initial (16ml) de solution RF2 glacée (MOPS 10mM, RbCl 10mM, CaCl₂ 75mM, glycérol 15% (p/v), pH 6.8). Le mélange est maintenu sur glace pendant 15-60 minutes. Le mélange est alors

aliquoté puis congelé à -70°C ou encore utilisé immédiatement en transformation.

2.3.2. Transformation bactérienne.

Un maximum de 100ng d'ADN plasmidique est utilisé en transformation. L'ADN est dilué dans 100 μl de RF2. Si l'ADN est dans de l'agarose à bas point de fusion, un maximum de 30 μl est alors dilué à 100 μl dans du RF2 à 37°C , puis refroidi sur glace-eau. A la solution d'ADN froide, on mélange vigoureusement 200 μl de bactéries compétentes. Le mélange est maintenu sur glace pendant 10-60 minutes. Les cellules sont alors soumises à un choc hyperthermique, en les plongeant dans un bain d'eau à 42°C pendant 90 secondes, suivi d'un retour immédiat sur glace-eau. On ajoute 1.2ml de milieu TB (tryptone 12g, extrait de levure 24g, glycérol 4ml, dissous dans 900ml H_2O ; après stérilisation ajout de 100ml d'une solution stérilisée par filtration de 0.17M en KH_2PO_4 et 0.72M en K_2HPO_4). Le mélange est agité à 37°C pendant 30 minutes, puis centrifugé à basse vitesse. Le culot est repris dans 50-100 μl de TB et étendu sur des boîtes d'agar 0.75%-TB contenant 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tétracycline ou 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ampicilline, selon le gène de résistance porté par le plasmide.

2.3.3. Mini-préparative d'ADN plasmidique.

La méthode utilisée est une variante de celle décrite par Birnboim et Doly, (1979). Un nombre variable de colonies sont prélevées des boîtes de sélection afin d'inoculer

un nombre égal de bouillons TB de 1ml, contenant l'antibiotique approprié. Les bouillons sont incubés sous agitation vigoureuse à 37°C pour 16-24 heures. Les bouillons sont centrifugés pendant 15 secondes dans une centrifugeuse Eppendorf modèle 5413. Les culots sont repris vigoureusement dans 100µl de tampon de lyse (glucose 50mM, CDTA 10mM, TRIS 25mM, pH 8.0) auquel on rajoute 4mg/ml de lysozyme, puis le tout est maintenu à température ambiante pendant 5 minutes. On ajoute alors 200µl de solution dénaturante (NaOH 0.2N, SDS 1%) fraîchement préparée, on mélange le tout et on incube sur glace pendant 5 minutes. On ajoute ensuite 150µl d'une solution d'AcOK 3M et d'acide formique 1.8M, on mélange le tout et on incube sur glace pendant 5 minutes. On centrifuge le tout pendant 5 minutes à froid dans une centrifugeuse Eppendorf. Le surnageant est extrait avec un volume équivalent d'un mélange 1:1 de phénol-chloroforme. La concentration en NaCl est ajustée à 100mM, et la précipitation effectuée avec 2 volumes d'éthanol à -20°C. L'ADN plasmidique est finalement culoté par centrifugation et repris dans 50µl de TE (TRIS 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0) contenant 10µg/ml d'ARNase H. L'ADN est conservé dans cet état à -20°C.

2.3.4. Maxi-préparative d'ADN plasmidique.

La méthode est une variante de celle décrite par Birnboim et Doly, (1979). Les étapes initiales sont très similaires et les solutions identiques à celles décrites pour la mini-préparative mais les proportions décrites ci-dessous

sont plus critiques afin d'assurer un rendement optimal. Un bouillon 500ml de TB contenant un antibiotique approprié est inoculé et incubé à 37°C avec agitation vigoureuse pendant 20-24 heures. Le bouillon est refroidi sur glace-eau pendant 15 minutes puis centrifugé à 5000 × g pendant 10 minutes. Le culot est repris dans 50-100ml d'eau doublement distillée, stérile et glacée, puis recentrifugé dans les mêmes conditions.

Le culot est repris dans 27ml de glucose-CDTA-TRIS. On ajoute au mélange homogène 3ml de glucose-CDTA-TRIS contenant 30mg/ml de lysozyme. On incube sur glace pendant 30 minutes, en agitant le mélange de temps à autre. On ajoute 60 ml de solution dénaturante et on mélange doucement jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. On incube sur glace pendant 30 minutes. Finalement, on ajoute 45ml de solution AcOK-acide formique et on agite jusqu'à obtention d'un abondant précipité blanc amorphe. On incube sur glace pendant 30 minutes. Le mélange est centrifugé à 15,000 × g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est précipité à l'éthanol glacé puis recentrifugé comme auparavant. Le précipité est repris dans 8ml de tampon acétate-MOPS (AcONa 100mM, MOPS 50mM pH 8.0). L'ADN est reprécipité avec de l'éthanol glacé puis centrifugé comme auparavant.

Le précipité est repris dans 4ml d'eau puis on ajoute 4.5ml de tampon MOPS-LiCl (MOPS 50mM, LiCl 5M). On incube sur glace pendant 15 minutes puis on centrifuge comme auparavant. Le surnageant est incubé à 65°C pendant 15 minutes puis centrifugé comme auparavant. Le surnageant est précipité

à l'éthanol glacé puis centrifugé. Le culot est repris dans 4ml d'acétate-MOPS puis précipité à l'éthanol glacé et centrifugé.

Le précipité est repris dans 2ml de tampon de chargement (NaClO₄ 6M, TRIS 50mM, CDTA 10mM, pH 8.0). On y ajoute 20ml de tampon de chargement contenant 2g de fibres de verre provenant de filtres Whatman GF/A broyés au mortier. Le tout est placé sur un culbuteur pour 20 minutes. Le mélange est alors lentement filtré sur une filtre Nalgene .45μ. La fibre de verre est lavée avec 80ml de tampon de chargement puis l'ADN est élué de la fibre de verre en lavant cette dernière avec 10ml de tampon d'élution (NaClO₄ 0.2M, TRIS 60mM, CDTA 10mM, pH 8.0). La concentration d'AcONa de l'éluat est ajusté à 0.3M puis la précipitation effectuée avec 2 volumes d'éthanol glacé. La solution est conservé à -20°C pour la nuit puis centrifugé pendant 30 minutes. Le culot translucide est repris dans 400μl de TE, la concentration en NaCl ajustée à 100mM, puis l'ADN est précipité avec de l'éthanol glacé. La solution est centrifugée et le précipité repris dans 500μl de TE. L'ADN est conservé sous cette forme à -20°C.

2.3.5. Isolation d'ADN génomique eucaryote de haut poids moléculaire.

La méthode d'extraction utilisée est une variante de celle décrite par Blin et Stafford (1976). L'extraction se fait sur des cellules en culture. Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS (NaCl 140mM, KCl 3mM, KH₂PO₄ 1.5mM,

Na₂HPO₄, 7mM). On ajoute 2ml de tampon de lyse (TRIS 10mM, NaCl 10mM, EDTA 10mM, SDS 0.5%, pH 8.0) contenant 50µg/ml de protéinase K à chaque boîte de culture de 100mm de diamètre. La solution visqueuse est incubée à 37°C pour la nuit. Le lysat est extrait au phénol équilibré à pH 8.0 puis au chloroforme. On dilue suffisamment d'ARNase dans le lysat pour obtenir une concentration finale de 50µg/ml et on incube 30 minutes à 37°C. On extrait une fois au chloroforme puis on ajuste la phase aqueuse à 300mM en AcONa et on précipite avec deux volumes d'éthanol glacé. La masse "cotonneuse" est retirée de la solution éthanolique avec un embout de pipette et repris dans 100µl de TE. L'ADN est conservé à 4°C.

2.3.6. Digestion endonucléasique de l'ADN.

L'ADN plasmidique est digéré avec 2-3 unités d'enzyme/µg d'ADN dans le tampon et les conditions d'incubation recommandés par le fabricant de l'enzyme. L'ADN génomique est digéré avec 10 unités d'enzyme/µg d'ADN pour une nuit.

2.3.7. Déphosphorylation de l'ADN.

Les groupements 5'-phosphates sont éliminés par traitement à la phosphatase intestinale de veau (CIP). Le volume de la digestion endonucléasique est quintuplée puis on ajoute 1/10 du volume final en tampon CIP 10X (TRIS 50mM, MgCl₂ 1mM, ZnCl₂ 10µM, spermidine 1mM, pH 9.0) et 1 unité de CIP.

Pour une extrémité cohésive 5', on incube à 37°C pendant 15 minutes, on rajoute 1 unité de CIP et incube pour 15 minutes supplémentaires. Pour une extrémité franche ou cohésive 3', on incube 15 minutes à 37°C puis 15 minutes à 56°C. On refroidit à 37°C, on ajoute 1 unité de CIP, et on répète le cycle d'incubation à 37°C et 56°C. On extrait le mélange au phénol et au chloroforme suivi d'une précipitation à l'éthanol, si l'ADN n'est pas destiné à être électrophorésé.

2.3.8. "Réparation" d'extrémités cohésives en 5' ou 3'.

La méthode utilisée est celle décrite par Maniatis et al. (1982). Un μg d'ADN plasmidique à réparer est extrait au phénol et au chloroforme puis précipité à l'éthanol. Le précipité est repris dans $9\mu\text{l}$ d'eau à laquelle on rajoute $10\mu\text{l}$ de tampon 3X (3X= TRIS 150mM, MgSO_4 30mM, DTT 300 μM , albumine bovine (fraction V) 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$), et $10\mu\text{l}$ de nucléotides 3X (3X=dATP, dCTP, dGTP, TTP: 300 μM chacun, pH 7.0). On ajoute 2 unités du fragment Klenow de l'ADN-polymérase et incube à température ambiante pendant 30 minutes. L'enzyme est dégradé par incubation à 65°C.

2.3.9. Isolation de fragments d'ADN plasmidique.

Les fragments d'ADN résultant de digestions endonucléasiques destinés à des protocoles de ligation sont préalablement purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à bas point de fusion (ABPF). L'agarose est dissoute dans un tampon TRIS-borate (20X= TRIS base 2M, acide borique 1.2M, EDTA.Na,

20mM), les tampons phosphate inhibant les ligations subséquentes. Les gels d'agarose ABPF sont coulés dans des mini-moules horizontaux à des concentrations d'agarose de 0.6% (p/v) pour des fragments de 200pb à 2.5kb, de 0.8% pour des fragments de 2.5 à 5kb et de 1% pour des fragments de taille supérieure à 5kb. Les digestions endonucléasiques, traitées ou non à la phosphatase, sont diluées au volume représentant celui du puits du gel avec un tampon de chargement à base de sucrose ou de glycérol. L'électrophorèse est menée dans un tampon TRIS-borate à un voltage qui dépend du niveau de difficulté de la séparation à exécuter. Après migration, le gel est coloré au bromure d'éthidium (5µg/ml) pendant 2-5 minutes puis décoloré pendant 10-45 minutes. Les bandes d'intérêt sont identifiées en éclairant le gel à l'aide d'une lampe U.V. (366nm) à main. Les bandes d'intérêt sont découpées à la lame de rasoir.

2.3.10. Ligation de fragments d'ADN.

A quelque rares exceptions, presque tous les fragments destinés à être ligués sont préalablement purifiés par électrophorèse sur agarose à bas point de fusion (voir section 2.3.9). Les tranches d'agarose contenant les ADN sont fondues à 65°C. Les volumes d'agarose représentant 150ng d'ADN de chacun des fragments à liguer sont mélangés ensemble. Leur volume total est doublé avec de l'eau. On ajoute 1/4 du volume final de mélange de ligation 5X (5X= TRIS pH7.6 0.25M, MgCl₂ 50mM, ATP 5mM, DTT 5mM, PEG 8000 25% (p/v)). On ajoute 1 unité de

ligase T4 par tranche de 20 μ l de volume final. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 60 minutes, s'il s'agit d'une ligation de bouts cohésifs 5', pendant 16 heures, s'il s'agit d'une ligation de bouts francs ou cohésifs 3'. Le mélange est alors incubé à 65°C pendant 10 minutes puis soumis au protocole de transformation (voir section 2.3.9).

2.3.11. Isolation d'ARN total cellulaire.

La méthode utilisée est une variante de la méthode décrite par Auffray et Rougeon (1980). Les cellules sont trypsinisées de la façon habituelle (voir section 2.4.1). La suspension cellulaire est diluée dans 10 volumes de milieu sans sérum puis centrifugée à basse vitesse. Le culot de cellules est placé sur glace après quoi 2ml / 75cm² de surface trypsinisée, d'une solution glacée d'urée 8M - LiCl 3M est ajouté au tube. La lyse est complétée par une agitation brève mais vigoureuse sur un agitateur de type vortex.

Le lysat est ensuite homogénéisé sur un appareil de type Polytron. Le mélange est incubé pendant 16-48 heures à 0-4°C. L'ARN précipité est recueilli par centrifugation à 8000 $\times$ g, à 4°C, pendant 30 minutes. Le précipité est lavé trois fois avec du LiCl 3M glacé à l'aide d'une seringue tuberculine. Le précipité resuspendu est centrifugé pendant 5 minutes à 4°C dans une centrifugeuse Eppendorf à chaque fois. L'ARN est finalement repris dans 400 μ l d'eau traitée au DEPC. L'ARN est conservé ainsi à -70°C.

2.3.12. Electrophorèse de l'ARN sur gel de formaldéhyde.

La méthode utilisée est une variante de celle décrite par Maniatis et al. (1982). La concentration d'ARN est évaluée par spectrophotométrie. L'équivalent de 20µg d'ARN est précipité à l'éthanol. Le précipité est repris dans 20µl d'une solution composée de formamide 50%, formaldéhyde 17% dans un tampon MOPS 1X (10X= MOPS 0.2M, AcONa 50mM, EDTA 10mM, pH 7.0). L'échantillon est incubé à 70°C pendant 5 minutes, bien repris au pipetteur et incubé de nouveau pour 5 minutes. L'échantillon est immédiatement transféré sur un mélange glace-eau jusqu'au chargement sur le gel. On ajoute à chaque échantillon 2µl de tampon de chargement (xylène cyanole 0.5%, bleu de bromophénol 0.5%, MOPS 1X, bromure d'éthidium 3µg/ml, glycérol 50%) et on charge sur un gel horizontal (pré-électrophorésé / 30 minutes) d'agarose 1.2% dans MOPS 1X, formaldéhyde 17%. Le gel est mis sous tension à 5-6 volt/cm pendant 4 heures avec recirculation constante du tampon d'électrophorèse (MOPS 1X). Le gel est photographié puis trempé dans l'eau avant l'installation du transfert Northern.

2.3.13. Transferts Southern et Northern.

Les gels d'ADN sont immergés dans une solution dénaturante (NaOH 0.5N, NaCl 1.5M) et agités dans celle-ci pendant 60 minutes. Ils sont ensuite neutralisés par immersion et agitation dans une solution contenant TRIS 1M pH 7.0 et NaCl 1.5M pendant 30 minutes. Les gels sont alors renversés sur 2-3 épaisseurs de papier Whatman 3MM saturé en tampon SSC

20X (NaCl 3M, citrate de sodium 0.3M). Une membrane combinée de nitrocellulose montée sur nylon (Hybond-N d'Amersham) est installée sur le gel, le tout coiffé de deux épaisseurs de papier 3MM. Ces dernières épaisseurs sont saturées en eau puis on y installe une épaisseur de plusieurs centimètres d'essuie-mains commerciaux et un poids de 500g à 1kg. Le transfert requiert de 6 à 12 heures. La membrane est récupérée du montage et emballée dans du papier Saran pour une exposition de 1 minute sur un illuminateur UV. La membrane est ensuite lavée dans du SSC 2X pendant 10 minutes avant d'être ensachée.

La procédure est essentiellement la même pour les transferts Northern. Les différences résident dans l'utilisation d'un tampon SSPE (20X= NaH_2PO_4 0.2M, EDTA 2mM, NaCl 3.6M, pH 7.7) en remplacement du SSC et on ne soumet pas les gels au traitement dénaturation-neutralisation.

2.3.14. Hybridation de transferts Southern et Northern.

La méthode utilisée est une variante de celle décrite par Southern (1975). Les membranes à hybrider sont scellées dans des sacs auxquels on a ajouté 50ml de mélange de pré-hybridation (formamide 50%, SDS 0.1%, SSC 6X (Southern) ou SSPE 5X (Northern), Denhardt's 5X (5X= albumine de sérum bovin 0.1%, polyvinylpyrrolidone 0.1%, Ficoll 0.1%), ARNt de levure 0.1mg/ml, ADN dénaturé de sperme de saumon 0.2mg/ml). Les sacs sont incubés à 50°C pendant 15-60 minutes pour les Southern, à 57°C pendant 1-24 heures pour les Northern. Les solutions

des sacs sont alors remplacées par des solutions de préhybridation fraîches auxquelles on a rajouté les ribosondes.

L'hybridation se fait à 50°C pendant 16 heures pour les Southern, à 57°C pendant 16-48 heures pour les Northern. Les membranes sont ensuite lavées pendant 2 x 30 minutes dans SSC 1X, SDS 0.1% à température ambiante et 2 x 30 minutes dans SSC 0.1X, SDS 0.1% à 65°C pour les Southern; 3 x 20 minutes dans SSPE 0.1X, SDS 0.1-0.4% à 65°C pour les Northern. Les membranes sont scellées à nouveau et exposées contre du film Kodak XAR-5 à -70°C dans des cassettes à double écrans intensificateurs de type Lanex.

2.3.15. Préparation de sondes radioactives.

Les sondes utilisées sont de type ribsonde. La méthode de préparation utilisée est le protocole suggéré par le manufacturier de l'ensemble de réactifs (Promega). Les séquences utilisées comme sondes étaient clonées dans pGEM-3/4 et les tailles des sondes générées se retrouvaient dans la fourchette de 300pb à 2.1kb. Essentiellement, la transcription était initiée par la polymérase (SP6 ou T7) générant un messenger complémentaire à la séquence recherchée, sur 1µg d'ADN linéarisé, dans un mélange constitué de TRIS 40mM pH 7.5, MgCl₂ 6mM, spermidine 2mM, NaCl 10mM, DTT 10mM, ATP/GTP/UTP .5mM chacun, CTP "froid" 15µM, et 50µCi d' α -³²P-CTP d'une activité spécifique de 800Ci/mMole. Le gabarit (ADN) de la réaction était éliminé avec l'ADNase RQ1 et les nucléotides non-incorporés par deux précipitations à l'éthanol. Les

sondes utilisées en hybridation étaient diluées dans 300 μ l de mélange de préhybridation puis dénaturées par traitement à 75°C pendant 3 minutes. Elles étaient ensuite refroidies sur glace puis ajoutées au mélange d'hybridation.

2.3.16. Dosage de l'activité β -galactosidasique.

Les boîtes de culture de 100mm couvertes de cellules sont lavées trois fois avec du PBS froid. On ajoute 200 μ l de tampon sucrose (sucrose 250mM, TRIS 10mM, EDTA 10mM, pH 7.5) à chaque boîte et les cellules sont décrochées du plastique avec un policeman. La suspension est transférée dans un tube Eppendorf et maintenue sur glace. Les cellules sont lysées par trois cycles de gel/dégel à -70°C. La suspension est alors centrifugée à froid dans une mini-centrifugeuse pendant 15 minutes.

Les surnageants sont soumis à un dosage protéique. On ajoute 5 à 10 μ l des surnageants à 2ml dans le réactif de Bradford (Bradford, 1976) pour dosage de protéines. Une lecture spectrophotométrique à 595nm est effectuée et le résultat utilisé pour le calcul de la concentration protéique, à l'aide d'une courbe standard de calibration.

Le dosage de l'activité β -galactosidasique est effectué en ajoutant 100 μ g d'extrait cellulaire (typiquement dans un volume de 5 à 50 μ l) à 800 μ l de tampon de dilution (NaPO₄ 100mM, MgSO₄ 1mM, β -mercaptoéthanol 100mM, pH 7.0) et 200 μ l d'o-nitrophényl β -galactopyrannoside (ONPG) (4mg/ml dilué dans le tampon de dilution). La cinétique d'accumulation du produit

de la réaction est enregistrée sur spectrophotomètre à 28°C et 420nm de longueur d'onde. Le pourcentage d'activité relative d'un échantillon X est mesuré en effectuant le rapport de la pente enregistrée pour X sur la pente enregistrée pour le contrôle positif.

2.4. Méthodes: Culture de tissus.

2.4.1. Ensemencement des lignées cellulaires.

Les lignées cellulaires sont maintenues en croissance exponentielle dans un milieu α -MEM de GIBCO comportant 10% de sérum foetal de veau pour les cellules HeLa, 5% de sérum foetal de veau pour les cellules cos, 2.5% de sérum foetal de veau et 7.5% de sérum de veau pour les cellules P19, et 10% (3% lorsqu'en protocole de formation de focus) de sérum de veau pour les cellules NIH 3T3. Les cellules sont détachées des boîtes de culture à tous les 2 jours par lavage avec du PBS suivi d'une incubation à 37°C pendant 5 minutes en présence de 1ml de trypsine-EDTA (trypsine 0.025%, EDTA 1mM, dans PBS). Seules les cellules P19 requièrent une dispersion mécanique vigoureuse à l'aide d'une pipette Pasteur afin d'obtenir une suspension monocellulaire adéquate. Les cellules trypsinisées servent ensuite à réensemencer des boîtes de culture à une densité de 10^4 - 10^5 cellules/ml de milieu, selon la lignée cellulaire et son temps de doublement.

2.4.2. Lignées cellulaires.

La lignée cellulaire humaine HeLa provient d'un carcinome du col utérin (Gey et al., 1952). Elles sont hétéro-ploïdes. La lignée cellulaire P19 est issue d'un tératocarcinome produit par transplantation d'un embryon de souris de souche C3H/HeHa dans le testicule d'une souris mâle de même lignée. Les cellules P19 sont diploïdes et affichent un caryotype mâle normal (40:XY) (McBurney et Rogers, 1982).

2.4.3. Transformation de cellules ~~mammifères~~ avec de l'ADN.

La méthode utilisée est celle décrite par Chen et Okayama (1987). Les cellules à transfecter sontensemencées à une dilution telle que la confluence de la mono-couche cellulaire ne sera pas obtenue avant 48 heures. La transformation est amorcée 8-16 heures après l'ensemencement. L'ADN est stérilisé par précipitation à l'éthanol puis repris dans 500 μ l d'une solution de CaCl₂ 0.25M. La solution d'ADN est maintenue en vortex pendant l'addition goutte à goutte de 500 μ l de tampon BES (BES (acide N,N-bis(2-hydroxyéthyle)-2-aminoéthanesulfonique) 50mM, NaCl 280mM, Na₂HPO₄ 1.5mM, pH 6.96). Le mélange est incubé à température ambiante pendant 20 minutes puis ajouté goutte à goutte au milieu baignant les cellules récipiendaires de l'ADN. Le précipité se forme dans les heures qui suivent; le précipité est retiré après 8-16 heures d'exposition aux cellules. Ces dernières sont ensuite incubées dans du milieu frais pendant 32-40 heures ou 16-24 heures, si les cellules doivent être ultérieurement trypsinisées et re-

prises en culture sur une plus grande surface. Les cellules sont alors prêtes pour les procédures de sélection ou d'extraction auxquelles elles sont destinées.

2.4.4. Sélection en présence de G418.

La concentration de G418 nécessaire pour produire une sélection efficace est évaluée en exposant les lignées cellulaires utilisées en transformation à une fourchette de concentrations croissantes de G418.

Les cellules, issues d'un protocole de transformation ayant introduit une copie fonctionnelle du gène de résistance à l'antibiotique G418, sont alorsensemencées à raison de 5×10^5 cellules/75cm² de surface. Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu frais contenant une dose de sélection de G418, telle que déterminée plus haut. Typiquement, une dose de 400µg/ml est requise pour les cellules P19 et 600µg/ml est requis pour les cellules HeLa. Le milieu de sélection est renouvelé au jour 5 et la sélection se poursuit pour atteindre 8-10 jours au total. Les colonies de cellules sont détachées du support, trypsinisées et amplifiées en maintenant la sélection.

2.4.5. Différenciation de cellules EC P19.

La méthode utilisée est celle décrite par Rudnicki et McBurney (1987). Deux régimes de différenciation sont utilisés: l'exposition des cellules à de l'acide rétinoïque induit les cellules à se différencier en neurones, cellules

gliales et muscle lisse alors que l'exposition au sulfoxide de diméthyle (DMSO) produit des cellules musculaires, incluant du muscle cardiaque.

Les cellules assujetties à un régime de différenciation sont ensemencées dans une boîte de pétri de qualité bactériologique, dans du milieu P19 contenant de l'acide rétinolique à une concentration de $5 \times 10^{-7} M$ ou 1% (v/v) de DMSO. Les cellules en suspension forment des agrégats. Après 48 heures, les agrégats sont sédimentés dans un tube et leur milieu renouvelé avec une seconde dose d'agent inducteur. Au jour 4, 100-200 agrégats sont prélevés, sédimentés et ensemencés dans des boîtes de culture conventionnelles avec du milieu sans agent inducteur. Le milieu est renouvelé tous les 2 jours pour un total de 8 à 10 jours.

2.4.6. Microscopie et immunofluorescence.

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles circulaires de verre, pré-traitées à la gélatine 0.15%. Les lamelles portant les cellules sont lavées avec du milieu sans sérum puis immergées pendant 5 minutes dans du méthanol à $-20^{\circ}C$ puis, pendant 30 secondes dans de l'acétone à $-20^{\circ}C$. Les lamelles sont séchées à l'air ambiant puis rehydratées dans du PBS pendant 20 minutes. Un volume de $50 \mu l$ de solution d'anticorps primaire dilué dans du PBS contenant 5% de sérum est appliqué sur chaque lamelle. Les lamelles sont incubées dans un contenant humidifié pendant 30 minutes à température ambiante ou pendant une nuit à $4^{\circ}C$. Les lamelles sont lavées

trois fois dans PBS pendant 5 minutes à la fois. L'anticorps secondaire portant un groupement chromophore est dilué, appliqué sur les lamelles et lavé de la même façon qu'avec l'anticorps primaire. Les lamelles sont ensuite montées en position inversée sur des lames de microscope en utilisant un milieu de montage constitué de 50% de glycérol dans du PBS. L'examen des lames se fait sur un microscope muni d'un système optique épifluorescent. Les photographies noir et blanc sont produites sur film Ilford XPI 400 alors que les diapositives couleur sont produites sur film Kodak Ektachrome 400.

Les anticorps primaires utilisés dans ce travail apparaissent ci-dessous.

Anticorps	Source	Spécificité	Référence
D2	lapin, polyclonal	grand T de SV40	*
GFAP	souris, monoclonal	astrocytes	**
NF160	souris, monoclonal	neurofilament 160kd	**
MF20	souris, monoclonal	isoforme de myosine muscles striés	Bader et al, 1982.
B4C3	souris, monoclonal	α -actines, muscles lisses et striés	Lessard, 1988.

*: don de Roger Hand, McGill Cancer Research Center, Montréal, Québec.
 **: disponible commercialement, Boehringer Mannheim Canada.

Table 2.1.: Anticorps utilisés en immunofluorescence.

Chapitre 3: Recherche d'éléments de contrôle transcriptionnels chez Bgl II N d'HSV-2.

3.1. Introduction.

Les mécanismes par lesquels s'exerce la spécificité de l'expression génique font l'objet d'une intense activité investigatrice. Cette spécificité, bien qu'elle s'exerce à de multiples niveaux, se manifeste davantage au niveau du contrôle de la fréquence d'initiation de la transcription. Un bon nombre de principes mécanistes gouvernant le contrôle de l'activité transcriptionnelle ont été élucidés par l'étude des séquences de nucléotides retrouvées à proximité d'unités transcriptionnelles.

Quelques approches expérimentales, basées sur le principe du trappage fonctionnel (voir section 1.2.3) ont permis l'isolation et la caractérisation d'un bon nombre de stimulateurs à spectre large ou spécifique. Nous avons développé notre propre système de trappage fonctionnel et l'avons utilisé dans notre recherche de stimulateurs chez le fragment Bgl II N d'HSV-2 et le promoteur pgk-1 de souris.

3.2. Le système de trappage fonctionnel des stimulateurs.

Les approches expérimentales retrouvées dans la littérature font appel à l'utilisation du promoteur, délesté de

son stimulateur, de l'antigène grand T de SV40, avec son unité transcriptionnelle attitrée ou un gène reporteur autorisant un processus de sélection. Le choix du promoteur de l'antigène grand T de SV40 se fonde sur la démonstration que des stimulateurs hétérologues se substituent adéquatement à celui de grand T (de Villiers et al., 1982; Levinson et al., 1982; Lusky et al., 1983) pour stimuler le promoteur de grand T.

Dans notre approche, nous utilisons le promoteur de l'antigène grand T de SV40. Le système fonctionne avec des vecteurs plasmidiques: 1) pour éviter la manipulation plus délicate de virus; 2) pour éviter les limites de taille de l'ADN testé, limites associées à l'utilisation du virus. Chez notre "trappe à stimulateur", le promoteur, délesté de son stimulateur, active la transcription de gènes reporteurs tels l'antigène grand T de SV40 (pVE, figure 3.1; pVEB, figure 3.2), neo (pVEneo) et lacZ (pVEBZ, figure 3.2). Le stimulateur de SV40 est remplacé par un multisite de clonage, autorisant les ligations avec des sites d'endonucléases variés.

Chez notre "trappe à promoteur", le promoteur de grand T, incluant les séquences répétitives de 21pb, est éliminé, ce qui laisse le stimulateur et l'unité transcriptionnelle séparés par un site Bam HI unique (pHS102 et pHS102M, figure 3.1) (Benoist et Chambon, 1981; Moreau et al., 1981).

Le choix de l'antigène grand T de SV40 comme gène reporteur découlait également de la disponibilité d'un bon anticorps polyclonal donnant une forte fluorescence nucléaire et l'abondance de deux messagers caractéristiques en analyse

Northern. Néanmoins, ce choix peut sembler comporter un désavantage significatif de par le fait que le produit du gène inhibe sa propre transcription en s'attachant, entre autres, à l'origine de réplication (Myers et al., 1981). Ce problème n'affecte pas les vecteurs pHS102-102M puisque qu'avec le promoteur s'est envolé un site d'attachement de l'antigène grand T nécessaire à la répression de la transcription (Shalloway et al., 1980; Rio et Tjian, 1983). En ce qui concerne pVE et pVEB, l'effet est probablement significatif mais la puissance du signal analytique devrait adéquatement compenser.

Figure 3.1: Vecteurs utilisés pour la recherche d'éléments de contrôle transcriptionnel.

a) le clone pVE fut construit par délétion de l'ADN entre les sites Eco RI (position 346) et Sph I (position 128) de pSV1BSS. La ligation des sites Eco RI et Sph I produisit un site Eco RI dans lequel fut inséré le multisite de clonage, le fragment Eco RI - Eco RI, de pUC7. Notons que le motif spécifique au facteur de transcription AP-1, situé à la droite du site Sph I, n'est pas éliminé dans cette construction.

b) le clone pSV1 (Benoist et Chambon, 1981) fut construit en ligant le fragment réparé Hpa II - Bam HI (3056pb) de SV40 (souche 776) dans le site Eco RI de pBR322. Le clone pSV1BSS est similaire à pSV1 à l'exception des sites Bam HI et Sph I du gène tet de pBR322 qui ont été détruits.

c) le clone pHS102 (Benoist et Chambon, 1981) résulte d'une délétion de l'ADN entre les positions 5226 et 113 du promoteur de grand T de SV40. Un site Bam HI fut reconstruit à la jonction 5226-113 (Moreau et al., 1981). Le clone pHS102M diffère de pHS102 de par le site Bam HI du gène tet de pBR322 qui a été détruit par un traitement au bisulfite (Shortle et Nathans, 1978); la résistance à la tétracycline est toutefois maintenue (R. Everett, résultats non-publiés).

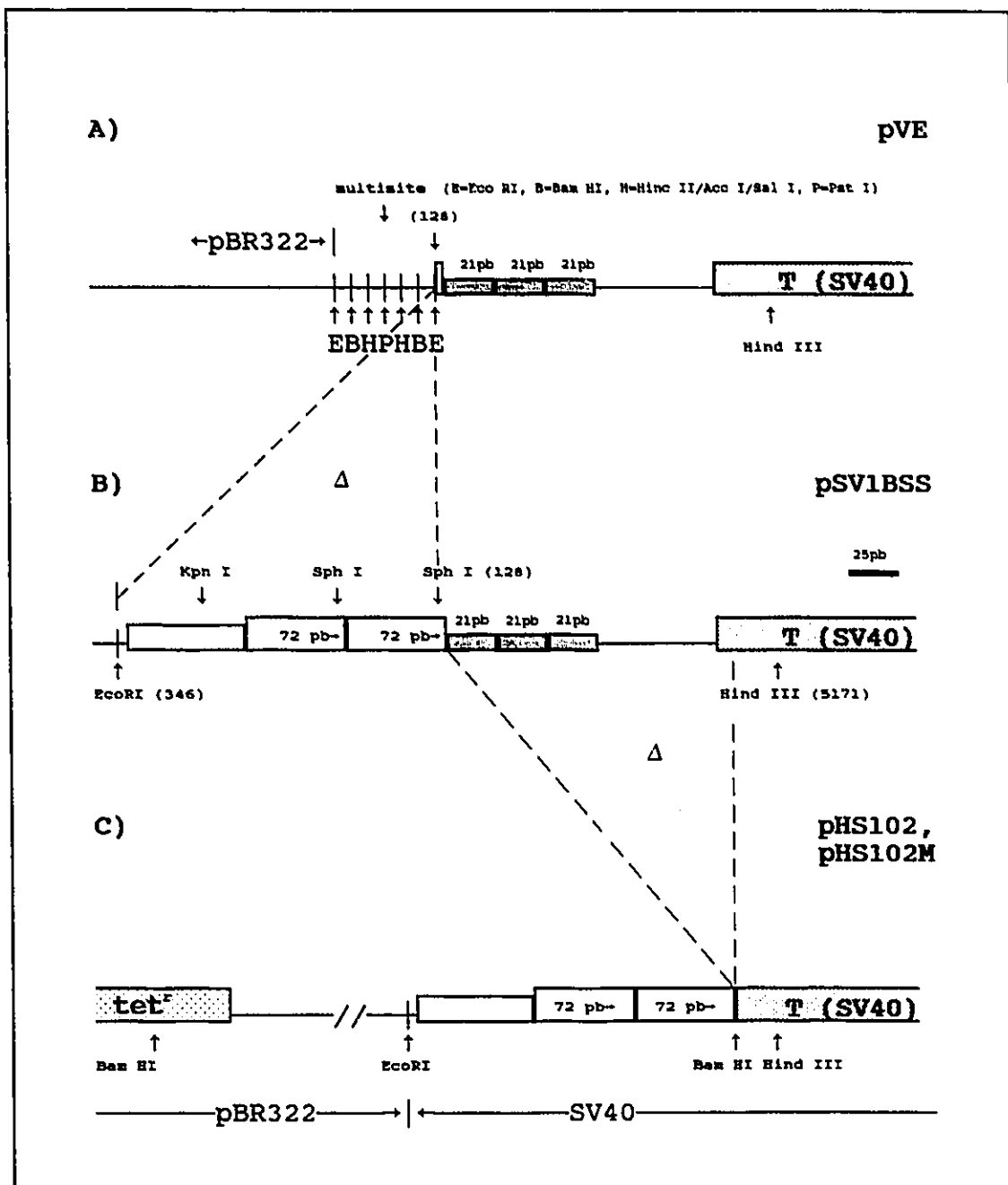


Figure 3.1: Vecteurs utilisés pour la recherche d'éléments de contrôle transcriptionnel.

Figure 3.2: Vecteurs dérivés de pVE.

a) diagramme détaillé des sites d'endonucléases retrouvés dans le multisite de pVE.

b) diagramme détaillé des sites d'endonucléases retrouvés dans le multisite de pVEB. pVEB fut construit en ligant le fragment Hind III - Sph I (200pb) du promoteur de l'antigène grand T de SV40 dans les sites Hind III et Sph I de pGEM3. Le promoteur flanqué du multi-site est extrait du plasmide résultant par Eco RI et Hind III (230pb) et ligué avec le fragment 7.0kb d'une digestion complète pour Eco RI et partielle pour Hind III de pSV1BSS. Le plasmide résultant est coupé avec Eco RI puis reliqué. Les sites uniques apparaissent soulignés.

c) carte des sites d'endonucléases dans la région du promoteur eucaryote de pVEBZ. pVEBZ fut construit en clonant le fragment Hind III - Bam HI (3305pb), contenant lacZ, de pCA B17 XbaI-TaqI 520 lacZ (Adra, 1988) dans les sites Hind III - Bam HI de pSV0neo (voir chapitre 4). Le fragment Hind III (250pb) de pVEB, contenant le promoteur et le multisite, est ensuite inséré dans le site Hind III du plasmide résultant.

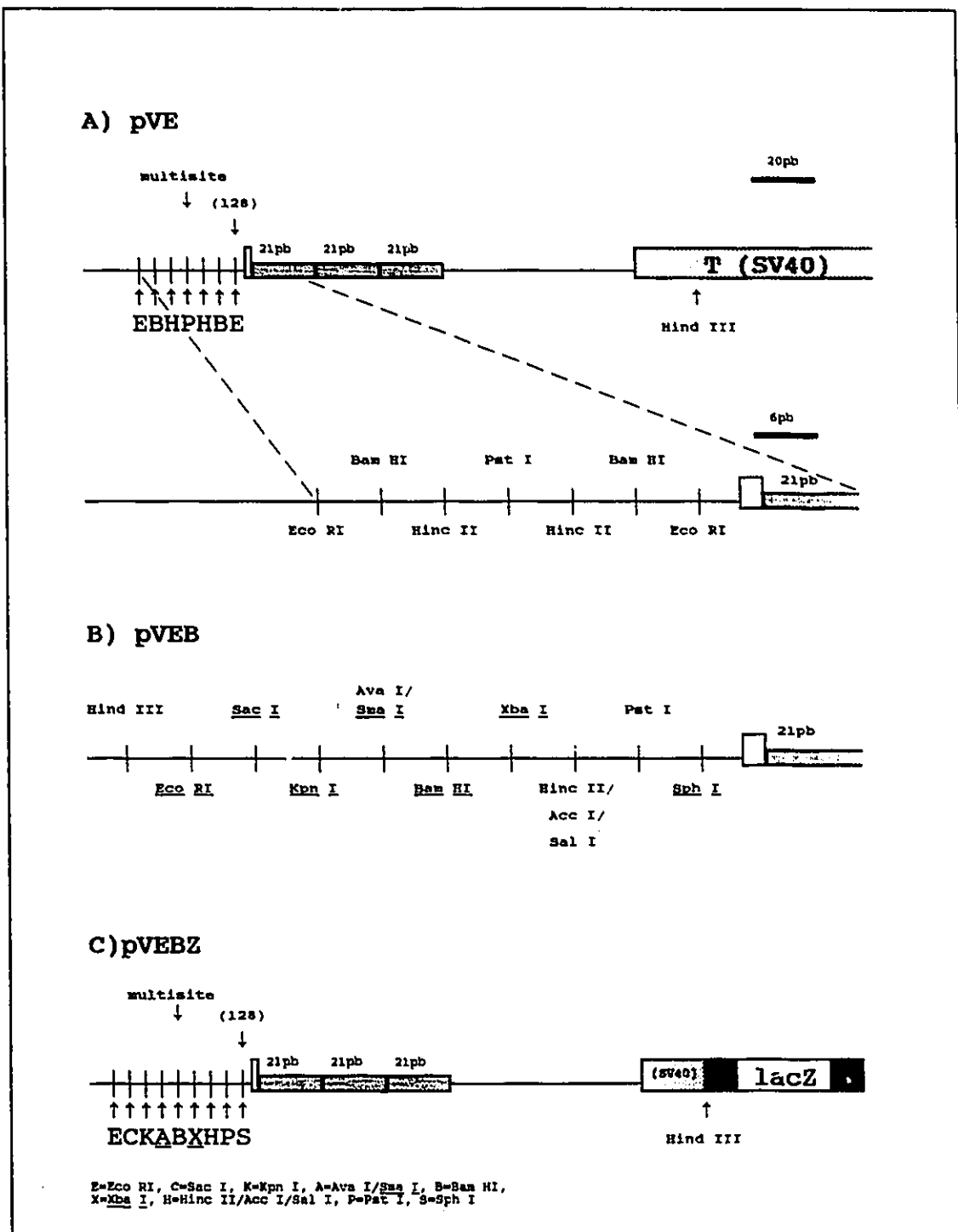


Figure 3.2: Vecteurs dérivés de pVE.

3.3. Résultats.

3.3.1. Construction et validation du système de vecteurs.

Le vecteur pVE comprend le promoteur et l'unité transcriptionnelle de l'antigène grand T de SV40, insérés dans pBR322. Le stimulateur est remplacé par le multisite de pUC7. pVEB est similaire à pVE à l'exception du multisite qui provient de pGEM-3. pHS102 et pHS102M (Benoist et Chambon, 1981) comprennent le stimulateur et l'unité transcriptionnelle de l'antigène grand T de SV40 insérés dans pBR322. L'insertion de promoteur chez pHS102 provoque la perte du stimulateur, permettant de tester le promoteur seul, alors que la même insertion chez pHS102M conserve le stimulateur.

Afin de valider le système, nous avons réinséré le stimulateur de SV40, dans les deux orientations, dans les sites Bam HI de pVE. Le fragment réinséré comprenait les séquences comprises entre les positions 113 et 270, les extrémités étant flanquées de sites Bam HI acquis au cours d'un sous-clonage. Les clones résultants, pVEC1 et pVEC2, représentent les deux orientations. Les contrôles de pHS102-102M ont été faits ailleurs (Benoist et Chambon, 1981).

Nous avons comparé pSV1BSS (contrôle positif, figure 3.1), pVE, pVEC1 et pVEC2 à l'aide d'un protocole d'expression transitoire. Les ADN sont transfectés chez des cellules HeLa par la méthode de précipitation au phosphate de calcium, selon le protocole de Chen et Okayama (1987). Après 48 heures, des cellules sur lamelles de verre sont fixées et

examinées en immunofluorescence pour un dosage qualitatif de l'expression de grand T (figure 3.3). Le résultat démontre une immunopositivité pour grand T chez 10-30% des cellules examinées transfectées avec pSV1BSS, pVEC1 et pVEC2. Aucune cellule positive n'est détectable chez les cellules transfectées avec pVE.

L'ARN de 4×10^6 cellules, extrait selon le protocole de Auffray et Rougeon (1980), est soumis à une analyse Northern afin de pouvoir effectuer un dosage quantitatif de grand T au moyen d'un densitomètre au laser (figure 3.4). Le résultat démontre deux bandes très intenses à 2100 et 2600 nucléotides, représentant les ARNm de grand T et petit T respectivement, chez pSV1BSS, pVEC1 et pVEC2. Aucun signal n'est détectable chez l'échantillon de pVE.

Le système apparaît donc fonctionner adéquatement puisque le rapport signal/bruit de fond est très satisfaisant au niveau des deux méthodes analytiques employées.

3.3.2. Le fragment Bgl II N d'HSV-2 ne recèle pas de stimulateur.

Nous avons amorcé l'étude du fragment Bgl II N en concentrant pour un moment notre attention sur le fragment transformant minimal de 227pb (voir figure 1.2). Le fragment recèle un tandem de séquences répétitives de même orientation, séparés de 129pb, tandem auquel on prête la capacité de former une structure secondaire en forme d'épingle à cheveux (Galloway et al., 1984) (voir figure 1.2). Les structures de la sor-

te trouvent des usages multiples autant dans le monde bactérien qu'eucaryote.

Le fragment en question est délimité par des sites Sau 3A que nous avons doublé de sites Eco RI lors d'un sous-clonage. Le fragment a été inséré dans les deux orientations dans pVE pour donner pVE1 et pVE3. Un protocole d'expression transitoire fut mené avec ces clones. Le clone pVE3 ne produisit aucune cellule immunopositive pour grand T, ni d'ARNm spécifique. Par contre, une cellule sur 10,000 transfectées avec pVE1 était immunopositive et la quantité d'ARNm détecté représentait 1% de la quantité mesurée chez pSV1BSS, le contrôle positif (figure 3.5).

Ce résultat s'est avéré intrigant puisque nous observons une immunopositivité intense chez 0.1% des cellules plutôt qu'une immunopositivité faible chez 10-30% des cellules examinées. Le résultat qualitatif, l'immunofluorescence, nous suggère la présence d'un puissant stimulateur alors que le résultat quantitatif, l'analyse Northern, nous suggère la présence d'un faible stimulateur. Afin de pouvoir analyser le phénomène plus en détail, nous avons remplacé l'unité transcriptionnelle de pSV1BSS, pVE, pVE1 et pVE2 par un gène de résistance permettant de sélectionner la population de cellules normalement immunopositives pour grand T. Les résultats obtenus apparaissent au chapitre 4.

**Figure 3.3: Validation du système de vecteurs:
immunofluorescence.**

Cette figure présente le résultat d'un protocole d'immunofluorescence, la fluorescéine révélant l'antigène grand T (colonne de droite), effectué sur des cellules HeLa, issues d'un protocole d'expression transitoire. La colonne de gauche présente les plans en contraste de phase des panneaux correspondant de la colonne de droite. Les cellules HeLa ont été transfectées avec pSV1BSS (A-B), pVEC1 (C-D), pVEC2 (E-F). Les panneaux G et H représentent un mélange de cellules cos (singe vert) (a), LNSV (humain) (c) et HeLa (humain) (b) servant de contrôle positif chez les lignées d'expression constitutive pour grand T (cos et LNSV) et de contrôle négatif (HeLa). La présence de l'antigène grand T de SV40 donne une forte fluorescence chez 10-30% des noyaux de cellules HeLa transfectées avec pSV1BSS (B). Une proportion équivalente de cellules positives est retrouvée chez les cellules HeLa transfectées avec pVEC1 (C) et pVEC2 (E). Aucune cellule positive n'était détectable avec pVE. L'anticorps primaire utilisé est l'anticorps polyclonal D2 de lapin, dirigé contre grand T. L'anticorps secondaire est un anticorps de chèvre, anti-lapin, conjugué à la fluorescéine. Le trait de référence représente 50 μ .

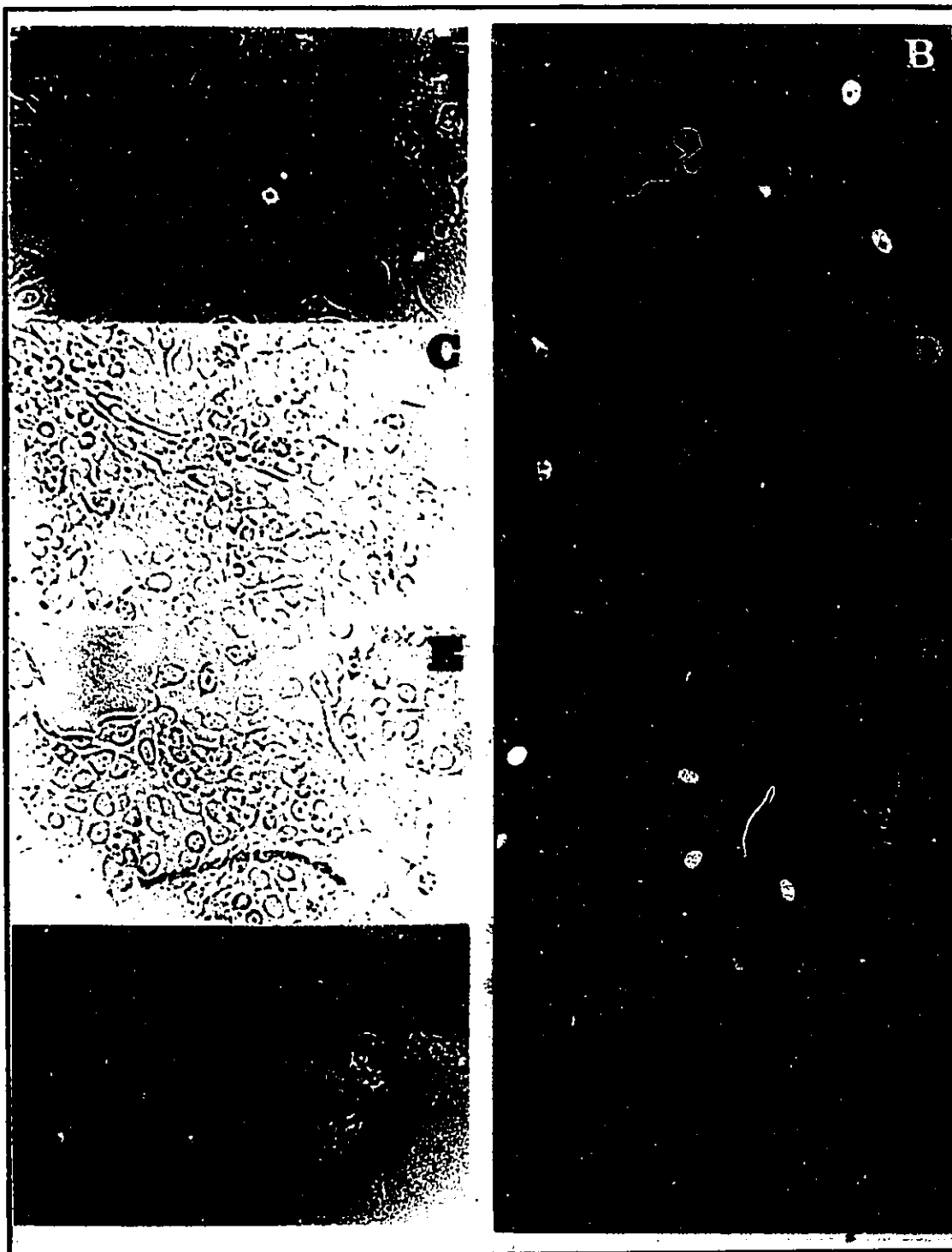


Figure 3.3: Validation qualitative du système de vecteurs.

Figure 3.4: Validation quantitative du système de vecteurs.

Cette figure représente le résultat de l'analyse Northern effectuée sur des échantillons de cellules HeLa issues de protocoles d'expression transitoire. L'ARNm total, 20 μ g par puits, est extrait de cellules transfectées avec pSV1BSS (3), pHS102M (5), pVE (6), pVEC1 (7), pVEC2 (8). Le puits 1 et 2 représentent 20 et 2 μ g respectivement d'ARN extrait de cellules cos exprimant constitutivement grand T. Le puits 4 représente 2 μ g d'ARN de l'échantillon pSV1BSS. Le transfert se fait sur membrane Hybond-N. Les messagers de grand T et petit T sont détectés avec une ribosonde, pGT2, contenant le fragment Hpa I - Hpa I (1067pb) de pSV1BSS. Le panneau A représente une exposition de 4 heures et le panneau B, une exposition de 48 heures de la même membrane. Les bandes inférieure et supérieure représentent les ARNm de grand T et petit T, respectivement. La position de migration des ARN ribosomiaux eucaryotes de 28S et 18S est indiquée. Le panneau C résume les lectures densitométriques effectuées sur ces échantillons.

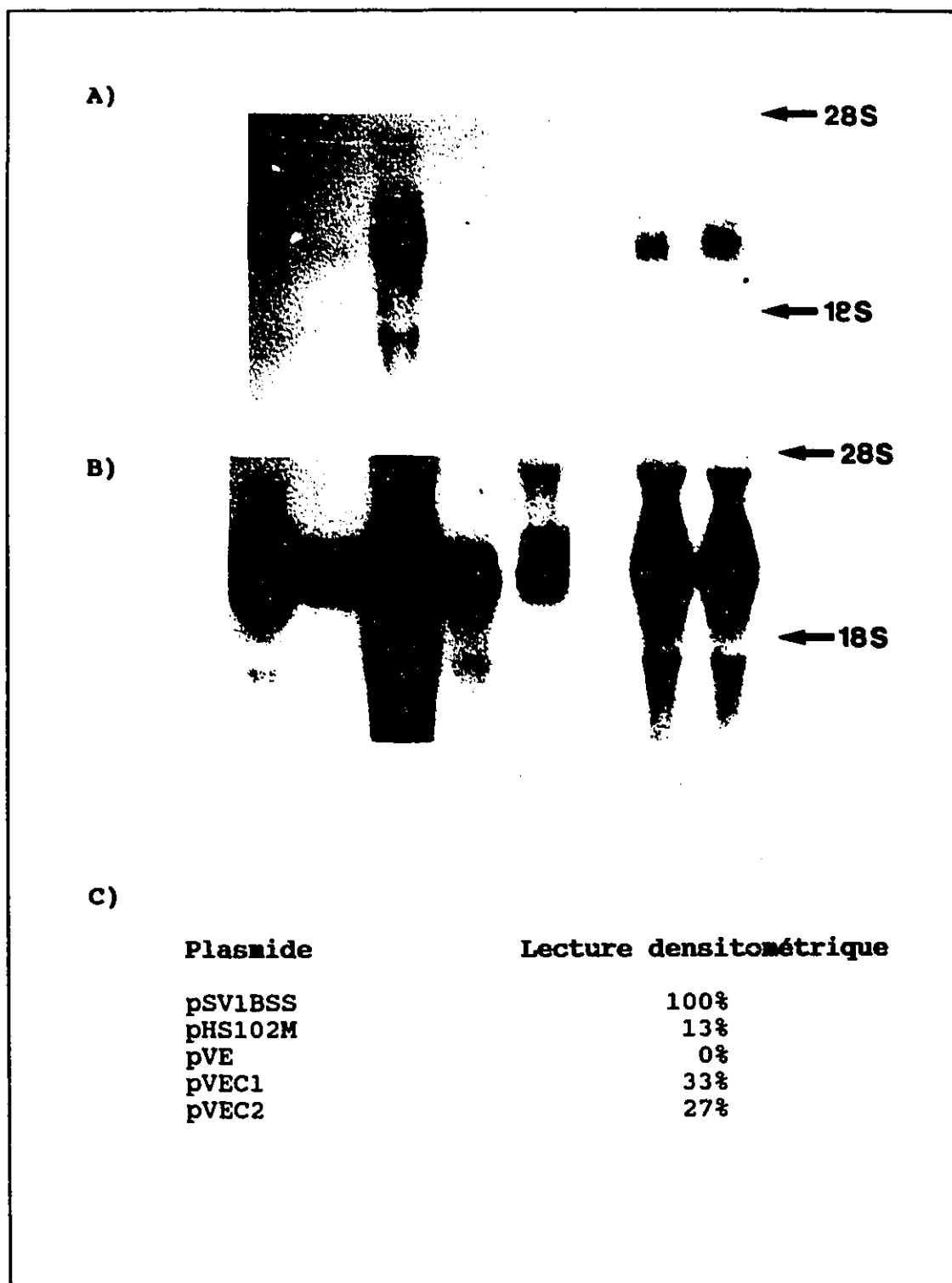
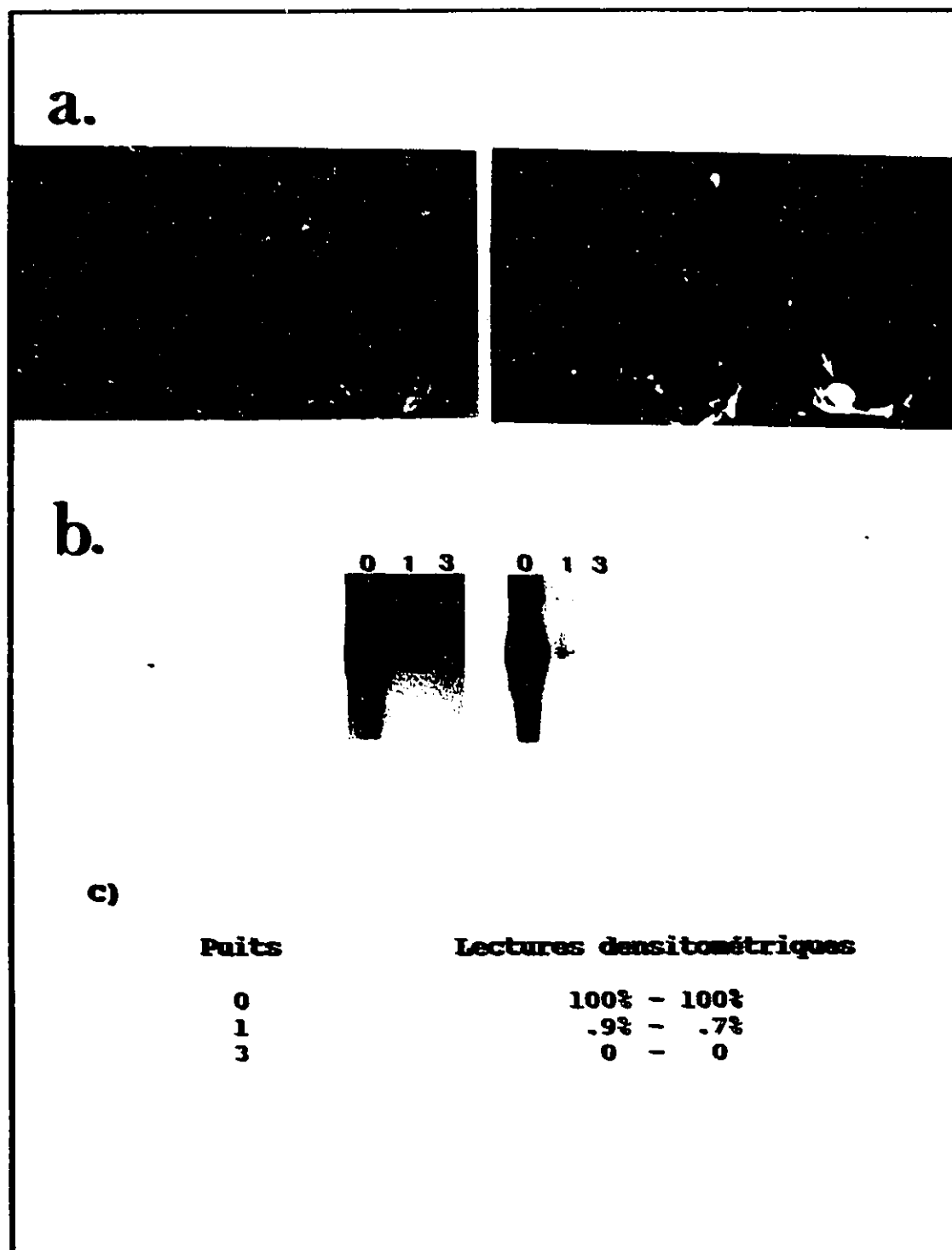


Figure 3.4: Validation quantitative du système de vecteurs.

Figure 3.5: Immunofluorescence et analyse Northern de pVE1 et pVE3.

Cette figure présente le résultat d'un protocole d'immunofluorescence, la fluorescéine révélant l'antigène grand T (panneau A) et d'une analyse Northern (panneau B), effectués sur des cellules HeLa, issues de protocoles d'expression transitoire. Le panneau B représente deux protocoles d'expression transitoire menés avec les mêmes plasmides, à des dates différentes. Les puits 0 représentent le contrôle positif pSV1BSS, les puits 1, pVE1 et les puits 3, pVE3. Le panneau C résume les lectures densitométriques effectuées sur les échantillons. De très rares cellules immunopositives pour grand T apparaissent chez les cellules HeLa transfectées avec pVE1 (A); aucune ne fut aperçue chez les cellules transfectées avec pVE3. La quantité d'ARNm détecté en analyse Northern est compatible avec l'observation faite en immunofluorescence. Les conditions d'utilisation des anticorps en immunofluorescence et de l'analyse Northern sont identiques à celles décrites dans les légendes des figures 3.3 et 3.4, respectivement. Le trait de référence du panneau A représente 50μ .



**Figure 3.5: Immunofluorescence et analyse
Northern de pVE1 et pVE3.**

Le fragment Bgl II N dans son entier fut ensuite examiné pour la présence de stimulateurs. Bgl II N fut fragmenté en 7 sous-fragments, selon le patron apparaissant à la figure 3.6, et les sous-fragments clonés dans pVE. Les clones résultants, pVEN1 à pVEN7, ont été soumis à un protocole d'expression transitoire (voir figure 3.7).

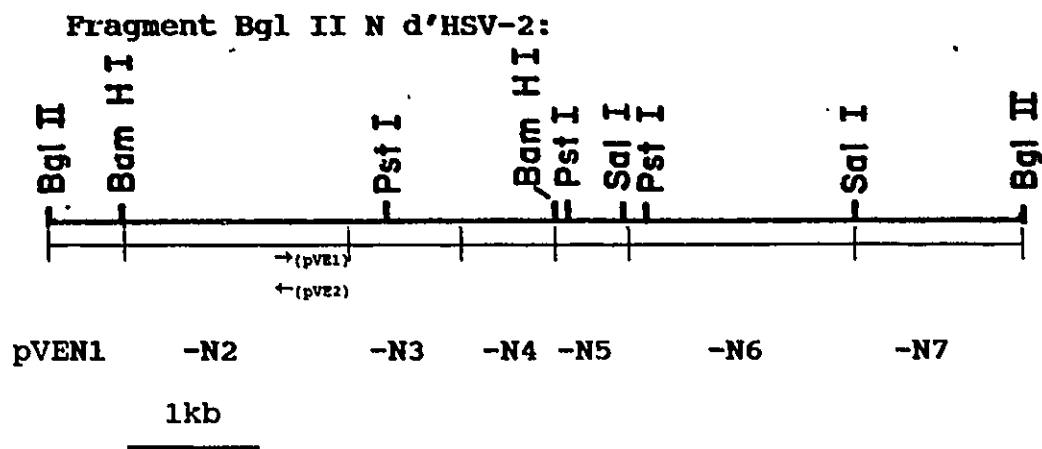


Figure 3.6: Fragmentation de Bgl II N.

Tous les clones ont été négatifs sauf pVEN6 et pVEN7 qui ont produit, comme pVE1, de rares cellules immunopositives pour grand T et un faible signal en analyse Northern, 0.3% du signal du contrôle positif, pSV1BSS. Tout comme pour pVE1, les protocoles ont été répétés avec différentes préparations de plasmides et les mêmes résultats obtenus. A noter que le clone pVEN2 qui contient un fragment de 1.6kb dans lequel on retrouve le fragment présumé transformant de 227pb donne un résultat négatif.

Figure 3.7: Recherche de stimulateurs chez Bgl II N.

Cette figure représente le résultat de l'analyse Northern effectuée sur des échantillons de cellules HeLa issues de protocoles d'expression transitoire. L'ARNm total, 20µg par puits, est extrait de cellules transfectées avec pSV1BSS (1), pVEN1 (2), pVEN2 (3), pVEN3 (4), pVEN4 (5), pVEN5 (6), pVEN6 (7-8), pVEN7 (9-10). Le transfert se fait sur membrane Hybond-N. Les messagers de grand T et petit T sont détectés avec une ribosonde, pGT2, contenant le fragment Hpa I - Hpa I (1067pb) de pSV1BSS. Les bandes inférieure et supérieure représentent les ARNm de grand T et petit T, respectivement. La position de migration des ARN ribosomiaux eucaryotes de 28S et 18S est indiquée. Les panneaux A et B représentent des expositions de 48 heures de deux protocoles d'expression transitoire différents. Le panneau C résume les lectures densitométriques effectuées sur les échantillons où des bandes étaient détectables. Les flèches pointent vers les bandes de faible intensité. Aucun des fragments de Bgl II N ne produit de grandes quantités d'ARNm spécifiques à grand T et petit T. La fragmentation de Bgl II N a été effectuée selon le diagramme de la figure 3.6 Les fragments obtenus furent clonés dans pVE.

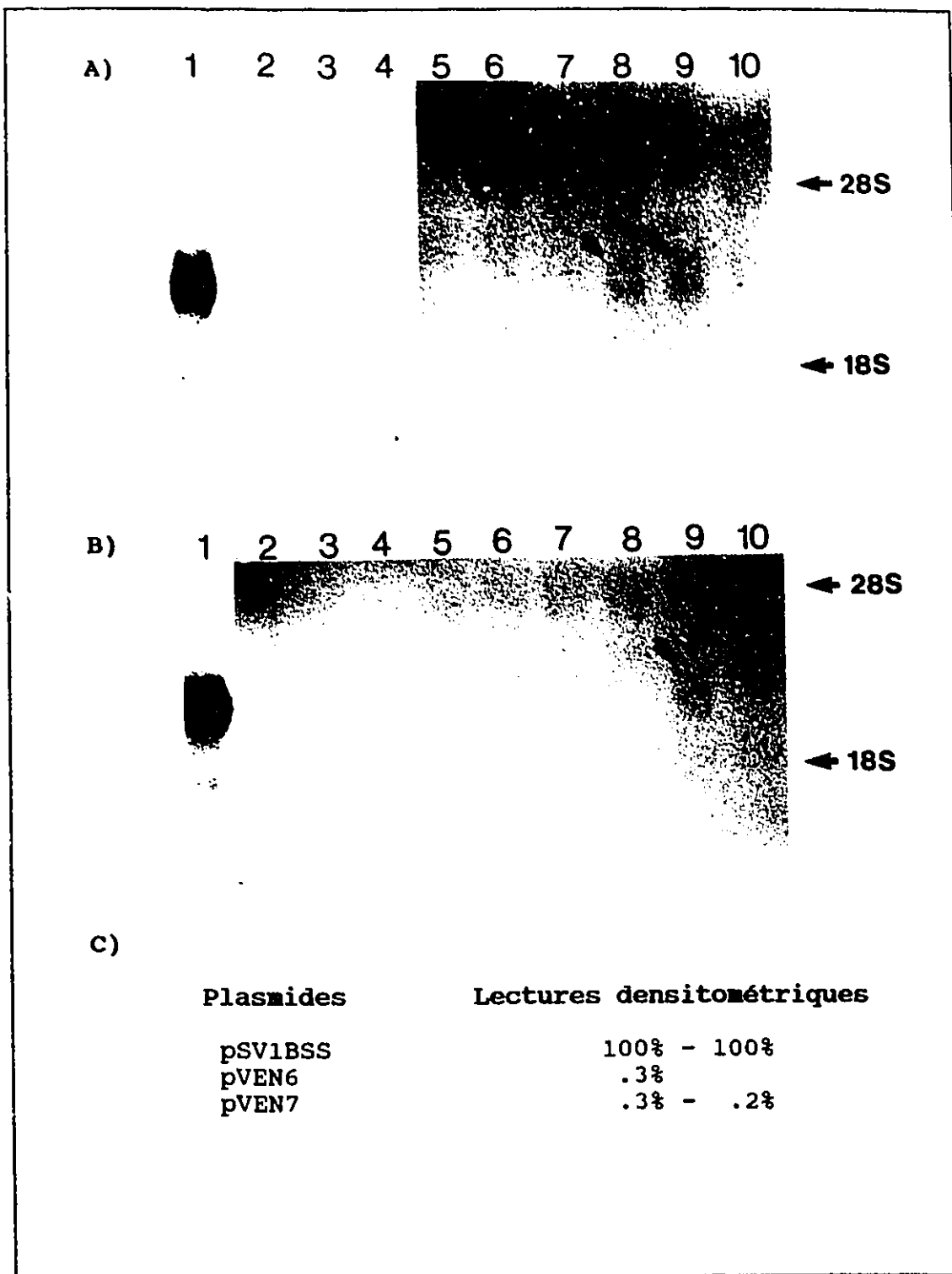


Figure 3.7: Recherche de stimulateurs chez Bgl II N.

Ce bloc d'expériences nous permet de conclure, qu'à moins d'avoir fragmenté Bgl II N à l'intérieur d'un stimulateur, le fragment Bgl II N d'HSV-2 ne contient pas de stimulateur capable de se substituer fonctionnellement au stimulateur de SV40.

3.3.3. Les promoteurs du fragment transformant.

De toutes les hypothèses sur le mécanisme par lequel Bgl II N opère la transformation, deux possibilités apparaissent plus probables. Dans un cas, le mécanisme fait appel à un oncogène présent sur le fragment qui peut être: 1) un gène normalement exprimé durant le processus infectieux mais dont la dérégulation est provoquée par la présence d'un trans-activateur inhabituel ou par l'intégration d'un stimulateur à proximité; 2) un gène normalement éteint pendant le processus infectieux et qui est activé par un trans-activateur spécifique ou une intégration. Dans l'autre cas, un stimulateur ou promoteur est relocalisé par intégration à proximité d'un proto-oncogène cellulaire et active ce dernier.

Dans les hypothèses ci-haut mentionnées, les promoteurs jouent les rôles-clé. Nous avons donc porté une attention particulière à toutes les séquences localisées en amont de phases de lecture ouvertes (PLO) assignées ou non du fragment Bgl II N dont la séquence est disponible (pour séquence, voir Galloway et Swain, 1984). La séquence de nucléotides fut soumise à une recherche de PLO (voir figure 3.8).

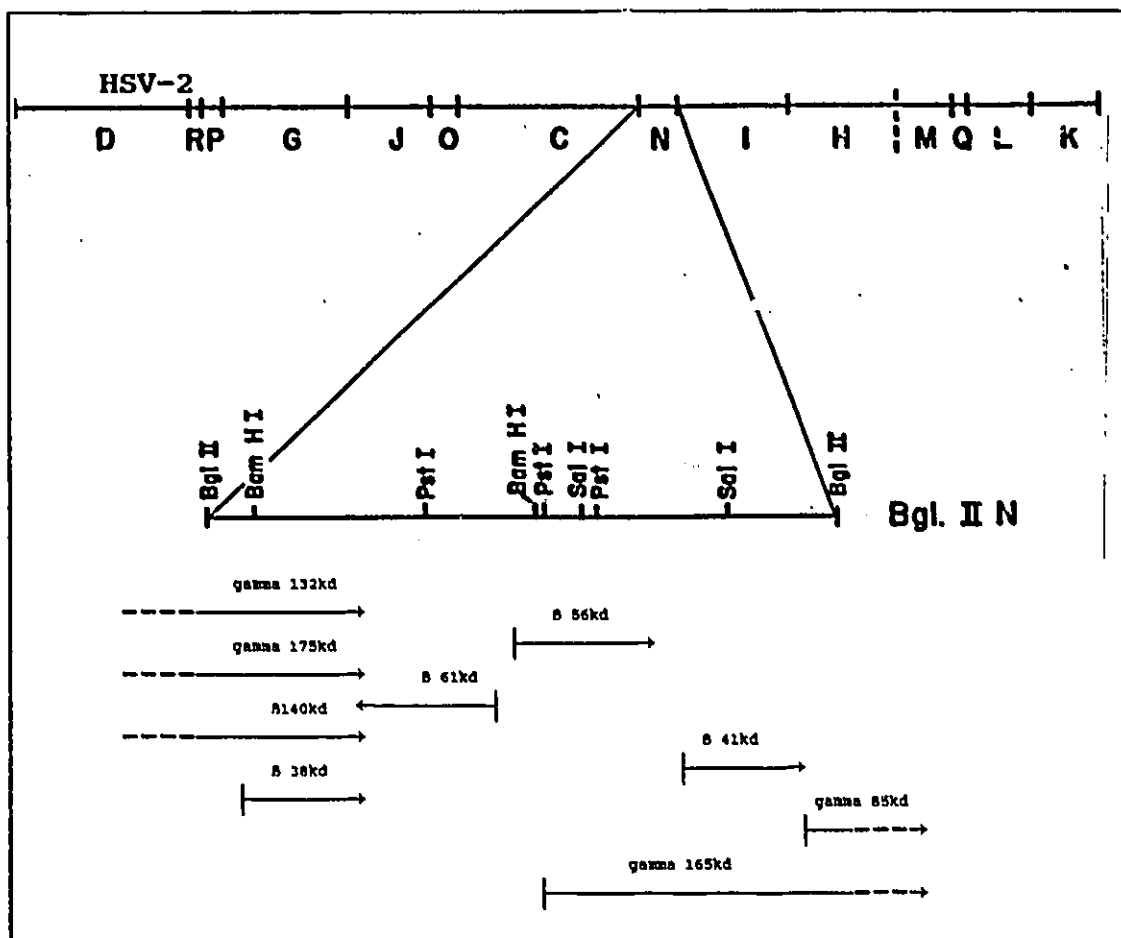


Figure 3.8: Les phases de lecture ouvertes chez Bgl II N.

Localisation schématique de la provenance des ARNm viraux recueillis au cours de l'infection de cellules TC7 par HSV-2, souche 333. L'information est tirée de l'article de Jenkins et Howett (1984). Chaque unité transcriptionnelle est identifiée par un trait indiquant la direction de la transcription ainsi que par un sigle indiquant la classe du gène et le poids moléculaire en kilodaltons du produit du gène.

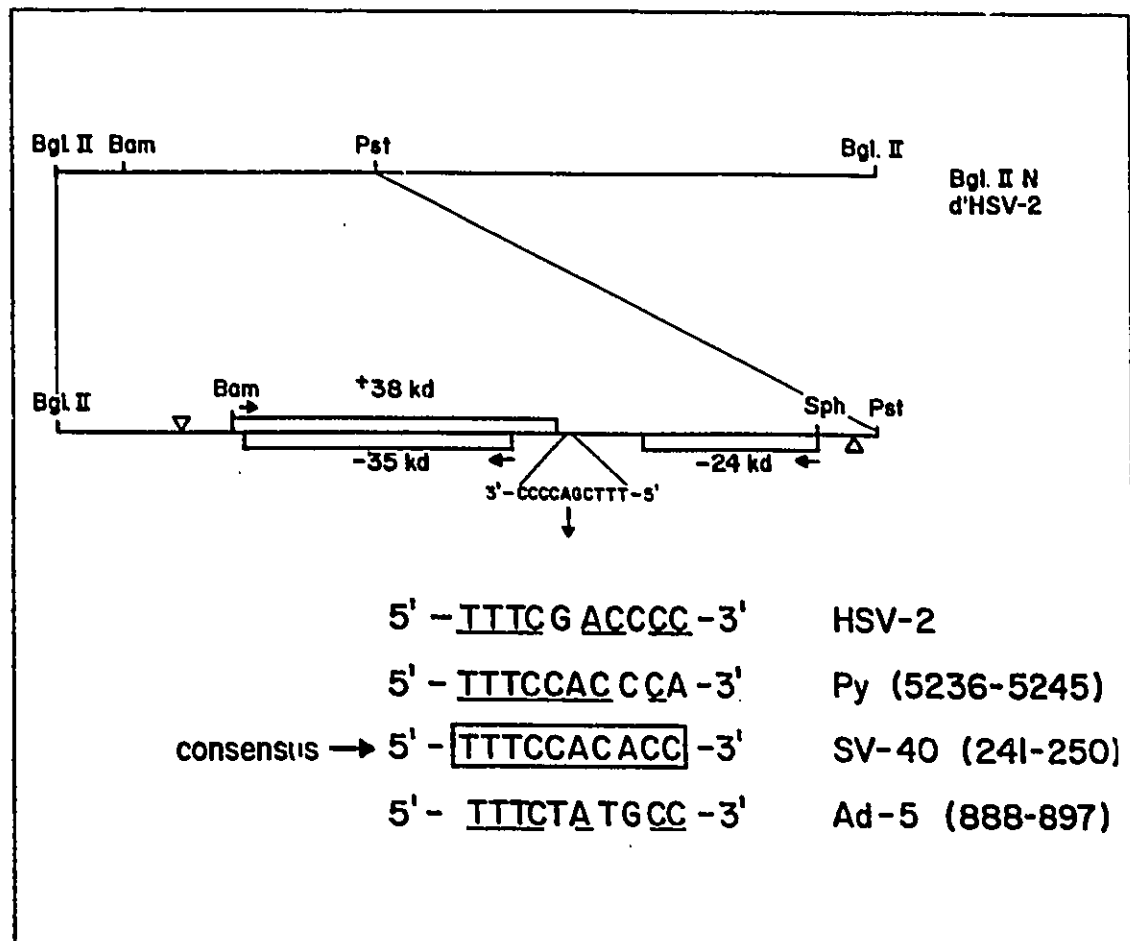


Figure 3.9: Recherche de PLO et séquences consensus chez la séquence de nucléotides de Bgl II N.

La séquence de nucléotides du premier tiers de Bgl II N chez lequel les fragments présumés transformants sont retrouvés a été traitée informatiquement pour identifier toutes les PLO ainsi que les séquences rencontrant les consensus d'éléments de promoteurs et de stimulateurs connus. Les PLO sont identifiées par des boîtes et la direction de la transcription par un trait. La taille estimée de la protéine produite sert à l'identification de la PLO, les signes + et - se rapportant au brin. Les boîtes TATA sont indiquées par des triangles renversés. L'agrandissement met en évidence une séquence s'apparentant à la séquence consensus du noyau de plusieurs stimulateurs connus, avec laquelle la séquence d'HSV-2 affiche 80% d'homologie.

La plus grande PLO est assignée et code pour une protéine de 38kd, la petite sous-unité de la ribonucléotide réductase virale (Galloway et al., 1982). Cette PLO est également co-linéaire avec l'extrémité 3'-non-traduite de la grande sous-unité de la ribonucléotide réductase virale, codant pour une protéine de 144kd, dont la transcription débute dans le fragment voisin de Bgl II N, Bgl II C (Swain et Galloway, 1986).

Deux PLO non-assignées de bonne taille ont été repérées. L'une d'entre elles code présumément pour une protéine de 24kd. Cette PLO est colinéaire avec l'extrémité 3' d'un gène β codant une protéine virale de 61kd et recèle le présumé fragment transformant minimal de 227pb. La seconde PLO est co-linéaire avec la PLO de la 38kd sur le brin négatif et code pour une présumée protéine de 35kd. La PLO de 35kd recèle entre ses limites plusieurs PLO de plus petite taille ayant toutes le même codon d'arrêt.

L'examen des séquences en amont des PLO a permis de localiser la boîte TATA chez le promoteur de la 38kd. Le promoteur a été identifié (Galloway et Swain, 1984) et son activité transcriptionnelle examinée dans le cadre du processus infectieux (O'Hare et Hayward, 1984, 1985). Malgré l'absence de boîtes TATA et CAAT en amont de la présumée 35kd, on y retrouve néanmoins deux courtes séquences définitivement intéressantes: un tandem de sites d'attachement du facteur de transcription Sp1 et la séquence consensus du noyau de plusieurs stimulateurs dont celui de SV40 (voir figure 3.10).

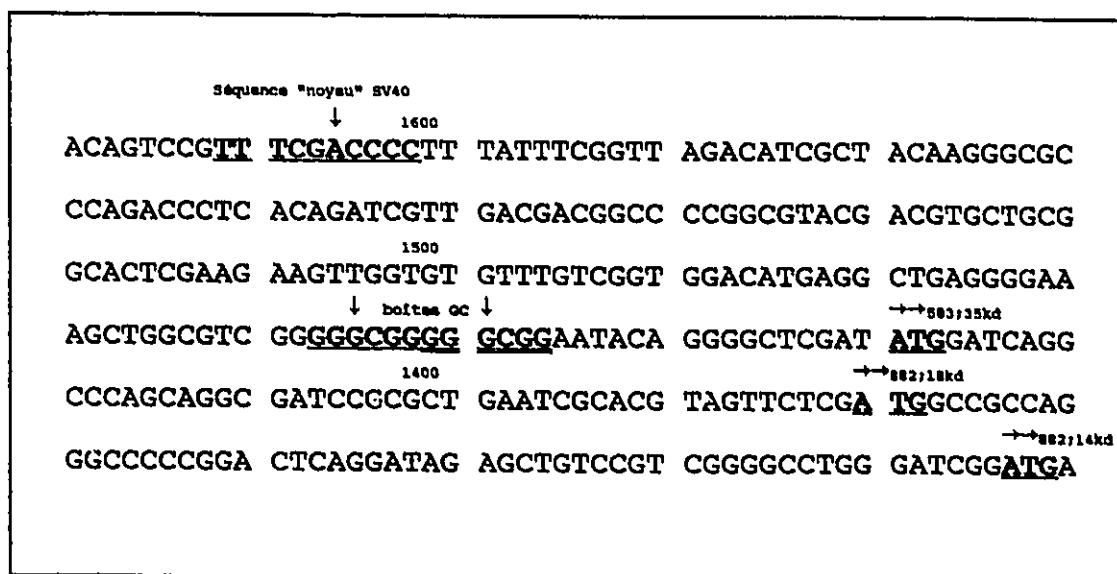


Figure 3.10: Séquence des nucléotides en amont d'une phase de lecture ouverte non-assignée chez Bgl II N d'HSV-2.

Cette figure représente une partie de la séquence de nucléotides de Bgl II N (Galloway et Swain, 1984) ayant servi à faire la recherche de PLO. La numérotation des paires de base débute au site Bgl II en amont de la 38kd. La séquence des nucléotides apparaissant ci-haut est celle du brin négatif. La séquence "noyau" de SV40 apparaît à 1600pb, les deux boîtes GC à 1450pb. Les ATG de départ de 3 PLO possibles apparaissent en gras; ils sont chapeautés par une double flèche indiquant la direction de la transcription. La double flèche est suivie du numéro du dernier nucléotide du codon d'arrêt et de la taille prédite de la protéine résultante.

Le promoteur de la 38kd et celui présumé de la 35kd ont été clonés dans pHS102 et pHS102M.

Les différentes constructions plasmidiques produites apparaissent schématisées à la figure 3.11. Toutes les constructions ont été soumises à un protocole d'expression transitoire chez des cellules HeLa. Le niveau relatif d'expression des constructions apparaît aux figures 3.11 et 3.12.

Deux fragments de Bgl II N englobant 350pb (pHSV350) et 510pb (pHSV510) respectivement de séquences en amont de la PLO-38kd ont démontré leur inhabileté à induire la transcription de grand T. Ce résultat suggère que le promoteur de la 38kd, dans son contexte viral et en absence de trans-activateurs, est transcriptionnellement éteint. En effet, le gène de la ribonucléotide réductase virale appartient à la classe des gènes précoces (β) et, à ce titre, nécessite une trans-activation par le produit d'un gène très précoce (α), comme l' α -4 (O'Hare et Hayward, 1985). Par contre, lorsque le fragment de 350pb du promoteur de la 38kd est cloné en aval du stimulateur SV40 (pHSV350E), un niveau d'activité transcriptionnelle comparable à celui de pSV1BSS est observé, suggérant ainsi la dépendance de ce promoteur sur l'apport d'un trans-activateur ou d'un stimulateur. De plus, l'inversion de l'orientation du promoteur de la 38kd diminue son activité transcriptionnelle de 8 fois mais ne l'éteint pas.

Un premier clonage des séquences du présumé promoteur de la 35kd englobait la séquence noyau des stimulateurs sans les sites Sp1. Ces séquences activent la transcription

à 3% du niveau observé chez le contrôle positif, sans produire de cellules immunopositives pour grand T. L'addition du stimulateur de SV40 à cette construction résulte en une perte totale d'expression. Par contre, lorsque le fragment testé comprend les sites Sp1, le niveau d'expression passe de 0 à 0.5% avec l'addition du stimulateur. Nous concluons que les séquences en amont de la PLO-35kd ne constituent pas un promoteur fonctionnel.

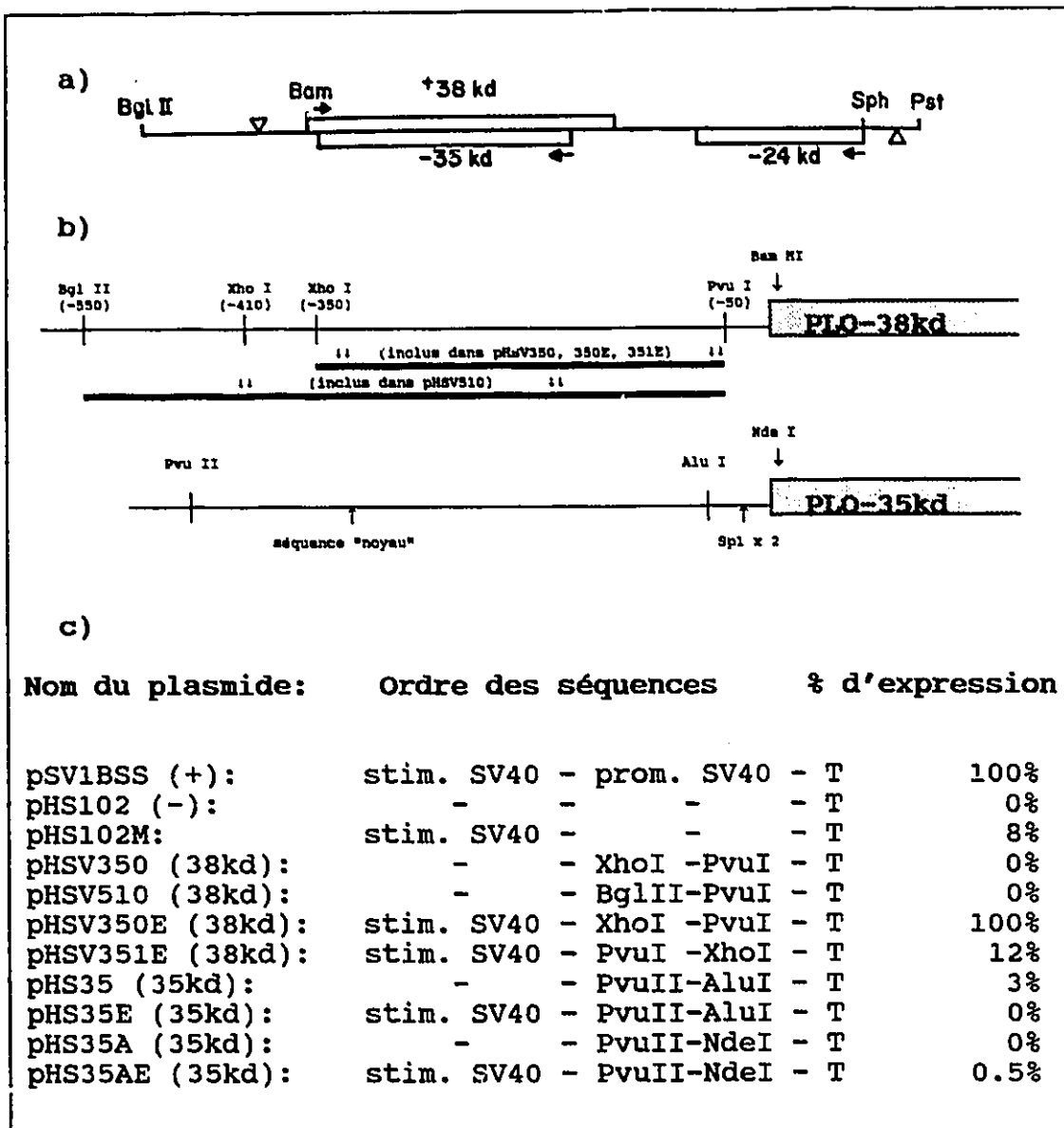


Figure 3.11: Analyse des séquences potentiellement pro-motrices du fragment Bgl II N.

- a) Localisation des promoteurs examinés, sur le tiers gauche de Bgl II N.
- b) Localisation des sites d'endonucléases ayant servi au sous-clonage des promoteurs.
- c) Tableau résumant le nom des constructions, la nature du matériel herpétique qui y est inséré, la présence ou l'absence du stimulateur de SV40 et le niveau d'expression relatif, mesuré par analyse Northern (voir figure 3.12)

Figure 3.12: Analyse Northern des clones dérivés de pHS102 et pHS102M contenant les promoteurs potentiels de Bgl II N.

Cette figure représente le résultat de l'analyse Northern effectuée sur des échantillons de cellules HeLa issues de protocoles d'expression transitoire. L'ARNm total, 20µg par puits, fut extrait de cellules HeLa transfectées avec pSV1BSS (3= 20µg; 4= 2µg), pHS102 (5), pHSV350E (6), pHSV351E (7), pHSV350 (8), pHS35 (9), pHS35A (10), pHS35E (11), pHS35AE (12). Les puits 1 et 2 représentent 20 et 2µg respectivement d'ARN extrait de cellules cos. Le transfert se fait sur membrane Hybond-N. Les messagers de grand T et petit T sont détectés avec une ribosonde, pGT2, contenant le fragment Hpa I - Hpa I (1067pb) de pSV1BSS. L'autoradiogramme représenté est une exposition de 48 heures. Les flèches mettent en évidence les faibles bandes de l'échantillon pHS35AE (12). Le panneau C de la figure 3.11 résume les lectures densitométriques effectuées sur les échantillons où des bandes étaient détectables. Les bandes inférieure et supérieure représentent les ARNm de grand T et petit T, respectivement. La position de migration des ARN ribosomiaux eucaryotes de 28S et 18S est indiquée. Les différentes configurations sont résumées à la figure 3.11.

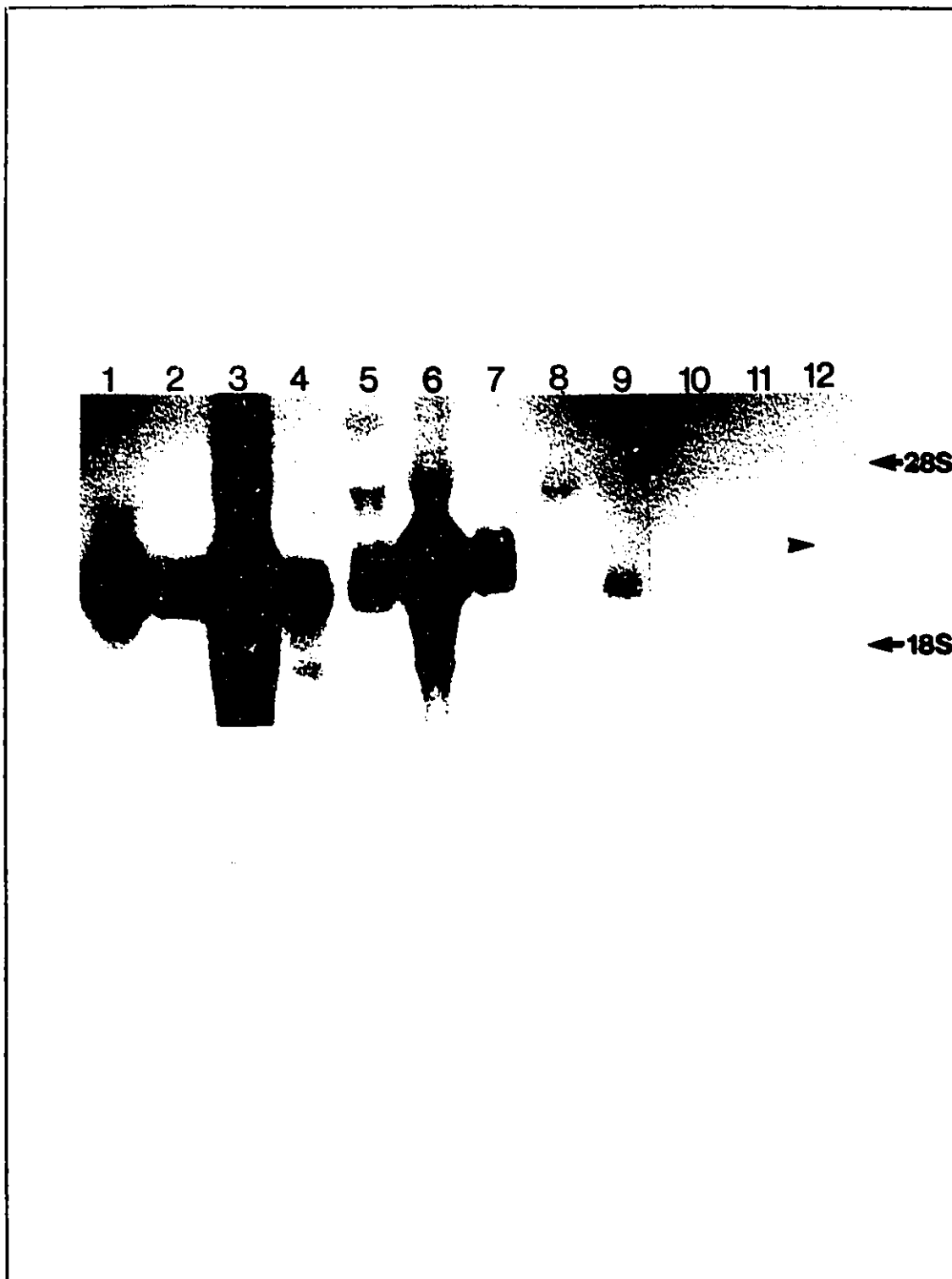


Figure 3.12: Analyse Northern des clones dérivés de pHS102 et pHS102M contenant les promoteurs potentiels de Bgl II N.

3.4. Discussion.

Trois clones, testant la capacité de sous-fragments de Bgl II N à remplacer fonctionnellement le stimulateur de SV40, ont produit, de façon répétée, de faibles bandes d'ARNm spécifiques au gène reporteur, grand T, et ce, en regard d'un excellent contrôle négatif, pVE. Nous pourrions conclure que les fragments en question recèlent des stimulateurs qui sont faibles dans le contexte du promoteur de SV40 mais qui pourraient s'avérer actifs à l'intérieur du génome viral. Toutefois, l'immunofluorescence de ces échantillons a produit de très rares cellules fortement immunopositives pour grand T, produisant possiblement une quantité d'antigène T compatible avec l'intensité des bandes d'ARNm observées. Ces observations sont difficiles à concilier avec l'hypothèse voulant que pVE1, pVEN6 et pVEN7 recèlent de faibles stimulateurs.

Une façon d'expliquer l'existence de ces rares cellules immunopositives pour grand T consiste à accepter l'hypothèse de Weintraub (1988) selon laquelle une probabilité, faible mais définie, existe qu'un complexe transcriptionnel fonctionnel se forme sur un promoteur démuné de séquence stimulatrice. Bien que l'évidence expérimentale présentée par Weintraub à l'appui de son hypothèse soit intéressante, cette dernière explique difficilement comment un contrôle absolu de l'expression de gènes régissant, par exemple la prolifération, est exercé. Ce modèle probabiliste permet de prédire que tous les plasmides contenant au moins le promoteur de SV40 produi-

ront des cellules immunopositives, ce qui n'est pas notre observation.

Une autre façon d'expliquer l'existence de ces rares cellules immunopositives consiste à évoquer une intégration génomique des plasmides à proximité de stimulateurs ou autres activateurs cellulaires. Les fragments d'ADN herpétique insérés dans les clones pVE1, pVEN6 et pVEN7 semblent contenir des séquences qui favorisent l'intégration des plasmides après la transfection ou encore qui dirigent l'intégration vers un nombre restreint de sites spécifiques. Dans chacun des cas, l'intégration placerait, à basse fréquence, le vecteur exogène à proximité d'un stimulateur transcriptionnel cellulaire. Seuls les plasmides contenant de l'ADN herpétique ont produit cet effet. Il est intéressant de noter que les fragments contenus dans les trois plasmides ci-haut décrits co-localisent avec les sous-fragments transformants résiduels de Bgl II N (Saavedra et Kessous-Elbaz, 1985). Cette hypothèse sera explorée davantage au chapitre 4.

La conclusion la plus plausible en regard de notre recherche de stimulateurs chez le fragment Bgl II N d'HSV-2 est que ce fragment n'en contient aucun. Comme ce fut le cas pour herpès saimiri (Schirm et al., 1985), on ne peut lier l'activité transformante de Bgl II N à la présence d'un stimulateur.

Notre analyse des promoteurs réels et présumés du premier tiers du fragment Bgl II N a démontré que le promoteur de la 38kd doit être trans-activé par un produit de gène α ou

stimulé en cis par un stimulateur afin d'induire la transcription. Il est intéressant de noter que toutes les PLO assignées au fragment Bgl II N sont des gènes de classes β et γ (voir figure 3.8). Le fragment Bgl II N, transfecté dans une lignée cellulaire, est dans l'impossibilité d'activer son programme génétique, pour cause de pénurie de produits de gènes viraux de classe α . Il devra donc dépendre de trans-activateurs cellulaires ou d'effets cis au site d'intégration dans le génome cellulaire. Si la carcinogenèse induite par HSV-2 implique l'expression dérégulée d'un ou plusieurs gènes de classe β localisés sur Bgl II N, le gène codant pour la 38kd constitue alors un candidat, d'autant plus que nous avons démontré qu'un stimulateur hétérologue induit en cis une spectaculaire augmentation de son activité transcriptionnelle.

L'intérêt envers le présumé promoteur de la 35kd découle, rappelons-le, de la présence d'un tandem de sites S_{pl} et de la séquence noyau des stimulateurs dont on avait noté la présence ailleurs dans les génomes herpétiques (Lang et al., 1984; Jones et Tjian, 1985). Ce présumé promoteur a démontré une très faible habileté à activer la transcription de grand T (pHS35). Nous avons démontré qu'en absence du promoteur de grand T, le stimulateur complet de SV40, alors situé à proximité (70pb) de l'ATG (pHS102M), initiera la transcription à 8-10% des niveaux normaux. Bien que le niveau d'activité enregistré avec les séquences de la 35kd soit faible, il est possible que, par analogie à pHS102M, le niveau observé représente la contribution faible mais néanmoins normale que

la séquence noyau apporte à l'activité totale du stimulateur SV40 complet. L'addition des sites Spl dans pHS35A entre la séquence noyau et grand T s'est avérée néfaste. Il est étonnant de constater que des sites Spl potentiels ne contribue pas à l'activation transcriptionnelle, d'autant plus que le facteur Spl s'attache et induit la transcription in vitro de gènes HSV de classe α (Jones et Tjian, 1985). Ces sites potentiels étant accolés un à l'autre, il est possible que cette situation rend les sites difficilement accessibles aux facteurs Spl ou que la libération des facteurs s'en trouve compliquée.

L'insertion, à 500pb de l'ATG, d'un stimulateur SV40 complet s'est également avérée néfaste à l'activité transcriptionnelle. Nous avons démontré que le stimulateur SV40, en absence de promoteur, initie tout de même la transcription, mais l'activation est faible et est induite à courte distance. La capacité du stimulateur d'activer, même faiblement, à distance respectable reste à démontrer. La distance des éléments de promoteur par rapport au site de coiffe constitue habituellement un paramètre critique pour l'initiation de la transcription. Il est possible que la même exigence s'applique aux stimulateurs lorsqu'ils se substituent aux promoteurs. Une autre explication possible à ce résultat consiste à suggérer que le stimulateur SV40 régule négativement ce présumé promoteur.

Contrairement au promoteur de la PLO-38kd, le présumé promoteur de la PLO-35kd ne démontrait pas, en dehors

des items déjà mentionnés, la présence d'autres séquences consensus retrouvées fréquemment chez les promoteurs eucaryotes. Cette PLO se terminait d'ailleurs par un codon de terminaison ambre. Je faisais référence jusqu'à maintenant à la PLO de 35kd bien qu'une PLO de 18kd débutant une centaine de nucléotides plus loin et se terminant par un codon TGA était plus probable en ce qu'elle procurait une séquence de tête non-traduite de longueur plus appropriée. L'intérêt dans la 35kd résidait dans le maintien d'une PLO non-assignée de pareille longueur. On peut imaginer, pour expliquer cette anomalie, une pression de sélection exercée sur le brin opposé à l'endroit de la PLO-38kd, couplée à un usage rare du codon TCA pour la sérine chez la 38kd, codon qui se traduirait chez la 35kd par le codon de terminaison TGA.

Le comportement, mis à jour par cette étude, de certains fragments herpétiques jette une lumière nouvelle sur les possibles mécanismes de l'activité carcinogénique que l'on prête à HSV-2. Le virus cause des épisodes d'infections lytiques récurrents, entre lesquels le virus entre en période de latence. En latence, il est très probable que le virus s'intègre au génome cellulaire, tout comme tout ADN épisomal est susceptible de le faire. Les résultats rapportés dans ce chapitre suggèrent que certains éléments contenus dans le fragment Bgl II N pourrait favoriser une intégration de certains fragments du virus dans des sites chromosomiques transcriptionnellement actifs ou à proximité de stimulateurs cellulaires. Ces fragments favoriseraient l'intégration en aug-

mentant la fréquence d'intégration ou en modifiant la spécificité de celle-ci. Ce mécanisme est compatible avec la basse fréquence de formation de focus chez NIH 3T3 observée avec Bgl II N. Selon ce scénario, un stimulateur cellulaire activerait en cis la transcription d'un ou plusieurs gènes de classe B intégrés à proximité du stimulateur et la dérégulation de l'expression de ces gènes produirait, par l'intermédiaire d'une cible cellulaire, l'effet carcinogénique.

Notre système de trappage fonctionnel de stimulateurs transcriptionnels se compare avantageusement aux autres systèmes de trappage décrits antérieurement. Nous comptions initialement utiliser une technique de type "shotgun" pour trier, sur une base fonctionnelle, un grand nombre de fragments. Le cas de pVE1 a démontré que notre système ne se prête pas à cette technique. Il est d'ailleurs plus efficace de laisser la trappe s'intégrer au génome. Effectivement, bien que notre système ait été conçu à l'origine pour identifier des stimulateurs exogènes, les dosages immunocytologiques effectués jusqu'à maintenant ont mis en évidence le fait que les vecteurs utilisés peuvent repérer, sous certaines conditions, des stimulateurs endogènes.

Chapitre 4: Des fragments de Bgl II N semblent induire une intégration génomique dirigée.

4.1. Introduction.

Au chapitre précédent, notre effort de recherche visant à mettre à jour de nouveaux éléments de contrôle de la transcription a produit de l'information inattendue. Le type de résultat attendu de notre trappe à stimulateur était simple: la transfection d'un vecteur tel pSV1BSS chez des cellules HeLa produit 10-30% de cellules immunopositives pour grand T; si un stimulateur moins puissant remplace celui de SV40, alors nous devrions observer 10-30% de cellules démontrant une fluorescence nucléaire plus faible. L'observation de rares cellules fortement immunopositives pour grand T chez pVE1, pVEN6 et pVEN7 ne cadrerait donc pas avec notre hypothèse de départ.

Notre système de vecteurs de type "trappe" étant en cours de validation, il s'est avéré difficile, pour moi, d'écarter ces résultats d'apparence artefactuelle sans chercher à comprendre la raison de leur apparition. De plus, cette observation était limitée à des plasmides contenant de l'ADN herpétique, nuance non-dénuée d'intérêt.

Trois explications possibles étaient envisagées pour expliquer le phénomène observé. La première veut qu'une inté-

gration génomique ait révélé, par l'intermédiaire de grand T, l'existence de stimulateurs d'origine cellulaire d'une puissance équivalente à celle du stimulateur SV40. La seconde, l'hypothèse de Weintraub (1988), propose deux choses: 1) qu'en expression transitoire, malgré la présence d'un grand nombre de copies épisomales d'un gène transfecté, une seule copie serait transcrite; 2) que l'initiation de la transcription est un phénomène probabiliste où les stimulateurs augmente la probabilité de l'événement et où leur absence met en évidence la probabilité de base, aussi mince fut-elle. La troisième explication va à l'encontre de la seconde alors qu'elle propose que les cellules immunopositives représentent des cellules marginales où un grand nombre de copies épisomales du gène transfecté sont transcriptionnellement actives, amplifiant ainsi le niveau détecté d'activité transcriptionnelle du promoteur dénué de stimulateur.

Afin de tenter de tirer au clair cette question, nous avons procédé au remplacement du gène reporteur par le gène de résistance à l'antibiotique G418, le gène neo, chez pSV1BSS, pVE, pVE1 et pVE2. Nous avons également construit pSV0neo où le promoteur et le stimulateur ont été éliminés. Un protocole d'expression transitoire fut mené avec ces nouvelles constructions et les populations cellulaires résultantes soumises à 2 semaines de sélection au G418. Les colonies survivant la sélection devraient permettre de mettre au test les trois explications explicitées plus haut.

4.2. Résultats: intégration d'un faible nombre de copies plasmidiques.

Les constructions pSV1neo, pSV0neo, pVEneo, pVE1neo et pVE2neo ont été transfectées dans 5×10^5 cellules HeLa et les populations cellulaires soumises, après 48 heures, à 15 jours de sélection sous G418. Le décompte des colonies survivantes apparaît à la figure 4.1.

Le nombre de colonies enregistré pour pSV1neo est important mais les nombres enregistrés pour pVEneo, pVE1neo et pVE2neo sont plus élevés que prévu. Le rapport de la fréquence de cellules immunopositives chez pVE1 versus pSV1BSS était de 1/3,000 alors qu'il n'est que de 1/8 pour les colonies des homologues neo, si l'on ne considère que les colonies de fort diamètre. Les résultats du chapitre précédant nous laissait prédire un plus grand nombre de colonies avec pSV1neo et très peu de colonies avec les autres constructions. A la lumière du modèle favorisant l'intégration, on peut toujours suggérer que, la mort par cytotoxicité au G418 ne survenant que 6 jours après la transfection, un plus grand nombre de copies épisomiques s'intègrent au génome, d'où une plus forte probabilité de trouver un stimulateur cellulaire. On note une nette démarcation au niveau du nombre de colonies de faible diamètre alors que pVE1neo enregistre de 2.5 à 4.5 fois plus de colonies que pVEneo et pVE2neo.

Les populations de clones ont été initialement amalgamées et amplifiées sous sélection. Les quelques clones observés chez pSV0neo n'ont pas survécu à l'amplification.

Figure 4.1: Résultats de sélection chez pVEneo et dérivés.

a) Tableau représentant l'arrangement des séquences en amont du gène reporteur neo chez les plasmides dérivés de pVEneo. La carte exacte de chacun de ces plasmides apparaît en appendice.

b) Les plasmides décrits plus haut ont été transfectés chez des cellules HeLa qui furent soumises, après 48 heures, à un régime de sélection au G418. Les colonies ont été comptées et quelques unes clonées pour amplification après 12 jours de sélection.

Nom du plasmide:	Ordre des séquences.
pSV1neo:	stim. SV40 - prom. SV40 - neo
pSV0neo:	- - - neo
pVEneo:	site multi-clonage - prom. SV40 - neo
pVE1neo:	HSV- 227pb ----> - prom. SV40 - neo
pVE2neo:	HSV- 227pb <---- - prom. SV40 - neo

Plasmides\diamètre:	nombre de colonies	
	fort	petit
pSV1neo:	60	60
pSV0neo:	0	5
pVEneo:	7	19
pVE1neo:	8	53
pVE2neo:	6	12

Figure 4.1: Résultats de sélection chez pVEneo et dérivés.

L'ADN génomique a été extrait et digéré avec Bam HI, Bgl I, Bgl II et Eco RI. Les digestions génomiques ont ensuite été soumises à une analyse Southern. Les autoradiogrammes apparaissent aux figures 4.2 à 4.4 alors que le résumé des observations apparaît à la figure 4.5.

L'intégration génomique est un phénomène au cours duquel est fréquemment observée l'insertion d'un grand nombre de copies d'un ADN épisomal que l'on retrouve dans le génome sous la forme de concatamères. Conséquemment, dans les cas d'intégration sous forme concatamérique, la digestion de l'ADN génomique avec des endonucléases coupant seulement une fois le plasmide de l'ADN transfecté devrait produire une seule bande, sur l'autoradiogramme de l'analyse Southern, de la taille de l'ADN linéarisé et d'une intensité équivalente au nombre de copies du plasmide dans les concatamères.

L'intensité des bandes observées sur les Southern suggère une équivalence de une à deux copies par génome. De une à quatre bandes étaient détectées, selon l'endonucléase. Une bande de la taille du plasmide linéarisé était souvent observée mais toujours accompagnée par d'autres bandes de tailles inférieures ou supérieures.

Il semble donc que, dans le contexte de ces expériences, la survie en milieu sélectif dépend du niveau d'expression d'un nombre limité de copies du plasmide transfecté, intégrées sous forme non-concatamérique dans le génome cellulaire.

Figure 4.2: Analyse Southern de populations de cellules transfectées avec pSV1neo.

Du protocole de sélection auquel les cellules HeLa transfectées avec pSV1neo furent soumises, les colonies non-clonées de pSV1neo furent soumises à une extraction génomique. L'ADN génomique fut fragmenté avec les endonucléases Bam HI (A), Bgl I (B), Bgl II (C), Eco RI (D), Bgl II -Bam HI (E), puis soumis à une analyse Southern. La détection est réalisée avec une ribosonde constituée du fragment Hind III - Ava I, couvrant la totalité du gène neo (voir carte de pSV1neo, figure 4.5). Les puits coiffés par un nombre contiennent la valeur numérique équivalente en copies par génome de pSV1neo linéarisé. L'autoradiogramme représente une exposition de 10 jours à du film XAR-5. Une bande faible, difficile à percevoir sur cette épreuve photographique, est indiquée par une flèche. Se référer à la carte de la figure 4.5 pour connaître l'emplacement des sites d'endonucléases.

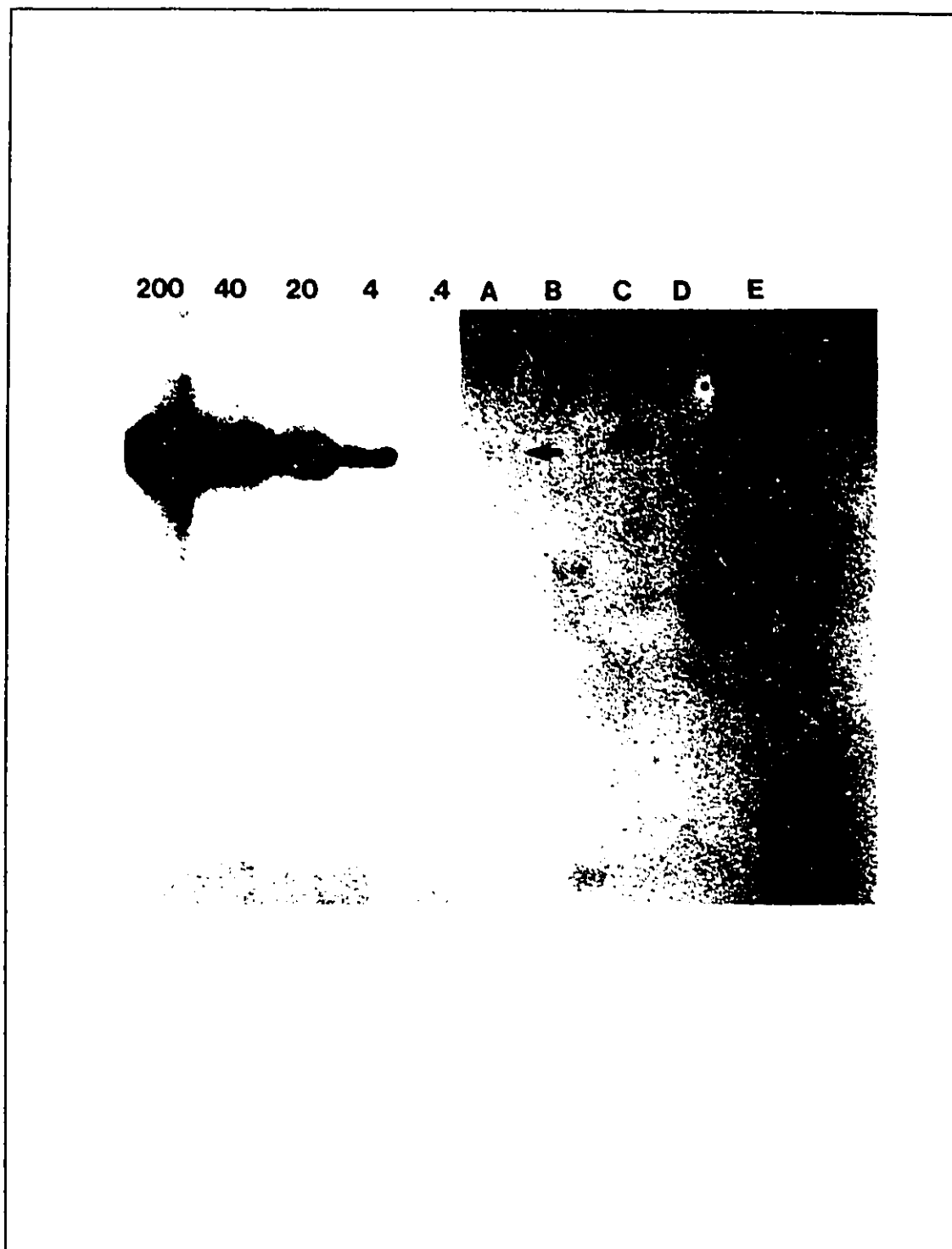


Figure 4.2: Analyse Southern de populations de cellules transfectées avec pSVineo.

Figure 4.3: Analyse Southern de populations de cellules transfectées avec pVElneo.

Du protocole de sélection auquel les cellules HeLa transfectées avec pVElneo furent soumises, les colonies non-clonées de pVElneo furent soumises à une extraction génomique. L'ADN génomique fut fragmenté avec les endonucléases Bam HI (A), Bgl I (B), Bgl II (C), Eco RI (D), Bgl II -Bam HI (E), puis soumis à une analyse Southern. La détection est réalisée avec une ribosonde constituée du fragment Hind III - Ava I, couvrant la totalité du gène neo (voir carte de pSVlneo, figure 4.5). Les puits coiffés par un nombre contiennent la valeur numérique équivalente en copies par génome de pSVlneo linéarisé. L'autoradiogramme représente une exposition de 10 jours à du film XAR-5. Se référer à la carte de la figure 4.5 pour connaître l'emplacement des sites d'endonucléases.

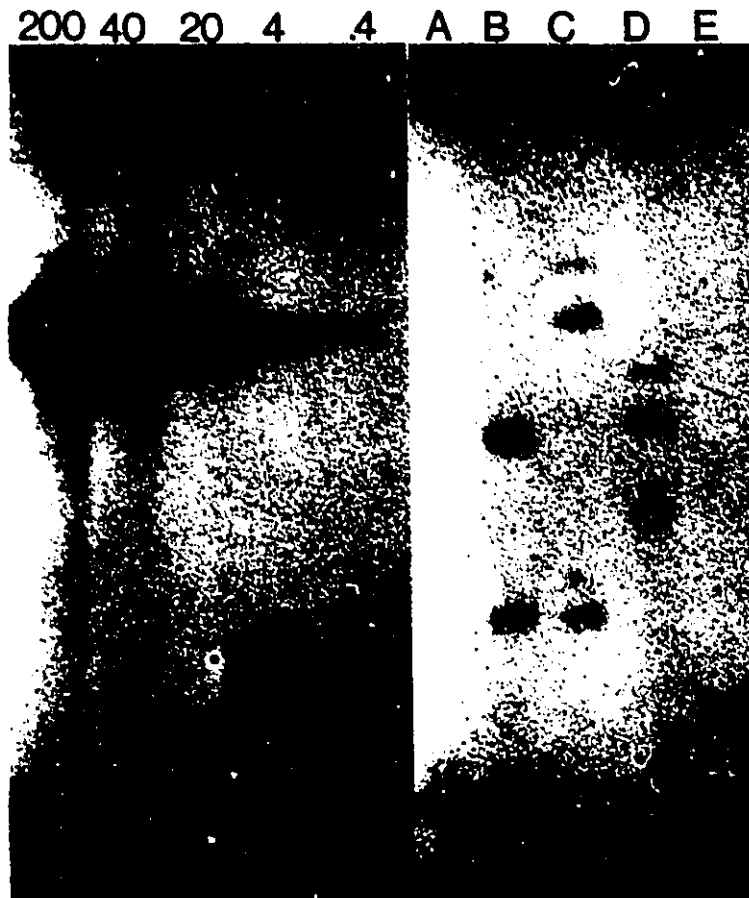


Figure 4.3: Analyse Southern de populations de cellules transfectées avec pVE1neo.

Figure 4.4: Analyse Southern de populations de cellules transfectées avec pVE2neo.

Du protocole de sélection auquel les cellules HeLa transfectées avec pVE1neo furent soumises, les colonies non-clonées de pVE2neo furent soumises à une extraction génomique. L'ADN génomique fut fragmenté avec les endonucléases Bam HI (A), Bgl I (B), Bgl II (C), Eco RI (D), Bgl II -Bam HI (E), puis soumis à une analyse Southern. La détection est réalisée avec une ribosonde constituée du fragment Hind III - Ava I, couvrant la totalité du gène neo (voir carte de pSV1neo, figure 4.5). Les puits coiffés par un nombre contiennent la valeur numérique équivalente en copies par génome de pSV1neo linéarisé. L'autoradiogramme représente une exposition de 10 jours à du film XAR-5. Les bandes faibles, difficiles à percevoir sur cette épreuve photographique, sont indiquées par des flèches. Se référer à la carte de la figure 4.5 pour connaître l'emplacement des sites d'endonucléases.

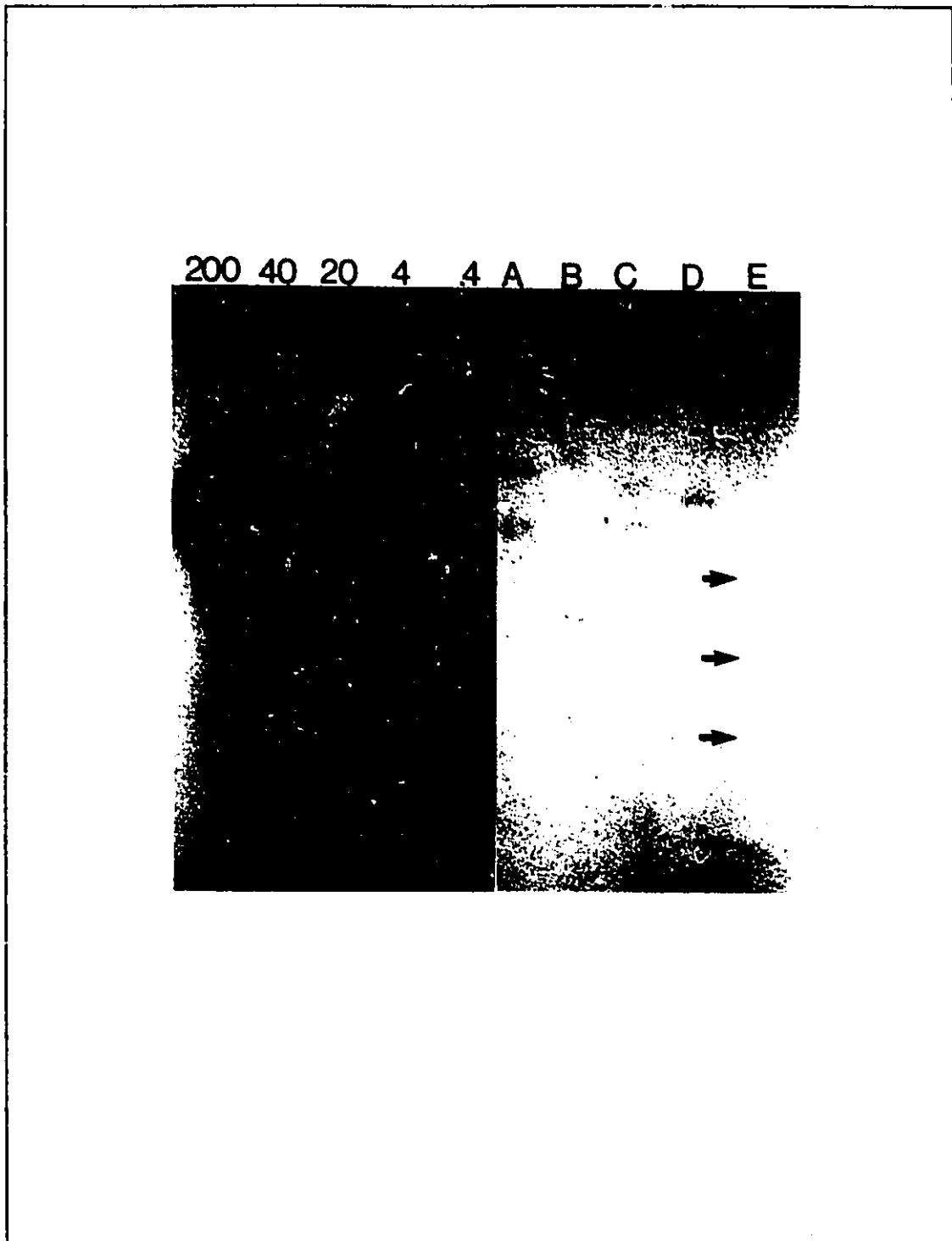


Figure 4.4: Analyse Southern de populations de cellules transfectées avec pVE2neo.

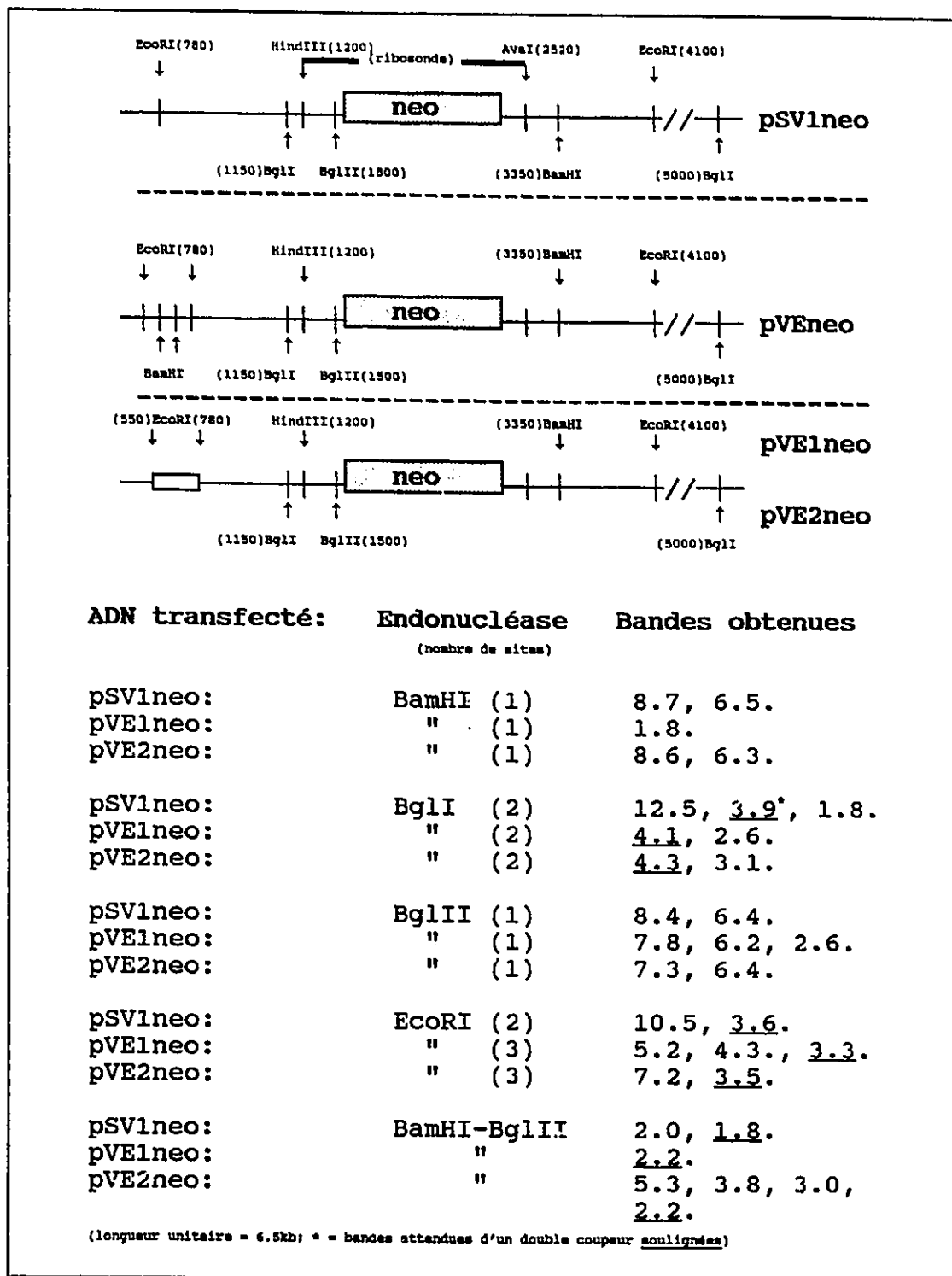


Figure 4.5: Résumé de l'analyse Southern des populations transfectées avec pSV1neo, pVE1neo et pVE2neo.

Nos observations, jusqu'à maintenant, vont à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle un grand nombre de copies transcriptionnellement actives sont responsables de l'apparition des rares cellules immunopositives chez pVE1. Evidemment, l'examen de populations clonales de ces cellules est nécessaire avant de pouvoir tirer une conclusion ferme. L'examen de ces populations permettra également de trancher la question suivante. Les multiples bandes observées sur les Southern, sont-elles la réflexion d'une population non-homogène de cellules abritant une seule copie du plasmide dont la localisation dans le génome varie d'un groupe de cellules à l'autre ou sont-elles plutôt la réflexion d'une population homogène de cellules, en tous points identiques quant aux nombre de copies et la localisation des sites d'intégration?

Un clone de pSV1neo et deux chacun de pVEneo, pVE1neo et pVE2neo ont été soumis à la même routine analytique que les populations ci-haut décrites (figure 4.6). Pratiquement tous les clones ont produit un nombre de bandes moindre qu'observé chez la population équivalente, suggérant que les populations observées plus tôt représentaient un regroupement de sous-populations. L'intensité de la majorité des bandes suggère une abondance de quelques copies par génome. Le clone pVE1 #2 produit, sous digestion Eco RI, une bande d'apparence concatamérique à 60 copies par génome; sous digestion Bam HI, la bande de même intensité se retrouve à une taille de 10.1. Sous digestions Bgl II et Hind III, l'intensité des bandes observées est à nouveau faible. Un phénomène similaire est

Figure 4.6: Analyse Southern de populations clonales initialement transfectées avec pSV1neo, pVEneo, pVE1neo ou pVE2neo.

Du protocole de sélection auquel les cellules HeLa transfectées avec pSV1neo et pVEneo furent soumises, des colonies furent clonées, amplifiées et soumises à une extraction génomique. L'ADN génomique fut fragmenté avec les endonucléases Bam HI, Bgl II (panneau A); Hind III et Eco RI (panneau B), puis soumis à une analyse Southern. La détection est réalisée avec une ribosonde constituée du fragment Hind III - Ava I, couvrant la totalité du gène neo (voir carte de pSV1neo, figure 4.5). Les puits regroupés sous la banderolle "marqueurs" contiennent la valeur numérique équivalente affichée en copies par génome de pSV1neo linéarisé. Les puits numérotés réfèrent à des extraits de clones cellulaires initialement transfectés avec: 1, pSV1neo; 2-3, pVE; 4-5, pVE1; 6-7, pVE2; 8, extrait de cellules Hela non-transfectées. L'autoradiogramme représente une exposition de 15 jours à du film XAR-5. L'information de cette analyse est résumée et comparée à celle obtenue des populations, à la figure 4.7. Se référer à la carte de la figure 4.5 pour connaître l'emplacement des sites d'endonucléases.

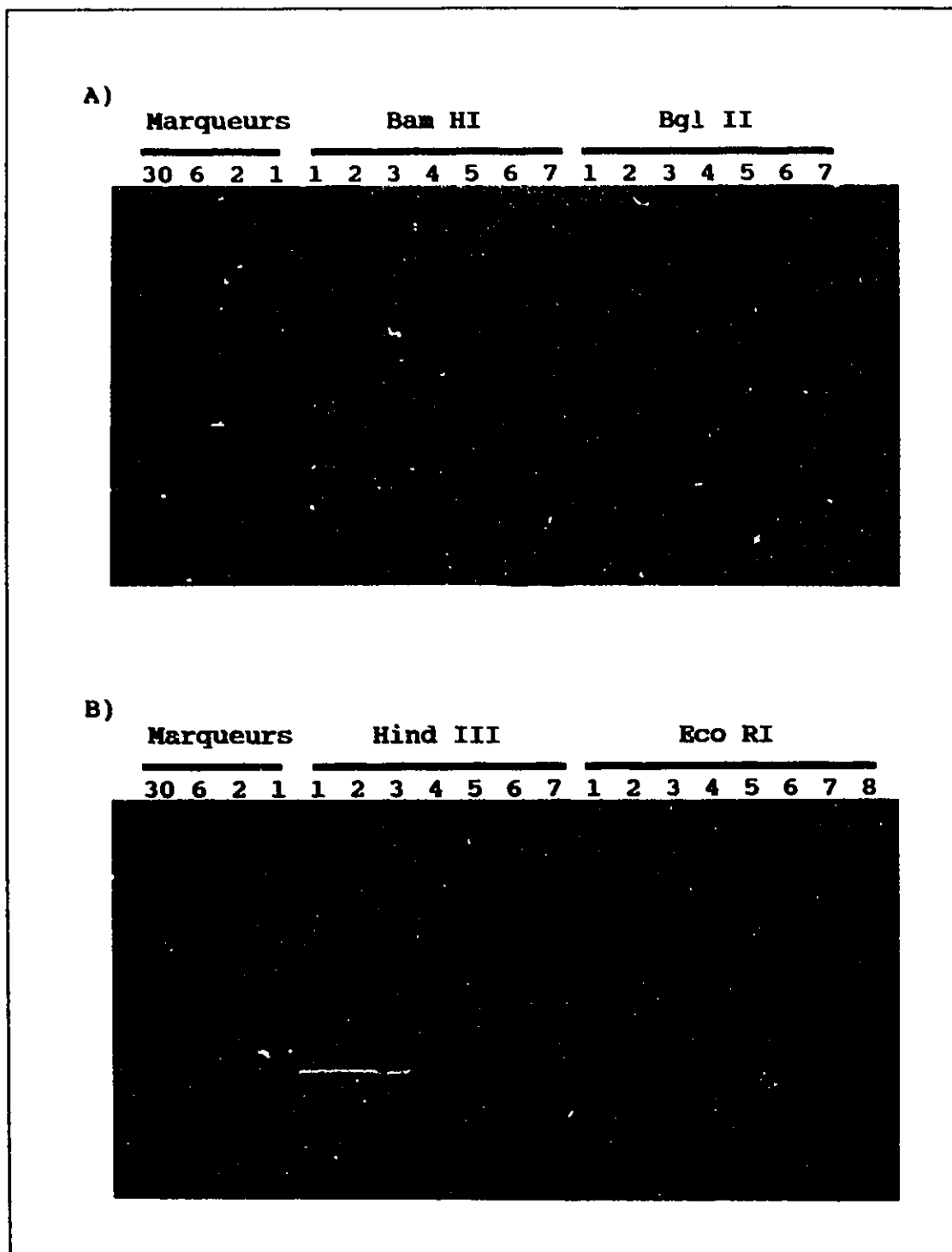


Figure 4.6: Analyse Southern de populations clonales initialement transfectées avec pSV1neo, pVEneo, pVE1neo ou pVE2neo.

Figure 4.7: Résumé de l'analyse Southern de populations clonales initialement transfectées avec pSV1-, pVE-, pVE1- ou pVE2neo.

La taille des fragments observés chez les analyses Southern de la figure 4.6 est répertoriée dans le tableau ci-contre, en caractères gras. Les données enregistrées chez les populations, telles que regroupées à la figure 4.5, apparaissent à titre de référence. Rappelons que les fragments de restriction présentis pour une endonucléase coupant au moins 2 fois sont soulignés. Se référer à la carte de la figure 4.5 pour connaître l'emplacement des sites d'endonucléases.

<u>ADN transfecté:</u>	<u>Nombre de sites</u>	<u>Bandes obtenues</u>
<u>Bam HI:</u>		
pSV1neo (pop.):	1	8.7, 6.5.
pSV1neo (clone):		10.6, 7.4.
pVEneo (clone #1):		3.3.
pVEneo (clone #2):		15.9.
pVE1neo (pop.):	1	1.8.
pVE1neo (clone #1):		6.3.
pVE1neo (clone #2):		10.1.
pVE2neo (pop.):	1	8.6, 6.3.
pVE2neo (clone #1):		8.8.
pVE2neo (clone #2):		8.8.
<u>Bgl II:</u>		
pSV1neo (pop.):	1	8.4, 6.4.
pSV1neo (clone):		31.5, 7.4.
pVEneo (clone #1):		14.0, 7.4, 6.3.
pVEneo (clone #2):		4.9.
pVE1neo (pop.):	1	7.8, 6.2, 2.6.
pVE1neo (clone #1):		9.0, 5.8.
pVE1neo (clone #2):		9.0, 4.9, 4.7.
pVE2neo (pop.):	1	7.3, 6.4.
pVE2neo (clone #1):		5.1.
pVE2neo (clone #2):		-
<u>Hind III:</u>		
pSV1neo (clone):	2	7.5, 4.2.
pVEneo (clone #1):	2	14.6, 7.8.
pVEneo (clone #2):		-
pVE1neo (clone #1):	2	12.1.
pVE1neo (clone #2):		3.3.
pVE2neo (clone #1):	2	7.2.
pVE2neo (clone #2):		7.2.
<u>Eco RI:</u>		
pSV1neo (pop.):	2	10.5, <u>3.6</u> .
pSV1neo (clone):		18.0, 12.1.
pVEneo (clone #1):		<u>3.5</u> .
pVEneo (clone #2):		<u>3.5</u> .
pVE1neo:	3	5.2, 4.3., <u>3.3</u> .
pVE1neo (clone #1):		28.5.
pVE1neo (clone #2):		19.1, 6.7.
pVE2neo:	3	7.2, <u>3.5</u> .
pVE2neo (clone #1):		<u>3.3</u> .
pVE2neo (clone #2):		<u>3.3</u> .

Figure 4.7: Résumé de l'analyse Southern de populations clonales initialement transfectées avec pSV1-, pVE-, pVE1- ou pVE2neo.

observé chez le clone pSV1neo et un clone pVEneo. Il semble peu probable que l'on puisse attribuer le phénomène à des digestions incomplètes puisque l'étalement des fragments des digestions tel qu'observé en fluorescence était normal et permettait l'observation d'unités répétitives de bas poids moléculaire avec Eco RI.

4.3. Discussion.

La premier point d'intérêt dans ce groupe de résultats concerne l'apparition de colonies survivant la sélection avec G418, après transfection de pSV0neo, pVEneo et pVE2neo. L'absence de fluorescence spécifique à grand T chez pVE et pVE2 laissait présager que seul pVE1neo produirait des colonies survivantes lors de la sélection. Toutefois, des colonies ont survécu après transfection avec pSV0neo, pVEneo et pVE2neo mais en nombre moindre qu'avec pVE1neo. Il demeure possible que la puissance de sélection n'ait pas été suffisante pour procurer une discrimination adéquate, bien que le dosage de sélection était de 600µg/ml. Cette divergence trouve peut-être son explication en l'absence, chez les plasmides neo, du phénomène d'auto-régulation qu'exerce grand T sur son promoteur. Ce phénomène, chez les plasmides grand T, a possiblement comme effet, chez les plasmides dérivés de pVE, de biaiser la sélection en faveur de stimulateurs suffisamment puissants pour surmonter le blocage des sites d'auto-régulation. Néanmoins, les données obtenues ici avec pVEneo et pVE2neo suggèrent que ces plasmides arrivent à s'intégrer dans un envi-

ronnement génomique propice à leur activation transcriptionnelle, quoiqu'avec moins de succès que pVE1neo.

On peut proposer l'hypothèse que le nombre de colonies obtenues avec pVEneo et pVE2neo représentent la fréquence normale d'intégration au hasard des plasmides dérivés de SV40 alors que le plus grand nombre obtenu avec pVE1neo reflète soit une fréquence plus élevée d'intégration au hasard, soit une fréquence normale d'intégration mais, cette fois, spécifique ou dirigée. La nature du matériel herpétique contenu dans pVE1neo, recelant une séquence de type "IS" ("insertion-like sequence"), suggère cette dernière possibilité. La structure en épingle à cheveux flanquée de séquences répétitives directes pourrait imposer une spécificité à l'intégration. L'orientation de ces séquences répétitives directes sélectionne probablement quelle portion du plasmide, les séquences procaryotiques de pBR322 ou le promoteur de grand T, se retrouvera à proximité du stimulateur cellulaire, ce qui permettrait d'expliquer les comportements différents de pVE1 et pVE1neo versus ceux de pVE2 et pVE2neo.

La seconde information d'intérêt réside dans le nombre de copies intégrées des plasmides retrouvées chez les colonies survivantes. Les cellules transfectées ne peuvent survivre que dans la mesure où suffisamment de produit du gène neo est produit. Comme les promoteurs chez pVEneo, pVE1neo et pVE2neo ont démontré être transcriptionnellement peu actifs en protocoles d'expression transitoire, les seules façons, chez ces plasmides, de produire suffisamment de produit du gène neo étaient: 1) de compenser la faiblesse du promoteur

par le maintien d'un grand nombre de copies du plasmide; 2) d'intégrer le plasmide à proximité d'un stimulateur transcriptionnel cellulaire. A cet égard, l'analyse Southern des populations et des clones a démontré qu'un faible nombre de copies suffit pour le maintien de niveaux adéquats du produit de neo. Des bandes plus intenses ont été observées dans quelques digestions de matériel d'origine clonale mais il demeure difficile de réconcilier leur existence avec les observations réalisées auprès des populations, chez lesquelles la présence d'un clone concatamérique aurait produit une ou plusieurs bandes d'intensités variables.

Les lectures densitométriques de l'analyse Southern des populations a démontré que les bandes de taille équivalente à celle du plasmide linéarisé, observées chez toutes les populations, n'affichaient pas une abondance supérieure à celle des autres bandes. Les concatamères, s'ils sont présents chez ces populations, ne peuvent comporter que 2 à 3 copies du plasmide.

De deux à quatre bandes seulement apparaissent sur les transferts Southern. On peut assumer qu'elles représentent autant d'événements d'intégration différents. Ce nombre paraît faible à la lumière du fait que plusieurs dizaines de colonies ont été regroupées à l'intérieur de ces populations, ce qui signifie que plusieurs colonies partagent les mêmes sites d'intégration. Il restait à déterminer si tous les clones comportent les mêmes bandes ou si les bandes observées représentent des sous-groupes de colonies arborant une seule bande.

Les colonies furent piquées individuellement et ces clones ont produit des bandes uniques en analyse Southern, suggérant que les populations examinées plus tôt étaient non-homogènes. L'intégration d'une seule copie du plasmide transfecté en un même site génomique chez tous les membres d'un même sous-groupe de colonies est donc suffisante pour produire la résistance à la sélection.

Trois explications avaient été suggérées plus tôt pour expliquer ce qui semblait être à l'origine un artéfact expérimental de notre trappe à stimulateurs.

Nous avons démontré que la troisième explication suggérant un grand nombre de copies intégrées n'expliquait pas l'existence de la majorité des clones survivant la sélection puisque les populations et la majorité des clones ont affichés de faibles nombres de copies.

La seconde explication, évoluant autour de l'hypothèse de Weintraub, n'a trouvé ni confirmation, ni infirmation dans nos résultats. Il faudrait présumer un caractère héréditaire à cet événement de nature statistique pour que nos résultats s'accordent avec cette hypothèse. Cette théorie probabiliste prédit davantage une incapacité à amplifier des populations, ce que nous avons réussi à faire.

La première explication, suggérant une intégration du plasmide à proximité d'un stimulateur transcriptionnel, a été appuyée par notre évidence expérimentale. Un nombre très faible de copies s'intègre au génome cellulaire dans un nombre de sites limités. En nombre total de colonies récupérées après sélection au G418, pVE1neo a produit un plus grand nombre de

colonies, suggérant que le matériel herpétique contenu dans pVElneo joue un rôle dans l'activation transcriptionnelle du promoteur inactif.

Les travaux d'Hamada (1986a, 1986b), Swift et al. (1987), Hiller et al. (1988) et Gossler et al. (1989) abondent dans le même sens que les nôtres. Cette première explication permet de proposer que la transformation oncogénique procède par intégration génomique d'une partie du matériel viral à proximité d'un stimulateur transcriptionnel cellulaire qui active certains gènes du fragment Bgl II N ou encore perturbe l'activité transcriptionnelle de certains gènes cellulaires. La rareté de l'apparition de cellules transformées refléterait la rareté de l'événement d'intégration productif (voir revue de Duesberg, 1987).

Il est tentant de suggérer qu'une recherche de stimulateurs dans un génome cellulaire procède plus efficacement par recombinaison des vecteurs dans le génome plutôt que par clonage d'une digestion génomique dans les vecteurs en question. En effet, l'approche "shot-gun", telle qu'utilisée par Weber et al. (1984), fut infructueuse. Par contre, il demeure possible que la recombinaison soit biaisée en faveur de séquences homologues ou des origines de répllication de virus résidant dans le génome, tel l'HPV-18 (Swift et al., 1987). Le succès apparent de l'approche recombinatoire pourrait éventuellement confirmer la suggestion de Weber et al. (1984) qui propose qu'il existe peu de stimulateurs cellulaires à large spectre, aptes à remplacer celui de SV40 dans l'amplification de la transcription de son promoteur précoc.

Chapitre 5: Activité du stimulateur du gène pgk-1 de souris en situation d'activation hétérologue.

5.1. Introduction.

Des travaux effectués dans ce laboratoire ont permis d'isoler et de cloner un gène localisé sur le chromosome X de la souris, le gène de la phosphoglycérate kinase (pgk-1) (Adra et al., 1987; Adra, 1988). Le promoteur de ce gène a été examiné en procédant au clonage de divers fragments du promoteur de pgk-1 en amont du gène de la β -galactosidase bactérienne (lacZ) d'E. coli. L'activité promotrice des fragments fut mesurée en quantifiant l'activité enzymatique générée par l'expression du gène bactérien, au cours de protocoles d'expression transitoire chez des cellules de tératocarcinome EC P19 (McBurney et al., en préparation). Ces études ont démontré que le fragment Xba-Stu (-(440-120)) du promoteur de pgk-1 (voir figure 5.1) se comportait comme un stimulateur transcriptionnel, de par sa capacité à stimuler la transcription après l'inversion de son orientation. La duplication de cette séquence a amplifié l'effet stimulateur de façon analogue au stimulateur SV40 dans un vecteur dérivé de SV40. Nous avons voulu évaluer la capacité du stimulateur de pgk-1 à induire une stimulation transcriptionnelle lorsque transplanté en amont d'un promoteur hétérologue, celui de l'antigène grand T de SV40.

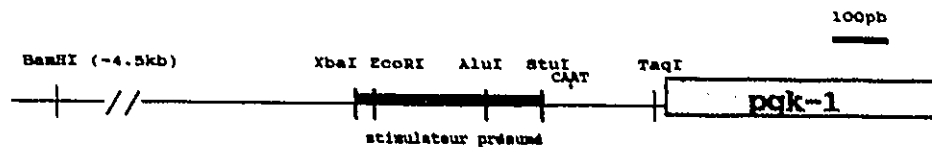


Figure 5.1: Le promoteur du gène pgk-1 de souris.

De plus, certains résultats préliminaires suggéraient l'existence d'une séquence distante, en amont, qui semble contribuer à l'activation transcriptionnelle. L'habileté présumée de cette séquence d'activer un promoteur à distance rappelle la capacité démontrée du stimulateur SV40 à en faire autant. Nous avons donc examiné 4.5kb de séquences en amont du gène pgk-1, à la recherche de séquences stimulatrices.

5.2. Résultats: stimulation hétérologue marginale par le stimulateur de pgk-1.

Les fragments du promoteur ont été clonés de plusieurs façons dans pVE. La figure 5.3 résume les arrangements de séquences retrouvés chez ces différents plasmides et le pourcentage d'activité transcriptionnelle enregistré.

Tous ces plasmides furent transfectés en protocole d'expression transitoire chez les cellules HeLa et EC P19 et leurs niveaux de production de grand T évalué en immunofluorescence et par analyse Northern. Seul pSV112 produisit en abondance de la fluorescence spécifique à grand T; la production d'ARNm spécifique fut mesurée et apparaît à la figure 5.3.

Figure 5.2: Analyse Northern des clones pVE dérivés de pgk-1.

Cette figure représente le résultat de l'analyse Northern effectuée sur des échantillons de cellules EC P19 (panneaux A et B) et HeLa (panneau C) issues de protocoles d'expression transitoire. L'ARNm total, 20µg par puits, est extrait de cellules transfectées avec pSV1BSS (A-1, B-1), pVE111 (A-2, B-3, C-2), pVE112 (A-3, B-4, C-3), pSV112 (A-4, B-5, C-4), pVE210 (A-5, B-2, C-1), pVE111A (A-6, B-6, C-5), pVE111B (A-7). Le transfert se fait sur membrane Hybond-N. Les messagers de grand T et petit T sont détectés avec une ribosonde, pGT2, contenant le fragment HpaI - HpaI (1067pb) de pSV1BSS. Les membranes furent exposées 96 heures (A) et 48 heures (B et C) à du film XAR-5. Les bandes inférieure et supérieure représentent les ARNm de grand T et petit T, respectivement. La position de migration des ARN ribosomiaux eucaryotes de 28S et 18S est indiquée. Les lectures densitométriques effectuées sur ces films ainsi que les détails de construction des différents plasmides apparaissent à la figure 5.3.

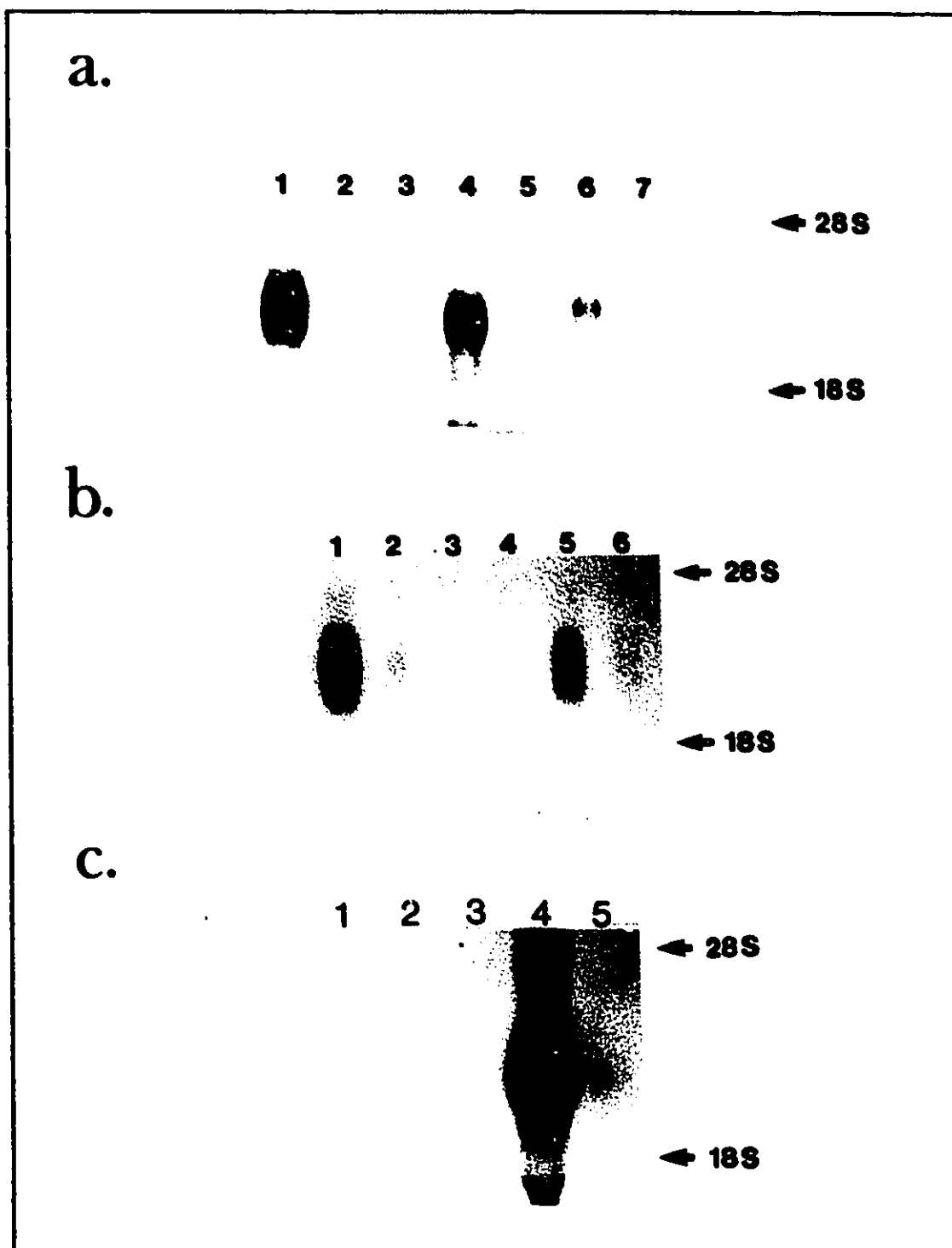


Figure 5.2: Analyse Northern des clones pVE dérivés de pgk-1.

Figure 5.3: Effet stimulateur du fragment Xba-Stu de pgk-1 sur la transcription du promoteur précoce de SV40 chez des cellules HeLa et EC P19.

a) Tableau représentant l'arrangement des séquences en amont du gène reporteur grand T chez les plasmides contenant des fragments du promoteur de pgk-1. La carte exacte de chacun de ces plasmides apparaît en appendice.

b) Les lectures densitométriques effectuées sur les autoradiogrammes apparaissant à la figure 5.2 sont ici résumées. Les unités sont A x cm.

Nom du plasmide:	Arrangement des séquences.	
pSV1BSS (+):	stim. SV40 - prom. SV40 - T	
pVE (-):	prom. SV40 - T	
pVE111:	Xba-Stu	- prom. SV40 - T
pVE112:	Stu-Xba	- prom. SV40 - T
pVE210:	Stu-Xba - Stu-Xba	- prom. SV40 - T
pSV112:	Stu-Xba - stim. SV40	- prom. SV40 - T
pVE111A:	Bam-Eco 4.5kb - Xba-Stu	- prom. SV40 - T
pVE111B:	Eco-Bam 4.5kb - Xba-Stu	- prom. SV40 - T

Nom du plasmide:	<u>% d'activité relative:</u>	
	cellules HeLa	cellules EC P19
pSV1BSS (+):	100%	100%
pVE (-):	0	0
pVE111:	0	8%
pVE112:	0	7%
pVE210:	0	9%
pSV112:	168%	56%
pVE111A:	3%	19%
pVE111B:	0	5%

Figure 5.3: Effet stimulateur du fragment Xba-Stu de pgk-1 sur la transcription du promoteur précoce de SV40 chez des cellules HeLa et EC P19.

Dans ce contexte expérimental, nous avons observé une faible capacité, de l'ordre de 10% par rapport au contrôle positif, du fragment Xba-Stu à induire la stimulation transcriptionnelle du promoteur précoce de SV40, chez des cellules EC P19. L'ajout du fragment Bam-Eco de 4.5kb améliore sensiblement l'activation. Cette activité stimulatrice apparaît significative mais fait-elle de ces fragments des stimulateurs, au sens de la définition de ceux-ci?

La capacité de stimulation pour les mêmes plasmides chez des cellules HeLa est nulle. Ces résultats suggèrent une absence chez les cellules HeLa de facteurs de transcription spécifiques au fragment Xba-Stu de pgk-1. Toutefois, des protocoles d'expression transitoire chez des cellules HeLa furent menées dans le contexte du chapitre 6, protocoles impliquant des plasmides où le promoteur de pgk-1 dirigeait la transcription de grand T. Ces expériences ont démontré que la transcription était efficace (voir figure 6.2) et que, conséquemment, les facteurs de transcription spécifique à Xba-Stu sont présents chez les cellules HeLa.

Puisque les facteurs de transcription spécifiques au fragment Xba-Stu et au promoteur précoce de SV40 sont présents chez les cellules HeLa, il apparaît possible que l'absence d'activité transcriptionnelle soit due à l'incapacité de ces facteurs de former un complexe transcriptionnel fonctionnel avec l'ARN-polymérase II et les protéines accessoires spécifiques aux motifs du promoteur de SV40. La faible stimulation détectée chez les cellules EC P19 refléterait une

meilleure compatibilité envers des facteurs accessoires du complexe transcriptionnel de souris.

Des résultats préliminaires ont démontré la capacité du stimulateur de SV40 à amplifier l'effet stimulateur du fragment Xba-Stu (McBurney, en préparation). Nous avons examiner la situation inverse, à savoir si le fragment Xba-Stu amplifie l'effet du stimulateur de SV40 sur la transcription de grand T par le promoteur précoce de SV40. Le résultat enregistré à la figure 5.3 pour pSV112 montre que l'activité du stimulateur de SV40 est, au mieux, sensiblement diminuée chez les cellules EC P19. Lorsque le gène reporteur de pSV112 est remplacé par lacZ chez pSV112Z, l'activité du stimulateur de SV40 chez les cellules EC P19 s'en trouve sensiblement améliorée (voir figure 5.4). Chez les cellules HeLa, le niveau d'activité de pSV112 est au mieux 1.5 fois supérieur à celui de pSV1BSS.

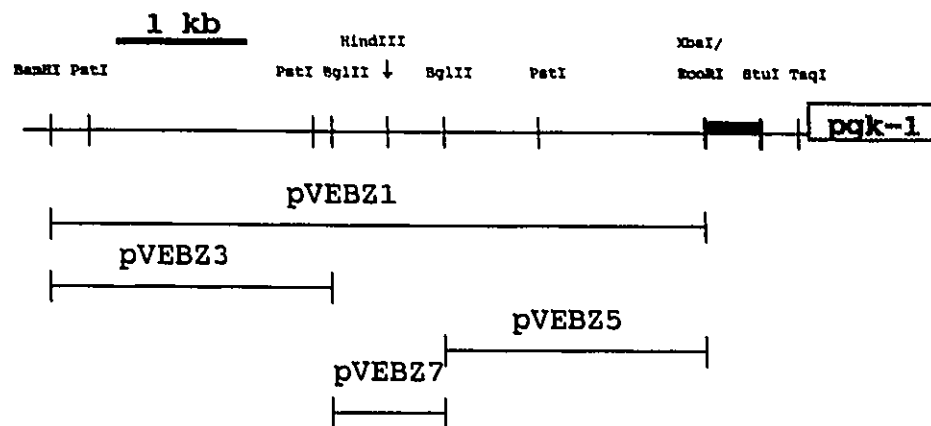
La présence du fragment de 4.5kb Bam HI-Eco RI chez pVE111A a augmenté le niveau de transcription induit par le fragment Xba-Stu (voir figure 5.2). Afin d'examiner cet effet marginal et d'évaluer s'il était le résultat d'une coopération entre Xba-Stu et Bam-Eco, le fragment Bam-Eco fut cloné seul dans un vecteur où les problèmes associés à l'auto-régulation de grand T sont éliminés, le vecteur pVEBZ où grand T est remplacé par lacZ. Le fragment Bam-Eco a été fragmenté en 3 morceaux qui furent également clonés dans pVEBZ.

Figure 5.4: Activité des dérivés de pVEBZ contenant des fragments du promoteur de pgk-1.

a) La carte des sites d'endonucléases retrouvés en amont du gène pgk-1 de souris. Le fragment Xba-Stu apparaît sous la forme d'un trait gras, le situant par rapport au fragment BamHI - EcoRI. Les traits sous les étiquettes pVEBZX délimitent, pour chacun de ces plasmides, la portion de BamHI - EcoRI insérée dans le multi-site de clonage de pVEBZ (voir figure 3.2), dont le gène reporteur est lacZ. L'orientation par rapport à pgk-1 est maintenue chez les dérivés pVEBZX.

b) Les plasmides dérivés de pVEBZ furent soumis à un protocole d'expression transitoire chez les cellules EC P19. L'activité β -galactosidasique fut mesurée sur les extraits cellulaires. Le pourcentage d'activité relative d'un échantillon X est mesuré en effectuant le rapport de la pente de la cinétique d'accumulation du produit de la réaction enregistrée pour X sur la pente enregistrée pour le contrôle positif (pSV1lacZ). Pour des fins de comparaison, les séquences insérées dans pVE pour produire pVE111, pVE112, pSV112 et pVE210 l'ont été également dans pVEBZ, donnant la série d'homologues portant le suffixe Z.

A)



B)

Nom du plasmide:	activité relative
pgklacZ:	129%
pSV1lacZ:	100%
pSV2lacZ:	26%
pVEBZ:	5%
pVEBZ1:	6%
pVEBZ3:	0%
pVEBZ5:	0%
pVEBZ7:	0%
pVE111Z:	5%
pVE112Z:	2%
pVE210Z:	10%
pSV112Z:	150%

Figure 5.4: Activité des dérivés de pVEBZ contenant des fragments du promoteur de pgk-1.

La première observation intéressante réside dans la différence importante d'activité entre deux plasmides identiques sur papier, pSV1lacZ et pSV2lacZ. La construction d'une carte comparative des sites d'endonucléases a permis de démontrer que le promoteur chez pSV2lacZ était inséré dans la mauvaise orientation, d'un point de vue transcriptionnel. Nous démontrons ici que la différence de niveau d'activité entre le promoteur pgk-1 et celui de la région précoce de SV40 en protocole d'expression transitoire chez les cellules EC P19 est beaucoup moindre que ce qui avait été précédemment rapporté (Adra, 1988). Le niveau d'activité du stimulateur de SV40 est 2 à 3 fois moindre que celui enregistré pour le stimulateur pgk-1.

Le fragment Bam-Eco de 4.5kb, lorsque testé en absence de Xba-Stu chez pVEBZ, a démontré un niveau d'activité nul chez des cellules EC P19. Il en fut évidemment de même avec les sous-fragments testés. Nous n'avons pu observer d'activité stimulatrice indépendante associée au fragment Bam-Eco de 4.5kb.

Nous avons également cloné les combinaisons de fragments Xba-Stu apparaissant à la figure 5.3 dans pVEBZ pour s'assurer que le phénomène d'autorégulation associé à l'usage de pVE ne biaise pas nos résultats. Ce dernier groupe de clones nous permet ainsi de comparer nos résultats directement avec ceux de l'analyse du promoteur de pgk-1 où lacZ était le gène reporteur. Les résultats des protocoles d'expression transitoire auxquels ont été soumis ces dérivés de pVEBZ appa-

raissent à la figure 5.4. Les niveaux d'activité sont sensiblement les mêmes qu'observés chez les homologues pVE.

5.3. Discussion.

Les caractéristiques principales des stimulateurs transcriptionnels comprennent la capacité de ces derniers à stimuler, à distance, des promoteurs et ce, indépendamment de l'orientation du stimulateur. La plupart des stimulateurs activent des promoteurs hétérologues. A cet égard, le stimulateur de SV40 stimule adéquatement le promoteur de pgk-1 de souris (McBurney, en préparation).

L'analyse des séquences en amont du gène pgk-1 a démontré la capacité du fragment Xba-Stu (-(440-120)), situé en amont de la boîte CAAT, à stimuler, à distance et dans les deux orientations, le promoteur de pgk-1 ((-119) - (+80)) (McBurney, en préparation). Certaines observations préliminaires (Adra, résultats non-publiés) ont également suggéré que le fragment Bam-Eco de 4.5kb semble faire de même. Nous avons examiné ici la capacité de ces fragments (Xba-Stu et Bam-Eco) à remplacer fonctionnellement le stimulateur SV40 auprès d'un promoteur hétérologue, celui de l'antigène grand T de SV40.

Notre évidence expérimentale indique qu'en protocole d'expression transitoire, le fragment Xba-Stu est un pauvre stimulateur de promoteur hétérologue. Bien que cette conclusion ne se base que sur l'essai du fragment Xba-Stu avec un seul promoteur, elle nous apparaît néanmoins valide puisque le promoteur précoce de SV40 est stimulable par une variété

de stimulateurs hétérologues (de Villiers et al., 1982; Levinson et al., 1982; Lusky et al., 1983). L'addition du fragment Bam-Eco de 4.5kb augmente sensiblement l'effet stimulateur du fragment Xba-Stu mais l'essai de Bam-Eco seul ne procure pas de stimulation. Ce dernier contient possiblement un ou plusieurs motifs pour facteurs de transcription qui ne suffisent pas, à eux seuls, à stimuler le promoteur de SV40 ou celui de pgk-1.

Malgré que la stimulation observée chez les cellules P19, avec les diverses combinaisons de fragment de pgk-1, est faible, peut-on néanmoins conclure que le fragment Xba-Stu de pgk-1 est capable de stimuler des promoteurs hétérologues, comme le fait le stimulateur de SV40? Pour accepter que le fragment Xba-Stu est un stimulateur fonctionnant de façon optimale qu'avec son propre promoteur, il faudrait vraisemblablement démontrer un minimum d'activité stimulatrice à l'endroit d'autres promoteurs connus pour être fonctionnels chez les cellules EC P19.

On note également une différence nette entre les niveaux d'activité observés chez les cellules EC P19 et HeLa. Nous avons démontré que les facteurs transcriptionnels spécifiques au promoteur précoce de SV40 et au fragment Xba-Stu de pgk-1 sont présents chez EC P19 et HeLa. La bonne "transfectabilité" des cellules HeLa rehausse davantage l'absence totale de transcription pour ces constructions. Le fait que le complexe transcriptionnel ne soit pas fonctionnel malgré la pré-

sence de tous les composants requis suggère une incompatibilité entre certains de ces composants.

Les "empreintes" laissées par les facteurs de transcription, qui protègent leur sites d'attachement d'une digestion par l'ADNase, ont permis d'identifier une multitude de sites d'attachement pour ces facteurs (Davidson et al., 1986; Schirm et al., 1987). La multiplicité ainsi que la variété des motifs de séquences retrouvés dans ces empreintes ont été invoqués pour expliquer la capacité démontrée du stimulateur de SV40 d'induire une stimulation transcriptionnelle chez une variété de promoteurs (Zenke et al., 1986). Une hypothèse sur la raison d'être de cette multiplicité chez SV40 suggère que la multiplicité est requise pour surmonter la non-disponibilité toujours possible de certains facteurs de transcription chez certains hôtes cellulaires. A cet égard, nos résultats suggèrent que la capacité d'un facteur à s'assembler adéquatement à l'intérieur d'un complexe transcriptionnel fonctionnel peut varier d'un complexe à l'autre et que l'activité d'un motif de stimulateur ne dépend pas uniquement de la disponibilité du facteur s'y attachant.

Donc, en résumé, le fragment Xba-Stu en amont du gène pgk-1 de la souris se comporte comme un stimulateur transcriptionnel lorsque lié à son promoteur homologue, stimulant à distance et dans les deux orientations, mais s'avère peu apte à stimuler un promoteur hétérologue.

Chapitre 6: Effets de l'antigène grand T de SV40 sur la différenciation des cellules EC P19.

6.1. Introduction.

L'étude des oncogènes identifiés jusqu'à maintenant a permis de cerner l'implication de certains d'entre eux dans des activités associées au contrôle de la prolifération et du statut de différenciation cellulaires. La prolifération et la différenciation semblent être d'ailleurs des événements reliés, le statut de différenciation s'accompagnant toujours d'un niveau prolifératif approprié. Une question fréquemment évoquée porte sur la nature de l'immortalisation cellulaire: l'immortalisation représente-t-elle une perte de contrôle de l'activité proliférative ou une dédifférenciation entraînant un regain de l'activité proliférative?

La découverte du produit de proto-oncogènes chez des cellules différenciées suggère que certains oncogènes jouent un rôle dans les mécanismes normaux de différenciation ou perturbent, par la présence de leur produit, les dits mécanismes.

L'idée fut examinée une première fois dans notre laboratoire par l'utilisation chez EC P19 de plasmides exprimant le proto-oncogène Ha-ras^{wt}-1 afin de déterminer si p21, le produit de l'oncogène, joue un rôle dans la différencia-

tion. Mise à part l'apparition de fibroblastes transformés ras⁺, p21 n'a pas modifié le spectre de lignées cellulaires différenciées obtenu après induction avec AR (Bell et al., 1986; Rudnicki et al., 1989).

Le problème fut approché différemment en soumettant des cellules différenciées à un protocole de sélection de croissance en milieu semi-solide qui permet d'isoler des clones de cellules semi-différenciées immortelles présentant les caractéristiques cytologiques de cellules musculaires squelettiques (Rudnicki, 1988). Une immortalisation fortuite avec fixation du statut de différenciation à un stade transitionnel sont observés ici, alors que p21 induit chez les fibroblastes ras⁺ une faible transformation.

Un certain nombre d'oncogènes, tels les antigènes grand T, de SV40 et polyome, E1A d'adénovirus, et de proto-oncogènes, tels v-myc, c-myc, N-ras, H-ras et v-erbA, ont démontré qu'ils peuvent, dans certains systèmes, interférer avec la différenciation, soit en l'induisant (Grimaldi et al., 1984; Müller et Wagner, 1984; Bar-Sagi et Feramisco, 1985), soit en la bloquant (Falcone et al., 1985; Cherington et al., 1986, 1987, 1988; Coppola et Cole, 1986; Prochownik et Kukowska, 1986; Denis et al., 1987; Olson et al., 1987; Webster et al., 1988; Coppola et al., 1989; Lassar et al., 1989;).

Dans le cas précis de l'antigène grand T, ce dernier a démontré sa capacité à immortaliser des lignées primaires de cellules et plusieurs lignées cellulaires permanentes aux caractéristiques différenciées ont été isolées (De

Vitry et al., 1974; Palmiter et al., 1985; Hanahan, 1986; Jat et al., 1986; Neto et al., 1986; McKay, 1989; Amsterdam et al., 1988; Frederiksen et al., 1988; Williams et al., 1988; Cepko, 1989; Liao et al., 1989).

Ces observations nous ont conduit à étudier la différenciation chez des cellules EC P19 transfectées avec des plasmides exprimant le gène de l'antigène grand T de SV40. Le produit de cet oncogène est de localisation généralement nucléaire, contrairement à p21, et démontre une compétence au chapitre de l'immortalisation. Il complète à l'occasion le travail d'un oncogène cytoplasmique pour générer le phénotype transformé (Hirakawa et Ruley, 1988). L'observation de Rudnicki (1988) nous suggéra qu'il était possible que grand T puisse immortaliser des cellules en voie de différenciation avec des caractéristiques cytologiques intermédiaires entre la cellule EC et la cellule entièrement différenciée. Dans un contexte plus large, nous voulions évaluer l'effet de cet oncogène sur le processus de différenciation chez les cellules EC P19.

6.2. Résultats.

6.2.1. Le gène tsT n'est pas exprimé chez les cellules P19 différenciées.

L'éventualité d'obtenir des clones de cellules P19 semi-différenciées, immortalisées avec grand T, nous amena à contempler l'utilisation d'un oncogène désactivable, tel un mutant ts sensible à la température, afin de pouvoir redif-

férencier l'intermédiaire transitionnel. Nous avons fait appel dans nos premières constructions au mutant tsA58 (Tegtmeyer, 1975) de l'antigène grand T de SV40, mutant désactivable à 39°C. Le gène mutant fut placé sous le contrôle transcriptionnel de divers promoteurs: son promoteur naturel, celui du gène pgk-1 de souris et RSV.

Nom du plasmide:	Enchaînement des séquences:
Tag-1:	stim.+ prom. SV40 - neo - Xba-Taq (pgk) - wtT
TagtsT:	stim.+ prom. SV40 - neo - Xba-Taq (pgk) - tsT
SVtsT:	stim.+ prom. SV40 - neo - stim.+ prom. SV40 - tsT
RSVtsT :	stim.+ prom. SV40 - neo - prom. RSV - tsT
pgktsT:	Xba-Taq (pgk) - tsT

Table 6.1: Enchaînement des séquences chez
les dérivés de tsT.

Les constructions furent soumises à un protocole d'expression transitoire chez EC P19 où les trois constructions produisirent des cellules immunopositives pour grand T (voir figure 6.1). On note que le plasmide RSV-tsT produit, chez bon nombre de cellules, une fluorescence nucléaire et cytoplasmique.

Deux régimes de différenciation furent utilisés par la suite, les deux régimes utilisant la co-transfection avec pKJ-1, un plasmide où neo est sous le contrôle transcriptionnel de pgk-1, et un plasmide contenant le gène pgk-1 entier (21kb), pour contribuer à stabiliser l'intégration.

Figure 6.1: Le gène tsT, sous le contrôle de divers promoteurs, produit une immunofluorescence détectable chez les cellules HeLa.

Cette figure présente le résultat d'un protocole d'immunofluorescence, la fluorescéine révélant l'antigène grand T (colonne de droite), effectué sur des cellules HeLa, issues de protocoles d'expression transitoire. La colonne de gauche présente les plans en contraste de phase des panneaux correspondant de la colonne de droite. Les cellules HeLa ont été transfectées avec SVtsT (A-B), RSVtsT (C-D), TagtsT (E-F), Tag-1 (G-H). On notera, au panneau D, des cellules avec une immunofluorescence nucléaire et cytoplasmique (flèches). L'anticorps primaire utilisé est l'anticorps polyclonal D2 de lapin, dirigé contre grand T. L'anticorps secondaire est un anticorps de chèvre, anti-lapin, conjugué à la fluorescéine. Le trait de référence représente 50 μ .

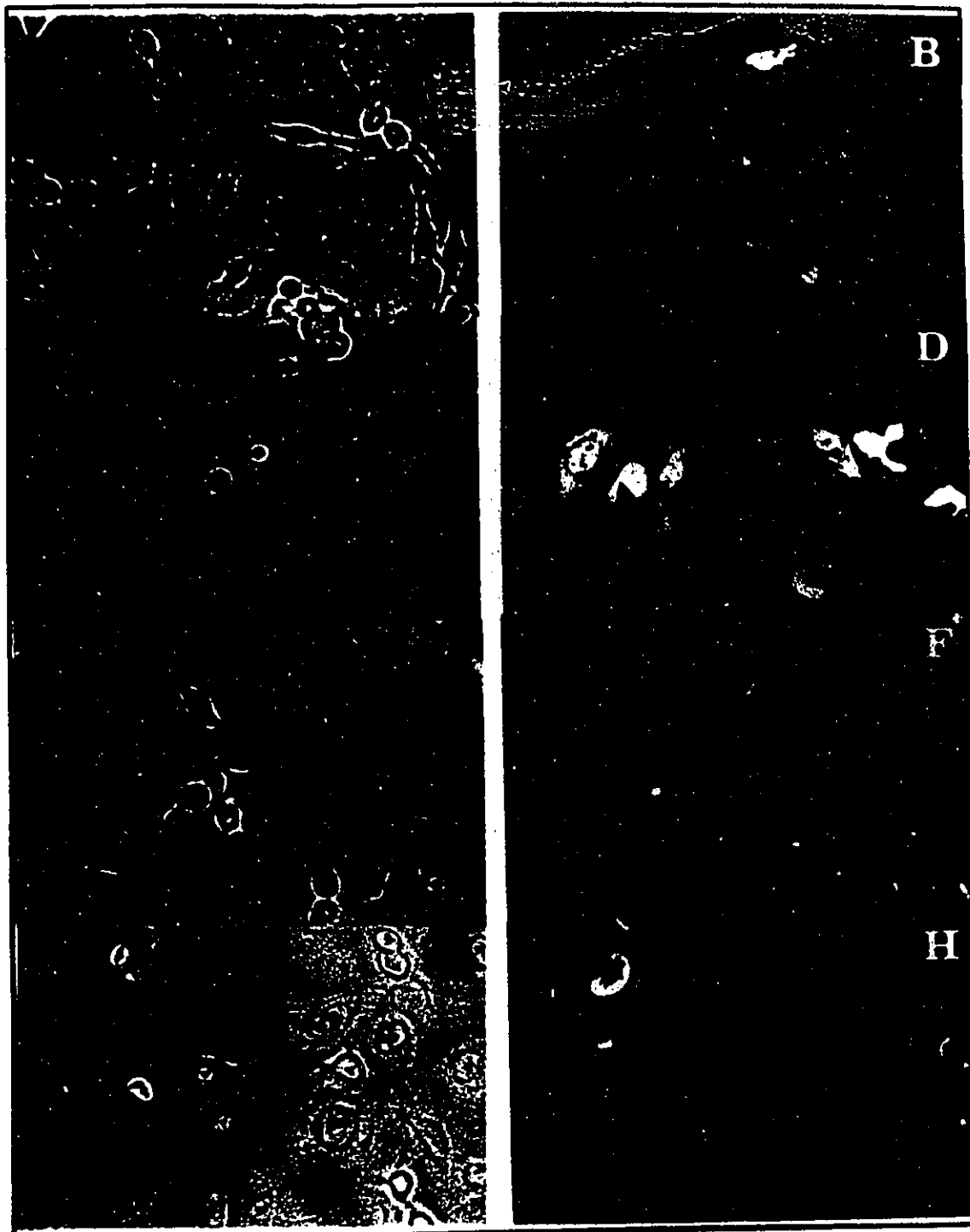


Figure 6.1: Le gène *tsT*, sous le contrôle de divers promoteurs, produit une immunofluorescence détectable chez les cellules HeLa.

Chez le premier régime, la différenciation était induite puis les plasmides transfectés à 8, 24 et 48 heures après l'induction, après quoi la population était placée sous sélection. Chez le second régime, les plasmides étaient d'abord transfectés, la population soumise à une sélection, des clones prélevés puis différenciés sous sélection.

Sous les conditions du premier régime, seule une descendance immortalisée, de cellules partiellement ou complètement différenciées, était attendue après la sélection puisque 100% des cellules EC P19 se différencient sous ces conditions et entrent éventuellement en sénescence. Soixante clones furent prélevés parmi les clones résultants, amplifiés sous sélection et testés pour la présence de grand T. Aucun clone ne s'avéra immunopositif. Même le contrôle positif Tag-1, où le gène type sauvage de grand T est sous le contrôle de pgk-1, ne produisit aucun clone positif après sélection.

Sous les conditions du second régime, tous les plasmides transfectés démontrèrent une immunopositivité et une production abondante d'ARNm avant la sélection (voir figures 6.1 et 6.2). Après la sélection, les seuls clones positifs furent observés chez les cellules transfectées avec Tag-1: la production de tous les mutants ts et de certains clones Tag-1 s'était éteinte durant la sélection. Le protocole fut répété à deux reprises, avec les mêmes résultats.

Figure 6.2: Production d'ARNm spécifique à tsT par divers promoteurs.

Cette figure représente le résultat de l'analyse Northern effectuée sur des échantillons de cellules HeLa (panneau A) et EC P19 (panneau B) issues de protocoles d'expression transitoire. L'ARNm total, 20µg par puits, est extrait de cellules transfectées avec Tag-1 (A-1, B-5), TagtsT (A-2, B-6), SVtsT (A-3, B-2), RSVtsT (A-4, B-3), pgktsT (A-5, B-4). Le transfert se fait sur membrane Hybond-N. Les messagers de grand T et petit T sont détectés avec une ribosonde, pGT2, contenant le fragment Hpa I - Hpa I (1067pb) de pSV1BSS. La membrane fut exposée 16 heures à un film XAR-5. Les bandes inférieure et supérieure représentent les ARNm de grand T et petit T, respectivement. La position de migration des ARN ribosomiaux eucaryotes de 28S et 18S est indiquée.

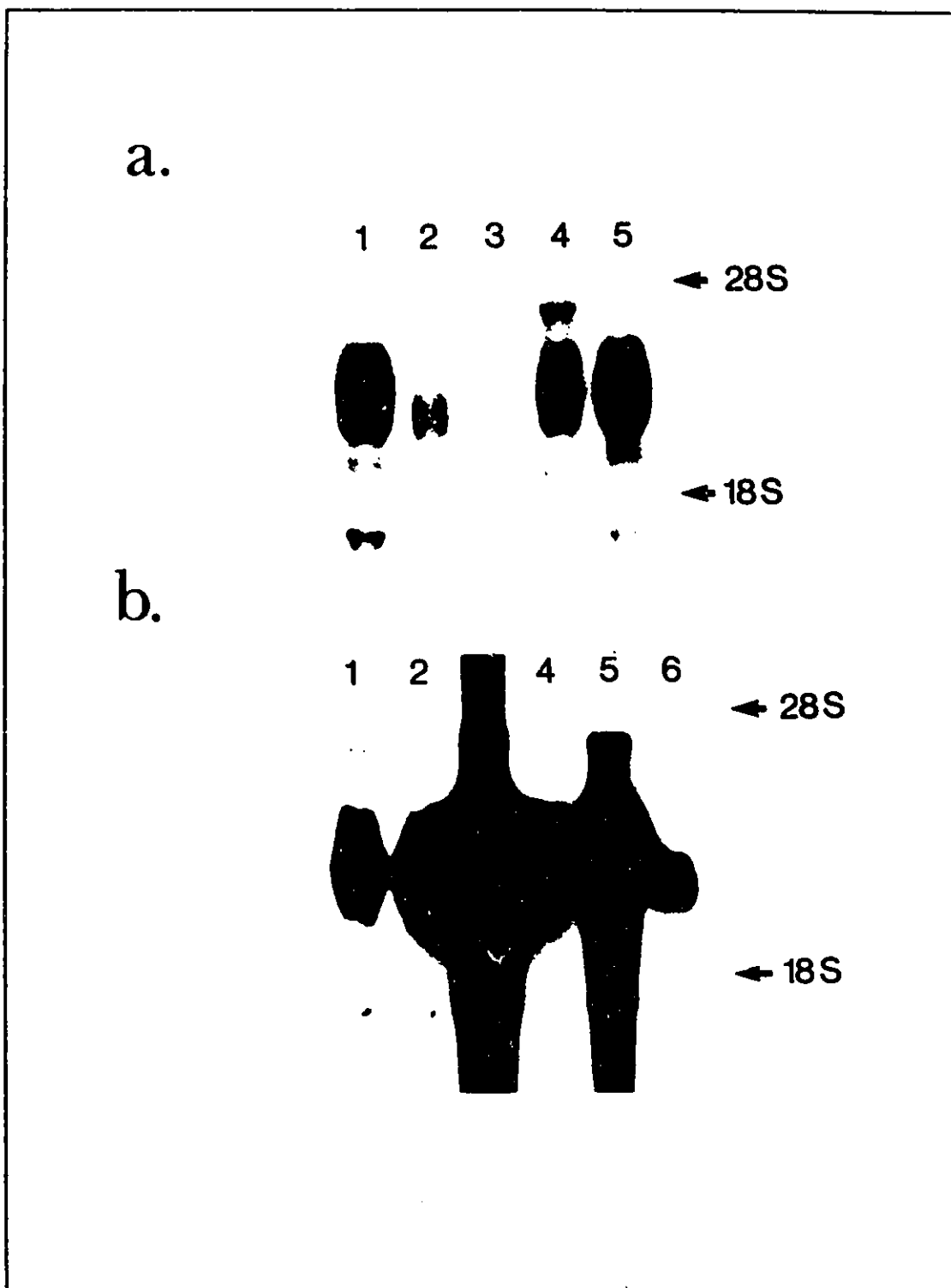


Figure 6.2: Production d'ARNm spécifique à tsT par divers promoteurs.

	nombre de focus observés	
	34°C	39°C
Plasmide transfecté:		
Tag-1:	6	19
TagtsT:	1	21
SVtsT:	0	4
RSVtsT:	0	11
pgktsT:	7	9
pZipSVtsA58:	2	13
pGEM-3:	0	3

Table 6.2: Test de formation de focus chez NIH 3T3 avec les plasmides tsT.

10µg de chaque plasmide sont transfectés sur 2.5×10^5 cellules NIH 3T3, selon la méthode de Chen et Okayama (1987), dans du milieu contenant 10% de sérum de veau. Après 48 heures, les cellules sont trypsinisées et réensemencées à raison de 10^5 / 25cm² dans du milieu contenant 3% de sérum de veau et 0.1mM en β-mercaptoéthanol. Le milieu est renouvelé aux 4 jours jusqu'à l'apparition de focus.

Les plasmides tsT furent soumis à un test de formation de focus chez les cellules NIH 3T3, afin de s'assurer du maintien de la capacité à transformer du mutant tsT. Un nombre de focus satisfaisant, en regard de la pauvre "transfectabilité" des cellules NIH 3T3, a été observé pour tous les plasmides (voir table 6.2). Plusieurs focus ont été prélevés sur les diverses boîtes et réensemencées à 39°C pour amplification. Toutefois, après 48 heures, il est devenu apparent que la croissance des clones s'était interrompue. Lorsque des cellules P19 transfectées avec les mêmes plasmides étaient incubées à 39°C avec ou sans sélection, aucune cellule ne survivait alors que des cellules P19 transfectées avec le gène neo se portent bien à la température non-permissive. Il est apparu possible qu'une tentative de désactivation de grand T chez des clones de cellules P19 ne permettrait pas d'observer la descendance de ces clones, de par la nécessité de maintenir les cellules à 39°C. L'idée d'utiliser des mutants tsT pour ce bloc d'expériences fut donc abandonnée.

6.2.2. Une corrélation entre la concentration cellulaire de grand T et le type cellulaire différencié?

Une douzaine de clones immunopositifs pour grand T furent obtenus des cellules transfectées avec Tag-1, dans le cadre du second régime de différenciation décrit à la section 6.2.1.. La plupart des clones démontraient peu de cellules immunopositives. En revanche, trois clones présentaient des

Identification des clones:	intensité de la fluorescence:	% de cellules positives:
1-2	modérée	80%
1-4	forte	90%
1-5	forte	40%

Table 6.3: Caractéristiques de clones de cellules EC P19
exprimant l'antigène grand T de SV40.

caractéristiques intéressantes, que l'on retrouve résumées à la table 6.3.

Ces trois clones ont été différenciés sous deux types de conditions: en mono-couche et en suspension. La différenciation en mono-couche n'a été réalisée qu'avec l'acide rétinoïque (AR). Les cellules étaient exposées à l'AR lors de leur ensemencement sur des boîtes de culture de tissu et 48 heures plus tard. Les cellules étaient détachées des boîtes et réensemencées tous les 3 jours. Les cellules étaient toujours immunopositives après 9 jours. Ces cultures différenciées furent maintenues en cultures pour un total de 27 jours. Les quantités d'ARNm spécifique à grand T des trois clones avant et après la différenciation apparaît à la figure 6.3.

Figure 6.3: Production d'ARNm spécifique à grand T avant et après la différenciation de clones de cellules P19 transformées avec Tag-1.

Cette figure représente le résultat de l'analyse Northern effectuée sur des échantillons de clones de cellules P19 issues de protocoles de sélection au G418, après transfection de cellules EC P19 avec Tag-1. L'ARNm total, 20µg par puits, est extrait de cellules de trois différents clones, 1-2, 1-4, et 1-5. Deux échantillons ont été prélevés pour chacun: un premier (AD) avant la différenciation, un second (PD) 27 jours après la différenciation en mono-couche avec l'acide rétinoïque. Les messagers de grand T et petit T sont détectés avec une ribosonde, pGT2, contenant le fragment Hpa I - Hpa I (1067pb) de pSV1BSS. La membrane fut exposée 18 heures à un film XAR-5. Les bandes inférieure et supérieure représentent les ARNm de grand T et petit T, respectivement. La position de migration des ARN ribosomiaux eucaryotes de 28S et 18S est indiquée.

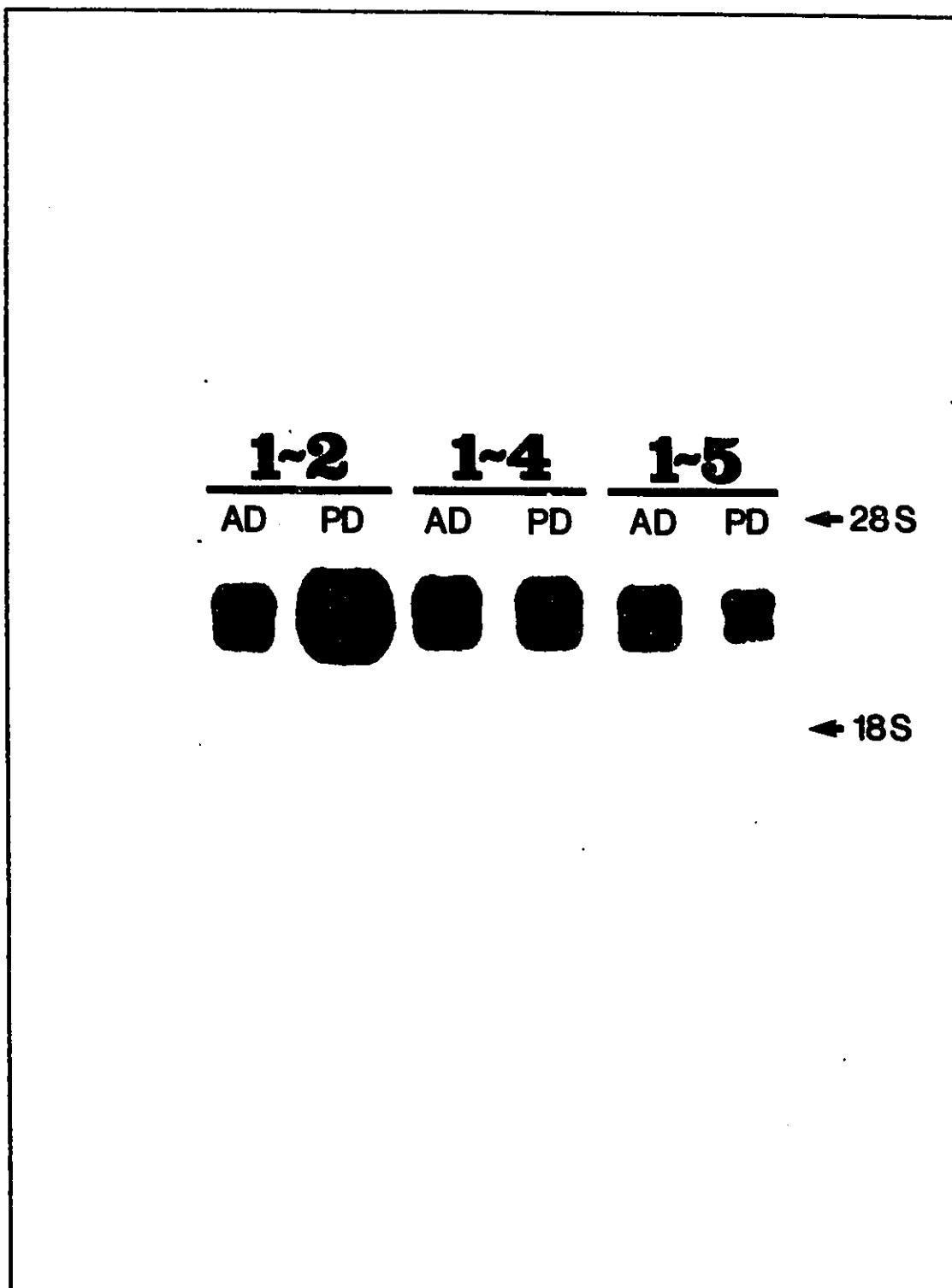


Figure 6.3: Production d'ARNm spécifique à grand T
avant et après la différenciation de
clones de cellules P19 transformées avec Tag-1.

Figure 6.4: Expression de GFAP et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en mono-couche avec l'acide rétinoïque.

Cette figure présente le résultat d'un protocole d'immunofluorescence à deux anticorps, la fluorescéine révélant l'antigène grand T (B, D), la rhodamine révélant le marqueur GFAP (C, E), effectué sur des cellules 1-4 différenciées en mono-couche avec l'acide rétinoïque. Les panneaux A, B et C représentent la même prise 250X alors que D et E représentent une prise 600X. La plupart des noyaux sont faiblement immunopositifs pour grand T. Les flèches du panneau C pointent vers de grandes structures fibrillaires immunopositives pour GFAP, qui ne semblent pas être dans le même plan que la fluorescence de grand T. La prise 600X, bien que dépourvu d'un plan de contraste de phase, exemplifie le phénomène. Un bon nombre de structures immunopositives pour GFAP ont repérées, sans toutefois pouvoir clairement démontrer une co-localisation avec grand T. Pour grand T, l'anticorps primaire utilisé est l'anticorps polyclonal D2 de lapin, dilué 1/100; l'anticorps secondaire est un anticorps de chèvre, anti-lapin, conjugué à la fluorescéine, dilué 1/50. Pour GFAP, l'anticorps primaire est un monoclonal de souris, dilué 1/3; l'anticorps secondaire, anti-souris, est conjugué à la rhodamine et dilué 1/50. Le trait de référence représente 50 μ .

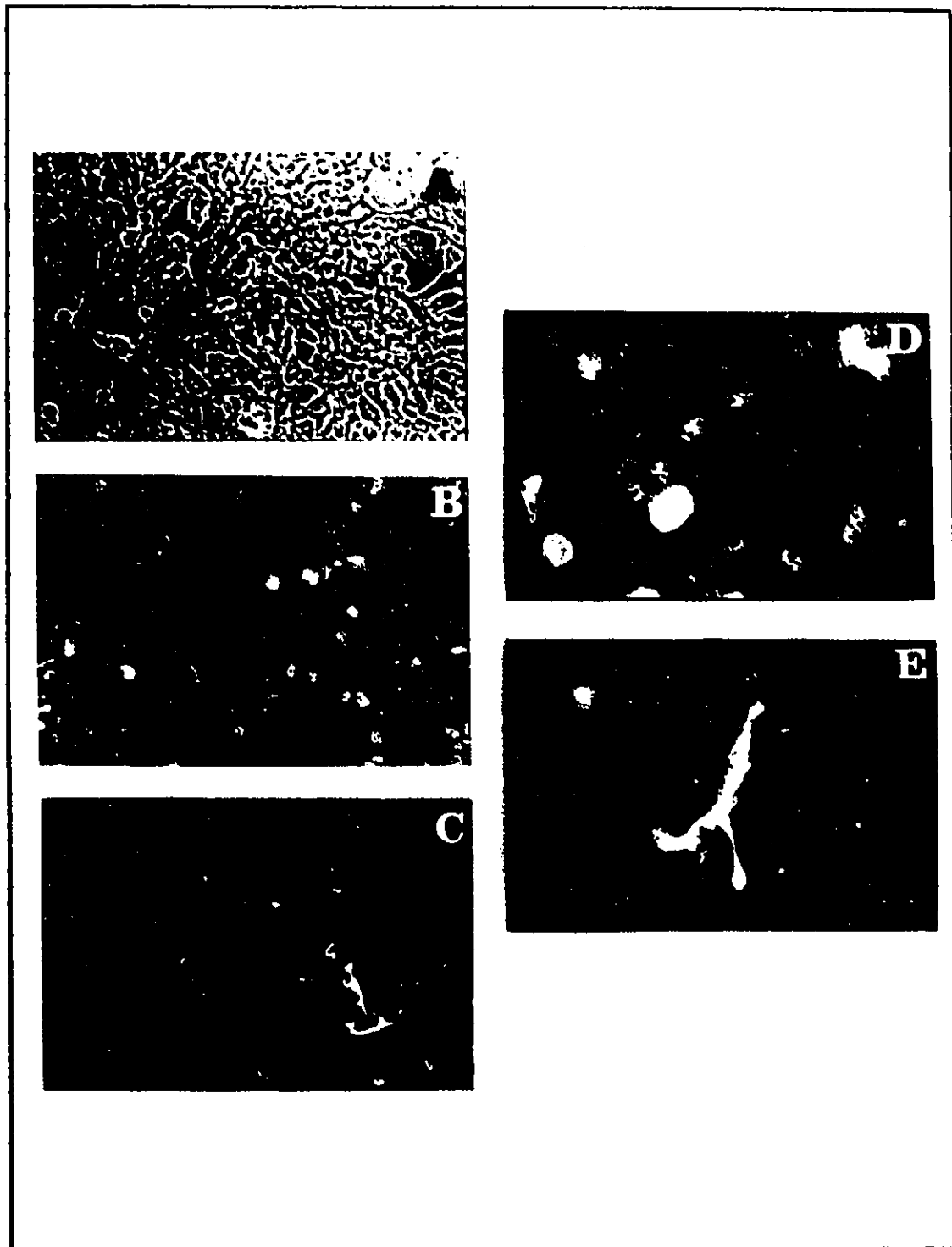


Figure 6.4: Expression de GFAP et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en mono-couche avec l'acide rétinolique.

Figure 6.5: Expression de NF160, B4C3 et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en mono-couche avec l'acide rétinoïque.

Les deux colonnes de cette figure présentent le résultat de deux protocoles d'immunofluorescence à deux anticorps, effectués sur des cellules 1-4 différenciées en mono-couche avec l'acide rétinoïque. Les panneaux A et D représentent des plans en contraste de phase à 250X, les panneaux B et E la fluorescéine révélant l'antigène grand T, les panneaux C et F la rhodamine révélant les marqueurs NF160 et B4C3 respectivement. Aucun processus neuronal n'a été aperçu en contraste de phase sur ces lamelles. Plusieurs cellules fortement immunopositives pour grand T sont en évidence. On observe au panneau C une fluorescence faible, diffuse et non-neurofilamentaire. Le panneau F met en évidence de la fluorescence spécifique à B4C3 qu'on retrouve à proximité de cellules fortement immunopositives pour grand T. Il y a co-localisation de signal tel qu'indiquée par les flèches des panneaux E et F. Pour grand T, l'anticorps primaire utilisé est le polyclonal D2 de lapin, dilué 1/100; l'anticorps secondaire est de chèvre, anti-lapin, conjugué à la fluorescéine, dilué 1/50. Pour NF160, l'anticorps primaire est un monoclonal de souris, dilué 1/4; pour B4C3, l'anticorps primaire est un monoclonal de souris, dilué 1/100; l'anticorps secondaire, dans les deux cas, est anti-souris, conjugué à la rhodamine et dilué 1/50. Le trait de référence représente 50 μ .

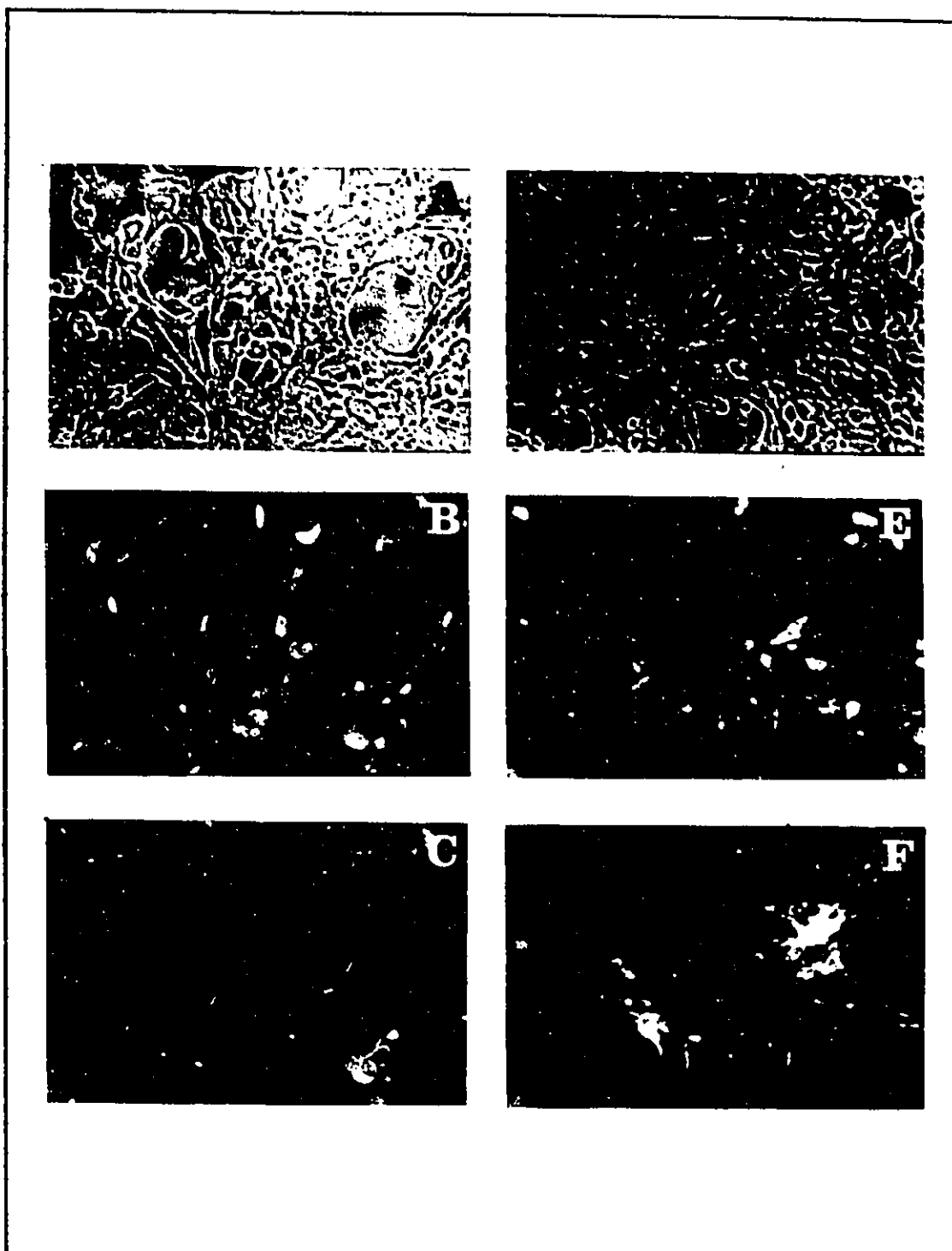


Figure 6.5: Expression de Nf60, B4C3 et grand T
chez les cellules 1-4 différenciées
en mono-couche avec l'acide rétinoïque.

A 27 jours post-différenciation, une différence morphologique était évidente chez les trois clones. Les trois clones présentaient des populations morphologiquement homogènes: les cellules 1-2 en post-différenciation affichaient une morphologie plate et une apparence proche de celle des cellules épithéliales; les cellules 1-5 en post-différenciation ressemblaient aux cellules EC P19; les cellules 1-4 en post-différenciation présentaient une morphologie fibroblastique analogue à celle observée chez les fibroblastes ras⁺ de Bell et al., (1986). Le clone 1-4 post-différencié fut analysé à l'aide d'une batterie d'anticorps dirigés contre des protéines spécifiques aux types cellulaires.

Très peu de cellules étaient positives pour GFAP (protéine acide des fibrilles de cellules gliales; marqueur d'astrocytes) (figure 6.4), aucune n'était positive pour NF160 (protéine 160kd des neuro-filaments) ou MF20 (dirigé contre un isoforme de la myosine, présent chez tous les types musculaires striés). Par contre, beaucoup de cellules étaient faiblement immunopositives pour B4C3, anticorps dirigé contre les α -actines des muscles striés et lisses (voir figure 6.5). Il n'y avait pas de co-localisation du signal B4C3 avec celui de grand T mais les cellules B4C3⁺ et T⁺ étaient souvent en contact.

6.2.3. L'antigène grand T de SV40 n'est pas exprimé chez les
cellules P19 différenciées avec l'acide rétinoïque.

Un protocole de différenciation en suspension a également été exécuté avec le clone 1-4. Les agrégats en suspension ont été induits avec l'acide rétinoïque, ensemencés sur des lamelles de verre au jour 4, fixés et soumis à un protocole immunocytologique au jour 7. Des processus neuronaux furent observés mais en proportion sensiblement moindre qu'habituellement observée avec les cellules P19 non-transfectées. Les anticorps spécifiques aux types cellulaires (ASTC) utilisés furent les mêmes qu'auparavant. Des structures immunopositives aux anticorps dirigés contre NF160 et B4C3 furent observés (voir figures 6.6 à 6.8). La proportion de cellules immunopositives pour grand T était faible. Les observations furent les mêmes sur différentes préparations et aucune co-localisation de NF160 ou B4C3 avec grand T n'a été démontrée.

Figure 6.6: Expression de GFAP et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en suspension avec l'acide rétinoïque.

Cette figure présente le résultat d'un protocole d'immunofluorescence à deux anticorps, effectués sur des cellules 1-4 différenciées en suspension avec l'acide rétinoïque. Les panneaux A, B et C représentent respectivement un plan en contraste de phase à 250X, la fluorescéine révélant l'antigène grand T et la rhodamine révélant le marqueur GFAP. Des structures fibrillaires, telles qu'observées chez les cellules différenciées en mono-couche (voir figure 6.4), n'ont pas été observées chez les agrégats. Nous n'avons observé pour GFAP qu'une fluorescence diffuse, dont l'intensité augmente dans les empilades de cellules. Un phénomène similaire est observable avec l'anticorps contre grand T bien qu'on observe régulièrement des grappes de cellules immunopositives pour grand T. Pour grand T, l'anticorps primaire utilisé est l'anticorps polyclonal D2 de lapin, dilué 1/100; l'anticorps secondaire est un anticorps de chèvre, anti-lapin, conjugué à la fluorescéine, dilué 1/50. Pour GFAP, l'anticorps primaire est un monoclonal de souris, dilué 1/3; l'anticorps secondaire, anti-souris, est conjugué à la rhodamine et dilué 1/50. Le trait de référence représente 50 μ .

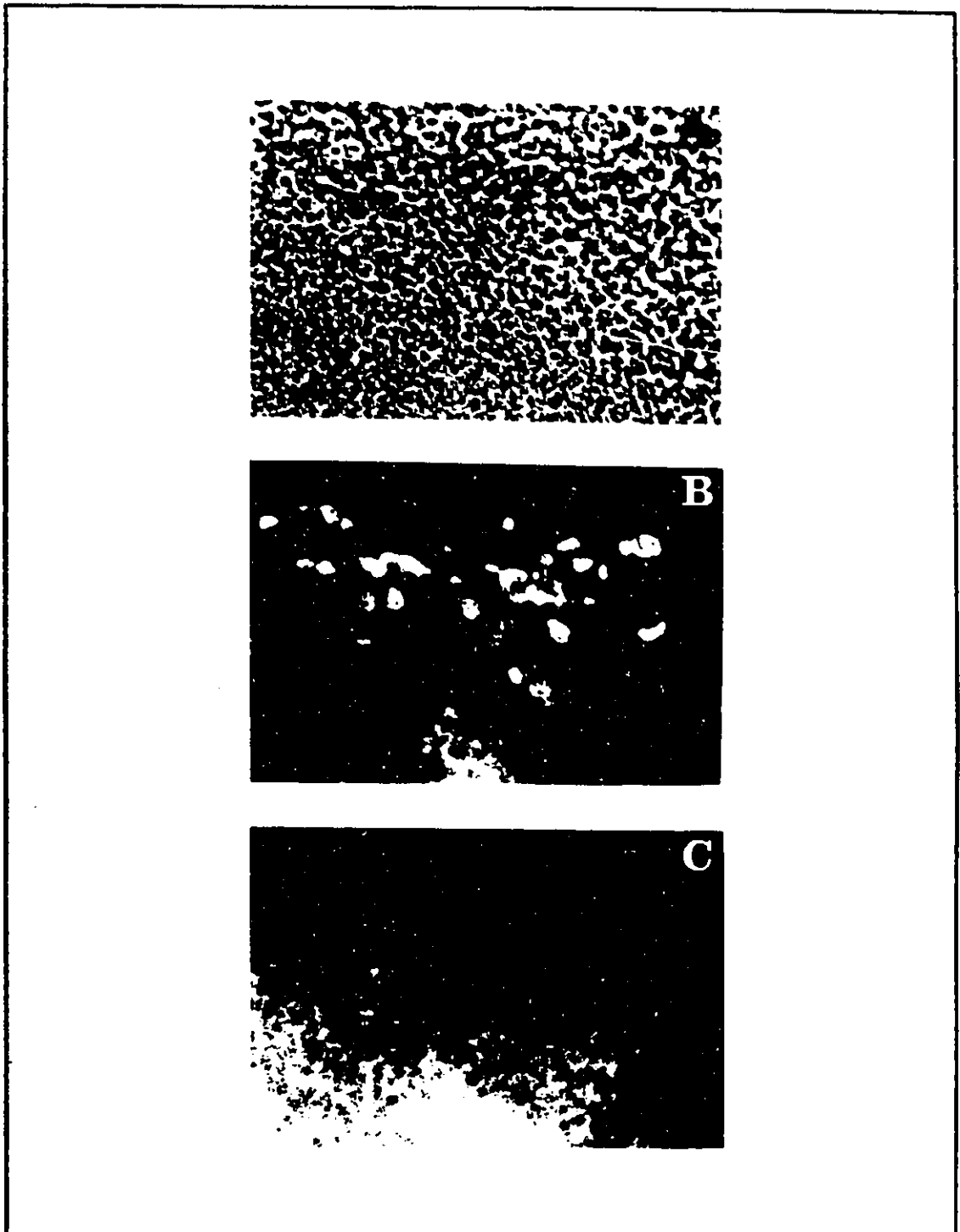


Figure 6.6: Expression de GFAP et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en suspension avec l'acide rétinolique.

Figure 6.7: Expression de NF160 et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en suspension avec l'acide rétinoïque.

Cette figure présente le résultat d'un protocole d'immunofluorescence à deux anticorps, la fluorescéine révélant l'antigène grand T (B, D), la rhodamine révélant le marqueur GFAP (C, E), effectué sur des cellules 1-4 différenciées en suspension avec l'acide rétinoïque. Les panneaux A, B et C représentent la même prise 250X alors que D et E représentent une prise 600X. Des processus neuronaux étaient visibles en contraste de phase (flèches). L'anticorps NF160 s'y localisait inmanquablement (panneau C), sans qu'on puisse co-localiser grand T (panneau B) dans les corps cellulaires, sur le parcours du processus. L'agrandissement sur le plan 600X met en évidence ce phénomène. Pour grand T, l'anticorps primaire utilisé est l'anticorps polyclonal D2 de lapin, dilué 1/100; l'anticorps secondaire est un anticorps de chèvre, anti-lapin, conjugué à la fluorescéine, dilué 1/50. Pour NF160, l'anticorps primaire est un monoclonal de souris, dilué 1/4; l'anticorps secondaire, anti-souris, est conjugué à la rhodamine et dilué 1/50. Le trait de référence représente 50 μ .

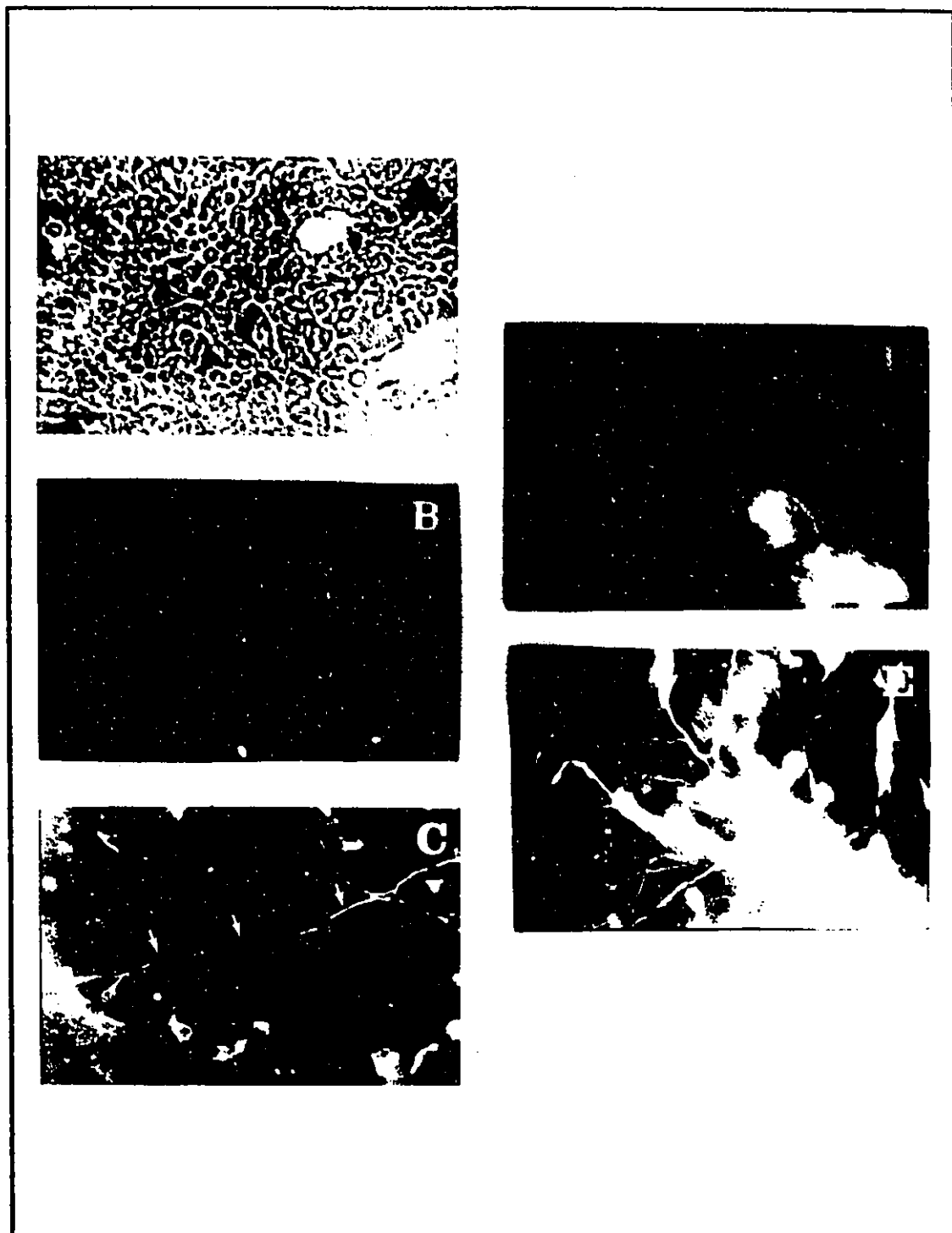


Figure 6.7: Expression de NF160 et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en suspension avec l'acide rétinolique.

Figure 6.8: Expression de B4C3 et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en suspension avec l'acide rétinoïque.

Cette figure présente le résultat d'une immunofluorescence à deux anticorps, la fluorescéine révélant l'antigène grand T (B, D), la rhodamine révélant le marqueur B4C3 (C, E), effectuée sur des cellules 1-4 différenciées en suspension avec l'acide rétinoïque. Les panneaux A, B et C représentent la même prise 250X alors que D et E représentent une prise 600X. La fluorescence observée pour B4C3 était généralement non-spécifique (panneau C) bien qu'un nombre limité de structures immunopositives, s'apparentant à des cellules musculaires lisses, ait été repérées (panneau E). On observe la présence occasionnelle de grappes de cellules immunopositives pour grand T (panneau B) mais pas de co-localisation avec B4C3. Pour grand T, l'anticorps primaire utilisé est l'anticorps polyclonal D2 de lapin, dilué 1/100; l'anticorps secondaire est un anticorps de chèvre, anti-lapin, conjugué à la fluorescéine, dilué 1/50. Pour B4C3, l'anticorps primaire est un monoclonal de souris, dilué 1/100; l'anticorps secondaire, anti-souris, est conjugué à la rhodamine et dilué 1/50. Le trait de référence représente 50 μ .

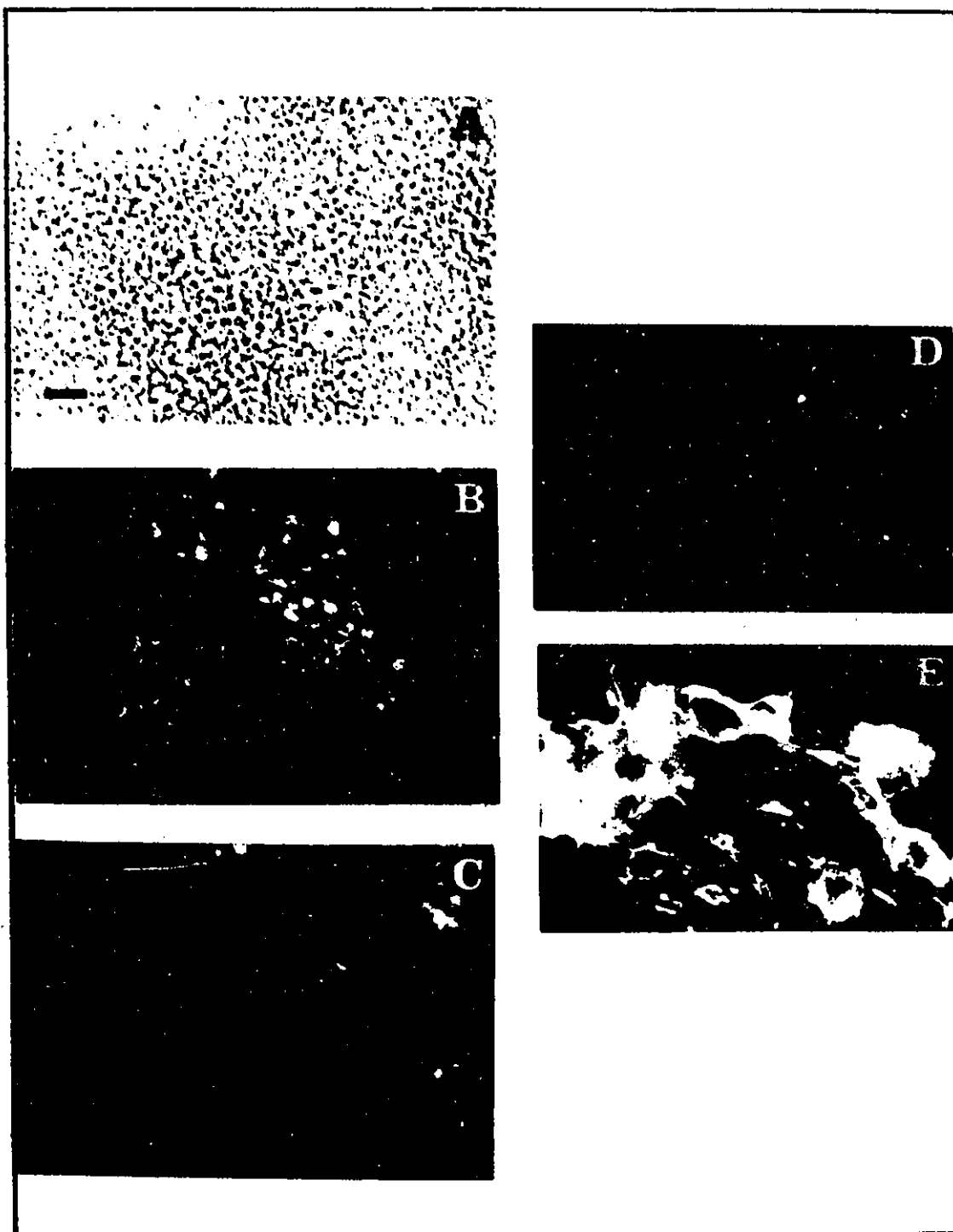


Figure 6.8: Expression de B4C3 et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en suspension avec l'acide rétinolique.

**6.2.4. L'antigène grand T de SV40 est exprimé chez les
cellules P19 différenciées de type cardiaque.**

Le clone 1-4 a été soumis à un protocole de différenciation en suspension, avec induction au DMSO. En contraste de phase, plusieurs focus de cellules cardiaques en contraction rythmique étaient évidents. A nouveau, la proportion de cellules immunopositives pour grand T était faible. Les cellules musculaires de morphologie cardiaque étaient fortement immunopositives pour B4C3. De plus, la co-localisation d'un ASTC avec grand T n'a été observée qu'avec B4C3 chez des cellules musculaires de morphologie cardiaque (voir figures 6.9 et 6.10). Les autres marqueurs de la batterie essayée ont été observés, mais à l'état de bruit de fond.

Figure 6.9: Expression de GFAP, NF160 et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en suspension avec DMSO.

Les deux colonnes de cette figure présentent le résultat de deux protocoles d'immunofluorescence à deux anticorps, effectués sur des cellules 1-4 différenciées en suspension avec du DMSO. Les panneaux A et D représentent des plans en contraste de phase à 250X, les panneaux B et E la fluorescéine révélant l'antigène grand T, les panneaux C et F la rhodamine révélant les marqueurs GFAP et NF160 respectivement. En dehors d'une fluorescence faible et diffuse, aucune structure ne s'est signalée immunopositive pour soit GFAP, soit NF160 (panneaux C et F). Dans les deux cas, des grappes de cellules immunopositives pour grand T étaient repérées de temps à autre (panneaux B et E). Pour grand T, l'anticorps primaire utilisé est l'anticorps polyclonal D2 de lapin, dilué 1/100; l'anticorps secondaire est un anticorps de chèvre, anti-lapin, conjugué à la fluorescéine, dilué 1/50. Pour GFAP, l'anticorps primaire est un monoclonal de souris, dilué 1/3; l'anticorps secondaire, anti-souris, est conjugué à la rhodamine, est dilué 1/50. Le trait de référence représente 50 μ .

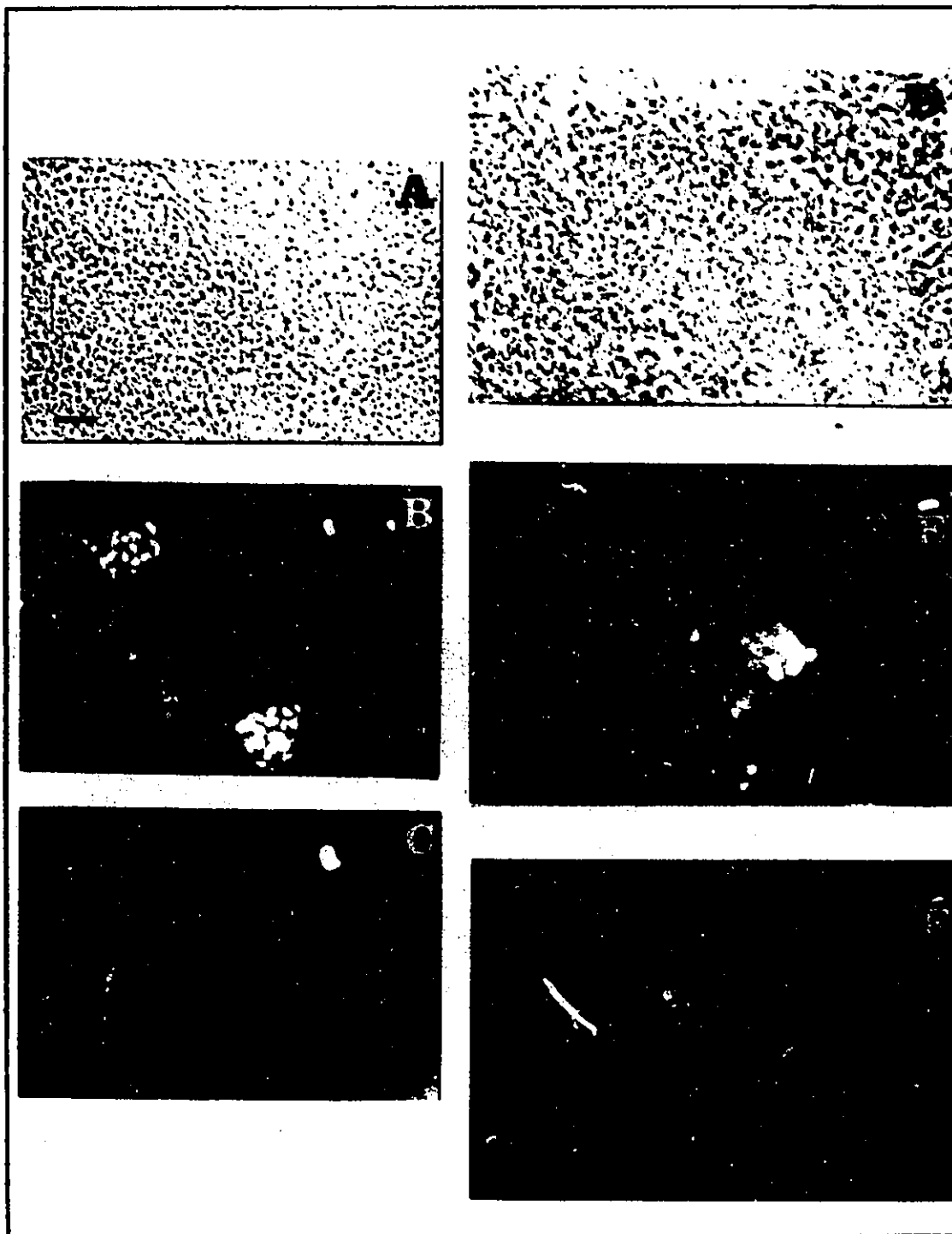


Figure 6.9: Expression de GFAP, NF160 et grand T
chez les cellules 1-4 différenciées
en suspension avec DMSO.

Figure 6.10: Expression de B4C3 et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en suspension avec DMSO.

Cette figure présente le résultat d'une immunofluorescence à deux anticorps, la fluorescéine révélant l'antigène grand T (B, E), la rhodamine révélant le marqueur B4C3 (C, F), effectuée sur des cellules 1-4 différenciées en suspension avec du DMSO. Chaque colonne regroupe les différents plans d'une prise 250X différente. Bon nombre de cellules immunopositives pour grand T ont été repérées (panneaux B et E). Une forte immunofluorescence fut détectée pour B4C3 chez des cellules de type musculaire de morphologie cardiaque (panneaux C et F). Les flèches apparaissant sur les différents panneaux pointent des cellules où la co-localisation de la fluorescence nucléaire de grand T avec la fluorescence cytoplasmique de B4C3 est nette. Pour grand T, l'anticorps primaire utilisé est l'anticorps polyclonal D2 de lapin, dilué 1/100; l'anticorps secondaire est un anticorps de chèvre, anti-lapin, conjugué à la fluorescéine, dilué 1/50. Pour B4C3, l'anticorps primaire est un monoclonal de souris, dilué 1/100; l'anticorps secondaire, anti-souris, est conjugué à la rhodamine et dilué 1/50. Le trait de référence représente 50 μ .

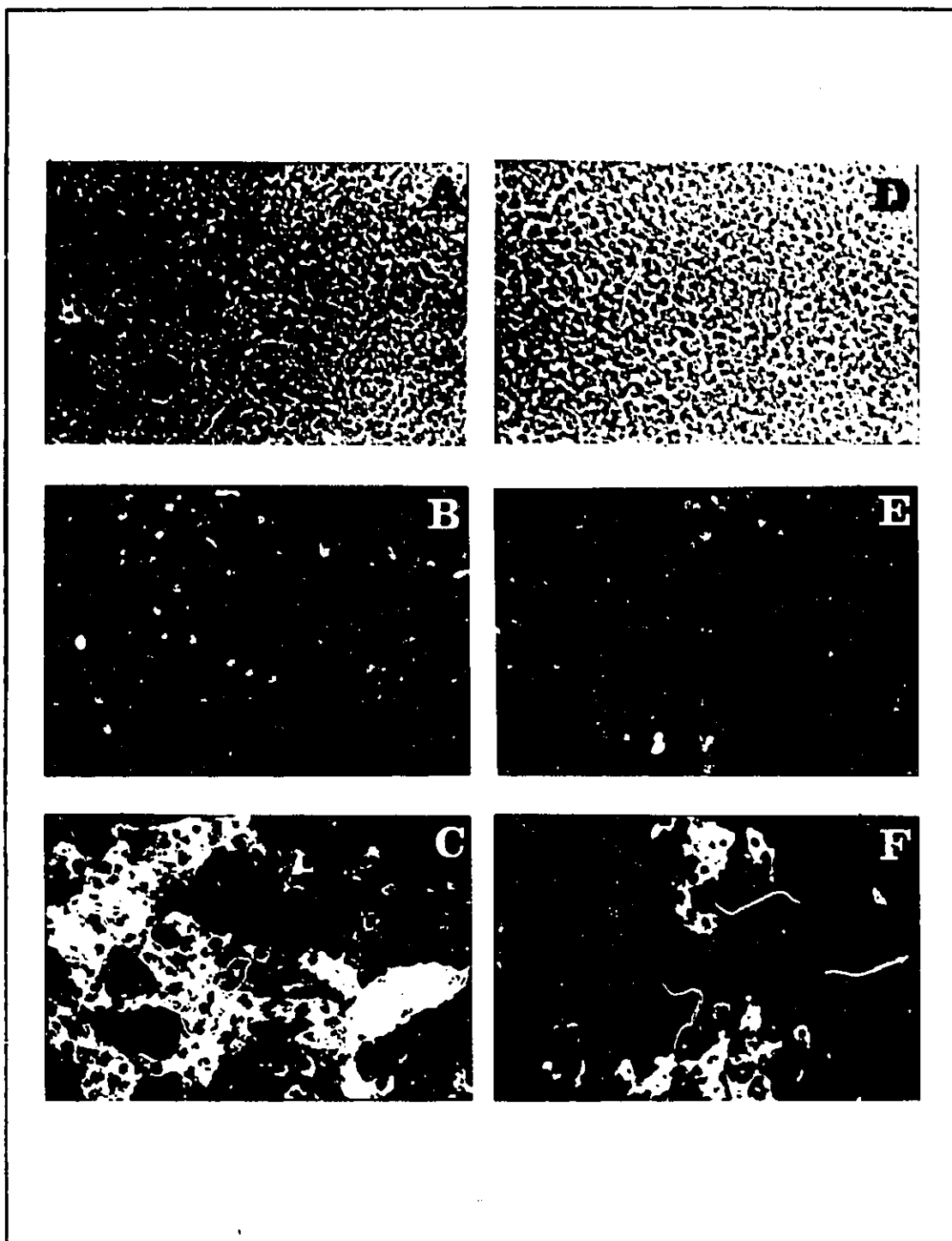


Figure 6.10: Expression de B4C3 et grand T chez les cellules 1-4 différenciées en suspension avec DMSO.

6.3. Discussion.

La première observation intéressante de ce bloc d'expériences fut la performance inattendue des plasmides contenant le gène *tsT*. La stratégie de clonage pour la construction du plasmide *TagtsT* impliquait le transfert simple, de *pZipSVtsA58* à *Tag-1*, d'un bloc de séquences flanqué de sites uniques, bloc débutant bien en deçà de l'ATG et finissant avant le codon d'arrêt TGA. *Tag-1* ainsi que tous les dérivés *tsT* produisent chez les cellules P19 et HeLa, les deux messagers correctement épissés et une protéine reconnue par l'anticorps polyclonal dirigé contre grand T lors de protocoles d'expression transitoire, suggérant que les constructions des dérivés de *tsT* sont correctes. L'observation que la production du produit protéique de *tsT* s'interrompt pendant la période de sélection et ce, peu importe le promoteur utilisé, alors que la production du produit de grand T est inaffectée, suggère que les deux protéines ne sont pas fonctionnellement équivalentes.

Nous n'avons pas tenté de déterminer si cette interruption de production trouve son explication dans une suppression sélective de l'expression de *tsT* ou dans une perte des copies intégrées des plasmides *ts*. Il est possible qu'un système de suppression d'expression visant *tsT* soit opérationnel dans les cellules non-différenciées. A cet égard, un système de suppression d'expression, dirigé contre grand T, est présumé être opérationnel en cours de différenciation de cellules ES (Suda et al., 1988). Tous les plasmides ont été

transfectés de la même façon en regard des rapports des plasmides T (tsT)/neo et T(tsT)/pgk(21kb), ce qui laissait présager que ces plasmides, étant pratiquement identiques, allaient s'intégrer et survivre de façon similaire dans le génome cellulaire. Notons que peu de clones de Tag-1 affichaient une forte expression de grand T après la sélection, suggérant que les copies plasmidiques de Tag-1 comportent peut-être l'avantage d'être moins instables, une fois intégrées dans le génome cellulaire, que leurs homologues tsT.

Le comportement, à 39°C, des clones de cellules P19 et NIH 3T3 transformées par tsT est intéressant. Nous avons observé, pour toutes nos constructions tsT, un arrêt de croissance à 39°C chez les cellules NIH 3T3. De plus, les cellules EC P19 transfectés avec les mêmes plasmides font de même et périssent sous sélection alors que les cellules EC P19 non-transfectées survivent bien à 39°C. Jat et Sharp (1989) ont observé un arrêt de croissance en phase G₁ ou G₂ du cycle cellulaire, lorsque des fibroblastes d'embryon de rat transfectés avec pZipSVtsA58 étaient incubés à 39°C. Ils avancent l'hypothèse que le produit de grand T est requis pour le maintien de l'activité prolifératrice. Une observation similaire fut rapportée pour des fibroblastes humains (Radna et al., 1989). Comme les cellules EC P19 sont déjà immortalisées, le rôle de grand T dans l'arrêt de croissance observé à 39°C est probablement plus complexe que celui proposé par l'hypothèse de Jat et Sharp.

La version virale du mutant tsA58 a été utilisée avec succès chez des cellules primaires (Frederiksen et al.,

1988). La version plasmidique, entre nos mains et celles de plusieurs autres collègues, ne semble pas produire les mêmes effets biologiques, à la température non-permissive. Des clones P19 tsT⁺ nous aurait été fort utiles mais notre inhabileté à les produire soulève plusieurs questions quant au rôle, à la température non-permissive, de la protéine codée par tsT.

Le premier régime de différenciation utilisé à la section 6.2.1, où les cellules étaient induites à se différencier avant la transfection des plasmides contenant grand T ou tsT, ne produisit aucune colonie immunopositive pour T chez 60 colonies piquées et amplifiées. L'observation chez les cellules différenciées en suspension que le même marqueur spécifique est le seul à co-localiser avec l'anticorps dirigé contre grand T chez les cellules musculaires suggère également que chez ce clone, la production de grand T est supprimée chez les lignées cellulaires de descendance neuro-ectodermique. Une observation similaire fut rapportée par Suda et al. (1988), relatant que des lignées souches transfectées avec des plasmides appropriés affichaient de forts niveaux d'expression de ras, myc et de grand T de SV40 alors que seuls ras et myc étaient exprimés dans les embryons en développement, les animaux chimériques adultes et les cellules souches différenciées *in vitro* avec l'acide rétinoïque.

Nous avons produit trois clones de cellules P19 affichant un génotype T⁺, clones que nous avons différenciés. Tout comme les cellules EC P19 transfectées avec ras, le spectre de cellules obtenu 9 jours après l'induction en mono-couche avec l'acide rétinoïque semble essentiellement le même

que celui obtenu avec des cellules EC P19. Par contre, à 27 jours post-induction, les différences morphologiques des trois clones étaient nettes. Bien que les quantités d'ARNm spécifique à grand T produites par chacune des lignées 1-2, 1-4 et 1-5 étaient essentiellement les mêmes avant l'induction, les niveaux post-induction étaient significativement différents: 1-2 avait doublé sa production, 1-4 avait maintenu la sienne et 1-5 avait réduit la sienne de moitié.

Mummery et al., (1985 et 1986) ont produit divers clones de cellules P19 différenciées; leur clone P19 END-2 ressemble aux cellules observées chez nos cellules 1-2 différenciées en mono-couche. Les cellules END-2 furent produites par désagrégation de cellules P19 différenciées en suspension avec AR, et l'utilisation d'un protocole de clonage par dilution limite. Nos conditions de production des clones 1-2, 1-4 et 1-5 établissent le caractère particulier de ces trois clones et soulèvent des questions en regard des événements qui ont conduit ces trois lignées vers des destins post-différenciation très différents. Les résultats suggèrent que les clones étaient pré-déterminés, en regard de leur phénotype éventuel, et que cette détermination se soit produite avant le protocole de sélection. Les deux seuls événements susceptibles de contribuer à déclencher ce processus sont la transfection des cellules avec Tag-1 et la production subséquente de l'antigène grand T. Quant au niveau d'expression de grand T en post-différenciation, il est possible qu'il soit relié au statut transcriptionnel du site d'intégration de Tag-1 chez chacun de ces clones.

Le fait que la population différenciée de 1-4 n'affiche aucun trait morphologique d'un des descendants normaux des cellules P19 permet d'envisager la possibilité que ces fibroblastes constituent un intermédiaire transitionnel arrêté, dans la cascade de différenciation, à un stade semi-différencié.

L'induction de la différenciation du clone T' 1-4 sous forme d'agrégats en suspension a produit de l'information très différente. L'analyse immunocytologique à deux anticorps des agrégats a permis de démontrer qu'une faible proportion des cellules étaient immunopositives pour grand T. Comme le produit de grand T était retrouvé chez 90% des cellules avant la différenciation, il semble donc, à prime abord, que le gène s'est éteint ou que son expression est supprimée chez la plupart des types cellulaires différenciés en suspension.

Effectivement, le seul type cellulaire différencié où l'on co-localise grand T avec un marqueur de type cellulaire est le type musculaire cardiaque. L'anticorps B4C3 produit une fluorescence modérée chez les muscles lisses mais intense chez les cellules musculaires cardiaques. L'anticorps MF20 est habituellement observé chez ces cellules mais ce, vers le dixième jour post-différenciation. Bien que le marqueur B4C3 est le premier à apparaître en cours de différenciation, un autre anticorps spécifique utilisé, nommé NF160, est présent dans les cultures différenciées à 7 jours mais ne co-localise pas avec grand T. A cet égard, notons que Frederiksen et al. (1988) avaient démontré que, chez leurs

lignées de cellules neuronales immortalisées avec grand T, l'anticorps GFAP n'apparaissait qu'à la température non-permissive. Il semble donc que, dans ce cas précis, l'absence de co-localisation avec GFAP est un événement dicté par la présence de grand T. Il apparaît peu probable que la co-localisation observée découle du fait que B4C3 est le premier marqueur à apparaître après la différenciation.

Deux explications sont possibles pour expliquer cette association entre les anticorps dirigés contre grand T et B4C3. Une première propose que la plupart des types cellulaires différenciés sont non-permissifs à l'expression de grand T ou de tout autre agent induisant la prolifération. Il est possible qu'un mécanisme similaire ait opéré une sélection pendant les 27 jours de réensemencement de la différenciation en mono-couche pour un type cellulaire immortalisé. Une seconde propose le mécanisme inverse, suggérant que grand T, dans son action pléiotropique, empêche l'engagement de la différenciation sauf chez un seul type cellulaire différencié. Chez ces deux mécanismes, le type cellulaire sélectionné pourrait dépendre de site chromosomique d'intégration de Tag-1.

Ces hypothèses n'expliquent pas la disparition de grand T chez la grande majorité des cellules différenciées. Cette disparition de grand T présente une analogie intéressante à l'observation rapportée par Suda et al. (1988) qui observèrent, rappelons-le, une disparition de grand T de SV40 après différenciation de cellules ES immunopositives pour grand T. Ce groupe n'avait pas observé d'expression de grand T dans le muscle cardiaque des animaux chimériques dérivés des

cellules ES. Le mécanisme de suppression d'expression qu'ils proposaient pourrait partiellement expliquer nos observations mais il n'est pas totalement satisfaisant. Le comportement marginal du muscle cardiaque trouve peut-être son explication dans les différences des systèmes cellulaires utilisés et notre utilisation du promoteur de pgk-1.

Il est probable que chaque clone démontre une spécificité différente, en ce qui a trait à l'ASTC qui co-localisera avec l'anticorps dirigé contre grand T. A cet égard, des travaux récents de mes collègues dans la même veine que ceux décrits ici ont permis d'obtenir un clone différencié avec l'acide rétinoïque qui produit presque exclusivement des cellules de morphologie neuronale. L'immunocytologie effectuée sur des préparations de ces cellules ont démontré une co-localisation des anticorps dirigés contre les neuro-filaments et contre grand T (P. Palerme et T. Bladon, communication personnelle).

Il émerge donc de cette série de résultats que l'antigène grand T de SV40 interfère, sans bloquer, les processus de détermination et de différenciation cellulaires des cellules EC P19. Les différents clones de cellules différenciées, en mono-couche ou en agrégats, seront utiles à l'identification progressive des composantes impliquées dans les processus de détermination et de différenciation cellulaires.

Chapitre 7: Conclusions d'ordre général.

7.1. Le système de trappage fonctionnel de stimulateurs.

Nous avons validé, pour fins d'identification de stimulateurs transcriptionnels exogènes, un système de banc d'essai, utilisant une variété de gènes reporteurs, dont le choix dépend du protocole expérimental.

Le vecteur de base utilise comme gène reporteur l'antigène grand T de SV40, dont l'expression est mesurée, de façon qualitative, par dosage immunocytoologique, et de façon quantitative, par dosage d'ARNm spécifiques. Cette approche analytique à deux volets a permis d'étudier la performance du système à sa limite de détection. Nos observations suggèrent qu'à cette limite, le système met en évidence ce qui apparaît être l'insertion génomique de dérivés de notre trappe à proximité de stimulateurs cellulaires. Le système permet donc l'utilisation des vecteurs plasmidiques comme bancs d'essai pour des stimulateurs exogènes alors qu'en absence de ces derniers, les vecteurs peuvent mettre en évidence, par insertion génomique, certains stimulateurs transcriptionnels cellulaires.

Les travaux de d'Hamada (1986a, 1986b), Swift et al. (1987), Hiller et al. (1988) et Gossler et al. (1989) appuient

notre hypothèse voulant que les clones dérivés de pVEnéo soient intégrés à proximité de stimulateurs transcriptionnels cellulaires. Nous avons démontré que l'intégration se fait à un nombre restreint de sites. Nous pourrions cloner le site d'insertion de chacun de ces clones et procéder à des séries de délétions afin de caractériser les séquences nécessaires au maintien de l'activité stimulatrice. Nous pourrions ainsi démontrer la nature cellulaire ou virale du matériel stimulateur et comparer les différents sites d'insertion. Les mêmes expériences pourraient être reprises avec des promoteurs différents, viraux et cellulaires, amputés des stimulateurs dont ils dépendent. Le patron d'insertion génomique de ces différents vecteurs procurerait de l'information utile à la compréhension des mécanismes d'insertion génomique. L'ensemble de ces expériences permettrait, en toute probabilité, de caractériser le statut cellulaire de plusieurs stimulateurs transcriptionnels.

7.2. Bgl II N d'HSV-2 et la transformation cellulaire.

Notre examen du fragment Bgl II N d'HSV-2, à l'aide de la trappe à stimulateurs, n'a pas permis d'identifier de stimulateur viral. Les seuls stimulateurs herpétiques chez les types 1 et 2 ont été identifiés à proximité de gènes de classe α alors que Bgl II N ne contient que des gènes de classes β et γ . Nous avons observé que trois sous-fragments de Bgl II N, représentés chez pVE1, pVEN6 et pVEN7, sous-fragments dont l'association au phénotype transformant a été démontrée par

le passé, produisent, avec notre trappe à stimulateur, de rares cellules immunopositives. Nos données actuelles suggèrent que, dans le cas de pVE1, le sous-fragment herpétique induit une intégration dirigée à proximité d'un stimulateur transcriptionnel cellulaire. Le modèle de transformation cellulaire, par HSV-2, compatible avec nos données en est un d'une recombinaison rare avec le génome cellulaire, causant la dérégulation transcriptionnelle d'un ou plusieurs gènes viraux de classe β .

De façon analogue à ce qui est proposé à la section précédente, les clones de cellules HeLa transfectées avec pVE1neo pourraient servir de matériel de départ au clonage des séquences cellulaires entourant les points d'insertion génomiques de pVE1neo, qui apparaissent peu nombreux chez les cellules HeLa. Cette manoeuvre permettrait d'apporter des éléments de réponse quant au rôle, si rôle il y a, des séquences herpétiques dans le processus d'intégration génomique, à savoir si ces séquences dirigent l'intégration vers des sites spécifiques. Il est possible que le ou les sites en question se révèlent être les copies intégrées du génome viral du virus du papillome humain HPV-18 ou d'un autre virus résident. Il faudrait alors examiner le patron d'intégration des mêmes plasmides chez des lignées cellulaires humaines exemptes d'HPV-18. Le même examen chez les cellules NIH 3T3 permettrait d'évaluer si l'activité transformante observée chez ces dernières est associée à une intégration dirigée. De plus, la comparaison des patrons d'intégration des clones pVEneo et

pVElneo chez différentes lignées cellulaires permettrait de déterminer la nature de la recombinaison lors de l'intégration génomique, à savoir si la recombinaison est de nature homologue et, dans l'affirmative, quelles séquences, l'origine de répllication de SV40 ou les séquences répétitives herpétiques, dirigent la recombinaison.

7.3. Le stimulateur du gène pgk-1 de souris.

Notre trappe à stimulateur a été utilisée pour étudier la performance d'un stimulateur identifié chez le gène pgk-1 de souris, dans le cadre d'un essai transcriptionnel avec un promoteur hétérologue. Le stimulateur en question s'est avéré être un faible stimulateur du promoteur de l'antigène grand T de SV40, même lorsque le protocole d'expression transitoire est effectué chez des cellules P19.

En fait, l'utilisation de la trappe comme banc d'essai a généré des données suggérant que la disponibilité des facteurs de transcription est certes un moyen important de contrôle de la transcription mais qu'un autre moyen de contrôle est peut-être plus fréquemment employé. Notre évidence expérimentale suggère que certains facteurs de transcription démontrent une compatibilité limitée dans leur capacité à s'assembler dans un complexe transcriptionnel, probablement dépendante de la nature des autres facteurs accessoires. Ceci renforce le concept que l'existence d'une pluralité de motifs chez le stimulateur SV40 ne signifie pas pour autant que tous les facteurs de transcription compatibles avec les motifs sont

nécessairement compatibles dans l'assemblage du complexe transcriptionnel ou, encore, qu'ils sont tous requis à la fois.

Cette question pourrait probablement être adressée adéquatement par l'utilisation de systèmes de transcription reconstitués *in vitro* où la performance des facteurs de transcription purifiés pourrait être observée à l'abri des autres mécanismes de contrôle habituellement à l'oeuvre dans les systèmes *in vivo*. Le recours à un protocole de gel retardateur, où les complexes protéines-ADN affichent des différences migratoires notables en fonction du nombre et de la nature des protéines s'amalgamant au complexe, permettrait d'obtenir essentiellement le même type d'information.

En regard de l'activité stimulatrice du fragment Xba-Stu de *pgk-1*, il serait utile de cloner ce stimulateur en amont d'autres promoteurs, qui dépendent de stimulateurs pour leur transcription, afin d'établir la généralité de notre hypothèse qui veut que ce stimulateur soit spécifique à son propre promoteur.

7.4. L'antigène grand T et la différenciation cellulaire.

Plusieurs oncogènes et proto-oncogènes s'attachent à une grande variété de protéines cellulaires et démontrent des spectres d'activités pléiotropiques. Certains d'entre eux interfèrent avec le processus de différenciation. Notre utilisation de l'antigène grand T de SV40 chez les cellules P19 s'inscrivait dans le cadre d'une tentative d'interférence avec

le processus de différenciation. Par cette manoeuvre, nous voulions examiner la nature de l'interférence et déterminer si 'grand T pouvait nous être utile dans l'identification de gènes impliqués dans le processus de différenciation, le but ultime étant d'éventuellement analyser les mécanismes contrôlant l'expression de ces gènes spécifiques.

L'approche sélectionnée au chapitre 6 fait appel à l'expression d'un oncogène afin d'identifier les gènes cellulaires affectés par la présence du produit de l'oncogène. Cette approche devrait permettre d'établir des relations de cause à effet entre les gènes affectés par grand T et l'effet phénotypique observé.

Nous comptons beaucoup sur l'obtention de clones de cellules EC P19 tsT⁺. Il serait intéressant de comprendre pourquoi les cellules EC P19 transfectées avec les plasmides tsT perdent l'activité grand T pendant la sélection. Une analyse Southern pourrait permettre de voir s'il y a perte des copies intégrées ou s'il s'agit d'un mécanisme de blocage d'expression.

L'utilisation d'un mutant ts de grand T a mis en évidence ce qui apparaît être un arrêt de croissance cellulaire à la température non-permissive, chez les cellules P19 et NIH 3T3. Cet arrêt de croissance serait intéressant à investiguer plus à fond afin de déterminer la nature de l'action de la protéine tsT, à la température non-permissive. Jat et Sharp (1989) soulignaient que chez certaines lignées cellulaires immortalisées par grand T, les processus normaux ré-

gulant la synthèse des divers éléments nécessaires à la transition entre les différentes phases du cycle cellulaire sont partiellement stimulés par l'oncogène. Ils suggéraient que le retrait rapide de l'activité oncogénique devrait résulter en un blocage du cycle cellulaire au point où la contribution de l'oncogène est devenue essentielle. Si nous parvenions à stabiliser l'intégration des dérivés tsT chez les cellules EC P19, alors il serait possible d'arriver à contourner le phénomène d'arrêt de croissance à 39°C en exécutant des changements de température étalés sur de longues périodes.

L'induction avec l'acide rétinoïque de la différenciation en mono-couche de clones de cellules P19 exprimant grand T (Tag-1) produit des populations aux caractéristiques morphologiques aussi divergentes que leur niveau d'expression de grand T. Il serait intéressant de déterminer si les clones testés étaient prédestinés, par le clonage, à leur phénotype final et si cette détermination cellulaire est reliée à l'expression de grand T chez ces cellules ou au traumatisme de la sélection avec neo. L'enrichissement notable en cellules immunopositives pour grand T en post-différenciation laisse croire que grand T influence la détermination cellulaire de ces clones.

En régime de différenciation d'agrégats en suspension, nous avons observé une différenciation essentiellement normale chez des clones exprimant fortement grand T. Il est évidemment difficile d'évaluer ce qui constitue une différenciation normale puisque le pourcentage de chaque type cellu-

laire obtenu varie d'un protocole de différenciation à l'autre, même avec des cellules EC P19 non-transfectées. Nous ne disposons pas pour le moment d'outils adéquats pour pouvoir distinguer les changements significatifs dans la composition du spectre de cellules différenciées. Nous ne pouvons que noter ce qui nous apparaît être la rareté inhabituelle d'un type cellulaire différencié. Bien que nous ayons observé un faible nombre de processus neuronaux chez le clone 1-4 différencié sous forme d'agrégats en suspension avec l'acide rétinoïque, nos observations ne permettent pas de conclure que grand T a altéré le spectre de types cellulaires différenciés. Mais, le comportement des clones lorsque différencié en mono-couche et l'obtention par mes collègues d'un clone de morphologie neuronale permettent de proposer que grand T contribue à enclencher la détermination cellulaire dans les cellules où il est exprimé.

Il faudrait piquer davantage de clones après transfection avec Tag-1 et sélection afin de confirmer la prédominance d'un phénotype ou la co-localisation de grand T avec certains marqueurs spécifiques. Il est probable que la constitution d'une banque de clones au profil de différenciation biaisé soit réalisable, ce qui procurerait le matériel nécessaire à la recherche des gènes impliqués dans la détermination et la différenciation cellulaires qu'affecte grand T.

La trappe à stimulateur pourrait être utilisée dans le contexte de ces expériences. La modification de pVEB, en substituant grand T par un autre gène dont le produit est re-

connu par un anticorps, permettrait de contourner la suppression d'expression frappant grand T, si elle s'avère exister, chez les autres types cellulaires différenciés et d'observer quels types cellulaires réactivent la trappe à stimulateur. Plus spécifiquement, l'utilisation d'un non-oncogène permettrait d'examiner la différenciation avec un minimum de perturbation. Le trappe intégrée pourrait alors être récupérée, ce qui permettrait d'examiner le gène sous le contrôle du stimulateur. Cette approche a été utilisée récemment par Gossler et al. (1989) chez des cellules ES. Un vecteur exprimant lacZ sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur minimal est électroporé chez des cellules ES, lesquelles servent à produire des blastocystes et des embryons qui, après une coloration appropriée, révèlent l'organe d'où le stimulateur cellulaire fut repêché par la trappe à stimulateur. L'utilisation de pVEBZ (ou autre dérivé non-oncogénique de pVE pour lequel on dispose d'un anticorps dirigé contre le produit du gène reporteur) chez les cellules P19 en différenciation permettrait d'identifier les types cellulaires différenciés chez lesquels la trappe récupère un stimulateur cellulaire.

Une variante de ce protocole permet au groupe d'Okamoto et al. (1990) d'isoler un nouveau facteur de transcription affichant une expression différentielle chez les cellules P19 et ce, à l'aide des séquences génomiques repêchées au site d'intégration d'une trappe à stimulateurs.

BIBLIOGRAPHIE

- Adra, C. N., 1988. «X chromosome inactivation and the phosphoglycerate kinase gene family». Thèse de doctorat, Université d'Ottawa.
- Adra, C. N., P. H. Boer et M. W. McBurney, 1987. «Cloning and expression of the mouse pgk-1 gene and the nucleotide sequence of its promoter». *Gene* 60:65-74.
- Amsterdam, A., A. Zauberger, G. Meir, O. Pinhasi-Kihmi, B. S. Suh et M. Oren, 1988. «Cotransfection of granulosa cells with simian virus 40 oncogene generates stable lines capable of induced steroidogenesis». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7582-7586.
- Auffray, C. et F. Rougeon, 1980. «Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA». *Eur. J. Biochem.* 107:303-314.
- Augereau, P. et P. Chambon, 1986. «The mouse immunoglobulin heavy-chain enhancer: effect on transcription in vitro and binding of proteins present in HeLa and lymphoid B cell extracts». *EMBO J.* 5:1791-1797.
- Bader, D., T. Masaki et D. A. Fischmann, 1982. «Immunocytochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis in vivo and in vitro». *J. Cell Biol.* 95:763-770.
- Banerji, J., S. Rusconi et W. Schaffner, 1981. «Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences». *Cell* 27:299-308.
- Bar-Sagi, D. et J. R. Feramisco, 1985. «Micro-injection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation». *Cell* 42:841-848.
- Bartlett, P. F., H. H. Reid, K. A. Bailey et O. Bernard, 1988. «Immortalization of mouse neural precursor cells by the c-myc oncogene». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3255-3259.
- Baty, D., H. A. Barrera-Saldaña, R. D. Everett, M. Vigneron et P. Chambon, 1984. «Mutational dissection of the 21bp repeat region of the SV40 early promoter reveals that it contains overlapping elements of the early-early and late-early promoters». *Nucl. Acids Res.* 12:915-932.
- Bell, J. C., K. Jardine et M. W. McBurney, 1986. «Lineage-specific transformation after differentiation of multipotential murine stem cells containing a human oncogene». *Mol. Cell. Biol.* 6:617-625.

- Benoist, C. et P. Chambon, 1981. «In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region». *Nature (London)* 290:304-310.
- Bhat, K., M. W. McBurney et H. Hamada, 1988. «Functional cloning of mouse chromosomal loci specifically active in embryonal carcinoma stem cells». *Mol. Cell. Biol.* 8:3251-3259.
- Birnboim, H. C. et J. Doly, 1979. «A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA». *Nucleic Acids Res.* 3:2303-2308.
- Bishop, J. M., 1987. «The molecular genetics of cancer». *Science* 235:305-311.
- Blin, N. et D. W. Stafford, 1976. «Isolation of high molecular weight DNA». *Nucleic Acids Res.* 3:2303-2308.
- Bolen, J. B., C. J. Thiele, M. A. Israel, W. Yonemoto, L. A. Lipsich et J. S. Brugge, 1984. «Enhancement of cellular src gene product associated tyrosyl kinase activity following polyoma virus infection and transformation». *Cell* 38:767-777.
- Borrelli, E., R. Hen et P. Chambon, 1984. «Adenovirus-2 E1A products repress enhancer-induced stimulation of transcription». *Nature (London)* 312:608-612.
- Boshart, M., F. Weber, G. Jahn, K. Dorsch-Häsler, B. Fleckenstein et W. Schaffner, 1985. «A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus». *Cell* 41:521-530.
- Bradford, M., 1976. *Anal. Biochem.* 72:248.
- Breathnach, R. et P. Chambon, 1981. «Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins». *Ann. Rev. Biochem.* 50:349-383.
- Briggs, M. R., J. T. Kadonaga, S. P. Bell et R. Tjian, 1986. «Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1». *Science* 234:47-52.
- Brugge, J. S., P. C. Cotton, A. E. Queral, J. N. Barrett, D. Nonner et R. W. Keane, 1985. «Neurons express high levels of a structurally modified activated form of pp60^{c-src}». *Nature (London)* 316:554-557.

- Buratowski, S., S. Hahn, P. A. Sharp et L. Guarente, 1988. «Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system». *Nature (London)* 334:37-42.
- Campione-Picardo, J., J.-J. Sun, J. Craig et M. W. McBurney, 1985. «Cell-cell interaction can influence drug-induced differentiation of murine embryonal carcinoma cells». *Dev. Biol.* 109:25-31.
- Cato, A. C. B., R. Miksicek, G. Schutz, J. Arnemann et M. Beato, 1986. «The hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus mediates progesterone induction». *EMBO J.* 5:2237-2240.
- Cattanach, B. M. et P. Papworth, 1981. «Controlling elements in the mouse. V. linkage tests with X-linked genes». *Genet. Res.* 38:57-70.
- Cavallini, B., J. Huet, J.-L. Plassat, A. Sentenac, J.-M. Egly et P. Chambon, 1988. «A yeast activity can substitute for the HeLa cell TATA box factor». *Nature (London)* 334:77-80.
- Cepko, C. L., 1989. «Immortalization of neural cells via retrovirus-mediated oncogene transduction». *Ann. Rev. Neurosci.* 12:47-65.
- Chen, C. et H. Okayama, 1987. «High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA». *Mol. Cell. Biol.* 7:2745-2752.
- Cherington, V., M. Brown, E. Paucha, J. St.Louis, B. H. Spiegelman et T. M. Roberts, 1988. «Separation of simian virus 40 large-T-antigen-transforming and origin-binding functions from the ability to block differentiation». *Mol. Cell. Biol.* 8:1380-1384.
- Cherington, V., C. Gee, M. Brown, E. Paucha, B. Spiegelman et T. Roberts, 1987. «Analysis of the effects of polyoma and SV40 large T antigens on differentiation». Dans "Nuclear oncogenes", édité par F. W. Alt, E. Harlow et E. B. Ziff, Laboratoires Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, New-York, pp. 138-143.
- Cherington, V., B. Morgan, B. M. Spiegelman et T. M. Roberts, 1986. «Recombinant retroviruses that transduce individual polyoma tumor antigens: effects on growth and differentiation». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4307-4311.
- Choi, Y., I. Lee et S. R. Ross, 1988. «Requirement for the simian virus 40 small tumor antigen in tumorigenesis in transgenic mice». *Mol. Cell. Biol.* 8:3382-3390.

- Colby, W. W. et T. Schenk, 1982. «Fragments of simian virus 40 transforming gene facilitates transformation of rat embryo cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5189-5193.
- Coppola, J. A. et M. D. Cole, 1986. «Constitutive c-myc oncogene expression blocks mouse erythroleukaemia cell differentiation but not commitment». *Nature (London)* 320:760-763.
- Coppola, J. A., J. M. Parker, G. D. Schuler et M. D. Cole, 1989. «Continued withdrawal from the cell cycle and regulation of cellular genes in mouse erythroleukemia cells blocked in differentiation by the c-myc oncogene». *Mol. Cell. Biol.* 9:1714-1720.
- Courtneidge, S. A. et A. E. Smith, 1983. «Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene». *Nature (London)* 303:435-439.
- Damjanov, I. et D. Solter, 1974. «Experimental teratomas». *Curr. Top. Pathol.* 59:69-130.
- Damjanov, I., D. Solter, M. Belicza et N. Skreb, 1971. «Teratomas obtained through extrauterine growth of seven day mouse embryos». *J. Natl. Cancer Inst.* 46:471-480.
- Danovich, R. M. et N. Frenkel, 1988. «Herpes simplex virus induces the replication of foreign DNA». *Mol. Cell. Biol.* 8:3272-3281.
- Davidson, I., C. Fromental, P. Augereau, A. Wildeman, M. Zenke et P. Chambon, 1986. «Cell-type specific protein binding to the enhancer of simian virus 40 in nuclear extracts». *Nature (London)* 323:544-548.
- Davidson, I., J. H. Xiao, R. Rosales, A. Staub et P. Chambon, 1988. «The HeLa cell protein TEF-1 binds specifically and cooperatively to two SV40 enhancer motifs of unrelated sequence». *Cell* 54:931-942.
- de Villiers, J., L. Olson, C. Tynäall et W. Schaffner, 1982. «Transcriptional "enhancers" from SV40 and polyoma virus show a cell type preference». *Nucl. Acids Res.* 10:7965-7976.
- de Villiers, J. et W. Schaffner, 1981. «A small segment of polyoma virus DNA enhances the expression of a cloned β -globin gene over a distance of 1400 base pairs». *Nucl. Acids Res.* 9:6251-6264.

- De Vitry, F., M. Camier, P. Czernichow, P. Benda, P. Cohen et A. Tixier-Vidal, 1974. «Establishment of a clone of mouse hypothalamus neurosecretory cells synthesizing neurophysin and vasopressin». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:3575-3579.
- DeFranco, D. et K. R. Yamamoto, 1986. «Two different factors act separately or together to specify functionally distinct activities at a single transcriptional enhancer». *Mol. Cell. Biol.* 6:993-1001.
- Denis, N., S. Blanc, M. P. Leibovitch, N. Nicolaiew, F. Dautry, M. Raymondjean, J. Kruh et A. Kitzis, 1987. «C-myc oncogene expression inhibits the initiation of myogenic differentiation». *Exp. Cell Res.* 172:212-217.
- DesRosiers, R. C., 1981. «Herpesvirus saimiri DNA in tumor cells - Deleted sequences and sequence rearrangements». *J. Virol.* 39:497-509.
- DesRosiers, R. C., A. Bakker, J. Kamine, L. A. Falk, R. D. Hunt et N. W. King, 1985. «A region of the herpesvirus saimiri genome required for oncogenicity». *Science* 228:184-187.
- Docherty, J. J., J. H. Subak-Sharpe et C. M. Preston, 1981. «Identification of virus-specific polypeptides associated with a transforming fragment (Bgl II N) of Herpes simplex virus type 2 DNA». *J. Virol.* 40:126-132.
- Dorn, A., J. Bollenkens, A. Staub, C. Benoist et D. Mathis, 1987. «A multiplicity of CCAAT box-binding proteins». *Nature (London)* 50:863-872.
- Draper, K. G., R. J. Frink, G. B. Devi, M. Swain, D. Galloway et E. K. Wagner, 1984. «Herpes simplex virus types 1 and 2 homology in the region between 0.58 and 0.68 map units». *J. Virol.* 52:615-623.
- Dudler, R. et A. Travers, 1984. «Upstream elements necessary for optimal function of the hsp 70 promoter in transformed flies». *Cell* 38:391-398.
- Duff, R. et F. Rapp, 1971. «Oncogenic transformation of hamster cells after exposure to Herpes simplex virus type 2». *Nature new Biol.* 233:48-50.
- Duesberg, P. H., 1987. «Cancer genes: rare recombinants instead of activated oncogenes (a review)». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2117-2124.

- Dynan, W. S. et R. Tjian, 1985. «Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins». *Nature (London)* 316:774-778.
- Dyson, N., K. Buchkovich, P. Whyte et E. Harlow, 1989. «The cellular 107K protein that binds to Adenovirus E1A also associates with the large T antigens of SV40 and JC virus». *Cell* 58:249-255.
- Edwards, M. K. S., J. F. Harris et M. W. McBurney, 1983. «Induced muscle differentiation in an embryonal carcinoma cell line». *Mol. Cell. Biol.* 3:2280-2286.
- Everett, R. D., D. Baty et P. Chambon, 1983. «The repeated GC-rich motifs upstream from the TATA box are important elements of the SV40 early promoter». *Nucl. Acids Res.* 11:2447-2464.
- Everett, R. D. et M. Dunlop, 1984. «Trans activation of plasmid-borne promoters by adenovirus and several herpes group viruses». *Nucl. Acids Res.* 12:5969-5978.
- Ewen, M. E., J. W. Ludlow, E. Marsilio, J. A. DeCaprio, R. C. Millikan, S. H. Cheng, E. Faucha et D. M. Livingston, 1989. «An N-terminal transformation-governing sequence of SV40 large T antigen contributes to the binding of both p110th and a second cellular protein, p120». *Cell* 58:257-267.
- Falcone, G., F. Tatò et S. Alemà, 1985. «Distinctive effects of the viral oncogenes myc, erb, fps, and src on the differentiation program of quail myogenic cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:426-430.
- Frederiksen, K., P. S. Jat, N. Valtz, D. Levy et R. McKay, 1988. «Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS». *Neuron* 1:439-448.
- Frederiksen, K. et R. D. G. McKay, 1988. «Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo». *J. Neurosci.* 8:1144-1151.
- Freytag, S. O., 1988. «Enforced expression of the c-myc oncogene inhibits cell differentiation by precluding entry into a distinct predifferentiation state in G₀/G₁». *Mol. Cell. Biol.* 8:1614-1624.
- Fromm, M. et P. Berg, 1982. «Deletion mapping of DNA regions required for SV40 early region promoter function in vivo». *J. Mol. Appl. Genet.* 1:457-481.

- Galloway, D. A., C. D. Copple et J. K. McDougall, 1980. «Analysis of viral DNA sequences in hamster cells transformed by herpes simplex virus type 2». Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:880-884.
- Galloway, D. A., L. C. Goldstein et J. B. Lewis, 1982. «Identification of proteins encoded by a fragment of Herpes simplex virus type 2 DNA that has transforming activity». J. Virol. 42:530-537.
- Galloway, D. A. et J. K. McDougall, 1981. «Transformation of rodent cells by a cloned DNA fragment of herpes simplex virus type 2». J. Virol. 38:749-760.
- Galloway, D. A. et J. K. McDougall, 1983. «The oncogenic potential of herpes simplex viruses: evidence for a "hit-and-run" mechanism». Nature (London) 302:21-24.
- Galloway, D. A., J. A. Nelson et J. K. McDougall, 1984. «Small fragments of herpesvirus DNA with transforming activity contain insertion sequence-like structures». Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4736-4740.
- Galloway, D. A. et M. A. Swain, 1984. «Organization of the left-hand of the herpes simplex virus type 2 Bgl II N fragment». J. Virol. 49:724-730.
- Gartler, S. M. et A. D. Riggs, 1983. «Mammalian X chromosome inactivation». Annu. Rev. Genet. 17:155-190.
- Gey, G. O., W. O. Coffman et M. T. Kubicek, 1952. «Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium». Cancer Res. 12:264.
- Gidoni, D., W. S. Dynan et R. Tjian, 1984. «Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters». Nature (London) 312:409-413.
- Gidoni, D., J. T. Kadonaga, H. Barrera-Saldaña, K. Takahashi, P. Chambon et R. Tjian, 1985. «Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions». Science 230:511-517.
- Giguère, V., S. M. Hollenberg, M. G. Rosenfeld et R. M. Evans, 1986. «Functional domains of the human glucocorticoid receptor». Cell 46:645-652.
- Gillies, S. D., S. L. Morrison, V. T. Oi et S. Tonegawa, 1983. «A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene». Cell 33:717-728.

- Gilman, S. C., J. J. Docherty, A. Clarke et W. E. Rawls, 1980. «Reaction patterns of Herpes simplex virus type 1 and type 2 proteins with sera of patients with uterine cervical carcinoma and matched controls». *Cancer Res.* 40:4640-4647.
- Glorioso, J., C. H. Schröder, G. Kumel, M. Szczesiul et M. Levine, 1984. «Immunogenicity of Herpes simplex virus glycoproteins gC and gB and their role in protective immunity». *J. Virol.* 50:805-812.
- Godowski, P. J., S. Rusconi, R. Miesfeld et K. R. Yamamoto, 1987. «Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement». *Nature (London)* 325:365-368.
- Goodbourn, S., H. Burstein et T. Maniatis, 1986. «The human B-interferon gene enhancer is under negative control». *Cell* 45:601-610.
- Goodbourn, S., K. Zinn et T. Maniatis, 1985. «Human B-interferon gene expression is regulated by an inducible enhancer element». *Cell* 41:509-520.
- Gorman, C. M., P. W. J. Rigby et D. P. Lane, 1985. «Negative regulation of viral enhancers in undifferentiated embryonic stem cells». *Cell* 42:519-526.
- Gossler, A., A. L. Joyner, J. Rossant et W. Skarnes, 1989. «Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes». *Science* 244:463-465.
- Graham, C. F., 1977. «Teratocarcinoma cells and normal mouse embryogenesis». Dans "Concepts in mammalian embryogenesis", édité par M. I. Sherman, M. I. T. Press, Cambridge, Mass., pp.315-397.
- Green, S., P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J.-M. Bornert, P. Argos et P. Chambon, 1986. «Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A». *Nature (London)* 320:134-139.
- Grimaldi, P., D. Czerucka, M. Rassoulzadegan, F. Cuzin et G. Ailhaud, 1984. «ob17 cells transformed by the middle-T-only gene of polyoma virus differentiate in vitro and in vivo into adipose cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5440-5444.
- Gruss, P., R. Dhar et G. Khoury, 1981. «The SV40 tandem repeats as an element of the early promoter». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:943-947.

- Hamada, H., 1986a. «Activation of an enhancerless gene by chromosomal integration». *Mol. Cell. Biol.* 6:4179-4184.
- Hamada, H., 1986b. «Random isolation of gene activator elements from the human genome». *Mol. Cell. Biol.* 6:4185-4194.
- Hampar, B., A. L. Boyd, J. G. Derge, M. Zweig, L. Eader et S. D. Showalter, 1980. «Comparison of mouse cells transformed by UV light-irradiated HSV or by SV40». *Cancer Res.* 40:2213-2222.
- Hanahan, D., 1985. «Techniques for transformation of E. Coli». Dans "DNA cloning: a practical approach", édité par D. M. Glover, IRL Press, Washington D.C., chapitre 6, pp. 109-135.
- Hanahan, D., 1986. «Oncogenesis in transgenic mice». Dans "Oncogenes and growth control", édité par T. Graf et P. Kahn, Springer-Verlag, Heidelberg, pp.349-363.
- Harrington, M. A., F. Gonzales et P. A. Jones, 1988. «Effect of cellular determination on oncogenic transformation by chemicals and oncogenes». *Mol. Cell. Biol.* 8:4322-4327.
- Haseltine, W. A., J. Sodroski, C. Rosen, W. Chun, A. Dayton et D. Celander, 1986. «Transactivator genes of HTLV-I, II and III». Dans "Oncogenes and growth control", édité par T. Graf et P. Kahn, Springer-Verlag, Heidelberg, pp.247-252.
- Hearing, P. et T. Shenk, 1983. «The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element». *Cell* 33:695-703.
- Hen, R., E. Borrelli, P. Sassone-Corsi et P. Chambon, 1983. «An enhancer is located 340bp upstream from the adenovirus E1A capsite». *Nucl. Acids Res.* 11:8747-8760.
- Herbomel, P., B. Bourachot et M. Yaniv, 1984. «Two distinct enhancers with different cell specificities coexist in the regulatory region of polyoma». *Cell* 39:653-662.
- Herr, W. et Y. Gluzman, 1985. «Duplications of a mutated simian virus 40 enhancer restore its activity». *Nature (London)* 313:711-714.
- Hiller, S., M. Hengstler, M. Kunze et R. Knippers, 1988. «Insertional activation of a promoterless thymidine kinase gene». *Mol. Cell. Biol.* 8:3298-3302.

- Hirakawa, T. et H. E. Ruley, 1988. «Rescue of cells from ras oncogene-induced growth arrest by a second, complementing, oncogene». Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:1519-1523.
- Hiscott, J., A. Wong, D. Alper et S. Xanthoudakis, 1988. «trans activation of type I interferon promoters by the simian virus 40 T antigen». Mol. Cell. Biol. 8:3397-3405.
- Howett, M. K. et F. J. Jenkins, 1984. «Characterization of continuous mouse cell lines established after malignant transformation by herpes simplex virus type 2 (HSV-2), HSV-2 DNA fragments and transformed cell DNA». 9th International Herpes virus Workshop, Seattle, USA, p. 76.
- Huszar, D. et S. Bacchetti, 1983. «Is ribonucleotide reductase the transforming function of herpes simplex virus 2?». Cell 30:76-78.
- Ishii, S., J. T. Kadonaga, R. Tjian, J. N. Brady, G. T. Merlino et I. Pastan, 1986. «Binding of the Sp1 transcription factor by the human Harvey ras1 proto-oncogene promoter». Science 232:1410-1413.
- Jariwalla, R. J., L. Aurelian et P. O. P. Ts'o, 1979. «Neoplastic transformation of cultured Syrian hamster embryo cells by DNA of herpes simplex virus type 2». J. Virol. 30:404-409.
- Jariwalla, R. J., L. Aurelian et P. O. P. Ts'o, 1980. «Tumorigenic transformation induced by a specific fragment of DNA from herpes simplex virus type 2». Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2279-2283.
- Jariwalla, R. J., L. Aurelian et P. O. P. Ts'o, 1983. «Immortalization and neoplastic transformation of normal diploid cells by defined cloned DNA fragments of herpes simplex virus type 2». Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:5902-5906.
- Jariwalla, R. J., B. Tanczos, C. Jones, J. Ortiz et S. Salimi-Lopez, 1986. «DNA amplification and neoplastic transformation mediated by a herpes simplex DNA fragment containing cell-related sequences». Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:1738-1742.
- Jat, P. S., C. L. Cepko, R. C. Mulligan et P. A. Sharp, 1986. «Recombinant retroviruses encoding simian virus 40 large T antigen and polyomavirus large and middle T antigens». Mol. Cell. Biol. 6:1204-1217.

- Jat, P. S. et P. A. Sharp, 1989. «Cell lines established by a temperature-sensitive simian virus 40 large-T antigen gene are growth restricted at the non-permissive temperature». *Mol. Cell. Biol.* 9:1672-1681.
- Jeltsch, J. M., Z. Krozowski, C. Quirin-Stricker, H. Grone-meyer, R. J. Simpson, J. M. Garnier, A. Krust, F. Jacob et P. Chambon, 1986. «Cloning of the chicken progesterone receptor». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5424-5428.
- Jenkins, F. J. et M. K. Howett, 1984. «Characterization of mRNAs that map in the Bgl II N fragment of the herpes simplex virus type 2 genome». *J. Virol.* 52:99-107.
- Jones, C., J. Ortiz et R. J. Jariwalla, 1986. «Localization and comparative nucleotide sequence analysis of the transforming domain in herpes simplex virus DNA containing repetitive genetic elements». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7855-7859.
- Jones, K. A., J. T. Kadonaga, P. J. Rosenfeld, T. J. Kelly et R. Tjian, 1987. «A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication». *Cell* 48:79-89.
- Jones, K. A. et R. Tjian, 1985. «Sp1 binds to promoter sequences and activates herpes simplex virus "immediate-early" gene transcription in vitro». *Nature (London)* 317:179-182.
- Jones-Villeneuve, E. M. V., M. A. Rudnicki, J. F. Harris et M. W. McBurney, 1983. «Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells». *Mol. Cell. Biol.* 3:2271-2279.
- Judd, B. H., 1988. «Transvection: allelic cross talk». *Cell* 53:841-843.
- Kadonaga, J. T., K. R. Carner, F. R. Masiarz et R. Tjian, 1987. «Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain». *Cell* 51:1079-1090.
- Kadonaga, J. T. et R. Tjian, 1986. «Affinity purification of sequence specific DNA binding proteins». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5889-5893.
- Kamine, J., A. Bakker et R. C. DesRosiers, 1984. «Mapping of RNA transcribed from a region of the Herpesvirus saimiri genome required for oncogenicity». *J. Virol.* 52:532-540.

- Kawamoto, T., H. Niwa, H. Sugiyama, S. Kimura, M. Amemura, A. Nakata et T. Kakunaga, 1988. «Identification of the human β -actin enhancer and its binding factor». *Mol. Cell. Biol.* 8:267-272.
- Kleinsmith, L. J. et G. B. Pierce, 1964. «Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells». *Cancer Res.* 24:1544-1552.
- Knipe, D. M., 1982. «Cell growth transformation by herpes simplex virus». *Prog. Med. Virol.* 28:114-144.
- Kriegler, M., C. F. Perez, C. Hardy et M. Botchan, 1984. «Transformation mediated by the SV40 T antigens: separation of the overlapping SV40 early genes with a retroviral vector». *Cell* 38:483-491.
- Kruse, F., C. T. Komro, C. H. Michnoff et R. J. MacDonald, 1988. «The cell-specific elastase I enhancer comprises two domains». *Mol. Cell. Biol.* 8:893-902.
- Kumar, R., T. A. Firak, C. T. Schroll et K. N. Subramanian, 1986. «Activation of gene expression is adversely affected at high multiplicities of linked simian virus 40 enhancer». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3199-3203.
- Lang, J. C., D. A. Spandidos et N. M. Wilkie, 1984. «Transcriptional regulation of a herpes simplex virus immediate early gene is mediated through an enhancer-type sequence». *EMBO J.* 3:389-395.
- Lassar, A. B., M. J. Thayer, R. W. Overell et H. Weintraub, 1989. «Transformation by activated ras or fos prevents myogenesis by inhibiting expression of MyoD1». *Cell* 58:659-667.
- Leibovitch, M.-P., S. A. Leibovitch, J. Hillion, M. Guillier, A. Schmitz et J. Harel, 1987. «Possible role of c-fos, c-N-ras and c-mos proto-oncogenes in muscular development». *Exp. Cell Res.* 170:80-92.
- Lessard, J. L., 1988. «Two monoclonal antibodies to actin: one generally reactive and one muscle selective». *Cell Mot. Cytoskel.* 10:349-362.
- Levinson, B., G. Khoury, G. V. Vande Woude et P. Gruss, 1982. «Activation of SV40 genome by 72 base pair tandem repeats of Moloney sarcoma virus». *Nature (London)* 295:568-572.
- Liao, W. S. L., K. -T. Ma, C. D. Woodworth, L. Mengel et H. C. Isom, 1989. «Stimulation of the acute-phase response in simian virus 40-hepatocyte cell lines». *Mol. Cell. Biol.* 9:2779-2786.

- Loeken, M., I. Bikel, D. M. Livingston et J. Brady, 1988. «Trans-activation of RNA polymerase II and III promoters by SV40 small t antigen». *Cell* 55:1171-1177.
- Lusky, M., L. Berg, H. Weiher et M. Botchan, 1983. «Bovine papilloma virus contains an activator of gene expression at the distal end of the early transcription unit». *Mol. Cell. Biol.* 3:1108-1122.
- Macnab, J. C. M., R. L. P. Adams, A. Rinaldi, A. Orr et L. Clark, 1988. «Hypomethylation of host cell DNA synthesized after infection or transformation of cells by herpes simplex virus». *Mol. Cell. Biol.* 8:1443-1448.
- Maniatis, T., E. F. Fritsh et J. Sambrook, 1982. «Molecular cloning: a laboratory manual». Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New-York.
- Maniatis, T., S. Goodbourn et J. A. Fischer, 1987. «Regulation of tissue-specific gene expression». *Science* 236:1237-1245.
- Martin, G. R. et M. J. Evans, 1975a. «Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma stem cells: formation of embryoid bodies in vitro». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:1441-1447.
- Martin, G. R. et M. J. Evans, 1975b. «Multiple differentiation of teratocarcinoma stem cells following embryoid body formation in vitro». *Cell* 6:467-474.
- Mathis, D. J. et P. Chambon, 1981. «The SV40 early region TATA box is required for accurate in vitro initiation of transcription». *Nature (London)* 290:310-315.
- McBurney, M. W., E. M. V. Jones-Villeneuve, M. K. S. Edwards et M. A. Rudnicki, 1983. «Controlled development of embryonic tissues in a differentiating embryonal carcinoma cell line». Dans "Teratocarcinoma stem cells", édité par L. M. Silver, G. R. Martin, S. Strickland, Laboratoires Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, New-York, pp.121-124.
- McBurney, M. W., K. R. Reuhl, A. I. Ally, S. Nasipuri, J. C. Bell et J. Craig, 1988. «Differentiation and maturation of embryonal carcinoma derived neurons in cell culture». *Dev. Neurosci.* 8:1063-1073.
- McBurney, M. W. et B. J. Rogers, 1982. «Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns». *Dev. Biol.* 89:503-508.

- McKay, R., 1989. «Where do different neurons come from? Identification and immortalization of CNS precursor cells». *Ann. N.Y. Acad. Sc.* 540:47-51.
- McKnight, S. et R. Tjian, 1986. «Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells». *Cell* 46:795-805.
- Metcalf, D., 1985. «The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors». *Science* 229:16-22.
- Miesfield, R., S. Rusconi, P. J. Godowski, B. A. Maler, S. Okret, A.-C. Wikström, J.-Å. Gustafsson et K. R. Yamamoto, 1986. «Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of a cloned receptor DNA». *Cell* 46:389-399.
- Minson, A. C., M. E. Thouless, R. P. Elgin et G. Darby, 1976. «The detection of virus DNA sequences in a Herpes type 2 transformed cell line (333-8-9)». *Int. J. Cancer* 17:493-500.
- Mitchell, P. J., C. Wang et R. Tjian, 1987. «Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen». *Cell* 50:847-861.
- Mitchell, R. L., L. Zokas, R. D. Schreiber et I. M. Verma, 1985. «Rapid induction of the expression of proto-oncogene fos during human monocytic differentiation». *Cell* 40:209-217.
- Mohandas, T., R. S. Sparkes et L. J. Shapiro, 1981. «Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for inactivation by DNA methylation». *Science* 211:393-396.
- Monk, M., 1986. «Methylation and the inactive X». *Bioessays* 4:204-208.
- Monk, M. et M. I. Harper, 1979. «Sequential X chromosome inactivation coupled with cellular differentiation in early mouse embryos». *Nature (London)* 281:311-313.
- Moreau, P., R. Hen, B. Wasylyk, R. Everett, M. P. Gaub et P. Chambon, 1981. «The SV40 72 base pair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants». *Nucleic Acids Res.* 9:6047-6068.
- Müller, H.-P., J. M. Sogo et W. Schaffner, 1989. «An enhancer stimulates transcription in trans when attached to the promoter via a protein bridge». *Cell* 58:767-777.
- Müller, R., 1986. «Proto-oncogenes and differentiation». *Trends Biochem. Sci.* 11:129-132.

- Müller, R., T. Curran, D. Müller et L. Guilbert, 1985. «Induction of c-fos during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation». *Nature (London)* 314:546-548.
- Müller, R., D. Müller et L. Guilbert, 1984. «Differential expression of c-fos in hematopoietic cell: correlation with differentiation of monomyelocytic cells in vitro». *EMBO J.* 3:1887-1890.
- Müller, R. et E. F. Wagner, 1984. «Differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells after transfer of c-fos proto-oncogenes». *Nature (London)* 311:438-442.
- Mummery, C. L., A. Feijen, P. T. van der Saag, C. E. van den Brink et S. W. de Laat, 1985. «Clonal variants of differentiated P19 embryonal carcinoma cells exhibit epidermal growth factor receptor kinase activity». *Dev. Biol.* 109:402-410.
- Mummery, C. L., A. Feijen, W. H. Moolenaar, C. E. van den Brink et S. W. de Latt, 1986. «Establishment of a differentiated mesodermal line from P19 EC cells expressing functional PDGF and EGF receptors». *Exp. Cell. Biol.* 165:229-242.
- Myers, R. M., D. C. Rio, A. K. Robbins et R. Tjian, 1981. «SV40 gene expression is modulated by the cooperative binding of T antigen to DNA». *Cell* 25:373-384.
- Nelson, J. A., B. Fleckenstein, G. Jahn, D. A. Galloway et J. K. McDougall, 1984. «Structure of the transforming region of human cytomegalovirus AD169». *J. Virol.* 49:109-115.
- Neto, V. M., M. Mallat, H. Chneiweiss, J. Premont, F. Gros et A. Prochiantz, 1986. «Two simian virus 40 (SV40)-transformed cell lines from the mouse striatum and mesencephalon presenting astrocytic characters: I. Immunological and pharmacological properties». *Dev. Brain Res.* 26:11-22.
- Nomiyama, K., C. Fromental, J. H. Xiao et P. Chambon, 1987. «Cell-specific activity of the constituent elements of the simian virus 40 enhancer». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7881-7885.
- O'Hare, P. et G. S. Hayward, 1984. «Expression of recombinant genes containing herpes simplex virus delayed-early and immediate-early regulatory regions and trans activation by herpesvirus infection». *J. Virol.* 52:522-531.

- O'Hare, P. et G. S. Hayward, 1985. «Evidence for a direct role for both the 175,000- and 110,000- molecular weight immediate early proteins of herpes simplex virus in the transactivation of delayed-early promoters». J. Virol. 53:751-760.
- Ohlsson, H. et T. Edlund, 1986. «Sequence specific interactions of nuclear factors with the insulin gene enhancer». Cell 45:35-44.
- Okamoto, K., H. Okazawa, A. Okuda, M. Sakai, M. Muramatsu et H. Hamada, 1990. «A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells». Cell 60:461-472.
- Olson, E. N., G. Spizz et M. A. Tainsky, 1987. «The oncogenic forms of N-ras or H-ras prevent skeletal myoblast differentiation». Mol. Cell. Biol. 7:2104-2111.
- Ondek, B., A. Shepard et W. Herr, 1987. «Discrete elements within the SV40 enhancer region display different cell-specific enhancer activities». EMBO J. 6:1017-1025.
- Palmiter, R. D., H. Y. Chen, A. Messing et R. L. Brinster, 1985. «SV40 and large-T antigen are instrumental in development of choroid plexus tumours in transgenic mice». Nature (London) 316:457-460.
- Papaioannou, V. E., M. W. McBurney, R. L. Gardner et M. J. Evans, 1975. «Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryo». Nature (London) 258:70-73.
- Payne, P. A., E. N. Olson, P. Hsiau, R. Roberts, M. B. Perryman et M. D. Schneider, 1987. «An activated c-Ha-ras allele blocks the induction of muscle specific genes whose expression is contingent on mitogen withdrawal». Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8956-8960.
- Persson, R. H., S. Bacchetti et J. R. Smiley, 1985. «Cells that constitutively express the herpes simplex virus immediate-early protein ICP4 allow efficient activation of viral delayed-early genes in trans». J. Virol. 54:414-421.
- Peterson, D. O., K. K. Beifuss et K. L. Morley, 1987. «Context-dependent gene expression: cis-acting negative effects of specific procaryotic plasmid sequences on eucaryotic genes». Mol. Cell. Biol. 7:1563-1567.
- Preston, C. M., M. G. Cordingley et N. D. Stow, 1984. «Analysis of DNA sequences which regulate the transcription of a Herpes simplex virus immediate early gene». J. Virol. 50:708-716.

- Prochownik, E. V. et J. Kukowska, 1986. «Deregulated expression of c-myc by murine erythroleukemia cells prevents differentiation». *Nature (London)* 322:848-850.
- Ptashne, M., 1986. «Gene regulation by proteins acting nearly and at a distance». *Nature (London)* 322:697-701.
- Radna, R. L., Y. Canton, K. K. Jha, P. Kaplan, G. Li, F. Traganos et H. L. Ozer, 1989. «Growth of immortal simian virus 40 tsA-transformed human fibroblasts is temperature dependent». *Mol. Cell. Biol.* 9:3093-3096.
- Reich, N. C., M. Oren et A. J. Levine, 1983. «Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor-antigen, p53». *Mol. Cell. Biol.* 3:2143-2150.
- Reyes, G. R., R. LaFemina, S. D. Hayward et G. S. Hayward, 1980. «Morphological transformation by DNA fragments of human herpesviruses: evidence for two distinct transforming regions in HSV types 1 and 2 and lack of correlation with biochemical transfer of the thymidine kinase gene». *Symposium de Biologie Quantitative de Cold Spring Harbor*, vol. 44, pp. 629-641 (Laboratoires Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor).
- Riggs, A. D., 1975. «X inactivation, differentiation and DNA methylation». *Cytogenet. Cell Genet.* 14:9-25.
- Rio, D. D. et R. Tjian, 1983. «SV40 T antigen binding site mutations that affect autoregulation». *Cell* 32:1227-1240.
- Rosen, C. A., J. Sodroski et W. A. Haseltine, 1985. «The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat». *Cell* 41:813-823.
- Rudnicki, M. A., 1988. «Embryonal carcinoma derived cardiac muscle: studies in gene expression and differentiation». Thèse de doctorat, Université d'Ottawa, chapitre 7, pp. 152-175.
- Rudnicki, M. A. et M. W. McBurney, 1987. «Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines». Dans "Teratocarcinomas and embryonic stem cells, a practical approach", édité par E.J. Robertson, IRL Press, Oxford, pp.19-49.
- Rudnicki, M. A., K. R. Reuhl et M. W. McBurney, 1989. «A transfected H-ras oncogene does not inhibit differentiation of cardiac and skeletal muscle from embryonal carcinoma cells». *Biochem. Cell. Biol.* 67:590-596.

- Saavedra, C. et A. Kessous-Elbaz, 1985. «Retention of herpes simplex virus type II sequences in Bgl II N transformed cells after co-transfection with a selectable marker». EMBO J. 4:3419-3426.
- Sarnow, P., Y. S. Ho, J. Williams et A. J. Levine, 1982. «Adenovirus Elb-58kd tumor antigen and SV40 large Tumor antigen are physically associated with the same 54kd cellular protein in transformed cells». Cell 28:387-394.
- Sassone-Corsi, P. et E. Borrelli, 1986. «Transcriptional regulation by trans-acting factors». Trends Genet. 2:215-219.
- Sassone-Corsi, P., A. Wildeman et P. Chambon, 1985. «A trans-acting factor is responsible for the simian virus 40 enhancer activity in vitro». Nature (London) 313:458-463.
- Scheffner, M., R. Knippers et H. Stahl, 1989. «RNA unwinding activity of SV40 large T antigen». Cell 57:955-963.
- Schirm, S., J. Jiricny et W. Schaffner, 1987. «The SV40 enhancer can be dissected in multiple segments each with a different cell type specificity». Genes Dev. 1:65-74.
- Schirm, S., I. Müller, R. C. DesRosiers et B. Fleckenstein, 1984. «Herpes virus saimiri DNA in a lymphoid cell line established by in vitro transformation». J. Virol 49:938-946.
- Schirm, S., F. Weber, W. Schaffner et B. Fleckenstein, 1985. «A transcription enhancer in the Herpesvirus saimiri genome». EMBO J. 4:2669-2674.
- Schlokot, U., D. Bohmann, H. Schöler et P. Gruss, 1986. «Nuclear factors binding specific sequences within the immunoglobulin enhancer differentially interact with other enhancer elements». EMBO J. 5:3251-3258.
- Schlokot, U. et P. Gruss, 1986. «Enhancers as control elements for tissue-specific transcription». Dans "Oncogenes and growth control", édité par T. Graf et P. Kahn, Springer-Verlag, Heidelberg, pp.226-234.
- Sen, R. et D. Baltimore, 1986a. «Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences». Cell 46:705-716.
- Sen, R. et D. Baltimore, 1986b. «Inducibility of the immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a post-translational mechanism». Cell 47:921-928.

- Serfling, E., M. Jasin et W. Schaffner, 1985. «Enhancers and gene transcription». *Trends Genet.* 1:224-230.
- Shalloway, D., T. Kleinberger et D. M. Livingston, 1980. «Mapping of SV40 DNA replication origin region binding sites for the SV40 T antigen by protection against exonuclease III digestion». *Cell* 20:411-422.
- Sharma, S. et M. F. Notter, 1988. «Characterization of neurotransmitter phenotype during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells». *Dev. Biol.* 125:246-254.
- Shortle, D. et D. Nathans, 1978. «Local mutagenesis: a method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2170-2174.
- Smith, S. C., K. R. Reuhl, J. Craig et M. W. McBurney, 1987. «The role of aggregation in embryonal carcinoma cell differentiation». *J. Cell. Physiol.* 131:74-84.
- Sorge, L. K., B. T. Levy et P. F. Maness, 1984. «pp60^{c-src} is developmentally regulated in the neural retina». *Cell* 36:249-257.
- Southern, E. M., 1975. «Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis». *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Spear, P. G. et B. Roizman, 1981. «Herpes simplex viruses». Dans "The molecular biology of tumor viruses", 2ième édition, édité par J. Tooze, Laboratoires Cold Spring Harbor, New-York.
- Speck, N. A. et D. Baltimore, 1987. «Six distinct nuclear factors interact with the 75-base pair repeat of the Moloney murine leukemia virus enhancer». *Mol. Cell. Biol.* 7:1101-1110.
- Stevens, L. C., 1967. «The biology of teratomas». *Adv. Morph.* 6:1-31.
- Suda, Y., S.-I. Hirai, M. Suzuki, Y. Ikawa et S. Aizawa, 1988. «Active ras and myc oncogenes can be compatible, but SV40 large T antigen is specifically suppressed with normal differentiation of mouse embryonic stem cells». *Exp. Cell Res.* 278:98-113.
- Suh, M., A. Kessous, N. Poirier et R. Simard, 1980. «Immunoprecipitation of polypeptides from hamster embryo cells transformed with Herpes simplex type 2». *Virology* 104:303-311.

- Swain, M. A. et D. A. Galloway, 1986. «Herpes simplex virus specifies two subunits of ribonucleotide reductase encoded by 3'-coterminial transcripts». J. Virol. 57:802-808.
- Swift, F. V., K. Bhat, H. Banfield Younghusband et H. Hamada, 1987. «Characterization of a cell type-specific enhancer found in the human papilloma virus type 18 genome». EMBO J. 6:1339-1344.
- Swimmer, C. et T. Schenk, 1984. «A viable simian virus 40 variant that carries a newly generated sequence reiteration in place of the normal duplicated enhancer element». Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6652-6656.
- Takahashi, K., M. Vigneron, H. Matthes, A. Wildeman, M. Zenke et P. Chambon, 1986. «Requirement of stereospecific alignments for initiation from the simian virus 40 early promoter». Nature (London) 319:121-126.
- Tegtmeyer, P., 1975. «Function of simian virus 40 gene A in transforming infection». J. Virol. 15:613-618.
- Tognoni, A., R. Cattaneo, E. Serfling et W. Schaffner, 1985. «A novel expression selection approach allows precise mapping of the hepatitis B virus enhancer». Nucleic Acids Res. 13:7457-7472.
- Tooze, J., 1981. «DNA tumor viruses». dans "Molecular Biology of Tumor Viruses", 2ième édition révisée, 2ième partie, éditeur J. Tooze, Laboratoires Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, New-York, pp.61-66.
- Treisman, R. et T. Maniatis, 1985. «Simian virus 40 enhancer increases number of RNA polymerase II molecules on linked DNA». Nature (London) 315:72-75.
- Tsai, S. Y., J. Carlstedt-Duke, N. L. Weigel, K. Dahlman, J.-Å. Gustafsson, M.-J. Tsai et B. W. O'Malley, 1988. «Molecular Interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation». Cell 55:361-369.
- VandeBerg, J. L., 1985. «The phosphoglycerate kinase isozyme system in mammals. Biochemical, genetic, developmental and evolutionary aspects». Isozymes: Curr. Top. Biol. Med. Res. 12:133-187.
- Velcich, A. et E. Ziff, 1985. «Adenovirus E1A proteins repress transcription from the SV40 early promoter». Cell 40:705-716.

- Vigneron, M., H. Barrera-Saldaña, D. Baty, R. D. Everett et P. Chambon, 1984. «Effect of the 21bp repeat upstream element on in vitro transcription from early and late SV40 promoter». *EMBO J.* 3:2373-2382.
- Voss, S. D., U. Schlokot et P. Gruss, 1986. «The role of enhancers in the regulation of cell-type specific transcriptional control». *Trends Bioch. Sci.* 2:287-289.
- Wasylyk, B., C. Wasylyk, P. Augereau et P. Chambon, 1983a. «The SV40 72bp repeat preferentially potentiates transcription starting from proximal natural or substitute promoter elements». *Cell* 32:503-514.
- Wasylyk, B., C. Wasylyk, H. Matthes, M. Wintzerith et P. Chambon, 1983b. «Transcription from the SV40 early-early and late-early overlapping promoters in the absence of DNA replication». *EMBO J.* 2:1605-1611.
- Watt, F. M., P. W. Jordan et C. H. O'Neill, 1988. «Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes». *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:5576-5580.
- Weber, F. et W. Schaffner, 1985a. «Simian virus 40 enhancer increases RNA polymerase density within the linked gene». *Nature (London)* 315:75-77.
- Weber, F. et W. Schaffner, 1985b. «Enhancer activity correlates with the oncogenic potential of avian retroviruses». *EMBO J.* 4:949-956.
- Weber, F., J. de Villiers et W. Schaffner, 1984. «An SV40 "enhancer trap" incorporates exogenous enhancers or generates enhancers from its own sequences». *Cell* 36:983-992.
- Webster, K. A., G. E. O. Muscat et L. Kedes, 1988. «Adenovirus E1A products suppress myogenic differentiation and inhibit transcription from muscle-specific promoters». *Cell* 332:553-557.
- Weinberg, R. A., 1985. «The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus». *Science* 230:770-776.
- Weintraub, H., 1988. «Formation of stable transcription complexes as assayed by analysis of individual templates». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5819-5823.
- Whyte, P., K. J. Buchkovich, J. M. Horowitz, S. H. Friend, M. Raybuck, R. A. Weinberg et E. Harlow, 1988. «Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product». *Nature (London)* 334:124-129.

- Wigdahl, B., A. C. Scheck, R. J. Ziegler, E. De Clercq et F. Rapp, 1984. «Analysis of the Herpes simplex virus genome during in vitro latency in human diploid fibroblasts and rat sensory neurons». *J. Virol.* 49:205-213.
- Wildeman, A. G., M. Zenke, C. Schatz, M. Wintzerith, T. Grundström, H. Matthes, K. Takahashi et P. Chambon, 1986. «Specific protein binding to the simian virus 40 enhancer in vitro». *Mol. Cell. Biol.* 6:2098-2105.
- Wilkie, N. M., J. B. Clements, J. C. Macnab et J. H. Subak-Sharpe, 1974. «The structure and biological properties of herpes simplex DNA». Symposium de Biologie Quantitative de Cold Spring Harbor, Laboratoires Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, vol. 39, pp. 657-666.
- Williams, D. A., M. F. Rosenblatt, D. R. Beier et R. D. Cone, 1988. «Generation of murine stromal cell lines supporting hematopoietic stem cell proliferation by use of recombinant retrovirus vectors encoding simian virus 40 large T antigen». *Mol. Cell. Biol.* 8:3864-3871.
- Yamamoto, K. R., 1985. «Steroid receptor regulated transcription of specific genes and genes networks». *Ann. Rev. Genet.* 19:209-252.
- Yoshimura, F. K. et K. Chaffin, 1987. «Different activities of viral enhancer elements before and after stable integration of transfected DNAs». *Mol. Cell. Biol.* 7:1296-1299.
- Young, K. S., R. Weigel, S. Hiebert et J. R. Nevins, 1989. «Adenovirus E1A-mediated negative control of genes activated during F9 differentiation». *Mol. Cell. Biol.* 9:3109-3113.
- Zenke, M., T. Grundström, H. Matthes, M. Wintzerith, C. Schatz, A. Wildeman et P. Chambon, 1986. «Multiple sequence motifs are involved in SV40 enhancer function». *EMBO J.* 5:387-397.