



UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE PRESENTE A
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

PAR

ALBENA PRAMATAROVA

CLONAGE DU GENE DE L'IMMORTALISATION
DU CYTOMEGALOVIRUS HUMAIN

JUILLET 1992

A toute ma famille avec amour.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	iii
LISTE DES ABREVIATIONS	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
SOMMAIRE	x
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. LE CYTOMEGALOVIRUS HUMAIN	5
2. LA TRANSFORMATION ONCOGENE.	6
3. L'IMMORTALISATION.	8
4. LE SYSTEME CELLULAIRE.	9
5. PROBLEMATIQUE.	10
OBJECTIF DU PROJET	13
MATERIEL ET METHODES	15
1. RESUME DES ETAPES PRINCIPALES	16
2. SOUCHES VIRALES.	16
2.1. <u>Cytomégalovirus humain.</u>	16
2.2. <u>Virus SV40.</u>	17
3. CONSTRUCTION DES PLASMIDES RECOMBINANTS.	18
4. TRANSFORMATION DES CELLULES BACTERIENNES.	19
5. SELECTION DES COLONIES RECOMBINANTES.	19
6. EXTRACTION DE L'ADN PLASMIDIQUE.	20
7. IDENTIFICATION DES PLASMIDES RECOMBINANTS.	21

7.1. <u>Identification par la taille.</u>	21
7.2. <u>Identification par hybridation avec l'ADN HCMV ou le fragment Hind III-E.</u>	22
7.2.1. Transferts de l'ADN.	22
7.2.2. Préparation des sondes.	23
7.2.3. Hybridation.	24
7.3. <u>Identification par les profils de restriction.</u>	25
8. PRODUCTION MASSIVE DES PLASMIDES RECOMBINANTS.	26
9. PURIFICATION DE L'ADN VIRAL CLONE.	26
10. CULTURES CELLULAIRES.	27
11. TRANSFECTIONS DES CELLULES.	28
11.1. <u>Préparation des ADN.</u>	29
11.2. <u>Préparation des cultures cellulaires.</u>	29
11.3. <u>Transfection des cellules par la méthode de précipitation au CaCl₂.</u>	30
11.4. <u>Méthode de transfection au CaCl₂ et centrifugation.</u>	30
11.5. <u>Transfection au DOTAP.</u>	31
11.6. <u>Infection des cellules par le HCMV ou SV40.</u>	32
12. CARACTERISATION DES CELLULES TRANSFORMEES.	32
12.1. <u>Durée de vie.</u>	32
12.2. <u>Besoins réduits en sérum.</u>	33
12.3. <u>Croissance en milieu semi-solide.</u>	33
12.4. <u>Rétention de la rhodamine 123.</u>	34
RESULTATS	35

1. CLONAGE DES FRAGMENTS <i>EcoR</i> I ET <i>BamH</i> I DU HCMV.	36
1.1. <u>Sélection par la taille.</u>	36
1.1.1. Les fragments <i>EcoR</i> I du génome HCMV.	36
1.1.2. Les fragments <i>BamH</i> I du génome HCMV.	37
1.2. <u>Sélection par hybridation avec l'ADN HCMV.</u>	38
1.3. <u>Sélection par hybridation avec le frag- ment <i>Hind</i> III-E.</u>	39
1.4. <u>Sélection par profil de restriction avec <i>Taq</i> I.</u>	40
2. TRANSFECTIONS DES CELLULES.	40
2.1. <u>Méthode au chlorure de calcium.</u>	40
2.2. <u>Méthode au chlorure de calcium et centri- fugation.</u>	40
2.3. <u>Méthode de transfection au DOTAP.</u>	41
2.4. <u>Transfections de cellules de reins de chiens adultes.</u>	41
2.5. <u>Récapitulation des résultats de transfec- tion.</u>	42
3. CARACTERISATION DES CELLULES TRANSFORMEES.	42
DISCUSSION	44
1. CLONAGE DU GENOME HCMV SOUS FORME DE FRAGMENTS <i>EcoR</i> I ET <i>BamH</i> I.	45
2. SELECTION DES PLASMIDES RECOMBINANTS.	46
3. TRANSFECTIONS DE CELLULES CANINES.	48
CONCLUSION	54
REMERCIEMENTS	56

	vi
BIBLIOGRAPHIE	58
TABLEAUX ET FIGURES	63
ANNEXE I: LISTE DES COMMUNICATIONS	91
ANNEXE II: PUBLICATIONS	93

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	:	Acide désoxyribonucléique
Amp ^r	:	Ampicilline résistant
DCDC	:	Dissociation-Congélation-Décongélation-Centrifugation
DOTAP	:	N-[1-(2,3-Dioléoyloxy) propyl]-N,N,N-tri-méthylammoniuméthylsulfate
EDTA	:	Acide éthylènediamine tétraacétique
HCMV	:	Cytomégalovirus humain
HBS	:	Solution saline tamponnée à l'HEPES
HEPES	:	Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique
HSV-1, HSV-2	:	Virus herpès simplex types 1 et 2
kb	:	Kilopaires de bases, 10 ³ pb
MOI	:	Multiplicité d'infection
pb	:	Paire de bases
PEC	:	Cellules de poumon d'embryon de chien en culture primaire
PEG	:	Polyéthylène glycol
RAC	:	Cellules de rein de chien adulte en culture primaire
REC	:	Cellules de rein d'embryon de chien en culture primaire
rpm	:	Révolutions par minute

SDS	:	Dodécyl sulfate de sodium
SIDA	:	Syndrome d'immunodéficience acquise
SSC	:	Solution tamponnée au citrate de sodium
SV40	:	Virus simien 40
SBF	:	Sérum bovin foetal
TE	:	Tampon 10 mM Tris-HCl, pH7,4; 1 M EDTA
Tet ^B	:	Tétracycline sensible
UV	:	Ultraviolets

LISTE DES TABLEAUX

<u>TABLEAU I:</u>	Propriétés des cellules normales vs transformées.....	64
<u>TABLEAU II:</u>	Propriétés des cellules de rongeurs vs les cellules de rein d'embryon de chien...	65
<u>TABLEAU III:</u>	Stratégies de transfection.....	66

LISTE DES FIGURES

<u>FIGURE 1:</u>	Localisation des séquences transformantes sur le génome des virus herpès simplex types 1 et 2 et du cytomégalo virus humain..	67
<u>FIGURE 2:</u>	Cartes de restriction d'une portion du génome du cytomégalo virus humain souche AD-169.....	69
<u>FIGURE 3:</u>	Profils de restriction des plasmides pAT153 porteurs de fragments <i>EcoR</i> I du HCMV.....	71
<u>FIGURE 4:</u>	Profils de restriction des plasmides pAT153 porteurs de fragments <i>BamH</i> I du HCMV.....	73
<u>FIGURE 5:</u>	Hybridation des plasmides pPCR porteurs de fragments <i>BamH</i> I du HCMV avec une sonde d'ADN HCMV marquée à la biotine.....	75
<u>FIGURE 6:</u>	Extraction rapide de l'ADN d'un gel d'agarose par la technique DCDC.....	77
<u>FIGURE 7:</u>	Montage de l'appareil à électrotransfert...	79
<u>FIGURE 8:</u>	Hybridation de plasmides pPCR porteurs d'un fragment <i>BamH</i> I d'environ 7 Kb du génome HCMV, avec le fragment <i>Hind</i> III-E cloné marqué à la biotine, suite à un électrotransfert.....	81
<u>FIGURE 9:</u>	Profils de restriction des plasmides pPCR avec <i>Taq</i> I, après migration en gel d'agarose Sea Prep 6%.....	83
<u>FIGURE 10:</u>	Foyers de transformation cellulaire.....	85
<u>FIGURE 11:</u>	Croissance en milieu semi-solide.....	87
<u>FIGURE 12:</u>	Rétention de la rhodamine 123.....	89

SOMMAIRE

La transformation néoplasique des cellules diploïdes est de plus en plus considérée comme un processus graduel impliquant premièrement une étape d'immortalisation suivie de changements phénotypiques conduisant à la tumorigénicité.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés aux propriétés immortalisantes d'un virus herpétique: le cytomégalovirus humain souche AD-169 (HCMV). Notre hypothèse de départ était l'existence chez HCMV, comme c'est le cas chez herpès simplex type 2, de deux gènes voisins mais différents responsables de l'immortalisation et de la transformation oncogène. Le principal problème lors de l'étude de l'immortalisation, est le choix d'un système cellulaire permettant l'observation du phénomène. Nous avons entrepris de cloner le fragment *BamH* I-P du génome HCMV, couvrant la région *Hind* III-E responsable de la transformation tumorigénique et nous avons testé son potentiel immortalisant sur des cellules de poumon d'embryon de chien. Lors d'expériences semblables, les cellules de rein d'embryon de chien étaient apparues particulièrement adéquates pour l'observation du phénomène de l'immortalisation par le HCMV, car elles avaient une durée de vie très limitée. Malheureusement, les cellules de poumons ne semblent pas partager toutes les caractéristiques de leurs consœurs. Elles ne sont pas aussi sensibles à la transformation et de

plus, elles semblent susceptibles à des manifestations du genre transformation spontanée. Les difficultés mentionnées plus tôt nous ont empêché de localiser de façon précise le gène de l'immortalisation du HCMV.

Les résultats de transformation obtenus avec les cellules de poumon semblent toutefois, confirmer les résultats obtenus avec les cellules de rein.

INTRODUCTION

La capacité transformante des Herpèsviridae est reconnue, bien que le phénomène en tant que tel ne soit pas tout à fait compris. Parmi les nombreuses étapes menant à la transformation morphologique d'une cellule, l'étape de l'immortalisation est encore la moins bien cernée. Dans l'étude de ce genre de manifestations, le système cellulaire joue un rôle primordial aussi bien au point de vue de sa susceptibilité à la transformation qu'au point de vue de la détection des transformants.

Au cours du présent projet nous avons étudié l'immortalisation cellulaire par le cytomégalo virus humain en utilisant un système cellulaire original: les cellules de poumon d'embryon de chien. Ce système a l'avantage de permettre l'observation de la première étape de la transformation cellulaire: l'immortalisation, habituellement inapparente chez les autres types de cellules utilisées pour ce type de recherches. Plus précisément, nous avons cherché à déterminer la localisation précise du gène de l'immortalisation cellulaire en clonant le génome viral sous forme de fragments de restriction et en testant le potentiel transformant de ces fragments.

Nous présentons dans ce mémoire une brève revue des recherches ayant déjà été effectuées dans le domaine, suivie de la description de notre stratégie expérimentale. Pour

finir, seront énoncés la synthèse des résultats obtenus avec les commentaires qu'ils ont suscités.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE CYTOMEGALOVIRUS HUMAIN.

Le cytomegalovirus humain (HCMV), membre de la famille des Herpèsviridae est l'un des plus gros virus avec ses 235 000 paires de bases (pb) d'ADN linéaire double brin (Figure 1). La molécule d'ADN est formée de deux segments : un long et un court bordés de séquences répétitives qui permettent aux fragments long et court d'inverser leur orientation l'un par rapport à l'autre, donnant ainsi quatre formes isomériques rencontrées en parts égales. De plus le HCMV fait partie de la sous famille des β -herpèsvirinae, caractérisés par un cycle de multiplication long. Rappelons que les Herpès simplex de types 1 et 2 (HSV-1, HSV-2) font partie des α -herpèsvirinae, c'est à dire des virus à répllication rapide, alors que les γ -herpèsvirinae englobent des virus oncogènes ou lymphotropes tels le virus d'Epstein Barr. Il existe plusieurs souches de HCMV, les plus connues étant les souches AD-169, Towne et Davis. Bien que représentant le même virus ces trois souches présentent des différences importantes au point de vue de l'organisation du génome viral (Nelson et al., 1984). Notons également que le HCMV est caractérisé par de fréquentes variations à l'intérieur d'une même souche.

Le HCMV est un agent pathologique fréquemment rencontré dans des maladies congénitales chez les nouveaux nés, de même

que dans de graves infections chez les immunodéprimés, que ce soit suite à une transplantation ou suite au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).

Le virus cytomégalique est également associé à des maladies néoplasiques tels le cancer de la prostate ou le sarcome de Kaposi en tant que cofacteur (Rapp, 1984, 1984a, Rapp et Robbins, 1984), cependant son rôle exact demeure encore obscur.

La transformation néoplasique de cellules diploïdes est de plus en plus considérée comme un processus graduel fort complexe impliquant premièrement une étape d'immortalisation, suivie de changements phénotypiques conduisant la cellule à la tumorigénicité (Newbold et al, 1982).

2. LA TRANSFORMATION ONCOGENE.

Les premières recherches sur le pouvoir transformant du HCMV ont débutées dans les années 70. Ces études de la transformation *in vitro* ont été effectuées principalement sur des cellules de rongeurs mais aussi sur des cellules humaines (Albrecht et Rapp, 1973, Boldogh et al., 1978, Geder, 1977).

La région du génome HCMV responsable de la transformation oncogène a même été localisée par Nelson et Fleckenstein, dans le début des années 80 (Nelson et al., 1982). En

utilisant des cellules de rats en culture primaire de même que des cellules NIH 3T3 en lignée continue, ces chercheurs ont démontré le pouvoir transformant de l'ADN HCMV souche AD-169, et ceci même après digestion par les enzymes *Hind* III et *Xba* I. Cependant l'enzyme *EcoR* I annulait ce pouvoir. La région transformante a ainsi été localisée sur un fragment *Hind* III-*Xba* I de 2 900 pb situé à l'extrémité du fragment *Hind* III-E (Figure 1 et 2). Les cellules transformées se sont avérées tumorigènes pour des souris athymiques, et ont pu croître en milieu semi-solide.

Quelques années plus tard le groupe de Nelson (1984) a pu isoler de façon précise le gène de la transformation oncogénique. Il s'agit de 490 nucléotides à l'extrémité du fragment *Hind* III-E proches du fragment *Hind* III-T (Figures 1 et 2).

Des expériences sur des cellules humaines (Huang, 1984, Huang et al., 1984, Boldogh et al., 1985) ont confirmé les résultats de Nelson, cependant la région transformante n'a pas été identifiée exactement. Les cellules transformées obtenues ont exprimé des antigènes viraux et ont présenté un bon potentiel tumorigène. D'autre part l'équipe de Tevethia (1985) a effectué le même genre de recherches sur des cellules de souris en culture primaire.

Cependant malgré le caractère tumorigène des cellules transformées obtenues après transfection avec l'ADN HCMV, il

a été impossible d'y détecter des séquences virales (Spector et Spector, 1984).

3. L'IMMORTALISATION.

Parallèlement à l'identification du gène de la transformation du HCMV souche AD-169, le groupe de Clanton a isolé chez le HCMV souche Towne une région sur le fragment Xba I-E (figure 1) responsable de l'immortalisation des cellules de hamster en culture primaire (Clanton et al., 1983). Ces cellules immortalisées présentaient une croissance illimitée comparativement aux cellules témoins, un besoin en sérum réduit, et la capacité de pousser en milieu semi-solide, dans lequel elles ne formaient que de très petites colonies (moins que 0,1 mm de diamètre). Cependant, lors des passages plus élevés, les colonies formées pouvaient atteindre plus que 0,2 mm de diamètre et les cellules qu'elles contenaient étaient tumorigènes quand injectées à des souris. Ceci semble indiquer la proximité sur le fragment Xba I-E de la souche Towne de deux gènes responsables l'un de l'immortalisation et l'autre de la transformation oncogène. Malheureusement ces deux gènes n'ont pas été isolés de façon plus précise et les recherches subséquentes ont été faites dans des systèmes permettant l'étude de la transformation oncogène seulement.

Des expériences d'hybridation du fragment immortalisant/transformant *Xba* I-E de Towne avec la région transformante de la souche AD-169 -fragment *Hind* III-*Xba* I de 2 900 pb située à l'extrémité du fragment *Hind* III-E (figure 2)- n'ont pas montré d'homologie entre ces deux fragments. Néanmoins le fragment *Xba* I-C de la souche AD-169 qui couvre l'autre partie du fragment *Hind* III-E (figure 2) réagit positivement avec le fragment *Xba* I-E de Towne (Clanton et al., 1983, Spector et Spector, 1984).

Ainsi il existe une certaine similitude entre les régions transformantes des souches Towne et AD-169, mais la disposition des gènes n'est pas conservée de façon exacte. La localisation précise du gène de l'immortalisation du cytomégalo-virus AD-169 reste donc à déterminer.

4. LE SYSTEME CELLULAIRE.

La transformation est un phénomène fort complexe, le rôle du système cellulaire utilisé lors de son étude est alors primordial. Il faut différencier les cellules permissives des cellules non permissives, les cellules en culture primaire des cellules en lignée continue.

Ainsi trois régions responsables de l'immortalisation, ou de la transformation oncogénique ont pu être identifiées chez les virus HSV 1 et 2 (Figure 1), en travaillant sur des

cellules d'origines diverses (Clanton et al., 1983, Jariwala et al., 1983, Tevethia, 1985). Les variations peuvent être rencontrées aussi bien au niveau du potentiel de prolifération à l'état normal et de la susceptibilité à la transformation, qu'au niveau des caractéristiques post-transformation. Par exemple, l'introduction du fragment immortalisant pour les cellules de hamster en culture primaire (Xba I-E, souche Towne) dans des cellules déjà immortalisées (lignée NIH 3T3) conduit à la transformation oncogène des dites cellules (Clanton et al., 1983). Donc le moyen de détection de la transformation, de même que la nature exacte du phénomène observé, sont intimement liés à l'origine et aux propriétés des cellules utilisées.

5. PROBLEMATIQUE.

Les études précédentes de la transformation ont été faites sur des cellules de rongeurs qui sont caractérisées par un très fort taux de transformation spontanée, dû à la présence de rétrovirus endogènes (Tableau I). Il est alors difficile d'estimer à leur pleine valeur les résultats obtenus.

Dans notre laboratoire des chercheurs ont démontré que les cellules REC de rein d'embryon de chien ne contiennent pas de rétrovirus endogènes et ne semblent pas présenter de

transformation spontanée. D'autre part ces cellules ont une durée de vie très limitée *in vitro*, 1-2 passages pour les cellules de rein et 10-12 passages pour les cellules de poumon (Hamelin et Yelle, 1986) (Tableau I). De plus les cellules de chien ne sont pas permissives au HCMV, ce qui en fait d'excellentes candidates pour les expériences de transformation.

Toujours dans notre laboratoire Jocelyn Yelle a démontré que les cellules canines sont susceptibles à la transformation par le HCMV ou son ADN entier mais également par de l'ADN digéré par l'enzyme *EcoR* I (Yelle et Hamelin, 1986, Yelle et al., 1986). Il a alors été possible d'observer des cellules immortalisées présentant les caractéristiques suivantes: capacité à se multiplier après avoir dépassé le passage limite, croissance en milieu appauvri en sérum (2% au lieu de 10%), absence d'inhibition de contact, croissance en agarose 0,3% et formation de petites colonies de diamètre inférieur à 0,2 mm (Tableau II). De plus, la présence d'antigènes viraux et la très faible tumorigénicité *in vivo* (une souris sur 40 injectées avec ces cellules a développé une tumeur de petite taille) ont pu être démontrées (Yelle et al., 1990). Cependant l'ADN HCMV digéré par les enzymes *Bgl* II ou *Hind* III n'a pas présenté de capacité transformante pour les cellules canines, alors que le fragment *Hind* III-E transformait oncogéniquement les cellules NIH 3T3 (Clanton et

al., 1983). Notons que ces cellules NIH 3T3 sont déjà immortalisées. Si on se rappelle l'hypothèse de la nature progressive de la transformation et de l'existence de deux gènes responsables, l'un de l'immortalisation cellulaire et l'autre de la transformation tumorigénique, on peut penser que le gène de l'immortalisation pour les cellules canines a été inactivé par l'enzyme *Hind* III. Or chez l'HSV-2, la présence de deux gènes différents mais voisins responsables des deux étapes de la transformation cellulaire a déjà été démontrée (Jariwalla et al., 1983, Hayashi et al., 1985). Il est alors possible de croire qu'une situation semblable existe chez le cytomégalo virus humain. Pour cette raison nous avons décidé, lors de nos recherches du gène de l'immortalisation du cytomégalo virus souche AD-169, de concentrer notre attention sur la région du génome viral entourant le fragment *Hind* III-E responsable de la transformation oncogénique (figure 2). Nous allons couvrir à l'aide de fragments *Bam*H I et *Eco*R I la région transformante du HCMV, c'est à dire la jonction *Hind* III-E et *Hind* III-T (Figure 2).

OBJECTIF DU PROJET

Le but du présent projet est d'étudier l'immortalisation cellulaire par le cytomégalo virus humain en utilisant un système cellulaire original: les cellules de poumon d'embryon de chien.

Pour ce faire le génome HCMV devra être cloné sous la forme de fragments *EcoR* I et *BamH* I dans le vecteur plasmidique pAT153, ce qui facilitera l'obtention de quantités suffisantes d'ADN. Une attention toute particulière sera accordée aux fragments *EcoR* I-R (6,6 kb), *EcoR* I-B (16,8 kb) et *BamH* I-P (7 kb) couvrant la région *Hind* III-E, contenant le gène de la transformation oncogénique (Figure 2). Nous testerons ensuite la capacité immortalisante de ces fragments d'ADN sur des cellules de poumon d'embryon de chien .

MATERIEL ET METHODES

1. RESUME DES ETAPES PRINCIPALES.

Au cours du présent travail nous avons tout d'abord entrepris de cloner le génome du cytomégalovirus humain sous forme de fragments *BamH I* et *EcoR I* dans le vecteur de clonage plasmidique pAT153. Nous avons ensuite sélectionné les plasmides porteurs de fragments HCMV intéressants d'après leur taille, leur profil de restriction et leur homologie de séquence avec la région *Hind III-E* du génome HCMV. Enfin nous avons testé le potentiel immortalisant de ces fragments clonés sur des cellules canines en culture primaire. Les cellules transformées obtenues ont été caractérisées en comparaison avec des cellules transformées par le virus SV40 d'une part, et des cellules immortalisées par un fragment *EcoR I* du HCMV.

2. SOUCHES VIRALES.

2.1. Cytomégalovirus humain.

Nous avons utilisé la souche AD-169 du cytomégalovirus humain qui nous a été fournie par le docteur Fred Rapp (Pennsylvania State University, Hershey, Pa, USA). Le virus a été cultivé sur des cellules de poumon d'embryon humain IAFP aux environs du passage 10. Les particules vira-

les dans le surnageant ont été concentrées par précipitation au polyéthylène glycol 6000 5% (Carbovax, Union Carbide, Montréal, Qc, Canada) (Hamelin et Lussier, 1979). Pour obtenir l'ADN viral, les virus ont été traités à la protéinase K (0,3 mg/ml, Sigma, St-Louis, Mo, USA) et au SDS 1% pendant 15 minutes à 37°C. Ensuite l'ADN a été purifié et concentré par passage sur gradients de saccharose 10-40% et de chlorure de césium.

2.2. Virus SV40.

Le virus SV40 a été cultivé sur des feuilletts de cellules Vero en lignée continue. Des flacons de 150 cm² ont étéensemencés avec 10 millions de cellules dans du milieu 199 Hank's/ MEM Earle (Gibco, BRL, Gaithersburg, Md, USA) enrichi de 10% de sérum bovin foetal (SBF) et de 50 µg/ml de gentamicine. Après une incubation de 48 heures à 37°C, les cellules ont été mises en contact avec environ 0,0001 MOI de virus pendant 90 minutes (Yelle, 1986). Du milieu de culture contenant 2% de SBF a ensuite été ajouté puis le tout a été incubé à 37°C pendant 4-5 jours. L'ADN viral a été extrait selon la méthode de Hirt (1967), c'est-à-dire que les cellules ont été lavées deux fois avec de la saline tamponnée au phosphate (PBS), puis mises en contact pendant 20 minutes à la température ambiante avec du tampon Hirt (0,6% SDS; 0,01 M EDTA;

0,01 M Tris-HCl, pH 7,4). Après l'ajout de 0,5 M NaCl, le mélange a reposé à 4°C pendant 16 heures. Ce traitement permet l'extraction sélective de l'ADN viral que l'on retrouve dans le surnageant après centrifugation de 30 minutes à 15 000 rpm dans une centrifugeuse Beckman J2-21 munie d'un rotor JA-20 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca, USA). L'ADN a ensuite été purifié au phénol, précipité avec 2,5 volumes d'éthanol 100% et 0,1 volume de NaCl 5 M, puis res-suspendu dans du tampon TE (0,01 M Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA).

3. CONSTRUCTION DES PLASMIDES RECOMBINANTS.

Le vecteur de clonage utilisé a été pAT153, un plasmide possédant un gène de résistance à l'ampicilline et un gène de résistance à la tétracycline (Twiggs et Sherratt, 1980).

Les ADN HCMV et pAT153 ont été digérés séparément par une dizaine d'unités d'enzyme *EcoR* I ou *BamH* I (BRL) dans les tampons appropriés (*EcoR* I: 100 mM Tris-HCl, pH 7,2; 5 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 2 mM 2-mercaptoéthanol. *BamH* I: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 7 mM MgCl₂; 60 mM NaCl) pendant deux heures à 37°C. Puis les deux préparations ont été mélangées dans un rapport d'extrémités molaires de 4:1, en ajoutant 1-4 unités d'ADN ligase T4 (BRL) et le tampon approprié (20 mM Tris-HCl,

pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 10 mM dithiothréitol; 0,6 mM ATP). Le tout a été incubé pendant 16 heures à 4°C.

4. TRANSFORMATION DES CELLULES BACTERIENNES.

Nous avons utilisé la bactérie *Escherichia coli* souche PRD I perméabilisée au CaCl₂ selon la technique classique de Kushner (Dale et Greenaway, 1984). Pour finir, les bactéries transfectées ont été étalées sur des géloses ML-Amp contenant: 10 g/l de bactotryptone, 5 g/l d'extrait de levure, 5 g/l de NaCl, 1% d'agar et 50 µg/ml d'ampicilline (Ayerst, Montréal, Qc, Canada). Comme le vecteur pAT153 contient un gène de résistance à l'ampicilline, cet antibiotique ajouté au milieu permet de sélectionner les colonies ayant avalé un plasmide (colonies Amp^r). Les pétris ont été incubés pendant 16 heures à 37°C.

5. SELECTION DES COLONIES RECOMBINANTES.

Le site *EcoR* I étant situé hors des gènes de résistance aux antibiotiques nous avons dû récolter les colonies bactériennes au hasard parmi toutes celles ayant résisté à l'ampicilline.

De son côté, le site *BamH* I se trouvant dans le gène de résistance à la tétracycline, les souches intéressantes sont

alors apparues comme étant ampicilline résistantes mais tétracycline sensibles ($Amp^r Tet^s$). Les colonies Amp^r ont donc été striées en parallèle sur milieu ML-Amp et ML-Tet (50 $\mu\text{g/ml}$, Boehringer Mannheim, Laval, Qc, Canada), et n'ont été considérées que les souches n'ayant poussé que sur ML-Amp.

6. EXTRACTION DE L'ADN PLASMIDIQUE.

Les suspensions bactériennes peuvent être obtenues, soit à partir de colonies sur boîtes de pétri (mini préparation), soit à partir d'une culture de nuit. Il s'agit d'ajouter aux suspensions concentrées, des volumes égaux des solutions A (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 25% Saccharose) et B (100 mM EDTA; 1 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme; 0,1% Triton X-100), de laisser reposer 10 minutes à la température de la pièce, puis d'ébouillanter pendant 45 secondes. Ceci a pour effet de faire sortir l'ADN plasmidique des cellules bactériennes tout en gardant l'ADN cellulaire emprisonné dans les débris. Après une centrifugation de 30 minutes à 15 000 rpm à 4°C, l'ADN dans le surnageant est recueilli et précipité au PEG 6000 10% et NaCl 0,5 M pendant la nuit à 4°C. Après une centrifugation de 30 minutes à 17 000 rpm, le culot d'ADN est ressuspendu dans du tampon TE.

7. IDENTIFICATION DES PLASMIDES RECOMBINANTS.

Nous avons procédé à une identification des plasmides porteurs du fragment *Bam*H I-P en trois étapes: tout d'abord par la taille du fragment inséré, puis par hybridation avec l'ADN HCMV ou le fragment *Hind* III-E et enfin par le profil de restriction.

7.1. Identification par la taille.

De l'ADN plasmidique digéré ou non par une enzyme de restriction (*Eco*R I ou *Bam*H I) a été déposé dans un gel d'agarose 1% préparé dans du tampon borate (0,1 M Tris-HCl, pH 8,3; 0,1 M acide borique; 2mM EDTA), puis soumis à l'électrophorèse- 2 heures à 90 V pour les minigels (mini-sub DNA cell, Bio Rad, Richmond, Ca, USA) et 16 heures à 40 V pour les grands gels (Hamelin et al., 1982). Après coloration au bromure d'éthidium 1 µg/ml (Sigma), les gels ont été photographiés sous lumière UV (transilluminateur modèle C-61, Ultraviolet products, San Gabriel, Ca, USA) sur pellicule Polaroid 667 (Polaroid Co., Cambridge, Ma, USA) (Figures 3 et 4). La taille des ADN a été déterminée grâce aux marqueurs 1 Kilobase DNA Ladder (plasmides digérés) ou Supercoiled DNA Ladder(plasmides intacts) de BRL.

7.2. Identification par hybridation avec l'ADN HCMV ou le fragment *Hind* III-E.

Nous avons testé l'origine virale des ADN insérés dans nos plasmides recombinants par hybridation avec une sonde d'ADN HCMV ou bien, de façon plus précise, avec le fragment *Hind* III-E du HCMV.

Les ADN à tester, préalablement dénaturés à la chaleur, ont été déposés sur filtre de nitrocellulose (BRL) mécaniquement (Hybridot Manifold, BRL) ou manuellement (Figure 5). Pour savoir quel fragment d'ADN particulier réagissait avec la sonde nous avons procédé au transfert des fragments de restriction dans un gel sur un filtre de nitrocellulose ou de nylon (MSI, Westboro, Ma, USA).

7.2.1. Transferts de l'ADN.

Nous avons mis au point un système simple et peu coûteux d'électrotransfert (Pramatarova et al., 1992). Un gel est placé sur un filtre de nitrocellulose entre deux électrodes dans des récipients en plastique. Le courant passe de l'électrode supérieure vers celle située sous le filtre entraînant ainsi l'ADN du gel sur le filtre. Il suffit d'un transfert de 30 minutes à 100 V pour récupérer aussi bien les gros fragments que les plus petits. Après transfert le filtre

est asséché, imbibé d'une solution dénaturante puis chauffé une heure sous vide à 80°C (Fisher Isotemp Vacuum Oven mod. 281, Montréal, Qc, Canada). La dénaturation est faite en déposant le filtre sur des feuilles de papier 3MM imbibées dans les solutions suivantes: 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl pour 5 minutes, suivies de 5 minutes de séchage à l'air, puis de 5 minutes sur 1 M Tris-HCl, pH 8; 1,5 M NaCl (Pramatarova et al., 1992).

7.2.2. Préparation des sondes.

Pour éviter les problèmes reliés au matériel radioactif, nous avons choisi de marquer nos sondes à la biotine. Ce marquage se fait par des réactions enzymatiques de coupure et substitution (Nick translation) suite auxquelles un nucléotide marqué se trouve incorporé à l'ADN sonde. Ces réactions requièrent des tampons, des enzymes (ADNase, polymérase) et des temps d'incubation relativement longs (90 minutes). Une nouvelle méthode consiste à utiliser de la photobiotine (Sigma). La réaction, cette fois, est de nature chimique et ne nécessite ni enzymes ni tampons. Il s'agit de mettre en contact à l'obscurité des volumes égaux d'ADN et de photobiotine, puis d'éclairer le mélange à l'aide d'une lampe au mercure. Cependant, comme le temps d'éclairage requis est relativement long et que la lampe de mercure dégage beaucoup

de chaleur, il faut travailler sur de la glace pour éviter une dégradation du matériel. Nous avons alors utilisé un flash électronique pour fournir rapidement une quantité suffisante de lumière sans échauffer l'échantillon (Pramatarova et Hamelin, 1992). Cette méthode s'est avérée très efficace. En effet, environ 12 éclairs permettent d'obtenir un excellent marquage. Néanmoins, cette technique peut devenir coûteuse en piles, sans oublier qu'il faut posséder un flash, ce qui nous a fait penser à utiliser la lumière du jour pour marquer l'ADN. En fin de compte, il suffit d'exposer le mélange ADN-photobiotine à la lumière du jour pendant 30 minutes en agitant délicatement de temps en temps, pour obtenir un marquage particulièrement efficace. Avant d'utiliser l'ADN marqué ainsi obtenu il faut le faire passer sur mini-colonne Worthington de Sephadex G 50 (Cooper Biomedical Inc., Malvern, Pa, USA) afin de le débarrasser de la photobiotine non incorporée.

7.2.3. Hybridation.

L'hybridation en elle même se déroule à 68°C comme suit: préhybridation de 2 à 4 heures dans: 6X SSC; 5X de solution Denhardt; 0,5% SDS; 100 µg/ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé, puis hybridation pendant 16 heures dans le tampon 6X SSC; 5X de solution Denhardt; 0,01 M EDTA; 0,5% SDS;

100 µg/ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé avec la sonde biotinylée dénaturée. Nous avons poursuivi avec les étapes de lavages post-hybridation et de révélation colorimétrique tel que décrit dans la brochure BluGENE-Nonradioactive Nucleic Acid Detection System fournie par la compagnie BRL lors de l'achat de la biotine. Un des problèmes rencontrés lors des hybridations à l'aide de sondes biotinylées est la coloration prononcée du filtre par le conjugué SA-AP (Streptavidine-alcaline phosphatase). Ceci peut être évité en utilisant de l'extravidine (Sigma) à la place de la streptavidine (BRL) habituelle.

7.3. Identification par les profils de restriction.

Pour identifier avec assurance le fragment *BamH I*-P parmi tous les fragments d'environ 7 kb ayant hybridé avec le HCMV et *Hind III*-E, nous avons digéré les ADN par l'enzyme *Taq I* (BRL). Nous avons fait migrer les petits fragments obtenus dans un gel d'agarose Sea Prep 6% (FMC Co., Rockland, Me, USA), que l'on fait migrer pendant 2 heures à 90 V dans une chambre froide.

8. PRODUCTION MASSIVE DES PLASMIDES RECOMBINANTS.

Les plasmides porteurs de fragments intéressants ont été produits en grande quantité, l'ADN a été extrait comme décrit précédemment en rajoutant une étape de purification au phénol.

9. PURIFICATION DE L'ADN VIRAL CLONE.

Pour certaines de nos expériences d'hybridation et de transfection cellulaire nous avons besoin de fragments purs c'est à dire sans pAT153. Nous avons mis au point une technique de purification simple et efficace: la technique DCDC. Cette méthode fonctionne selon le principe du "Freeze-Squeeze" (Thuring et al., 1975). Nous avons coupé une quantité importante d'ADN plasmidique recombinant et nous l'avons déposé dans un gel d'agarose 0,8% préparatif (Figure 6). Après migration de 2 heures à 90 V, puis coloration au bromure d'éthidium à 1 μ g/ml, nous avons découpé la bande intéressante avec un scalpel puis nous avons homogénéisé l'agarose en le passant dans une seringue munie d'une aiguille numéro 18 (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA). L'homogénat ainsi obtenu a été congelé pendant 30 minutes à -70°C puis décongelé 10 minutes à 37°C et enfin vortexé quelques secondes. Les étapes de congélation et de décongélation ont été répé-

tées trois fois ce qui a eu pour effet de faire sortir l'ADN du gel. Il suffit alors de se débarrasser de l'agarose par centrifugation 30 minutes à 17 000 rpm à 4°C et de récupérer l'ADN du surnageant par précipitation au PEG 6000 10%- NaCl 0,5 M. Les ions provenant du tampon d'électrophorèse peuvent interférer lors des réactions enzymatiques et il a donc fallu s'en débarrasser en passant la suspension d'ADN sur colonne de Sephadex G50.

10. CULTURES CELLULAIRES.

Le potentiel transformant de nos fragments d'ADN clonés a été testé en parallèle sur deux types de cellules canines: les cellules de poumon d'embryon (PEC) et les cellules de rein adulte (RAC). Notons que les expériences de Yelle (Yelle, 1986) étaient faites sur des cellules de rein d'embryon (REC). Dans la suite du texte les cellules utilisées seront nommées par leur sigle respectif- PEC, RAC et REC.

Les culture primaires ont été obtenues d'après la méthode décrite précédemment (Yelle et Berthiaume, 1982). Les tissus ont été hachés très finement à l'aide de deux scalpels, puis lavés avec de la saline PBS tamponnée à pH 7,4 et additionnée de 100 µg/ml de gentamicine, pour éviter la contamination. Les lambeaux de tissus ont été incubés avec agitation dans de la trypsine PBS pendant 30 à 45 minutes à

37°C. Cette opération a été répétée 3 fois au moins, c'est à dire jusqu'à dissociation quasi complète des tissus. Les cellules ont ensuite été lavées et mises en culture dans du milieu MEM Earle additionné de 10% de SBF et 100 µg/ml de gentamicine. Après un passage, les cellules ont été comptées après coloration au bleu de trypan et congelées dans l'azote liquide à -198°C, dans du milieu 199 Hank's/ MEM Earle enrichi de 10% de SBF, 50 µg/ml de gentamicine et 10% de diméthyle sulfoxyde (Sigma). Il faut noter que les cellules REC ne supportent pas plus que 2-3 passages (Yelle et Hamelin, 1986) alors que les cellules PEC peuvent faire 14-15 passages. Pour les expériences de transfection, les cellules RAC ont été utilisées au passage 2 et les cellules PEC au passage 14.

11. TRANSFECTIONS DES CELLULES.

Au cours du présent travail nous avons essayé plusieurs méthodes de transfection afin d'augmenter notre rendement, telles que la méthode de transfection au chlorure de calcium (Yelle et al, 1983) ainsi que la trousse commerciale de Boehringer Mannheim Biochemica - DOTAP. Nous avons aussi effectué des infections de nos cellules non permissives avec les virus HCMV et SV40 entiers. Les stratégies de transfection sont exposées dans le Tableau III.

11.1. Préparation des ADN.

Des quantités allant de 20 à 40 μg par échantillon, d'ADN viral ou plasmidique, ont été digérées par diverses enzymes de restriction dans le tampon approprié à 37°C pendant au moins deux heures. La réaction enzymatique a été arrêtée par ébullition des mélanges pendant deux minutes. Les ADN ont ensuite été précipités au PEG 6000 à 10% et NaCl 0,5 M pendant une heure à 0°C puis centrifugés à 17 000 rpm à 4°C pendant 30 minutes dans une centrifugeuse Beckman J2-21 munie d'un rotor JA-20. Les ADN prêts à être utilisés ont été resuspendus dans 375 μl de tampon HBS à pH 7,05 (137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,88 mM Na_2HPO_4 ; 5,6 mM dextrose; 19 mM HEPES) préparé dans de l'eau stérile distillée et passé sur un mini filtre Acrodisc à porosité de 0,2 μm (Gelman, Ann Arbor, Mi, USA).

11.2. Préparation des cultures cellulaires.

Les cellules ont étéensemencées à raison de 1,5 millions par flacon de 25 cm^2 (Corning, NY, USA), dans du milieu 199 Hank's/ MEM Earle additionné de 10% de SBF et de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicine. Les cultures ont été utilisées à l'état de semi-confluence, c'est-à-dire après une incubation de 2-3 jours à 37°C.

11.3. Transfection des cellules par la méthode de précipitation au CaCl_2 .

Les ADN en suspension dans du tampon HBS ont été précipités par l'ajout de 25 μl de CaCl_2 2M stérile, afin d'obtenir une concentration finale de 125 mM. Après une incubation de 20-30 minutes à la température ambiante, les ADN ont été ajoutés aux milieux de culture des cellules et ces dernières ont été incubées à 37°C. Le lendemain, le milieu de culture a été changé pour éliminer l'effet nocif du chlorure de calcium. Le tout a été incubé pendant 6-8 semaines ou jusqu'à l'apparition des foyers de transformation, avec des changements hebdomadaires de milieu.

11.4. Méthode de transfection au CaCl_2 et centrifugation.

Afin de faire pénétrer une plus grande quantité d'ADN dans les cellules suite à la précipitation au chlorure de calcium traditionnelle, nous avons pensé ajouter une étape de centrifugation juste après l'ajout de l'ADN au milieu de culture. La centrifugation des flacons a été effectuée à une vitesse de 1 500 rpm, à la température de 30°C, pendant une heure, dans une centrifugeuse IEC model PR-2 (International Equipment Co., Needham Hts, Mas, USA) munie d'un rotor 267 et

de plateaux de Microtiter Cook Laboratory Products (Cook Eng. Co., Alexandria, Va, USA).

11.5. Transfection au DOTAP.

L'ADN a été préparé de la façon décrite précédemment sauf en ce qui a trait au volume de tampon HBS utilisé pour resuspendre le culot après précipitation au PEG-NaCl. En effet, il ne faut que 100 μ l de tampon par échantillon. Le réactif DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy) propyl]-N,N,N-triméthylammoniuméthylsulfate) a été utilisé à raison de 30 μ l dilués dans 70 μ l de tampon HBS par échantillon. L'ADN et le DOTAP ont été mélangés dans des tubes de polystyrène et incubés ensemble à la température ambiante pendant 10 minutes avant de leur ajouter 5,8 ml de milieu 199 Hank's/ MEM Earle additionné de 50 μ g/ml de gentamicine et de 10% de SBF. Les feuillets cellulaires ont été mis en contact avec le mélange pendant 16 heures à 37°C, puis le milieu a été remplacé et le tout incubé à 37°C, avec des changements hebdomadaires de milieu. L'apparition de foyers a été surveillée pendant 6-8 semaines.

11.6. Infection des cellules par le HCMV ou SV40.

Des feuillets cellulaires obtenus comme décrit plus haut ont été mis en contact avec le virus HCMV ou SV40, pendant 90 minutes à 37°C. Suite à ce traitement, du milieu a été ajouté et les flacons incubés dans les mêmes conditions que les cellules transfectées.

12. CARACTERISATION DES CELLULES TRANSFORMEES.

Les cellules provenant de foyers de croissance ont été testées pour leur état de transformation suivant plusieurs critères tels que: durée de vie prolongée, besoins réduits en sérum, croissance en milieu semi-solide, rétention du colorant rhodamine 123.

12.1. Durée de vie.

Suite à l'apparition de foyers de croissance inhabituelle dans nos flacons, les cellules ont été trypsinées et remises en culture. Des passages ont été effectués à chaque fois que les feuillets atteignaient la confluence.

12.2. Besoins réduits en sérum.

Les cellules ayant subi avec succès des passages supplémentaires par rapport à leur durée de vie anticipée, ont été mises en culture dans du milieu 199 Hank's/ MEM Earle additionné de 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicine et de 2% de SBF au lieu de 10%. La capacité de croissance des cellules dans de telles conditions a été évaluée par passages successifs.

12.3. Croissance en milieu semi-solide.

Le test de croissance en milieu semi-solide permet de faire la discrimination entre des cellules transformées oncogéniquement, qui forment des colonies de diamètre supérieur à 2 mm et des cellules immortalisées qui ne forment que de très petites colonies, c'est à dire de diamètre inférieur à 2 mm (Yelle et al., 1990). Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode de Lang et al. (1974) où les cellules à tester sont trypsinées, comptées et resuspendues à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules au millilitre dans du milieu 199 Hank's/ MEM Earle additionné de 10% de SBF, 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicine et enfin 0,3% d'agarose. Ce mélange est coulé sur du milieu 199 Hank's/ MEM Earle additionné de 10% de SBF, 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicine et solidifié par l'ajout de 0,4% d'agarose. Les plateaux Linbro à six puits (Flow Laboratories Inc., McLean,

Va, USA) ont été incubés dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 6-8 semaines.

12.4. Rétention de la rhodamine 123.

Chaque type de cellules a un processus d'élimination de la rhodamine différent, c'est à dire demandant plus ou moins de temps. Nous avons comparé le comportement des diverses lignées de cellules dont nous disposions. Les cellules ont étéensemencées à raison de 2×10^5 cellules/ml dans du milieu 199 Hank's/ MEM Earle additionné de 10% de SBF et de 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicine, dans des flacons de 25 cm². Après 2 jours d'incubation à 37°C, le milieu des feuillets cellulaires a été remplacé par du milieu frais auquel nous avons ajouté 10 $\mu\text{g/ml}$ de rhodamine 123 (Fisher). Les flacons ont été incubés avec la rhodamine pendant 45 minutes, suite à quoi le milieu coloré a été enlevé et les feuillets lavés deux fois au PBS. Du milieu frais a été ajouté et les flacons ont été incubés pendant 7 heures (témoins temps) ou 17 heures à l'obscurité à 37°C. Avant d'observer les cellules au microscope à fluorescence (Zeiss) à 546 nm de longueur d'onde, deux lavages au PBS et au milieu de culture frais ont été effectués pour s'assurer de bien éliminer la rhodamine du milieu extracellulaire.

RESULTATS

1. CLONAGE DES FRAGMENTS *EcoR* I ET *BamH* I DU HCMV.

Le plasmide pAT153 (3 658 pb), possède deux gènes de résistance aux antibiotiques *bla* et *tet* qui facilitent la sélection des recombinants par l'utilisation de milieux additionnés d'ampicilline ou de tétracycline à raison de 50 $\mu\text{g/ml}$ (Twiggs et Sherratt, 1980).

1.1. Sélection par la taille.

1.1.1. Les fragments *EcoR* I du génome HCMV.

Dans le cas des colonies à plasmides porteurs d'un fragment *EcoR* I, nous n'avons pas de moyen de sélection des recombinants car le site de coupure unique par *EcoR* I se situe hors des gènes de résistance aux antibiotiques. Nous avons donc analysé les colonies porteuses d'un plasmide (les seules qui peuvent pousser sur milieu ML-Amp) au hasard. Un total de 1 355 souches Amp^r ont été testées pour la présence d'un plasmide recombinant (Figure 3). Seulement 2,4%, c'est à dire 32 souches se sont avérées, suite à la digestion par *EcoR* I, porteuses d'un fragment d'ADN étranger. Quelques plasmides recombinants des plus intéressants sont montrés sur la Figure 3.

Même après cinq expériences de clonage indépendantes, nous n'avons jamais pu obtenir des insertions de taille supérieure à 12 kb, ce qui est nettement inférieur à la taille du fragment *EcoR* I-B que nous recherchions et qui mesure 16,8 kb. En effet la taille des fragments obtenus variait entre 0,2 et 12 kb. Notons cependant que le puits 13 de la Figure 3 contient peut être le deuxième fragment qui nous intéressait, le fragment *EcoR* I-R de 6,6 kb. Mais il n'a pas été étudié plus avant.

1.1.2. Les fragments *BamH* I du génome HCMV.

Pour ce qui est des plasmides recombinants à fragment *BamH* I, il en était tout différemment que pour *EcoR* I. En effet le site *BamH* I se trouvant dans le gène de résistance à la tétracycline celui-ci est inactivé suite au clonage, et les colonies intéressantes sont ampicilline résistantes mais tétracycline sensibles (Amp^r Tet^s). Nous avons donc un moyen efficace de sélection des recombinants. Nous avons testé 835 souches sur milieux sélectifs et 264 d'entre elles se sont révélées Amp^r Tet^s (31,6%). Dix-neuf de ces souches sont montrées à la Figure 4. Après digestion par *BamH* I, tous les plasmides portaient un fragment d'ADN étranger; de plus, ces fragments avaient dans 59,1% des cas une taille supérieure à 10 kb (Figure 4).

Rappelons que le fragment *BamH* I-P que nous recherchions ne mesure que 7 kb et il était donc probable que nous réussissions à le cloner. Etant donné le nombre restreint de plasmides intéressants obtenus avec l'enzyme *EcoR* I, nous avons donc décidé de concentrer notre attention sur les fragments *BamH* I, et plus particulièrement sur les fragments d'environ 7 kb.

1.2. Sélection par hybridation avec l'ADN HCMV.

Après avoir sélectionné les plasmides recombinants de taille intéressante c'est à dire supérieure à 10 kb (3,6 kb + 7 kb), nous avons voulu nous assurer de l'origine virale de l'insertion. Pour ce faire nous avons procédé à une hybridation des ADN plasmidiques sous forme de dépôts avec une sonde d'ADN HCMV marquée à la photobiotine. Nous avons retenu pour la suite de nos expériences, seulement les plasmides ayant donné une très forte réponse avec la sonde. Ainsi, par exemple, les souches D3 et D4 de la Figure 5 portent une insertion d'ADN HCMV.

1.3. Sélection par hybridation avec le fragment
Hind III-E.

Il existe trois fragments *Bam*H I de taille avoisinant 7 kb. Nous avons différencié le fragment *Bam*H I-P des fragments N et O par hybridation avec le fragment *Hind* III-E purifié par DCDC.

Après électrotransfert des fragments d'ADN dans un gel sur un filtre de nylon en utilisant l'appareil montré à la Figure 7, nous avons pu sélectionner parmi tous les plasmides porteurs d'un fragment viral de 7 kb, ceux porteurs de *Bam*H I-P, c'est à dire ceux qui ont réagi de façon positive avec la sonde *Hind* III-E. Dans le puits 2 de la Figure 8 C, nous pouvons voir un exemple de fragment *Bam*H I-P identifié par hybridation. Il s'agit du plasmide pLCR127. Le plasmide pLCC1534 entier a servi de sonde dans ce cas-ci, afin de pouvoir utiliser la bande des pAT153 comme point de repère sur le filtre. Notons que la bande de 1,6 kb du marqueur de taille origine du plasmide pBR322 (Composition of 1 kb DNA ladder, 1989, Gaithersburg, USA, Focus 11(2):36) et réagit avec le plasmide pAT153 qui est un dérivé de pBR322.

1.4. Sélection par profil de restriction avec *Taq* I.

Pour confirmer l'identité de pLCR127 nous avons procédé à une analyse de restriction de notre plasmide avec *Taq* I, en comparaison avec pLCC1534 et pAT153. Ainsi, nous avons pu reconnaître les bandes appartenant au vecteur dans les puits contenant les plasmides pLCR127 et pLCC1534 mais en plus, nous avons observé des bandes homologues entre ces deux derniers plasmides non retrouvées chez pAT153 (Figure 9). Le plasmide pLCR127 est donc bien porteur du fragment *Bam*H I-P que nous recherchions.

2. TRANSFECTIONS DES CELLULES.

Les ADN clonés obtenus (pLCR127), de même que les ADN viraux HCMV et SV40 ont servi lors d'expériences de transformation de cellules canines. Diverses techniques ont été testées afin d'avoir le meilleur rendement de transformation possible.

2.1. Méthode au chlorure de calcium.

Suite aux transfections selon la méthode au CaCl_2 , nous avons obtenu une efficacité de transformation des cellules

PEC très inférieure à nos prévisions d'après les résultats de Yelle (Yelle et al., 1990).

2.2. Méthode au chlorure de calcium et centrifugation.

La centrifugation avait pour but d'augmenter la quantité d'ADN précipité sur les cellules et par la même occasion la quantité d'ADN absorbé. Malgré la quantité augmentée d'ADN incorporé, le taux de transformation des cellules de rein d'embryon de chien n'a pas subi de hausse significative.

2.3. Méthode de transfection au DOTAP.

La trousse commerciale à base de DOTAP permet en théorie, une bonne incorporation de l'ADN par les cellules, tout en minimisant les effets secondaires. Dans notre cas, le taux de réussite de la transformation a été tout à fait comparable à celui avec le CaCl_2 .

2.4. Transfections de cellules de reins de chiens adultes.

Les cellules RAC ont une durée de vie en culture primaire de 1-2 passages et ne sont capables de survivre que

pendant 3-4 semaines post-transfection. Ce temps est trop court pour permettre l'apparition de la transformation.

2.5. Récapitulation des résultats de transfection.

Suite à dix expériences de transfection indépendantes nous avons obtenu des foyers de transformation des cellules PEC avec de l'ADN HCMV entier ou coupé par *EcoR* I, de même qu'avec l'ADN du fragment *BamH* I-P cloné (pLCR127) (Figure 10). Le virus SV40, notre témoin positif, a également permis l'obtention de foyers. En parallèle, l'infection des cellules PEC par les virus SV40 et HCMV a conduit à la formation de foyers, mais en plus faible quantité qu'avec les ADN purifiés. D'autre part, un certain nombre de cellules témoins, ont présenté une croissance inhabituelle qui s'est prolongée sur de nombreux passages.

Si nous tenons compte de ces "transformations spontanées", nous avons en moyenne un rendement de transformation d'environ un foyer par 5×10^5 cellules transfectées avec 10-20 μg d'ADN de SV40, et même moins pour les ADN HCMV.

3. CARACTERISATION DES CELLULES TRANSFORMEES.

Les cellules provenant de foyers de transformation ont montré une durée de vie prolongée, la capacité de croître en

milieu à concentration en sérum réduite, et ont formé de petites colonies en milieu semi-solide (Figure 11).

Pour ce qui est de la rétention de la rhodamine, les cellules normales de même que les cellules transformées par SV40 se sont décolorées après une vingtaine d'heures, alors que les cellules immortalisées par de l'ADN du cytomégalovirus ont conservé leur fluorescence (Figure 12).

DISCUSSION

1. CLONAGE DU GENOME HCMV SOUS FORME DE FRAGMENTS

EcoR I ET BamH I.

Le plasmide pAT153 s'est avéré très pratique pour notre genre d'expériences car il est capable de porter de gros fragments d'ADN et permet d'obtenir de grandes quantités d'ADN facilement. De plus il possède deux gènes de résistance aux antibiotiques ampicilline et tétracycline, qui facilitent la sélection des recombinants.

Nous comptions cloner dans les sites *EcoR I* et *BamH I*, parmi lesquels seul le deuxième se trouve dans un gène de résistance aux antibiotiques. La sélection des recombinants *EcoR I* a donc été difficile car il a fallu procéder au hasard. Le peu de succès connu lors de ce clonage provient également du fait que les fragments intéressants sont de taille importante et sont donc plus rarement avalés par la bactérie. L'insertion du fragment *BamH I-P* quant à lui, inactive le gène de résistance à la tétracycline en plus de présenter la taille idéale pour un clonage dans pAT153 (7 kb).

Le fragment *BamH I-P* couvre la région qui nous intéresse c'est-à-dire la jonction des fragments *Hind III-E* et *Hind III-T*, où nous pensons que doit se situer le gène HCMV pour l'immortalisation. De plus, le fragment *BamH I* possède plusieurs centaines de paires de bases, de part et d'autre du site *Hind III*, ce qui permettrait la conservation de l'acti-

tivité du gène (rappelons que l'enzyme *Hind* III inactive ce gène). Le fragment *Bam*H I-P semble donc un excellent candidat pour l'isolement du gène de l'immortalisation du HCMV souche AD-169.

2. SELECTION DES PLASMIDES RECOMBINANTS.

Le génome HCMV possède trois fragments *Bam*H I de taille avoisinant 7 kb (N, O et P), que l'on peut difficilement différencier sur gel. Cependant, seul le fragment *Bam*H I-P se situe dans la région HCMV *Hind* III-E. Il a alors été possible d'éliminer les fragments, *Bam*H I-N et *Bam*H I-O clonés, après hybridation avec le fragment *Hind* III-E. Nous avons obtenu le fragment *Hind* III-E libre de pAT153 par notre méthode DCDC. Cette technique permet d'obtenir un ADN de qualité pouvant servir dans toutes sortes de réactions enzymatiques (digestions et ligations) comme on le voit à la Figure 6. Le rendement de la purification est excellent, bien supérieur à l'électroélution (Maniatis et al., 1982), et tout à fait comparable à celui obtenu à l'aide du kit GeneClean II de Bio/Can Scientific Inc. (Ontario, Canada). Notre méthode a de plus l'avantage de permettre une très bonne récupération des fragments de grande taille, qui avec GeneClean II ont tendance à être brisés (traînée en gel). Notre technique est également intéressante car elle est d'une grande souplesse,

la simplicité des manipulations permet à l'utilisateur de vaquer à d'autres occupations.

Etant donné qu'un plasmide peut être porteur de plusieurs fragments d'ADN viral et que parfois il est important de savoir laquelle de ces insertions réagit avec la sonde, nous avons mis au point un système pratique d'électrotransfert de l'ADN dans un gel à un filtre. Ce montage simple permet une excellente récupération des ADN de toutes les tailles de façon rapide, sûre et peu coûteuse alors que les transferts par capillarité (Southern, 1975) demandent un montage précaire et prennent la nuit pour se réaliser. De plus, les gros fragments ont du mal à sortir du gel or nous nous intéressions à des fragments de taille assez importante. La qualité de notre électrotransfert est de plus tout à fait comparable à celle obtenue grâce aux appareils commerciaux. Suite à ces expériences d'hybridation nous avons pu identifier les plasmides porteurs du fragment *Bam*H I-P que nous recherchions, dont pLCR127.

Pour plus d'assurance quant à l'identité de notre pLCR127, nous avons comparé son profil *Taq* I à celui de pAT153 et pLCC1534 (*Hind* III-E cloné: Yelle et al., 1986). *Taq* I reconnaît la séquence TCGA ce qui mène à la production de nombreux fragments. Au cours de ces expériences, nous avons remplacé les gels de polyacrylamide par des gels d'agarose Sea Prep qui tout en donnant des résultats avec les

petits fragments d'ADN tout à fait comparables (Figure 9), ont l'avantage de se travailler plus facilement et de ne pas nécessiter d'appareillage d'électrophorèse différent de celui des gels d'agarose habituels. Les profils de restriction permettent une différenciation des ADN de tailles ou de structures semblables, surtout si le nombre de fragments générés est suffisamment important. Nous avons ainsi pu confirmer l'identité du plasmide pLCR127.

3. TRANSFECTIONS DE CELLULES CANINES.

Pour nos transfections, nous avons utilisé la technique au CaCl_2 décrite précédemment par Yelle (Yelle et al., 1983). Le rendement de transformation n'étant pas tel que prévu d'après les travaux de Yelle, nous avons pensé que la quantité d'ADN pénétrant dans les cellules était insuffisante. Nous avons alors mis au point une technique inspirée du "Shell Vial Assay" utilisé en diagnostic (Hamelin, 1990) , et qui consiste à précipiter les virus cytomégaliqes des urines de patients par centrifugation sur des feuillets cellulaires. Nous avons donc appliqué une légère centrifugation sur nos cultures suite à la précipitation au CaCl_2 . D'après des tests préliminaires avec de l'ADN SV40 marqué à la thymidine tritiée (H^3), effectués selon le protocole décrit précédemment (Yelle et al., 1983), il apparaît que la quantité d'ADN

pénétrant dans les cellules après centrifugation est trois fois plus importante qu'après simple précipitation au CaCl_2 . Malgré cette amélioration et même suite aux essais avec des produits commerciaux tels que la trousse de DOTAP (BMC), le rendement de transformation est resté insatisfaisant. Les recherches précédentes faites dans notre laboratoire sur des cellules REC, ont montré un rendement au moins cinq fois meilleur (1 foyer pour 10^5 cellules ou 1 foyer par μg d'ADN) (Yelle et al., 1990). Etant donné, d'une part, que la quantité d'ADN incorporée ne semblait pas être la source de nos problèmes et que, d'autre part, les expériences de Yelle citées plus haut étaient faites sur des cellules de rein- REC et non de poumons- PEC, nous avons pensé que la difficulté venait peut être du type de cellules utilisées. Nous avons donc tenté de nous rapprocher le plus possible des conditions de travail de Yelle avec les cellules REC. Malheureusement il est très difficile de se procurer des cellules REC en culture primaire et les réserves sont vite épuisées. Néanmoins nous avons réussi à avoir des reins de chiens adultes. Cependant les cultures primaires- RAC obtenues se sont avérées très fragiles, probablement dû à l'âge avancé des cellules. Notons que les cellules reinales même d'origine embryonnaire (REC), ont une durée de vie très limitée. Nous avons donc effectué nos expériences avec les cellules de poumon d'embryon (PEC) malgré le faible rendement obtenu. Ceci étant tout de même

regrettable car la transformation par le cytomégalo virus est un phénomène relativement rare.

Les cellules transfectées avec les ADN HCMV et SV40 de même qu'avec le plasmide pLCR127, et qui ont présenté une croissance anormale ont été étudiées. Elles semblaient posséder les caractéristiques des cellules transformées, surtout pour les cellules transfectées avec SV40, notre témoins positif. Cependant, contrairement à notre attente, les cellules témoins ont également montré une tendance à la multiplication prolongée. Les études précédentes ayant été faites surtout sur les caractéristiques des cellules de rein, peut être que les cellules de poumons ne se conduisent pas exactement de la même façon? Peut-être qu'elles sont plus sensibles à la transformation spontanée que leurs consœurs? Même si la caractéristique la plus intéressante des cellules canines était justement leur durée de vie très limitée, ce regain de vigueur inattendu ne nous empêche pas d'utiliser nos résultats. Il a suffi de retrancher des données obtenues le nombre de foyers rencontrés dans les témoins, c'est à dire de travailler de façon différentielle comme le font d'autres chercheurs avec les cellules de rongeurs. Nous avons l'avantage que ces foyers soient quand même un phénomène relativement rare.

Une fois les cellules transformées obtenues, il était important de pouvoir facilement faire la différence entre

l'immortalisation et la transformation oncogène. Les seules façons utilisées étaient la culture en milieu semi-solide et l'injection aux animaux de laboratoire. La première méthode est la plus simple mais malgré tout il n'est pas toujours évident de différencier des colonies de moins de 0,1 mm des cellules isolées ou en petits amas d'une part, et d'autre part les colonies de 0,1 mm de celles à 0,2 mm. Pour ce qui est des animaux de laboratoire, l'injection de cellules immortalisées ne provoque pas la formation de tumeurs. Rappelons que c'est cette absence de tumorigénicité qui permet de différencier une cellule d'immortalisée d'une cellule transformée oncogéniquement. De plus, les tests sur les animaux sont coûteux et exigeants au point de vue manipulation et entretien des souris. Nous avons donc utilisé la coloration à la rhodamine 123 comme méthode de remplacement pour les tests de routine. Ce colorant fluorescent a la propriété d'être rapidement incorporé par les mitochondries, qui s'en débarrassent ensuite de façon irréversible et à un rythme dépendant du type de cellule (Summerhayes et al., 1982). Ce rythme dépend souvent de la nature transformée ou non de la cellule. Ainsi les cellules immortalisées par le cytomégalo virus semblent retenir le pigment plus longtemps que les cellules témoins ou même les cellules transformées oncogéniquement par SV40. Ceci tend à prouver que les phénomènes de transformation observés avec SV40 et le cytomégalo virus ne sont pas de

même origine. D'ailleurs il est bien connu que le virus SV40 laisse des traces de son intervention dans la cellule alors qu'il est impossible de mettre en évidence des acides nucléiques ou autre produit des herpèsvirus dans les cellules transformées (phénomène du "hit & run") (Galloway et McDougall, 1983, Spector et Spector, 1984). De plus, cette coloration nous fournit un moyen simple et efficace pour différencier les cellules immortalisées des cellules tumorigènes.

En fin de compte, les expériences effectuées au cours de ce projet de maîtrise nous ont permis de perfectionner nos techniques, nous donnant ainsi tous les outils nécessaires à l'étude des phénomènes de la transformation par le cytomégalo-virus humain. Les résultats obtenus avec les cellules de poumon d'embryon de chien bien que décevants, nous confirment dans l'idée déjà exprimée par Yelle (1986), de l'importance primordiale du système cellulaire dans l'étude de manifestations aussi complexes que la transformation cellulaire par le HCMV.

Néanmoins les recherches doivent se poursuivre en utilisant les techniques et le matériel déjà amassés. Des renseignements précieux sur les différentes étapes de la transformation cellulaire, sur le caractère transitoire de l'intervention des herpèsvirus dans le processus d'oncogénèse, de même que sur les fonctions virales impliquées dans la multi-

plication anarchique des cellules transformées, pourraient être obtenus de ces expériences.

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons tenté de vérifier l'hypothèse selon laquelle il existerait chez HCMV, comme c'est le cas chez herpès simplex type 2, deux gènes voisins mais différents responsables de l'immortalisation et de la transformation oncogène. La difficulté résidait dans le choix d'un système cellulaire permettant l'observation du phénomène de l'immortalisation. Après avoir cloné le fragment HCMV *BamH I-P*, recouvrant la région responsable de la transformation oncogène, nous avons testé son potentiel immortalisant sur des cellules PEC de poumon d'embryon de chien. Cependant, contrairement aux cellules REC de rein d'embryon de chien, déjà utilisées avec succès pour ce genre d'expérience, les cellules PEC se sont avérées peu sensibles à la transformation et enclines à des reprises de croissance faisant penser à de la transformation spontanée. Malgré cela le système peut très bien servir à l'étude de l'immortalisation à condition de travailler de façon différentielle lors de l'interprétation des résultats. De plus, les techniques mises au point lors de ce projet (DCDC, électrotransfert, photobiotine, transfection par centrifugation) permettent d'améliorer l'efficacité des manipulations et augmentent les chances d'obtenir des résultats.

REMERCIEMENTS

Je voudrais commencer en exprimant ma gratitude envers le Dr Michel Trudel, directeur du centre de Virologie pour avoir accepté ma candidature au programme de maîtrise en virologie et immunologie.

Je veux remercier le Dr Claude Hamelin, mon directeur de recherche, pour avoir eu confiance en moi et m'avoir acceptée comme étudiante, de même que pour l'attention toute particulière qu'il a portée à ma formation. Je le remercie pour son enthousiasme et ses encouragements continuels.

Je remercie également Mad. Lise Cousineau pour son aide technique irremplaçable, sa gentillesse, sa serviabilité et surtout sa patience à toute épreuve.

Mes remerciements vont au Dr Jocelyn Yelle, qui a su m'encourager dans mes travaux lorsque j'en avais le plus besoin. Je le remercie également pour tous ses judicieux conseils.

Je remercie l'Institut Armand-Frappier et le Fonds FCAR pour leur aide financière au cours de mes études de maîtrise.

Enfin merci à ma famille pour tout son amour, sa compréhension et son encouragement.

BIBLIOGRAPHIE

- ALBRECHT, T. et F. RAPP. 1973. Malignant transformation of hamster embryo fibroblasts following exposure to ultraviolet-irradiated human cytomegalovirus. *Virology*, **55**: 53-61.
- BOLDOGH, I., E. GONCZOL et L. VACZI. 1978. Transformation of hamster embryonic fibroblast cells by UV-irradiated human cytomegalovirus. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **25**: 269-275.
- BOLDOGH, I., B. BRICHACEK, E. GONCZOL, I. HIRSCH et L. VACZI. 1985. Viral DNA sequences in human cytomegalovirus transformed hamster cell line at low passage levels. *Acta Microbiol. Hung.*, **32**: 167-173.
- CLANTON, D.J., R.J. JARIWALLA, C. KRESS et L.J. ROSENTHAL. 1983. Neoplastic transformation by a cloned human cytomegalovirus DNA fragment uniquely homologous to one of the transforming regions of herpes simplex type 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 3826-3830.
- DALE, J.W. et P.J. GREENAWAY. 1984. Bacterial transformation (Kushner Method). Dans: *Methods in Molecular Biology Vol.2, Nucleic Acids*. p 241-244. Walker J.M. éditeur, Humana Press, Clifton, NJ, USA.
- DION, M. et C. HAMELIN. 1990. Cartographie physique de l'ADN du cytomégalo-virus humain souche AD169. *Can. J. Microbiol.*, **36**: 341-347.
- GALLOWAY, D.A. et J.K. McDOUGALL. 1983. The oncogenic potential of herpes simplex viruses: evidence for a "hit-and-run" mechanism. *Nature*, **302**: 21-24.
- GEDER, L., E.J. SANFORD, T.J. ROHNER et F. RAPP. 1977. Cytomegalovirus and cancer of the prostate: *In vitro* transformation of human cells. *Cancer Treat. Rep.*, **61**: 139-146.
- GREENAWAY, P.J., J.D. ORAM, R.G. DOWNING et K. PATEL. 1982. Human cytomegalovirus DNA: *Bam*H I, *Eco*R I and *Pst* I restriction endonuclease cleavage maps. *Gene*, **18**: 355-360.
- HAMELIN, C. 1990. Infection à cytomégalo-virus chez l'homme: diagnostic, traitement et prévention. *Med. Sci.*, **6**: 544-551.
- HAMELIN, C. et G. LUSSIER. 1979. Concentration of human cytomegalovirus from large volumes of tissue culture fluids. *J. Gen. Virol.*, **42**: 193-197.

HAMELIN, C. et J. YELLE. 1986. Diminution de l'activité topoisomérase associée à la chromatine de cellules canines après transformation par les virus HCMV et SV40. *Gerontol. Perspecta*, 1: 94-100.

HAMELIN, C., L. COUSINEAU, M. DION et R. BRASSEUR. 1982. Separation of viral DNA molecules in horizontal agarose slab gels using a new type of wick. *J. Virol. Methods*, 5: 159-164.

HAYASHI, Y., T. IWASAKA, C.C. SMITH, L. AURELIAN, G.K. LEWIS et P.O.P. TS'O. 1985. Multistep transformation by defined fragments of herpes simplex virus type 2 DNA: oncogenic region and its gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 8593-8497.

HIRT, B. 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.*, 26: 365-369.

HUANG, E.-S. 1984. Cytomegalovirus: its oncogenes and Kaposi's sarcoma. *Antibiot. Chemother.*, 32: 27-42.

HUANG, E.-S., E.-C. MAR, I. BOLDOGH et J. BASKAR. 1984. The oncogenicity of human cytomegalovirus. Dans: Plotkin, S.S., S. Michelson, J.S. Pagano et F. Rapp (eds): *CMV: Pathogenesis and prevention of human infection*. A.R. Liss Inc., New York. pp. 193-211.

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.

LANG, D.J., L. MONTAGNIER et R. LATARJET. 1974. Growth in agarose of human cells infected with cytomegalovirus. *J. Virol.*, 14: 327-332.

MANIATIS, T., E.F. FRITSCH et J. SAMBROOK. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Laboratory.

NELSON, J.A., B. FLECKENSTEIN, D.A. GALLOWAY et J.K. McDOUGALL. 1982. Transformation of NIH 3T3 cells with cloned fragments of human cytomegalovirus strain AD-169. *J. Virol.*, 43: 83-91.

NELSON, J.A., B. FLECKENSTEIN, G. JAHN, D.A. GALLOWAY et J.K. McDOUGALL. 1984. Structure of the transforming region of human cytomegalovirus AD-169. *J. Virol.*, 49: 109-115.

NEWBOLD, R.F., R.W. OVRELL et J.R. CONNELL. 1982. Induction of immortality is an early event in malignant transformation of mammalian cells by carcinogens. *Nature*, **299**: 633-635.

PRAMATAROVA, A. et C. HAMELIN. 1992. Photobiotinylation of DNA using an electronic flash. *BioTechniques*, **13**(1): 10-13.

PRAMATAROVA, A., L. MICHAUD, F. GAGNON et C. HAMELIN. 1992. Electro-phoretic transfer of DNA from gels to filters using a homemade apparatus. *Gen. Anal. Tech. Appl.*, **9**: 26-30.

RAPP, F. 1984. The challenge of herpesviruses. *Cancer Res.*, **44**: 1309-1315.

RAPP, F. 1984a. Cytomegalovirus and carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, **72**: 783-787.

RAPP, F. et D. ROBBINS. 1984. Cytomegalovirus and human cancer. Dans: Plotkin, S.S., S. Michelson, J.S. Pagano et F. Rapp (eds): *CMV: Pathogenesis and prevention of human infection*. A.R. Liss Inc., New York. pp. 175-192.

ROIZMAN, B. 1980. Structural and functional organization of herpes simplex virus genomes. Dans F. Rapp (Ed.): *Oncogenic herpes viruses*. Vol. I, CRC Press Inc., Boca Raton, pp: 19-51.

SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

SPECTOR, D.H. et S.A. SPECTOR. 1984. The oncogenic potential of human cytomegalovirus. *Prog. Med. Virol.*, **29**: 45-89.

SUMMERHAYES, I.C., T.J. LAMPIDIS, S.D. BERNAL, J.J. NADAKAVUKAREN, K.K. NADAKAVUKAREN, E.L. SHEPHERD et L.B. CHEN. 1982. Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79**: 5292-5296.

TEVETHIA, M.J. 1985. Transforming potential of herpes simplex viruses and human cytomegalovirus. Dans: Roizman, B. (ed.): *The herpesviruses*. Vol. 3. Plenum Press, New York. pp. 257-313.

THURING, R.W., J.P.M. SANDERS et P. BORST. 1975. A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Anal. Biochem.*, **66**: 213-220.

TWIGG, A.J. et D. SHERRATT. 1980. Trans-complementable copy-number mutants of plasmid ColEi. *Nature* **286**: 216.

YELLE, J. 1986. Etude du pouvoir transformant du cytomégalo-virus humain. Thèse de doctorat. Institut Armand-Frappier, Université du Québec.

YELLE, J. et L. BERTHIAUME. 1982. Expression of virus like particles in normal and transformed gerbil cells. *Arch. Virol.*, **74**: 77-83.

YELLE, J. et C.HAMELIN. 1986. Transformation of dog embryo kidney cells by human herpesviruses. *Cell Biol. Int. Rep.*, **10**: 493-499.

YELLE, J., M. DION et C. HAMELIN. 1983. Efficient transfection of mammalian cells with viral DNA in optimal culture conditions. *J. Virol. Methods*, **7**: 321-326.

YELLE, J., M. DION et C. HAMELIN. 1986. Distinct regions of the human cytomegalovirus genome are responsible for the immortalization and tumorigenicity of animal cells. *Cancer Lett.*, **32**: 101-106.

YELLE, J., G. LUSSIER, A. PRAMATAROVA et C. HAMELIN. 1990. Low tumorigenicity of canine cells transformed by the human cytomegalovirus. *Biol. Cell*, **70**: 9-18.

TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAU I

**PROPRIETES DES CELLULES DE RONGEURS VS
LES CELLULES DE REIN D'EMBRYON DE CHIEN**

CELLULES DE RONGEURS	CELLULES CANINES
Rétrovirus endogènes : transformation spontanée	Pas de rétrovirus endogènes: pas de transf. spontanée
Cellules en lignée continue	Cellules en culture primaire
Durée de vie illimitée	Durée de vie limitée: rein: 2-3 passages poumon: 14-15 passages
Non permissives au HCMV	Non permissives au HCMV

TABLEAU II

PROPRIETES DES CELLULES NORMALES VS TRANSFORMEES

PROPRIETES DES CELLULES	NORMALES	IMMORTALISEES	TRANSFORMEES ONCOGENIQUE- MENT
Durée de vie illimitée	Non	Oui	Oui
Taille	Normale	Réduite	Réduite
Besoin en sérum	Elevée: 10%	Réduite: 2%	Réduite: 2%
Croissance en milieu semi- solide	Non	Oui Colonies < 0,2 mm	Oui Colonies > 0,2 mm
Tumorigéni- cité	Non	Non (< 5%)	Oui (100%)

TABLEAU III

STRATEGIES DE TRANSFECTION

APPELLATION DE L'ECHANTILLON	TRAITEMENT INFLIGE
Témoins cellules (-)	Aucun
Témoins de transformaton (-)	Transfection avec: pAT 153 pLCC 1534 (<i>Hind</i> III-E)
Témoins de transformation (+)	Transfection avec: SV40 HCMV HCMV- <i>Eco</i> R I Infection avec: SV40 HCMV
Tests	Transfection avec plasmides recombinants: ex. pLCR 127 (<i>Bam</i> H I-P) pCM 1058 (cosmide)

FIGURE 1: Localisation des séquences transformantes sur le génome des virus herpès simplex types 1 et 2 et du cytomégalovirus humain.

Les cartes de restriction de HSV-1 et HSV-2 (a) et du HCMV (b) ont été reproduites dans Yelle et al., 1990, d'après les données de Roizman (1980), Greenaway et al. (1982), Nelson et al. (1984), Hayashi et al. (1985) et Dion (1986).

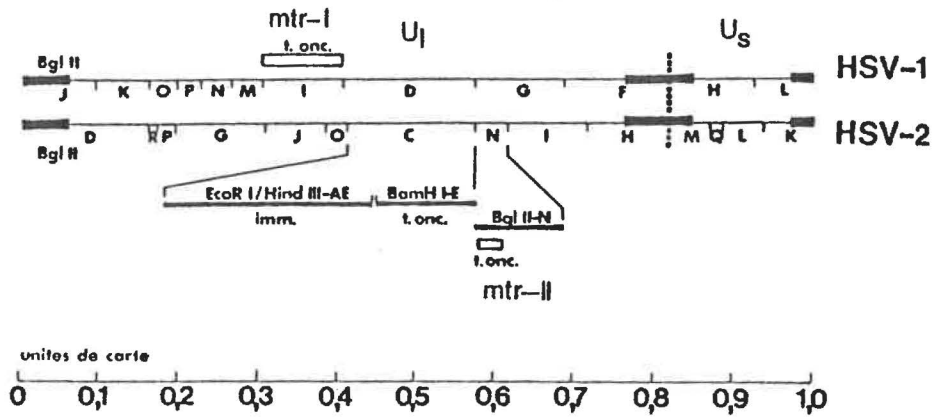
Abréviations:

imm.: immortalisation

t. onc.: transformation oncogène complète (tumorigène).

N.B. Pour la souche Towne du cytomégalovirus humain, on retrouve dans la région marquée "imm." les gènes immortalisant et transformant oncogéniquement, car ces derniers n'ont pas encore été bien différenciés.

(a) HERPES SIMPLEX



(b) CYTOMEGALOVIRUS HUMAIN

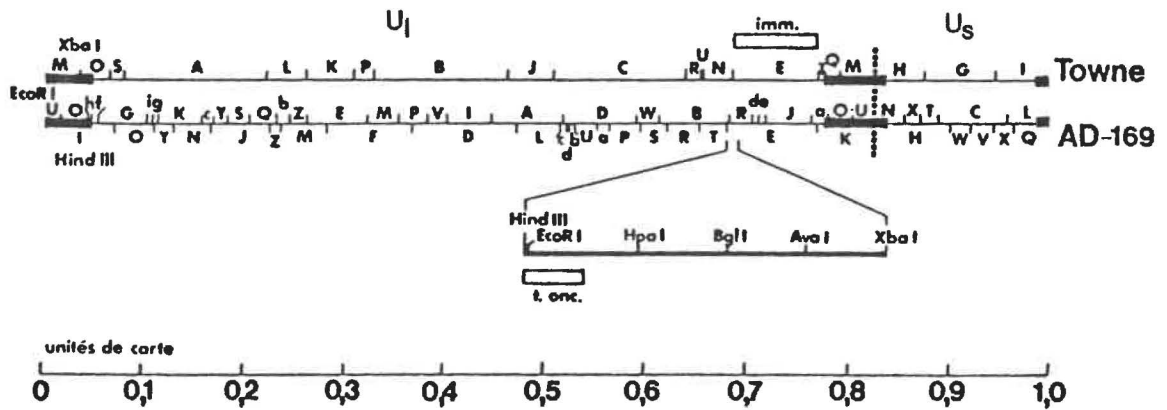


FIGURE 2: **Cartes de restriction d'une portion du génome
du cytomégalo virus humain souche AD-169.**
(Greenaway et al., 1982)

En hachuré est représentée la région du génome
HCMV commune aux fragments *BamH* I-P, *EcoR* I-B,
EcoR I-R, *Hind* III-E et *Hind* III-T.

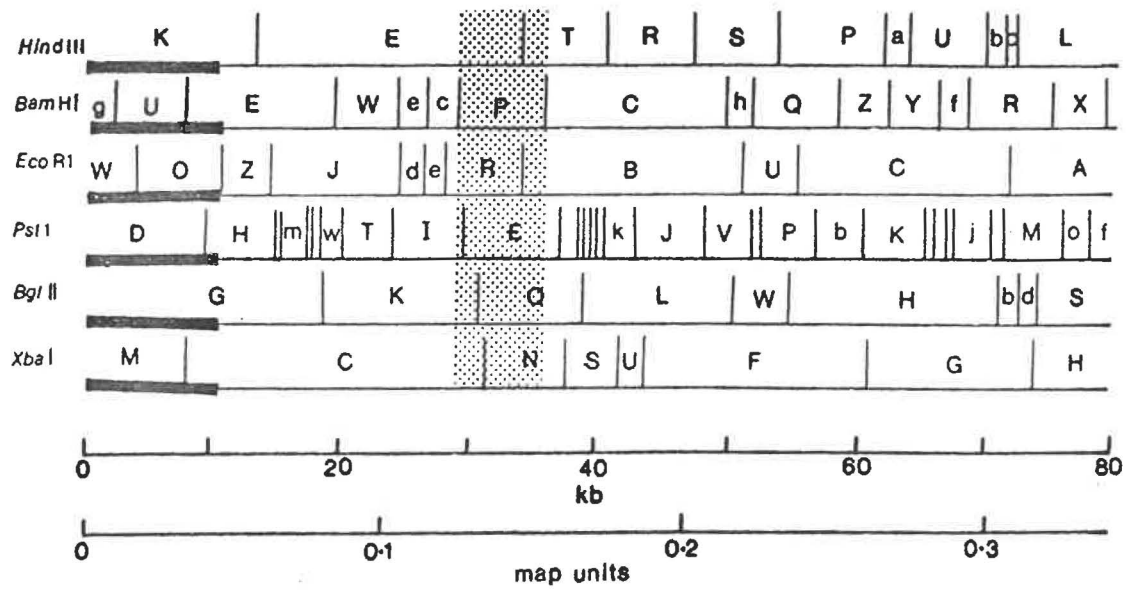


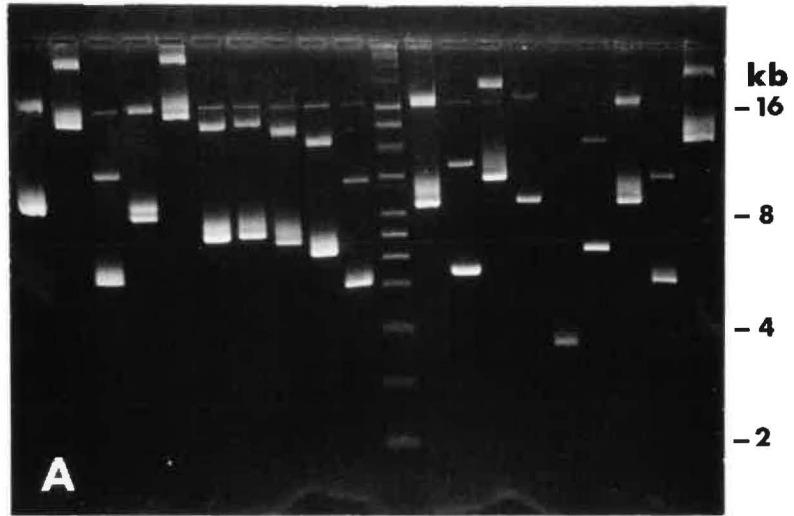
FIGURE 3: **Profils de restriction des plasmides pAT153
porteurs de fragments *EcoR* I du HCMV.**

a) Puits 1 à 19: Plasmides entiers
Puits M: Marqueur Supercoiled Ladder

b) Puits 1 à 19: Plasmides digérés par *EcoR* I
Puits M: Marqueur 1 Kilobase Ladder

EcoR I

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M 11 12 13 14 15 16 17 18 19



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M 11 12 13 14 15 16 17 18 19

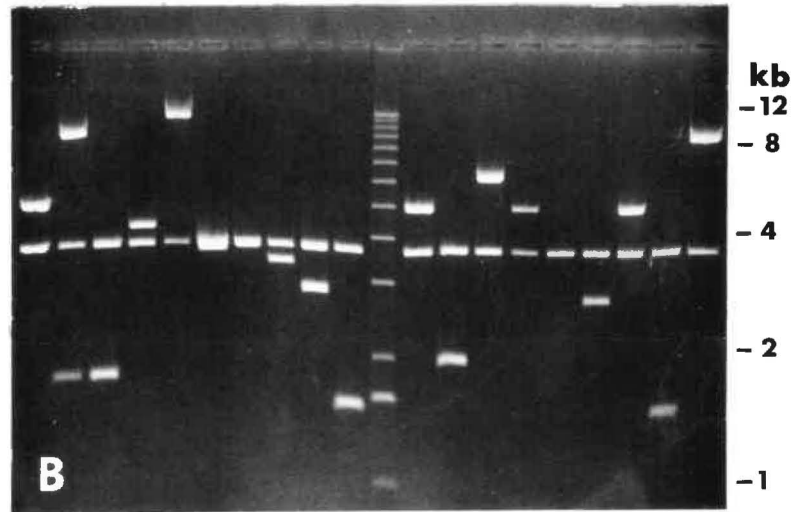


FIGURE 4:

**Profils de restriction des plasmides pAT153
porteurs de fragments *BamH I* du HCMV.**

- a) Puits 1 à 19: Plasmides entiers
Puits M: Marqueur Supercoiled Ladder
- b) Puits 1 à 19: Plasmides digérés par *BamH I*
Puits M: Marqueur 1 Kilobase Ladder

BamHI

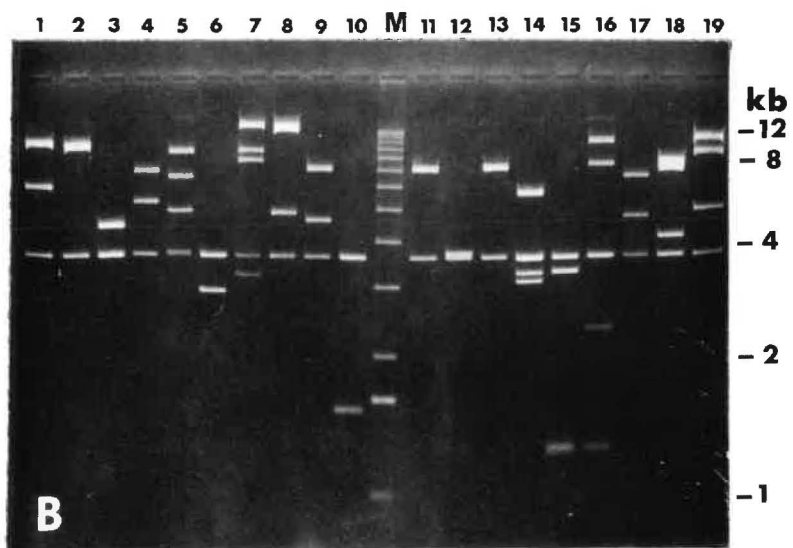
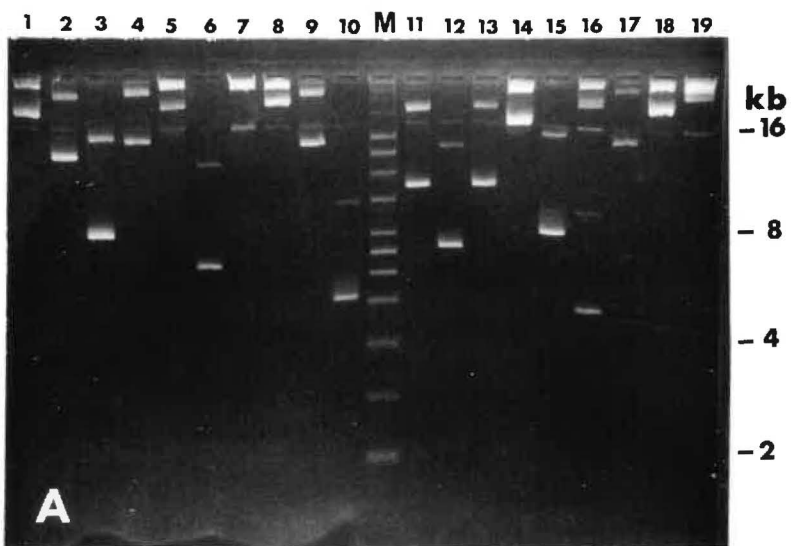


FIGURE 5:

Hybridation des plasmides pPCR porteurs de fragments *BamH* I du HCMV avec une sonde HCMV marquée à la biotine.

Dépôt F3: témoins positif- ADN HCMV

Dépôt F4: témoins négatif- ADN pAT153

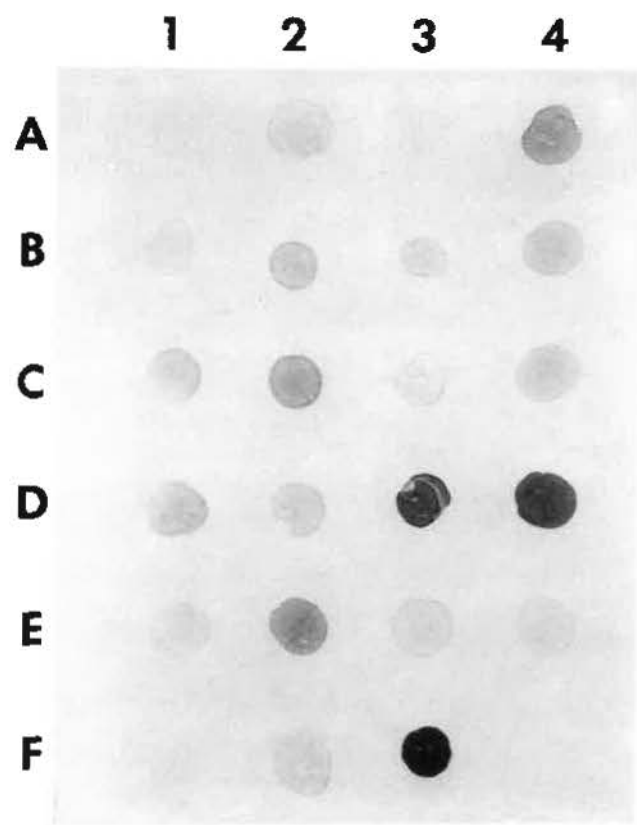


FIGURE 6: Extraction rapide de l'ADN d'un gel d'agarose par la technique DCDC.

- a) Migration des ADN à séparer.
ADN plasmidique pLCC1534 coupé par *Hind* III, après migration en gel d'agarose 0,8% préparatif.
Bande supérieure: fragment *Hind* III-E du HCMV.
Bande inférieure: plasmide pAT153 libéré.
- b) Séparation des bandes d'ADN.
Puits 1: ADN de pAT153 extrait du gel a)
Puits 2: ADN *Hind* III-E extrait du gel a)
Puits M: Marqueur 1 Kilobase Ladder
- c) Digestion enzymatique par *Pst* I.
Puits 1 à 3: 2, 5 et 10 μ l d'ADN de pAT153 avant passage sur colone de Sephadex G50.
Puits 4 à 6: 2, 5 et 10 μ l d'ADN de pAT153 après passage sur colone de Sephadex G50.
- d) Ligations avec l'ADN ligase T4.
Puits 1 à 3: 2, 5 et 10 μ l d'ADN pAT153 avant passage sur colone de Sephadex G50.
Puits 4 à 6: 2, 5 et 10 μ l d'ADN pAT153 après passage sur colone de Sephadex G50.

N.B. Les ADN sont dessalés par passage sur colone de Sephadex G50, ce qui augmente le rendement des réactions enzymatiques subséquentes.

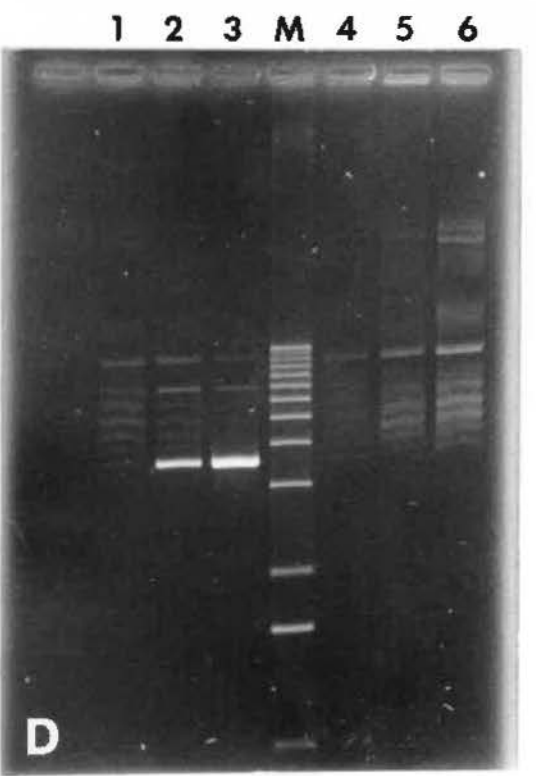
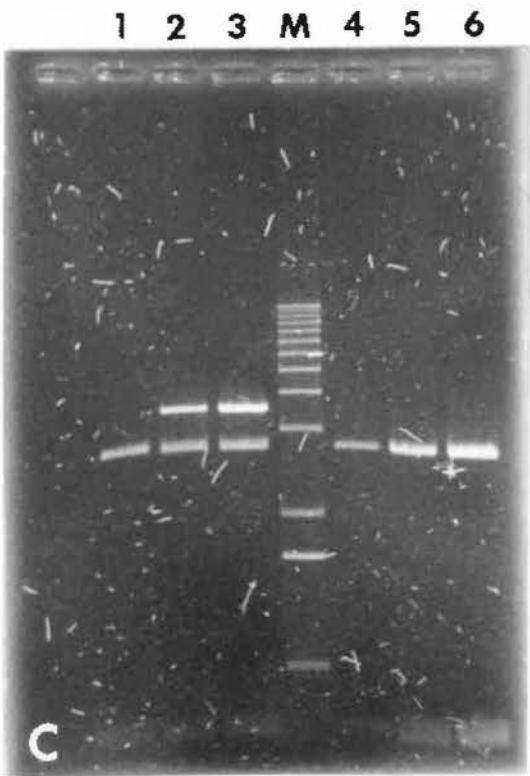
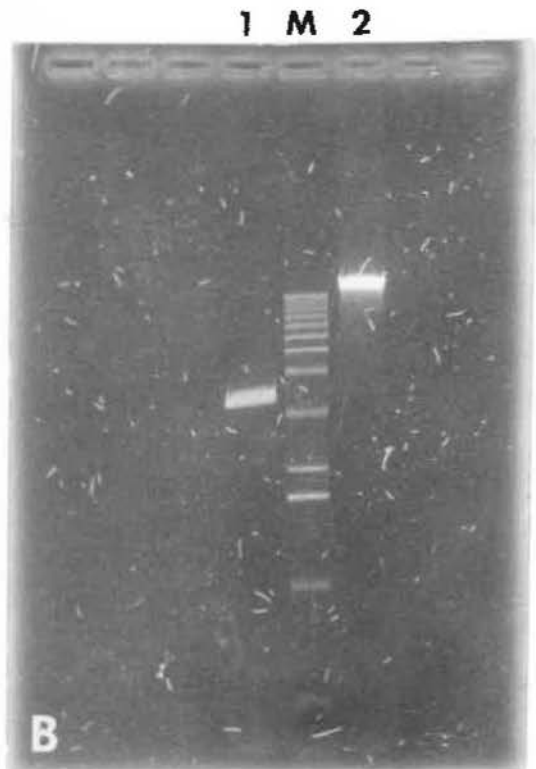
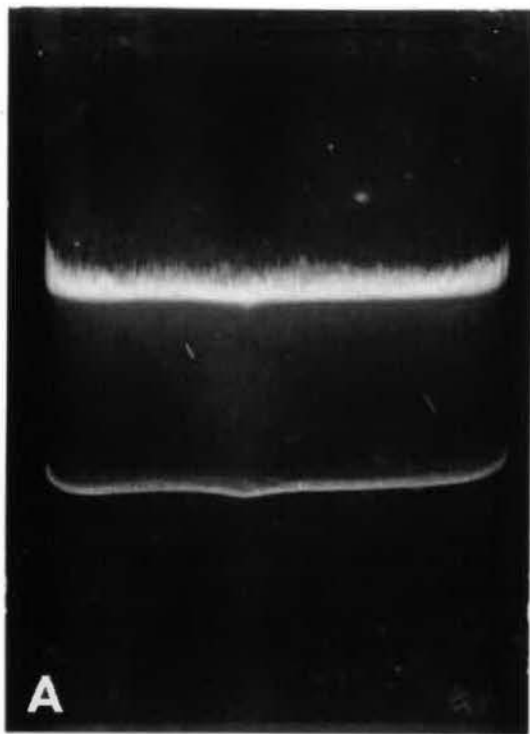
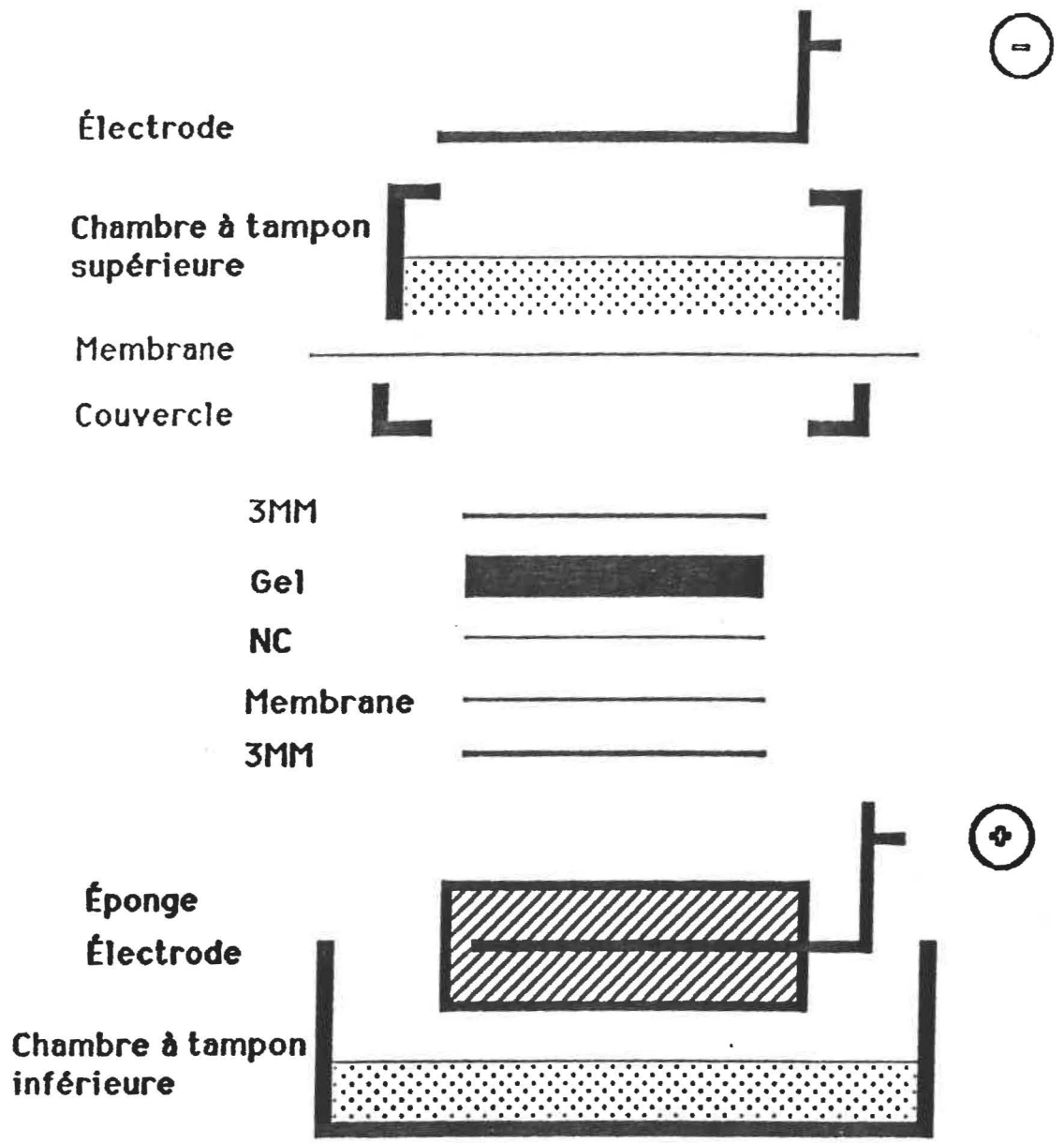


FIGURE 7: Montage de l'appareil à électrotransfert.



- FIGURE 8: **Hybridation de plasmides pLCR porteurs d'un fragment *BamH* I d'environ 7 kb du génome HCMV, avec le fragment *Hind* III-E cloné marqué à la biotine, suite à un électrotransfert.**
- a) ADN après migration en un gel d'agarose 1%
Puits 7: Témoin positif- pLCC1534
 (*Hind* III-E dans pAT153)
Puits 8: Marqueur 1 Kilobase Ladder
- b) ADN sur le filtre de nitrocellulose après électrotransfert de 30 minutes à 100 V
- c) Filtre après hybridation:
Tous les puits: Bande de pAT153 apparente
Puits 7: Témoins positifs
Puits 2: Plasmide pLCR127, porteur du fragment *BamH* I-P.

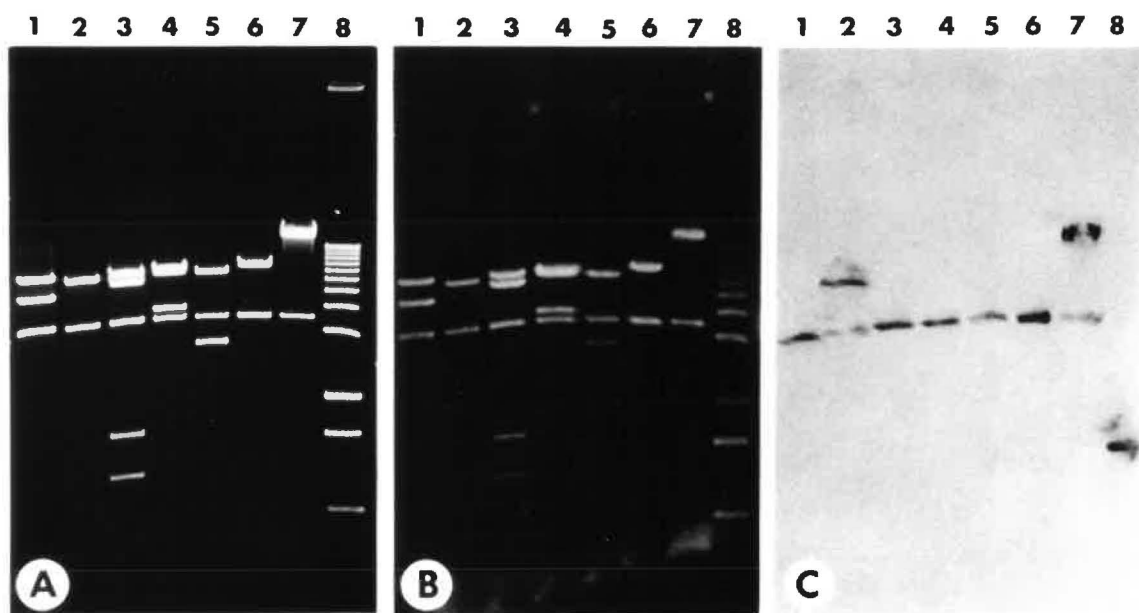


FIGURE 9: **Profils de restriction des plasmides pLCR avec
Taq I, après migration en gel SeaPrep 6%.**

Puits 1: Marqueur 123 pb
Puits 2: Marqueur 1 kb
Puits 3: pAT153 coupé par *Taq* I
Puits 4: pLCC1534 (*Hind* III-E) coupé par *Taq*I
Puits 5: *Hind* III-E coupé par *Taq* I
Puits 6: pLCR127 (*Bam*H I-P) coupé par *Taq* I
Puits 7: Marqueur 1 kb
Puits 8: Marqueur 123 pb

Les bandes marquées d'un point blanc appartiennent au fragment *Bam*H I-P et sont retrouvées également chez le fragment *Hind* III-E (puits 5), les autres bandes appartiennent au plasmide pAT153 (puits 3).

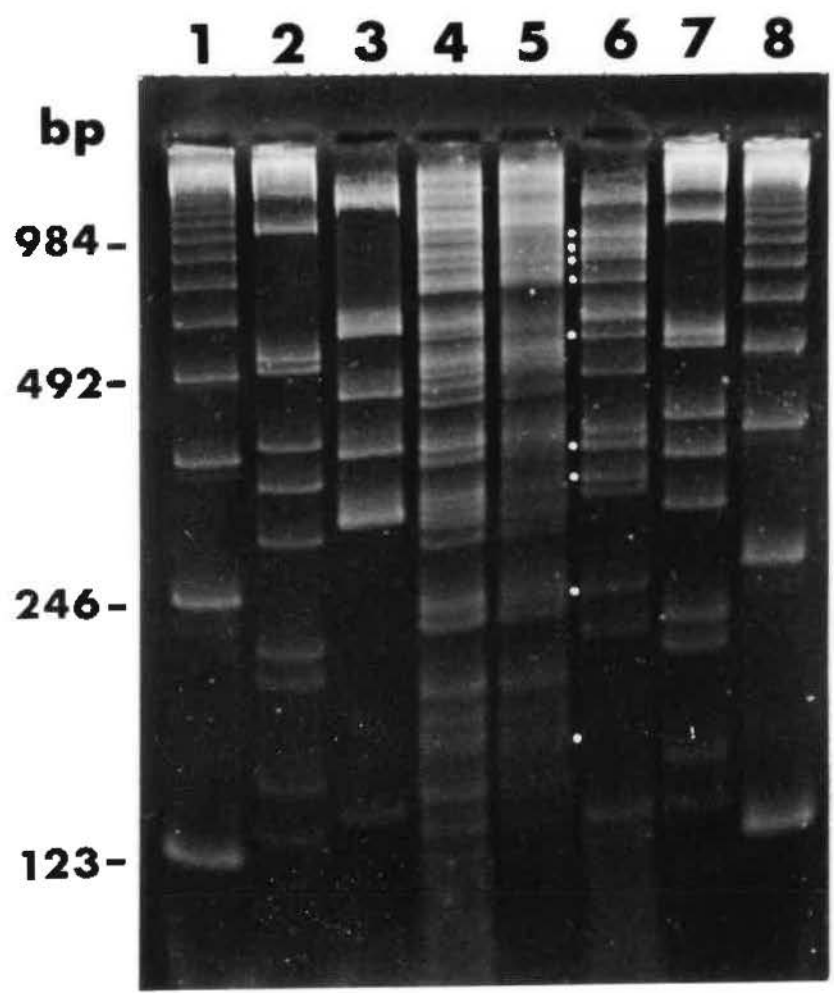


FIGURE 10: **Foyers de transformation cellulaire.**

- A) Cellules PEC de poumon d'embryon de chien
- B) Cellules PEC de poumon d'embryon de chien
immortalisées par pLCR127 (*BamH* I-P).

Grossissement: environ 30x.

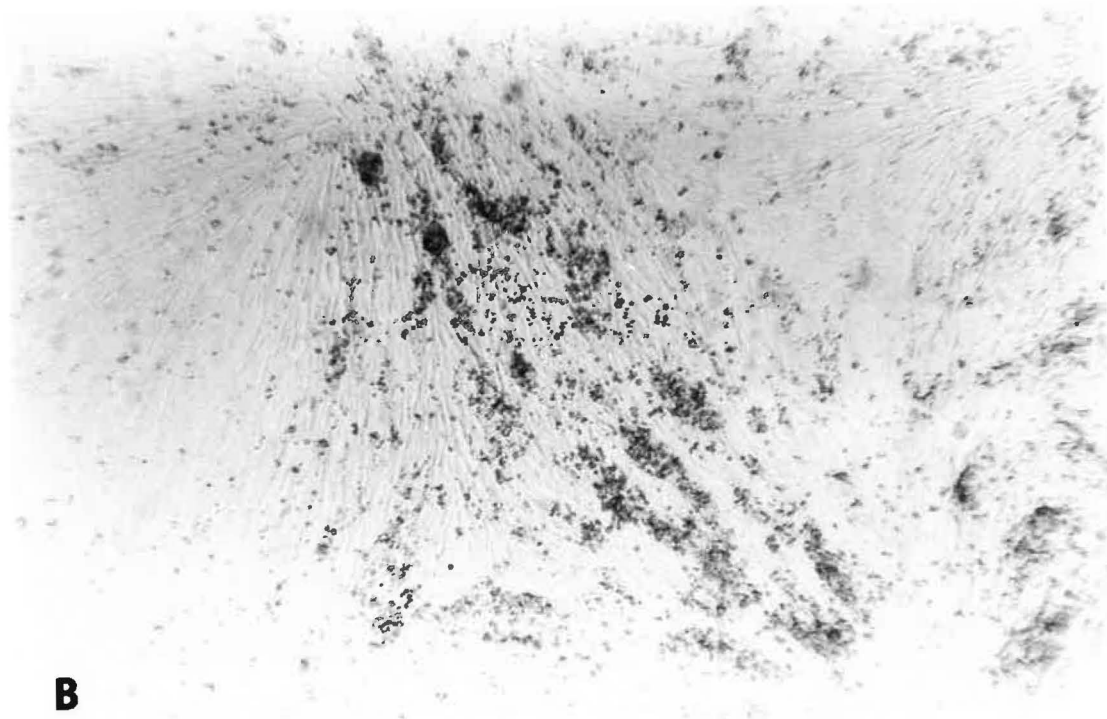


FIGURE 11: **Croissance en milieu semi-solide.**

- a) Cellules PEC de poumon d'embryon de chien
- b) Cellules PEC de poumon d'embryon de chien
immortalisées par pLCR127 (*BamH* I-P).

Grossissement: environ 35x.

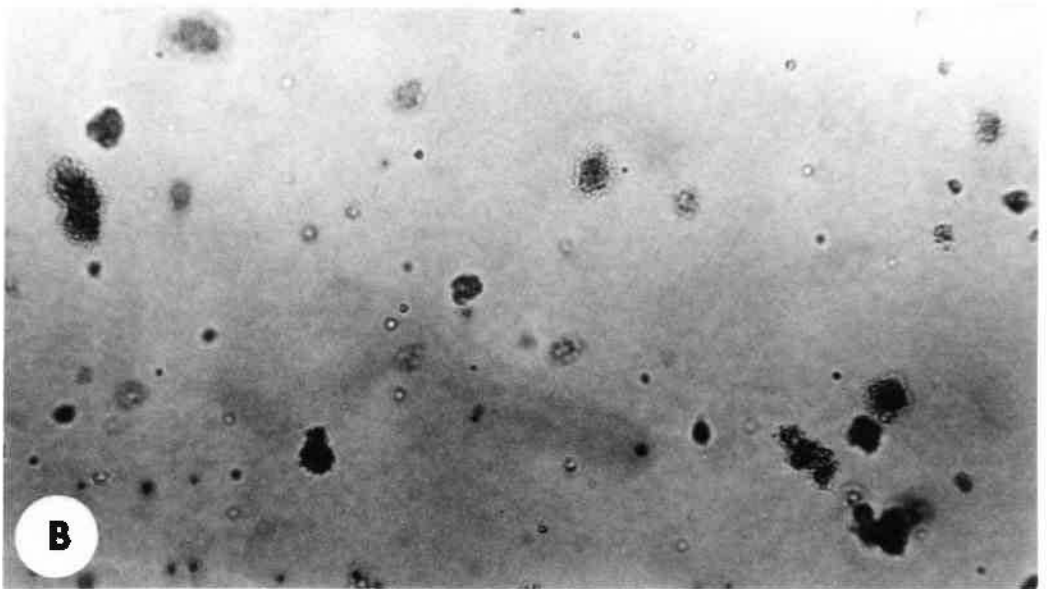
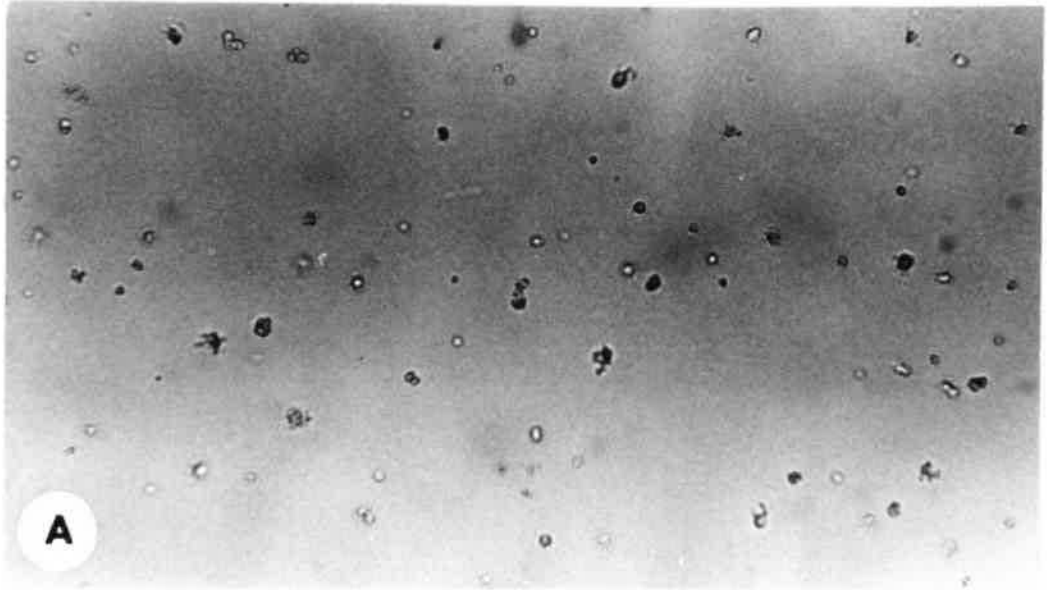


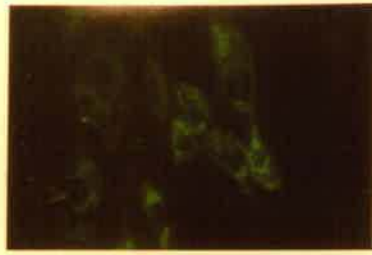
FIGURE 12: **Rétention de la rhodamine 123.**

- a) Cellules PEC-témoins: temps 7 heures
- b) Cellules PEC-témoins: temps 17 heures
- c) Cellules PEC-SV40: 7 heures
- d) Cellules PEC-SV40: 17 heures
- e) Cellules REC-HCMV/*Eco* R I: 7 heures
- f) Cellules REC-HCMV/*Eco* R I: 17 heures

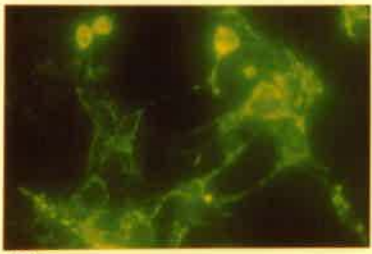
Grossissement: environ 60x.



A



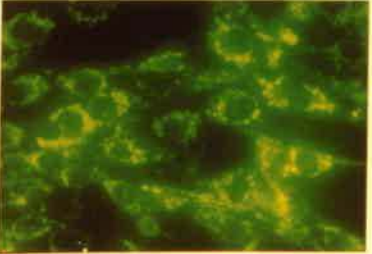
B



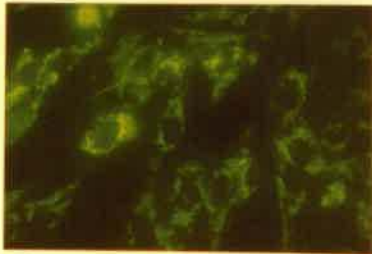
C



D



E



F

ANNEXE I: LISTE DES COMMUNICATIONS

1. PRAMATAROVA, A. et C. Hamelin. Identification de fragments *Bam*H I de l'ADN HCMV à l'aide de sondes marquées par photobiotinylation. 59^e Congrès de l'Association Canadienne Française pour l'Avancement des Sciences, Sherbrooke, Québec (21-24 mai 1991). Résumé page 42.

2. Hamelin, C., A. PRAMATAROVA, et J. Yelle. Instabilité d'un plasmide transportant le gène HCMV pour la transformation cellulaire. 41^e Congrès Annuel de la Société Canadienne des Microbiologistes, London, Ontario (2-6 juin 1991). Résumé V7p, page 87.

3. PRAMATAROVA, A. et C. Hamelin. Instabilité de la région transformante du génome HCMV. 42^e Congrès Annuel de la Société Canadienne des Microbiologistes, St John's, Terre-Neuve (14-18 juin 1992). Résumé GM1p, page 48.

ANNEXE II: PUBLICATIONS

