

Université du Québec

**Thèse
présentée à
l'Institut Armand-Frappier
comme exigence partielle
du doctorat en virologie**

par

**My Mustapha Ennaji
B.Sc., M.Sc.**

**Relations entre l'expression génétique
du virus du papillome humain type 16 (HPV16) et
la prolifération et la différenciation cellulaires**

Septembre 1993

DÉDICACE

À mon père Moulay M'Barek

À ma mère Zohra

Je dédie cette thèse, couronnement de mes études. Puisse-t-elle exprimer toute ma profonde gratitude pour vos vifs encouragements, votre aide précieuse et indispensable, et vos innombrables sacrifices. Puisse-t-elle dire ma fierté d'être votre fils, vivant à tout instant selon les valeurs authentiques que vous m'avez inculquées.

À mon épouse Loubaba, pour la patience, le courage, l'amour et son support dont elle a fait preuve tout au cours de ce doctorat.

À mon frère, My Kebir, qui est décédé d'une crise cardiaque au cours de ce travail, à l'âge de 35 ans; Je dédie cette thèse à toi et ton fils Amine avec l'espoir de contribuer, sans prétention, au soulagement des maladies affligeant l'homme contemporain.

À tous mes frères et soeurs, qui se sont toujours intéressés aux découvertes de la science, et à ma famille qui m'a sans cesse encouragé et supporté au cours de mes études, je dédie ce travail.

Les travaux de la présente thèse de doctorat font l'objet de publications et de communications scientifiques mentionnées ci-dessous. D'autres travaux issus des résultats de cette thèse sont en préparation ou sur le point d'être soumis pour publications.

PUBLICATIONS

Ennaji, M.M., M. Arella, L. Belbaraka et J. Phipps. 1994. RT-PCR analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) mRNA expression during *in vitro* myoblast differentiation. Nucl. Acids Symp. Ser. UK. 30: 11.

Ennaji, M.M., M. Arella, S. Garzon, L. Belbaraka, M.A. Alaoui et J. Phipps. 1994. Characterization of ultrastructural changes and chromosomal aberrations in human papillomavirus type 16 transfected rat myoblasts. Nucl. Acids Symp. Ser. UK. 30: 52.

Ennaji, M.M., M. Arella, H. Jouishomme, L. Belbaraka et J. Phipps. 1993. Membrane associated protein kinase C (PKC) activity in rat myoblasts (L₆ cell) transfected with the human papillomavirus type 16 (HPV16). Prot. Engin. USA 6: 77.

Ennaji, M.M., M. Arella, H. Jouishomme, L. Belbaraka et J. Phipps. 1993. Protein expression of human papillomavirus type 16 E4 open reading frame (ORF) from *E. coli*. Prot. Engin. USA 6: 63.

Ennaji, M.M., J.L. Schwartz, M. Arella, H. Jouishomme, A. Merzouki et J. Phipps. 1992. Intracellular calcium responses to 1% DMSO in normal and human papillomavirus type 16 (HPV16) transfected rat myoblast (L₆ cells) using imaging analysis. The Histochem. J. UK 24(8): 496.

Ennaji, M.M., M. Arella, H. Jouishomme, A. Merzouki, et J. Phipps. 1992. Correlation between endogenous membrane PKC activity and proliferation versus differentiation of normal and HPV16 transformed rat myoblast (L₆ cells). The Histochem. J. UK 24(8): 614.

Ennaji, M.M., J. Phipps, B. Chakvarthy, R. MacRae, S. Scott, J. Whitfield, et J. Durkin. 1992. Putative role of PKC in proliferation versus differentiation. Recent Adv. Cell. Mol. Biol. Belgium 6: 237-243.

Ennaji, M.M., M. Arella, J. Phipps, R. MacRae, A. Merzouki, et J. Campione. 1992. The relationship between cell differentiation and humain papillomavirus type 16 (HPV16) gene expression. *Recent Adv. Cell. Mol. Biol. Belgium* 2: 193-201.

Ennaji, M.M., J. Phipps, R. MacRae, A. Merzouki, J. Campione et M. Arella. 1992. High efficiency strategy for amplification, cloning and expression of different HPV16 open reading frames (ORFs). *Recent Adv. Cell. Mol. Biol. Belgium* 2: 53-65.

COMMUNICATIONS

Ennaji, M.M., M. Arella, M. Parentaux, L. Belbaraka et J. Phipps. (sponsor: Ed Preston). 1994. Communications intracellulaires et différenciation des myoblastes contenant le génome complet du HPV16. 37^{ième} Congrès Annuel de la Fédération Canadienne des Sociétés de Biologie. Montréal, Québec, Canada. 16-18 juin.

Ennaji, M.M., M. Arella, L. Belbaraka et J. Phipps. 1994. RT-PCR analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) mRNA expression during *in vitro* myoblast differentiation. *Advances in Gene Technology: Molecular Biology and Human Disease*. Miami Bio/Technology Symposia Proceeding. Fort Lauderdale, Florida, USA, February 5-10.

Ennaji, M.M., M. Arella, S. Garzon, L. Belbaraka, M.A. Alaoui et J. Phipps. Characterization of ultrastructural changes and chromosomal aberrations in human papillomavirus type 16 rat myoblast. 1994. *Advances in Gene Technology: Molecular Biology and Human Disease*. Miami Bio/Technology Symposia Proceeding. Fort Lauderdale, Florida, USA, February 5-10.

Ennaji, M.M., M. Arella, G. Mealing, P. Morley, M. Parentaux, H. Jouishomme, L. Belbaraka, M.A. Jamali, G. Batist, M. Phipps et J. Phipps. 1994. Altered cell-cell communication in rat myoblasts transfected with the human papillomavirus type 16 (HPV16). 85th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. *In Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 35: 616. San Francisco, California, USA, April 10-13.

Centurioni, M.G., M.A. Alaoui, M. Ennaji, J. Phipps, G. Nicola, G. Reggiardo, I. Ferrani et N. Ragni. 1994. Study of prevalence of genital human papillomavirus (HPV) infection in asymptomatic women. 85th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. *In Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 35: 289. San Francisco, California, USA, April 10-13.

Centurioni, M.G., N. Ragni, G.E. Serra, J. Phipps, M. Arella, L. Belbaraka, M.A. Alaoui et M.M. Ennaji. 1994. Human papillomavirus type 16 (HPV16) E6 expression and splicing as a prognostic factor of cervical cancer. 85th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. *In Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 35: 223. San Francisco, California, USA, April 10-13.

McRae, R., L. Belbaraka, P. Morley, M. Ennaji, J. Whitfield et J. Phipps (sponsor: Ed Preston). 1994. Differentiation potential of embryonic stem cell line D3 for neuronal phenotypes. 37th Annual Meeting. Canadian Federation of Biological Societies. Montreal, Quebec, Canada. June 16-18.

Ennaji, M.M., M. Arella, L. Belbaraka, M. Parenteaux, P. Morley, G. Mealing, G. Centurioni, H. Jouishomme et J. Phipps. 1993. Inhibition of myoblasts differentiation by human papillomavirus type 16 (HPV16). Abstracts Book VIIIth International Conference on Aids in Africa and VIIIth African Conference on Sexually Transmitted Disease. Marrakech, Morocco. December 12-16.

Ennaji, M.M., M. Arella, G. Batist, M.A. Alaoui-Jamali, L. Belbaraka, et J. Phipps. 1993. Effect of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA on rat myoblast differentiation. 84th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. *In Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **34**: 544. Orlando, Florida, USA, May 19-22.

Ennaji, M.M., M. Arella, H. Jouishomme, L. Belbaraka, et J. Phipps. 1993. Membrane associated protein kinase C (PKC) activity in rat myoblasts (L₆ cells) transfected with human papillomavirus type 16 (HPV 16). Miami Bio/Technology Symposia Proceedings. Miami, USA, January 17-23.

Ennaji, M.M., M. Arella, H. Jouishomme, L. Belbaraka et J. Phipps. 1993. Protein expression of human papillomavirus type 16 E4 open reading frame (ORF) from E. coli. Miami Bio/Technology Symposia Proceedings. Miami, USA, January 17-23.

Ennaji, M.M., M. Arella, H. Jouishomme, L. Belbaraka et J. Phipps (spon: E. Preston). 1993. Oncoprotéine E7 du papillomavirus type 16: clonage après amplification par la réaction de polymérisation en chaînes (PCR). 36^{ième} Congrès Annuel de la Fédération Canadienne des Sociétés de Biologie (FCSB). Windsor, Ontario. Canada. 17-19 juin.

Centurioni, M.G., J. Phipps, M. Arella, L. Belbaraka, M.A. Alaoui-Jamali et M. Ennaji. 1993. Efficient and simple molecular and immunological assay for screening and diagnosis of human papillomavirus infection in cells and cervical biopsies. 84th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. *In Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **34**: 492. Orlando, Florida, USA, May 19-22.

Ennaji, M.M., M. Arella, H. Jouishomme, A. Merzouki et J. Phipps. 1992. Correlation between endogenous membrane PKC activity and proliferation versus differentiation of normal and HPV16 transfected rat myoblasts (L₆ cells). Cell growth and differentiation symposia. The 9th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. Maastricht, The Netherlands, August 30-September 5.

Ennaji, M.M., J.-L. Schwartz, M. Arella, H. Jouishomme, A. Merzouki et J. Phipps. 1992. Intracellular calcium responses to 1% DMSO in normal and human papillomavirus type 16 (HPV16) transfected rat myoblast (L6 cells) using imaging analysis. Image and flow cytometry symposium. 9th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. Maastricht, The Netherlands, August 30 - September 5.

Ennaji, M.M., M. Arella, H. Jouishomme, A. Merzouki et J. Phipps. 1992. Correlation between endogenous membrane PKC activity and proliferation versus differentiation of normal and HPV16 transfected rat myoblast (L6 cells). Cell growth and differentiation symposium. 9th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. Maastricht, The Netherlands, August 30 - September 5.

Ennaji, M.M., M. Arella, A. Merzouki, et J. Phipps. 1992. A potential role of protein kinase C (PKC) in the proliferation/differentiation of cells transfected by the type 16 papillomavirus. Virology Symposia. The 42th Annual Canadian Society of Microbiology Meeting. St. Johns, Newfoundland, Canada, June 14-18.

Ennaji, M.M., J. Phipps, B. Chakravarthy, R. MacRae, S. Scott, J. Whitfield, et J. Durkin. 1991. Putative role of PKC in proliferation versus differentiation. Physiological and tumoral cell markers symposium. 1st World Congress of cellular and molecular biology. Paris, France, September 1-7.

Ennaji, M.M., M. Arella, J. Phipps, R. MacRae, A. Merzouki, et J. Campione. 1991. The relationship between cell differentiation and human papillomavirus type 16 (HPV16) gene expression. Genes: Structure, function and expression symposium. 1st World Congress of cellular and molecular biology. Paris, France, September 1-7.

Ennaji, M.M., J. Phipps, J. Campione, et M. Arella. 1991. High efficiency strategy for amplification, cloning and expression of different HPV16 open reading frames (ORFs) using polymerase chain reaction (PCR). Molecular Biology symposium. 1st World Congress of cellular and molecular biology. Paris, France, September 1-7.

Ennaji, M.M., J. Phipps, A. Merzouki, J. Campione, R. MacRae et M. Arella. 1991. Amplification par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de différents cadres de lecture ouverts (ORFs) du papillomavirus humain type 16 (HPV16): clonage et expression dans les vecteurs procaryotiques. 8^{ième} Congrès scientifique de l'association des microbiologistes du Québec. Sherbrooke, Québec, 21-22 Septembre.

Ennaji, M.M., M. Arella et J. Campione. 1989. Établissement de paramètres d'électroporation et de souches cellulaires contenant le génome complet de papillomavirus. Recueil des résumés de communications. Congrès de la société canadienne de microbiologie. Laval, Québec, 18-22 Juin.

TABLE DES MATIÈRES

	PAGE
DÉDICACE	II
LISTE DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	III
LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	V
TABLE DE MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	XVIII
LISTE DES FIGURES	XIX
LISTE DES ANNEXES	XXVIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XXIX
SOMMAIRE	XXXIII
INTRODUCTION	37
HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	40
OBJECTIFS DE RECHERCHE	42
REVUE BIBLIOGRAPHIE	44
INTRODUCTION	45
1. GÉNÉRALITÉS	45
1.1 Les virus du papillome et leur importance médicale	45
1.2 Historique	46
1.3 Classification	49
1.4 Propriétés du virus du papillome	52
1.4.1 Structure de la capside	52
1.4.2 Les protéines structurales de la capside	54
1.4.3 Acide nucléique	56
1.4.3.1 Organisation du génome du virus du papillome	56
1.4.3.2 Fonction des régions codantes	58
1.4.3.2.1 Région précoce	58
a) Fonction du cadre de lecture ouvert E1	59
b) Fonction du cadre de lecture ouvert E2	59
c) Fonction du cadre de lecture ouvert E3 et E8	60
d) Fonction du cadre de lecture ouvert E4	61
e) Fonction du cadre de lecture ouvert E5	61
f) Fonction du cadre de lecture ouvert E6	61
g) Fonction du cadre de lecture ouvert E7	62
1.4.3.2.2 Région tardive	62
a) Fonction du cadre de lecture ouvert L1	62
b) Fonction du cadre de lecture ouvert L2	63
1.4.3.3 Fonction de la région non codante	63
2. PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES PAPILOMAVIRUS ET IMPORTANCE DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE	64

	PAGE
2.1 Interaction virus du papillome - cellule hôte	64
2.1.1 Structure et différenciation des épithélium stratifiés	64
2.1.1.1 La peau	64
2.1.1.2 Les muqueuses	66
2.2 La dépendance de la réplication du virus sur la différenciation cellulaire	66
2.3 Cycle de développement du virus de papillome et différenciation cellulaire	67
2.4 Expression du virus du papillome et différenciation cellulaire	69
3. LES VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN (HPV)	70
3.1 Étude et caractérisation des virus de papillome humaine (HPV)	70
3.2 Aspects pathologiques des virus de papillome humain (HPV)	72
3.2.1 Virus de papillome humain (HPV) et cancers génitaux	72
3.2.1.1 Epidémiologie	72
3.2.2 Virus du papillome humain type 16 (HPV16), son importance et son implication dans la transformation cellulaire	78
3.2.2.1 Transformation <i>in vivo</i>	78
3.2.2.1.1 Présence de génome du virus du papillome humain (HPV16) dans les cancers génitaux	80
3.2.2.1.2 Expression du virus du papillome humain (HPV16) dans les cancers génitaux	82
a) Régulation de la transcription des gènes E6 et E7 du HPV16 associés à la transformation	82
b) Produit de la transcription de gène E6 et E7	84
3.2.2.2 Transformation cellulaire <i>in vitro</i>	86
3.3 Biologie moléculaire: outil de prévention systématique dans les cancers génitaux associés au virus de papillome humain (HPV)	88
4. GÉNÉRALITÉS SUR LA PROLIFÉRATION ET LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE	89
4.1 Concept de la différenciation cellulaire	89
4.1.1 Marqueurs de différenciation cellulaire universels	90
4.1.2 Marqueurs de différenciation cellulaire spécifiques	91
4.2 Corrélations entre la croissance et la différenciation cellulaire	93
4.3 Modèles cellulaires d'étude de la prolifération et de la différenciation	93
4.3.1 Les myoblastes	93
4.3.2 Différenciation des myoblastes	93

	PAGE
4.4 Interaction virus et prolifération/différenciation cellulaire	94
5. MÉTHODES D'ÉTUDES DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE	96
5.1 Méthodes d'études usuelles	96
5.2 Mécanismes impliqués dans la différenciation cellulaire	96
5.2.1 Protéine kinase C	99
5.2.2 Étude du calcium intracellulaire	99
5.2.3 Communication inter-cellulaire	101
MATERIEL ET METHODES	103
PARTIE A: Établissement de lignées cellulaires contenant le génome complet du HPV16	104
1. CULTURE CELLULAIRE	104
1.1 Conditions générales de culture	104
1.2 Serum	105
1.3 Description des lignées cellulaires	106
1.3.1 Cellules murines L6	106
1.3.2 Cellules murines kératinocytes	106
1.4 Inducteurs potentiels de différenciation des systèmes cellulaires utilisés	107
2. VIRUS DU PAPILOME HUMAIN TYPE 16 (HPV16)	107
2.1 Digestion des molécules d'ADN du virus du papillome humain type 16 (HPV16) par des endonucléases de restriction	107
2.2 Électrophorèse de l'ADN du virus du papillome humain type 16 (HPV16) sur gel d'agarose	107
2.3 Récupération de l'ADN viral du HPV16 par électro-élution	109
3. TRANSFECTION DES CELLULES	109
3.1 Précipitation de l'ADN du virus du papillome humain type 16 (HPV16) en présence de chlorure de calcium (CaCl ₂)	109
3.2 Électroporation	109

	PAGE
PARTIE B: Étude de l'expression génétique du HPV16 et la prolifération et différenciation cellulaire	111
4. CARACTÉRISATION DES CELLULES TRANSFECTÉES PAR L'ADN DU VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN TYPE 16 (HPV16)	111
4.1 Morphologie des cellules	111
4.2 Évaluation de la densité de saturation	111
4.2.1 Croissance des cellules en milieu semi-solide	112
4.3 Immunofluorescence	112
4.3.1 Techniques d'immunofluorescence	112
4.3.2 Immunofluorescence sur des cellules fixées	113
4.3.3 Immunofluorescence sur des cellules non fixées	114
4.4 Cytométrie de flux	114
4.4.1 Technique de cytométrie de flux	114
4.4.2 Détection des antigènes de surface	115
4.4.3 Détection des antigènes intracytoplasmiques	116
4.5 Étude ultra-structurale de l'effet du virus du papillome humain type 16 (HPV16) en immuno-électromicroscopie (IEM)	117
5. PHOTOGRAPHIE	118
6. EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES	119
6.1 Extraction d'ADN	119
6.1.1 Extraction des ADN cellulaires	119
6.1.2 Extraction des ADN plasmidiques recombinants	120
6.1.2.1 Extraction des plasmides recombinants à petite échelle	120
6.1.2.2 Extraction semi-préparative des plasmides recombinants	121
6.2 Extraction des ARN	122
6.2.1 Extraction des ARN totaux	122
6.2.1.1 Méthode au guanidinium isothiocyanate	123
6.2.1.2 Méthode à la protéinase K et au phénol	124
7. ÉLECTROPHORÈSE	125
7.1 Électrophorèse des ADN	125
7.2 Électrophorèse des ARN	126
7.3 Électrophorèse des protéines	127
8. RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE ("PCR")	128

	PAGE
8.1 PCR à partir d'une matrice à ADN: Préparation de sondes moléculaires spécifiques au virus du papillome humain type 16 (HPV16)	128
8.1.1 Amorces utilisées pour amplification des ORFS du HPV16	128
8.1.2 Conditions de réaction du PCR à partir d'ADN comme matrice	128
8.2 PCR à partir d'une matrice ARN: Analyse des produits de transcription du virus du papillome humain type 16 (HPV16)	129
8.2.1 Amplification par PCR à partir d'une matrice ARN: "RT-PCR"	129
9. CLONAGE DES ORFS DU HPV16: PRÉPARATION DE SONDES MOLÉCULAIRES SPECIFIQUES DU VIRUS DU PAPILOME HUMAIN TYPE 16 (HPV16)	131
9.1 Clivage de l'ADN plasmidique par endonucléases de restriction	131
9.2 Isolement et purification de fragments d'ADN séparés par électrophorèse en gel d'agarose	132
9.3 Clonage des fragments d'ADN du HPV16	132
9.4 Préparation de cellules bactériennes compétentes	133
9.5 Transformation bactérienne	133
9.6 Sélection de clones recombinants	134
10. TRANSFERT DES ACIDES NUCLÉIQUES ET DES PRODUITS D'EXPRESSION SUR SUPPORT SOLIDE	135
10.1 Transfert des colonies sur filtre	135
10.2 Technique du dépôt direct d'ADN: "Dot blot"	135
10.3 Transfert d'ADN de type "Southern"	136
10.4 Transfert d'ARN de type "Northern"	136
10.5 Transfert de protéines de type "Western"	137
10.6 Immunodétection indirecte	137
11. MARQUAGE DES SONDES	138
11.1 Coupure-substitution	139
11.2 Amorces aléatoires	139
11.3 Mesure de l'activité spécifique après marquage de sondes moléculaires	139
12. HYBRIDATION MOLÉCULAIRE	140

	PAGE
12.1 Hybridation non différentielle	140
12.2 Hybridation différentielle	141
12.3 Autoradiographie	141
13. ÉTUDE DES MÉCANISMES CELLULAIRES	142
13.1 Études fluorographiques: Elucidation du rôle de l'ion calcium (Ca^{2+}) dans la signalisation cellulaire	142
13.1.1 Dosage du calcium intracellulaire (Ca^{2+}) par microspectrofluorométrie	142
13.1.1.1 Principe de la microspectrofluorométrie	142
13.1.1.2 Mode de changement de cellules en Fura-2	143
13.1.1.3 Mesure de concentration du calcium intracellulaire (Ca^{2+})	143
13.1.1.4 Modulation du taux de calcium intracellulaire	145
13.1.1.5 Étude de la dépolarisation de la membrane cellulaire par microspectrofluorométrie	145
13.1.2 Technique d'imagerie	145
13.1.2.1 Principe d'imagerie	145
13.1.2.2 Evaluation de la concentration du Ca^{2+} en imagerie	146
13.1.2.3 Modulation du taux de calcium intracellulaire libéré	147
13.1.2.4 Étude de la dépolarisation de la membrane cellulaire en imagerie	147
13.2 Essais enzymatiques de l'activité de la protéine kinase C (PKC): Étude de la modulation de la transduction du signal	148
13.2.1 Mode de préparation des cellules pour les essais enzymatiques de la PKC	149
13.2.2 Mode de préparation des membranes cellulaires	149
13.2.3 Inhibiteurs de la PKC	150
13.2.4 Mesure de l'activité PKC	150
PARTIE C: Communications inter-cellulaires	152
14. MÉTHODES D'ANALYSE DES COMMUNICATIONS INTERCELLULAIRES	152
14.1 Cytométrie de flux	152
14.2 Microscopie électronique	152
14.3 Technique de "Jaune Lucifer" "scrape loading"	152

	PAGE
RESULTATS	154
PARTIE A: Etablissement de lignées cellulaires contenant le génome complet du virus du papillome humain type 16 (HPV16)	155
1. MODÈLE CELLULAIRE	155
2. BANQUE DE GÉNOME COMPLET DU VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN TYPE 16 (HPV16) ET MARQUEURS DE SÉLECTION pSVtkneoβ	159
3. DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE DE TRANSFECTION DES CELLULES	159
3.1 Détermination de la sensibilité des cellules à la Généticine (G418)	160
3.2 Technique de précipitation au chlorure de calcium (CaCl ₂)	160
3.3 Technique d'électroporation: optimisation des conditions des paramètres d'électroporation	161
PARTIE B: Etude de l'expression génétique du virus du papillome humain type 16 (HPV16) et la prolifération et la différenciation cellulaire	163
4. CARACTÉRISATION DES LIGNÉES CLONALES	163
4.1 Production de sondes moléculaires spécifiques	163
4.2 Caractérisation de cellules L6 transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16)	163
5. ÉTUDE STRUCTURALE DES CELLULES NORMALES ET TRANSFECTÉES PAR LE VIRUS PAPILLOME HUMAIN TYPE 16 (HPV16)	165
5.1 Morphologie	165
5.2 Cytopáthie des cellules transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16)	172
5.3 Analyse ultrastructurale des cellules L6 normales et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16)	172
5.4 Réarrangements chromosomiques associés au virus du papillome humain type 16 (HPV16)	174
6. ÉVALUATION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE	179

	PAGE
6.1 Croissance des populations	179
6.2 Effet des inducteurs de différenciation sur la prolifération cellulaire	184
7. ANALYSE DES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE	187
7.1 Observation en microscopie optique	187
7.2 Cinétique de la différenciation estimée par la cytométrie de flux	189
7.2.1 Morphologie	196
7.2.2 Expression de marqueurs de différenciation	196
7.2.2.1 Actine	198
7.2.2.2 N-CAM	198
7.2.2.3 Fibronectine	199
7.2.2.4 Vimentine	200
7.2.2.5 α foeto-protéine	201
7.2.2.6 Cytokératines	201
8. EXPRESSION GÉNÉTIQUE DU VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN TYPE 16 (HPV16) ET DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE	203
8.1 Analyse de la transcription du virus du papillome humain type 16 (HPV16)	203
8.2 Analyse de la traduction du virus du papillome humain type 16 (HPV16)	206
8.2.1 Analyse en cytométrie de flux	206
8.2.2 Immunobuvardage	209
8.2.3 Traduction des gènes E6 et E7 du HPV16 dans le modèle kératinocytes	209
9. ÉTUDE DES MÉCANISMES CELLULAIRES	211
9.1 Protéine kinase C (PKC) des myoblastes	211
9.1.1 Étude de l'évolution de l'activité protéine kinase C (PKC) en fonction de l'âge des cellules	212
a) Spécificité de l'activité phosphorylase mesurée	212
b) Activité basale	213
c) Activité de la protéine kinase C (PKC) membranaire	213
d) Activité de la protéine kinase C (PKC) cytoplasmique	217
9.1.2 Effet des modulateurs de la différenciation cellulaire par l'activité de la protéine kinase C (PKC) des myoblastes	222
a) Calcium	225

	PAGE
b) DMSO	227
c) Acide rétinoïque	227
d) Sérum de cheval	227
9.1.3 Effet des modulateurs de la différenciation cellulaire sur la protéine kinase C (PKC) des kératinocytes Balbc/MK	228
10. ÉTUDE DU CALCIUM PAR MICROSPECTROFLUOROMÉTRIE	230
10.1 Mesure du niveau de calcium intracellulaire	231
10.2 Origine du calcium intracellulaire	231
10.3 Effet des modulateurs de la différenciation cellulaire sur la réponse calcique	238
11. ANALYSE EN IMAGERIE	242
11.1 Mesure du niveau de calcium intracellulaire	242
11.2 Origine du calcium intracellulaire	246
11.3 Effet des modulateurs de la différenciation cellulaire sur la réponse calcique	246
a) Calcium	246
b) DMSO 1%	250
c) Acide rétinoïque	256
11.4 Réponse des kératinocytes aux modulateurs de différenciation	257
PARTIE C: Communications intercellulaires	259
12. COMMUNICATIONS INTERCELLULAIRES	259
12.1 Étude des communications intercellulaires <i>in situ</i>	259
12.2 Cytométrie de flux	259
12.3 Technique du chargement par grattage: "scrape loading"	261
DISCUSSION	262
PARTIE A: Établissement de lignées cellulaires contenant le génomme complet du HPV16	263
PARTIE B: Expression génétique du HPV16 et prolifération et différenciation cellulaire	265

1. EXPRESSION DU HPV16	265
1.1 Analyse de la transcription	265
1.2 Analyse de la traduction	270
2. PROLIFÉRATION CELLULAIRE	271
3. DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE	272
3.1 Les marqueurs de différenciation cellulaire	272
a) Actine	273
b) Fibronectine	274
c) Vimentine	276
d) N-CAM	276
e) Les cytokératines	278
3.2 Immortalisation et transformation	280
4. ASPECT MECANISTIQUE	281
4.1 Protéine kinase C (PKC)	281
4.2 Identité de l'enzyme	284
4.3 Effet des modulateurs de différenciation	284
4.4 Calcium intracellulaire	287
PARTIE C: Communications intercellulaires	292
CONCLUSIONS	295
REMERCIEMENTS	302
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	305
ANNEXES	347

LISTE DES TABLEAUX

	PAGE
TABLEAU 1	Manifestations pathologiques des principaux papillomavirus humains (HPV) 51
TABLEAU 2	Transformation <i>in vitro</i> des cellules animales et humaines par le virus du papillome humain type 16 (HPV 16) 87
TABLEAU 3	Amorces utilisées pour l'amplification des cadre de lecture ouvert (ORFs) du virus du papillome humain type 16 (HPV16) 129
TABLEAU 4	Liste et effets des inhibiteurs de la protéine kinase C (PKC) utilisés sur des cellules L6 151
TABLEAU 5	Caractérisation de l'état physique du génome du virus du papillome humain type 16 (HPV16) et son nombre de copies par génome cellulaire dans quelques clones cellulaires positifs du HPV16 166
TABLEAU 6	Evaluation du marquage des marqueurs de différenciation (%) 190
TABLEAU 7	Cinétique de l'activité spécifique de la protéine kinase C (PKC) membranaire sur le substrat endogène 214
TABLEAU 8	Activité spécifique de la protéine kinase C (PKC) membranaire dans les cellules L6 215
TABLEAU 9	Activité spécifique de la protéine kinase C (PKC) membranaire dans les cellules HPV16-L6 215
TABLEAU 10	Activité spécifique cytosolique de la protéine kinase C (PKC) dans les cellules L6 218
TABLEAU 11	Activité spécifique cytosolique de la protéine kinase C (PKC) dans les cellules HPV16-L6 218
TABLEAU 12	Activité spécifique de la protéine kinase C (PKC) membranaire: enzyme active/inactive. Comparaison entre cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) 223
TABLEAU 13	Activité spécifique de la protéine kinase C (PKC) membranaire dans les kératinocytes (Balbc/MK) 229
TABLEAU 14	Activité spécifique de la protéine kinase C (PKC) membranaire dans les kératinocytes transformés par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-Balbc/MK) 229
TABLEAU 15	Détermination de concentration du calcium intracellulaire (Ca ²⁺): Microspectrofluorométrie 232

LISTE DES FIGURES

		PAGE
FIGURE 1	Microscopie électronique du virus du papillome humain type 16 (HPV16) (Grossissement 187 500 X)	53
FIGURE 2	Organisation génomique du virus du papillome humain type 16 (HPV16)	55
FIGURE 3	Organisation comparée de différents génomes du virus du papillome humain (HPV)	57
FIGURE 4	Cycle de développement du virus du papillome dans les lésions bénignes et malignes	68
FIGURE 5	Modèle de progression de la transformation par le virus du papillome humain type 16 (HPV16) et progression des lésions et changements histologiques au cours de la néoplasie intraépithéliale cervicale	76
FIGURE 6	Relations entre l'ion calcium et l'activation de la protéine kinase C (PKC)	98
FIGURE 7	Évolution de la différenciation et de la morphologie des cellules L6 normales après coloration au GIEMSA	156
FIGURE 8	Évolution de la différenciation et de la morphologie des cellules L6 transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16) après coloration au GIEMSA	157
FIGURE 9	Morphologie des kératinocytes normales (Balbc/MK) normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-Balbc/MK)	158
FIGURE 10	Effet de l'électroporation sur la croissance et la différenciation cellulaire: Évaluation en microscopie optique et à épifluorescence	162

	PAGE
FIGURE 11	164
Profils électrophorétiques des produits d'amplification par la réaction de Polymérisation en chaine (PCR) des cadres de lecture ouverts (ORFs) du virus du papillome humain type 16 (HPV16)	
FIGURE 12	167
Autoradiographie du transfert de type "Southern" des clones cellulaires positifs au virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6), analysés à l'aide de différents enzymes de restriction. Etat extrachromosomique du HPV16 dans les cellules HPV16-L6	
FIGURE 13	168
Autoradiographie du transfert de type "Southern" des clones cellulaires positifs au virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6), analysés à l'aide de différents enzymes de restriction. Etat intégré du HPV16 dans les cellules HPV16-L6	
FIGURE 14	170
Effets cytopathiques (ECP) associés au virus du papillome humain type 16 (HPV16) dans les cellules HPV16-L6	
FIGURE 15	171
Effets cytopathiques (ECP) associés au virus du papillome humain type 16 (HPV16) dans les cellules Balbc/MK transformées par le HPV16 (HPV16-Balbc/MK)	
FIGURE 16	173
Analyse de la morphologie et des changements ultrastructuraux en microscopie électronique des cellules L6 normales et transformés par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 17	175
Analyses en immunoélectromicroscopie des marqueurs de différenciation cellulaire (N-CAM) dans les cellules L6 normales et transformées par le virus de papillome humain type 16 (HPV16-L6)	

	PAGE
FIGURE 18	176
Évaluation des communications intercellulaires par chargement du colorant "Jaune luficer" dans les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 19	178
Caryotypes et analyse des caractéristiques chromosomiques des cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 20	180
Courbes de croissance cellulaire des cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6). Analyse à l'aide des tests directs et indirects	
FIGURE 21	181
Courbes de croissance cellulaire des kératinocytes normaux (Balbc/MK) et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-Balbc/MK)	
FIGURE 22	182
Effet des inducteurs de la différenciation cellulaire sur la prolifération des L6 normales et transformés par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 23	183
Effet des inducteurs de la différenciation cellulaire sur la prolifération des kératinocytes normaux (Balbc/MK) et transformés par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-Balbc/MK)	
FIGURE 24	185
Croissance en milieu semi-solide des cellules L6 immortalisées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 25	188
Mise en évidence par immunofluorescence de la distribution de la protéine N-CAM dans les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	

	PAGE	
FIGURE 26	Mise en évidence par immunofluorescence de la distribution de la fibronectine dans les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	191
FIGURE 27	Mise en évidence par immunofluorescence de la distribution de la connexine 43 dans les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	192
FIGURE 28	Évaluation par cytométrie de flux de l'expression de la protéine N-CAM dans les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	193
FIGURE 29	Évaluation de l'intensité de marquage des marqueurs de différenciation chez les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	194
FIGURE 30	Analyse par cytométrie de flux de divers marqueurs de différenciation chez les cellules L6 témoin (L6) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6): Évolution des populations fortement marquées	195
FIGURE 31	Évaluation par cytométrie de flux des volumes et de la granulosité des cellules normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	197
FIGURE 32	Évaluation par cytométrie de flux de l'expression de l'alpha foeto-protéine dans les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	202
FIGURE 33	Analyse de la transcription dans les clones cellulaires positifs au virus du papillome humain type 16 (HPV16). Amplification par le PCR pour la détection des transcrits spécifiques (RT-PCR)	204

	PAGE
FIGURE 34	205
Cinétique de la transcription des cadres ouverts de lecture (ORFs) du virus du papillome humain type 16 (HPV16) au cours de la différenciation cellulaire	
FIGURE 35	207
Analyse de la transcription par "Northern blot" et détection des transcrits spécifiques du virus du papillome humain type 16 (HPV16) dans les cellules L6 transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) à l'aide d'une sonde génomique totale du HPV16	
FIGURE 36	208
Évaluation par cytométrie de flux de l'expression du virus du papillome humain type 16 (HPV16) dans les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6). L'anticorps monoclonal utilisé est dirigé contre la protéine E6 du HPV16.	
FIGURE 37	210
Analyse par Immunobuvardage. Détection du produit de traduction du virus du papillome humain type 16 (HPV16) à l'aide d'un anticorps polyclonal spécifique de groupe	
FIGURE 38	216
Relations entre les changements du calcium intracellulaire et l'activité protéine kinase C (PKC) dans les cellules L6 normales (A) et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 39	219
Évolution des quotients d'activité de la PKC membranaire chez les cellules témoins L6 et les cellules transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6): Activité obtenue en réponse aux modulateurs par rapport à l'activité des témoins correspondants	

	PAGE
FIGURE 40	220
Évolution des quotients d'activité de la PKC membranaire chez les cellules témoin Balbc/MK et les cellules transfectées par le HPV16 (HPV16-Balbc/MK): Activité obtenue en réponse aux modulateurs par rapport à l'activité des témoins correspondants	
FIGURE 41	221
Corrélation entre les activités spécifiques de la protéine kinase C (PKC) membranaire et cytosolique dans les cellules L6 normales (A) et transformées (B) par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 42	224
Analyse par Immunobuvardage. Détection de l'expression de la protéine kinase C (PKC) à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre les isoformes de la PKC	
FIGURE 43	234
Activité spécifique de la PKC membranaire en fonction du temps chez les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (A). Relation entre l'activité spécifique protéine kinase C (PKC) et la croissance cellulaire des cellules L6 et HPV16-L6 (B).	
FIGURE 44	235
Analyse en microspectrofluorométrie de l'effet du DMSO et du bloquant D600 sur la réponse calcique intracellulaire dans les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 45	236
Analyse en microspectrofluorométrie de l'effet du calcium extracellulaire et du bloquant D600 sur la réponse calcique intracellulaire dans les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 46	236
Analyse en microspectrofluorométrie de l'effet de la thapsigargine sur la réponse calcique intracellulaire dans les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	

	PAGE
FIGURE 47	239
Analyse en microspectrofluorométrie de l'inhibition de la réponse calcique intracellulaire à l'aide du bloquant du flux de calcium: le TMB 8. Cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6).	
FIGURE 48	240
Analyse en microspectrofluorométrie de l'inhibition de la réponse calcique intracellulaire par le bloquant du flux de calcium: le cobalt. Cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6).	
FIGURE 49	241
Analyse en microspectrofluorométrie de la dépolarisation par le KCl des cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 50	243
Mise en évidence des récepteurs muscariniques par microspectrofluorométrie: expression différentielle des récepteurs d'acétylcholine dans les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 51	244
Analyse en microspectrofluorométrie des effets de la caféine et du l'U-73, 122 sur la réponse du calcium intracellulaire. Cellule L6 normales et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6).	
FIGURE 52	245
Évaluation en imagerie et effet des modulateurs de la différenciation cellulaire sur la concentration du Ca ²⁺ intracellulaire en fonction du temps dans les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 53	247
Analyse en imagerie de l'effet modulateur de la thapsigargine sur la réponse calcique des cellules L6 normales et kératinocytes normaux (Balbc/MK)	

	PAGE
FIGURE 54	248
Images séquentielles en imagerie des rapports de concentration du calcium intracellulaire des cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6), stimulées par le calcium extra-cellulaire 1.8 mM	
FIGURE 55	249
Analyse en imagerie de l'effet modulateur du calcium extracellulaire sur la réponse calcique intracellulaire des cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome human type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 56	251
Images séquentielles en imagerie des rapports de concentrations du calcium intracellulaire des cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6), stimulées par le DMSO	
FIGURE 57	252
Analyse en imagerie de l'effet modulateur du DMSO extracellulaire sur la réponse calcique intracellulaire des cellules L6 normales et transformées par le par le virus de papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 58	253
Analyse en imagerie de l'altération des communications intercellulaires dans les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 59	254
Analyse en imagerie de l'effet modulateur de l'acide rétinoïque extracellulaire sur la réponse calcique intracellulaire des cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	
FIGURE 60	255
Images sequentielles en imagerie des rapports de concentration du calcium intracellulaire des cellules, L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6), stimulée par l'acide rétinoïque	

		PAGE
FIGURE 61	Analyse séquentielle en imagerie des rapports de concentration du calcium intracellulaire des kératinocytes normaux (A) et transformés par le virus de papillome humain type 16 (HPV16-Balbc/MK) (B) stimulés par le calcium extracellulaire	258
FIGURE 62	Évaluation par cytométrie de flux de l'expression de la connexine 43 dans les cellules L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)	260
FIGURE 63	Schéma hypothétique illustrant les processus impliqués dans la stimulation de la prolifération et le blocage de la différenciation par le virus du papillome humain type 16 (HPV16) dans les cellules L6 (A) et les kératinocytes (Balbc/MK) (B)	301

LISTE DES ANNEXES

		PAGE
ANNEXE I	Exemple de calcul de l'activité spécifique de la protéine kinase C (PKC)	348
ANNEXE II	Analyses statistiques: test de student (t)	352
ANNEXE III	"Gene clean": protocole du manufacturier	358
ANNEXE IV	Publications	359

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMP:	ampiciline
ARN:	acide ribonucléique
ARN _m :	acide ribonucléique messenger
ATCC:	American Type Culture Collection
bc:	bicatenaire
BET:	bromure d'éthidium
bouillon LB:	bouillon luria-bertani
BPV:	virus du papillome bovin type 1
BSA:	albumine sérique bovine
CaCl ₂ :	chlorure de calcium
cAMP:	adenosine monophosphate cyclique
ci:	curie = quantité de désintégration de nucléotide radioactif à un taux de $3,7 \times 10^4$ atomes par seconde (= $3,7 \times 10^4$ Bq)
CPM:	coup par minute
CsCl:	chlorure de césium
D600:	méthoxyverapamil
Da:	dalton
DAG:	diacylglycerol
DEPC:	diéthylpyrocarbonate
DMSO:	diméthylsulfoxyde

dNTP:	déoxyribonucléoside triphosphate
DTT:	dithiothréitol
ECP:	effet cytopathique
EDTA:	acide éthylènediamine tétraacétique
EGF:	facteur de croissance épidermique
EGTA:	acide éthylènediamine tétraacétique
EMEM:	"Eagle minimum essentielle medium"
E.V.:	épidermodysplasies verruciformes
FITC:	isothiocyanate de fluoresceïne
GTP:	guanosine triphosphate
h:	heure
HBS:	solution tamponnée avec l'hepès
HEPES:	acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique
HPV:	virus du papillome humain
HPV16:	virus du papillome humain type 16
HPV16-L6:	cellules L6 transformées par le HPV16
HPV16-Balbc/MK:	kératinocytes transformées par le HPV16
HSV-2:	virus herpès simplex de type 2
IF:	immunofluorescence
IEM:	immunoélectromicroscopie
IP3:	inositol triphosphate
IP3R:	recepteur de l'inositol triphosphate
IPTG:	isopropylthio- β -galactoside

Kb:	kilobase ou 10^3 bases
KDa:	kilodalton ou 10^3 daltons
Kpb:	kilopaire de bases ou 10^3 paires de bases
L6:	cellules de myoblastes de rat
mc:	anticorps monoclonal
ME:	microscopie électronique
min:	minute
MST:	maladies sexuellement transmissibles
NaCl:	chlorure de sodium
NaOAc:	acetate de sodium
N-CAM:	N(neural)-molécule d'adhésion intercellulaire (CAM)
O.D.:	densité optique
ORF:	"Open Reading Frame" ou cadre ouvert de lecture
ng:	nanogramme ou 10^{-9} g
nm:	nanomètre ou 10^{-9} m
p:	plasmide
pb:	paire de bases
PBS:	solution saline tamponnée contenant des ions phosphates
pc:	anticorps polyclonal
PCR:	réaction de polymérisation en chaîne
PKC:	protéine kinase C
PLC:	phospholipase C
PMSF:	fluorure de phénylméthylsulfonyle

PV:	virus du papillome
RA:	acide rétinoïque
RPM:	révolution par minute
RYS:	récepteur de la ryanidine
SDS:	dodécyl sulfate de sodium
sec:	seconde
SDS-PAGE:	électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence du SDS
SSC:	tampon SSC 1X (chlorure de sodium 3M et citrate de sodium 0.3M)
SSP:	tampon SSP 1X (chlorure de sodium 0.18 M; phosphate de sodium 10 mM pH 7.4 et EDTA 1 mM pH 7.4)
STE:	tampon STE 1X (chlorure de sodium 0.1M; Tris-HCl 10 mM; pH 8.0 et EDTA 1 mM pH 8.0)
SV40:	virus simien 40
SVF:	sérum de veau foetal
TCA:	acide trichloroacétique
Xgal:	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

SOMMAIRE

Notre travail avait pour but d'amorcer l'établissement d'une corrélation possible entre l'expression génétique du papillomavirus humain type 16 (HPV16) et la prolifération et la différenciation cellulaire. Dans un premier temps, nous avons développé les cultures cellulaires et optimisé les conditions d'une technique de transfection: l'électroporation. Cette technique a été appliquée à la transfection des deux modèles cellulaires murins à l'état indifférencié utilisés au cours de ce projet de recherche: les myoblastes de rat (cellules L6) et les kératinoblastes de souris. La caractérisation du génome du HPV16 dans les lignées cellulaires transfectées par le HPV16 a été réalisée par hybridation et analyse de transfert d'ADN de type "Southern" à l'aide d'une sonde génomique totale du HPV16. Des sondes spécifiques à différents cadres de lecture (ORFs) du HPV16 ont également été utilisées pour la caractérisation des clones positifs et pour l'analyse des transcripts viraux du virus. L'état physique du génome du HPV16, l'état extrachromosomique ou intégré, dans les deux lignées cellulaires indifférenciées a été ensuite caractérisé à l'aide de ces sondes moléculaires associées à l'analyse par enzymes de restriction.

L'étude des réarrangements chromosomiques dans les cellules transfectées par le HPV16 a montré des altérations spécifiques des chromosomes dans toutes les cellules transfectées et l'apparition de "doubles minutes" dans environ 50% des cellules. Ce résultat qui est à rapprocher de ceux obtenus dans des cellules humaines est important car il est peut être lié à l'activation par les gènes viraux d'oncogènes cellulaires qui coopèrent avec ceux du virus dans l'induction de la tumorigénèse.

L'effet du HPV16 sur la croissance cellulaire a été analysé et les caractères d'immortalisation et de transformation, croissance continue et en milieu semi-solide, des lignées contenant le génome complet du HPV16 ont été mis en évidence.

L'effet du HPV16 sur la différenciation cellulaire a été également évalué avec des marqueurs de différenciation, étudiés par cytofluorométrie et immunofluorescence, tel que la fibronectine, la vimentine, l'actine et le N-CAM ainsi que l'alpha foetoprotéine. Nos résultats montrent qu'avec les marqueurs étudiés la différenciation cellulaire terminale est bloquée par le HPV16 à un stade intermédiaire. Ces modifications au niveau moléculaire ont été confirmées par des changements morphologiques et structuraux dus à la présence du HPV16. Le stade de blocage de la différenciation a été identifié pour les myoblastes comme celui qui précède la fusion, un stade bien défini du programme de différenciation des cellules musculaires.

L'expression génétique du HPV16 au cours du programme de différenciation a été évaluée au niveau de la transcription, à l'aide de la réaction de polymérisation en chaîne du type "RT-PCR" et l'analyse des transcrits par hybridation de type "Northern". Dans les deux niveaux d'expression du HPV16 dans le système cellulaire L6 utilisé une expression transitoire et différentielle a été observée entre les jours 3 et 6 à partir de la mise en culture.

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons essayé d'identifier des interférences possibles du HPV16 avec la signalisation cellulaire puisque la différenciation aussi bien que la prolifération est tributaire de la signalisation. Pour cela, nous avons étudié l'activité de la protéine kinase C (PKC) car cette enzyme semble jouer un rôle de pivot au niveau de la décision pour une cellule de progresser ou non dans les étapes de la différenciation. Nos travaux ont montré une activation substantielle de la PKC dans les cellules L6 transformées par le HPV16. Des fluctuations dans la concentration endogène et l'influx des ions calcium, un messager secondaire - dans les cellules normales et transformées, par le HPV16 ont été également mesurées. Le Ca^{2+} joue un rôle crucial dans l'activation de la PKC et des processus liés à la prolifération et la différenciation cellulaire.

Dans la troisième partie de ce travail nous avons étudié l'interaction du HPV16 et des communications intercellulaires, via les jonctions lacunaires, une voie de signalisation qui assure la répartition intercellulaire des messagers secondaires et joue un rôle majeur dans l'acquisition de l'homéostasie. La cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la connexine 43, protéine structurale des jonctions lacunaires, la microscopie électronique et les techniques permettant d'évaluer la capacité des échanges intercellulaires ont été utilisées pour cette partie du travail. L'ensemble des résultats concernant l'évaluation des communications cellulaires révèle une altération des échanges intercellulaires associée à la transformation cellulaire par le HPV16.

1. Introduction
2. Literature Review
3. Methodology
4. Results
5. Discussion
6. Conclusion
7. References
8. Appendix
9. Glossary
10. Index

INTRODUCTION

L'étiologie virale des lésions associées aux virus du papillome (PV) a été décrite depuis 1907 par Ciuffo. Les PVs ont été étudiés en détail pour la première fois en 1933 par Shope et Hürst. Cependant, les études sur leurs propriétés moléculaires ont progressé lentement jusqu'à l'avant dernière décennie; ceci, à cause de l'absence d'un modèle cellulaire permissif adéquat pour la culture du virus *in vitro*. Les progrès importants qui ont marqué la biologie moléculaire ont grandement amélioré l'état de connaissances sur les PVs, depuis que leur structure et leur poids moléculaire ont été déterminés en 1965 par Crawford et en 1974 par Zur Hausen et ses collaborateurs.

Les PVs sont groupés avec les polyomavirus dans la famille papovaviridae. La nomenclature de ces virus est basée sur l'hôte naturel. Il peut exister plus d'un PV pour un même hôte avec un sous-classement correspondant par type.

Les PVs montrent également un tropisme tissulaire pour la peau et les muqueuses. Ils sont associés à des lésions spécifiques. Trois types de lésions sont connus pour les PVs: le papillome, le fibropapillome et le fibrome.

Les PVs ont une grande importance économique, en particulier pour l'industrie agro-alimentaire où les infections du PV notamment chez les bovins sont dévastatrices. De plus, la transmission croisée des PVs entre certains animaux et même l'homme a été souvent évoquée d'où l'importance de ce groupe viral en médecine humaine et vétérinaire. Chez l'homme, plus de 60 types de virus du papillome humain (HPV) ont été identifiés dont la plupart ont été isolés à partir de patients présentant de l'*épidermodysplasia verruciformis*. Les HPVs ont été

reclassés en 20 groupes distincts selon leur identité de séquence d'ADN. En plus des lésions bénignes dont la plupart de ces types sont responsables, plusieurs d'entre eux se montrent régulièrement associés à des lésions malignes d'où leur importance médicale. Ces résultats sont autant d'arguments en faveur du rôle des HPVs dans l'évolution vers le cancer (Zur Hausen, 1986). Chez des personnes atteintes de cancer de la peau on observe la présence du génome du HPV. Les HPVs sont associés à une incidence élevée du cancer de la peau chez les récipiendaires de transplantation rénale (Lutzner *et al.* 1980; Rüdlinger *et al.* 1986). 80% de ces patients présentent des problèmes dermatologiques (Eplanttenier *et al.* 1980; Rüdlinger *et al.* 1986). De plus, l'activation d'oncogènes cellulaires par les PVs est souvent rapportée et ce notamment pour le HPV16, virus qui fait l'objet de ce travail. Il a été caractérisé par Dürst et ses collaborateurs en 1983. La présence du génome des HPVs a été associée au cancer cervical et à d'autres lésions génitales (Gissmann et Zur Hausen, 1980). Dans le but de limiter les désordres associés à l'action pathologique de ce virus et dans la perspective éventuelle de la conception d'un vaccin, il était nécessaire de connaître les mécanismes fondamentaux et les facteurs régissant la biologie de ce virus, comme d'appréhender les rapports de cet agent viral avec l'hôte. Les recherches présentées dans le cadre de cette thèse constituent à ces différents niveaux une contribution expérimentale et théorique à la connaissance de la biologie et de la pathologie virale du HPV16.

HYPOTHÈSE DU TRAVAIL

L'interaction entre la différenciation cellulaire et la régulation de l'expression génétique de virus autres que les papillomavirus est rapportée dans la littérature (Lafemia et Hayward, 1986). Dans le cas des papillomavirus, l'importance de l'état de différenciation cellulaire de l'hôte est souvent suggérée ou soulignée: cependant, aucune étude systématique destinée à élucider les relations entre la différenciation cellulaire et l'expression génétique virale n'a été entreprise ce qui nous a incité à en faire l'objet de ce travail. Nos hypothèses de travail sont de deux ordres: cinétique et mécanistique.

1^o hypothèse: Hypothèse d'ordre cinétique.

- L'expression du papillomavirus humain type 16 (HPV16) dans des cellules transfectées dépend du degré de différenciation de ces cellules. Le patron de l'expression des protéines virales change au cours de la progression des cellules hôtes dans leur programme de différenciation.
- Le HPV16 à son tour influence la différenciation cellulaire et/ou la prolifération en bloquant la différenciation cellulaire à une certaine étape de son programme de telle sorte que la prolifération se poursuit.

2^{ème} hypothèse: Hypothèse d'ordre mécanistique.

- Le mécanisme ou les mécanismes impliqués dans les inter-relations différenciation cellulaire/expression du HPV16 sont contrôlés par la signalisation cellulaire.

OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'état des connaissances sur les relations cellule hôte/parasite chez les papillomavirus est relativement limité, ce qui souligne l'importance d'une contribution originale à la connaissance de ces relations. Nous avons élaboré les objectifs suivants de travail:

1. La cinétique de la différenciation cellulaire dans des lignées cellulaires capables de se différencier *in vitro*.
2. L'analyse de l'effet de la différenciation cellulaire sur l'expression génétique du virus du papillome humain type 16 (HPV16).
3. L'analyse de l'effet potentiel de l'expression du HPV16 sur la progression de la différenciation cellulaire.

Deux modèles inédits pour l'étude *in vitro* du HPV16 ont été utilisés. Les lignées transfectées n'appartiennent pas à l'espèce hôte du virus. Le choix de ces modèles cellulaires hétérologues a été motivé par:

1. le fait que les cellules embryonnaires, des myoblastes de rat et kératinocytes de souris sont inductibles en ce qui concerne la différenciation.
2. le fait que les processus de signalisation impliqués dans le progrès de la différenciation sont différents dans les deux systèmes.
3. la différenciation est réversible sous certaines conditions, dans l'un des systèmes étudiés.

On a choisi d'étudier plus en détail les résultats obtenus avec le modèle des myoblastes. Le modèle kératinocytes a été utilisé seulement à des fins de comparaison.

REVUE BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

L'intérêt et l'importance des papillomavirus sont illustrés par l'augmentation constante des travaux de recherche réalisés dans ce domaine. Récemment, plusieurs revues sur le sujet ont été publiées. Elles couvrent l'aspect moléculaire, cellulaire, immunologique et pathologique des papillomavirus (Matlashewski, 1989; Voosden, 1989; Gross *et al.* 1989; Syrjänen 1987; Salzman et Howley, 1987; Pfister, 1990).

1. GÉNÉRALITÉS

1.1 Les virus du papillome et leur importance médicale

Le cancer du col de l'utérus est le cinquième cancer au monde par ordre de fréquence et c'est le deuxième cancer le plus meurtrier chez la femme après celui du sein. Il est plus fréquent dans les pays en voie de développement, mais de récentes études indiquent qu'il augmente dans les pays développés (Parkin *et al.* 1988). De nombreux facteurs, selon plusieurs enquêtes épidémiologiques influencent de façon constante la progression de ce cancer, par exemple: l'activité sexuelle, le tabagisme, certains facteurs immunitaires et humoraux et enfin certains virus sexuellement transmissibles (Zur Hausen, 1986). La recherche d'un virus comme agent causal des cancers du cervix dure déjà depuis plusieurs décennies. Le virus de l'herpes simplex de type 2 (HSV2) a été considéré comme un sérieux candidat, mais l'absence d'ADN viral dans la majorité des tumeurs et les résultats négatifs des enquêtes épidémiologiques prospectives ont finalement montré que

ce virus ne joue probablement pas de rôle dans la genèse du cancer du col de l'utérus (Vonka *et al.* 1987; Vousden 1989). Au contraire, il existe maintenant de nouveaux arguments pour incriminer certains types de virus de papillomes humains infectant le tractus génital (Meisels et Fortin, 1976; Della Torre *et al.* 1978; Gissmann et Zur Hausen, 1980; Dürst *et al.* 1983; Dürst *et al.* 1987; Boshart *et al.* 1984; Lorincz *et al.* 1986; Beaudenon *et al.* 1986; Zur Hausen, 1986). Parmi les facteurs responsables du cancer du col de l'utérus, l'HPV16 a été identifié et son génome a été trouvé intégré dans les cellules tumorales des cancers du col (Dürst *et al.* 1983; Lorincz *et al.* 1986). Chez l'homme, à ce jour, plus de 60 types de virus de papillome ont été identifiés (Pfister, 1990). Ces virus n'infectent *in vivo* que les cellules épithéliales et la production virale est limitée aux kératinocytes matures, ce qui pose un problème majeur pour leur étude, car ce stade de différenciation des cellules épithéliales cutanées n'a pas été pour l'instant reproduit en laboratoire.

1.2 Historique

Les verrues de la peau et des organes génitaux sont bien connues comme tumeurs papulamenteuse. Leur origine virale a été démontrée en 1907 par Ciuffo qui fut capable de vérifier le premier postulat de Koch (Wilson et Miles, 1975) en injectant le filtrat d'extrait de verrues à des patients volontaires qui ont par la suite développé des verrues. Des expériences similaires ont été également réalisées à partir d'extraits de condylomes et de papillomes laryngiaux (Rowson et Mahy, 1967).

Le virus du papillome a été isolé pour la première fois chez le lapin (Shope et Hürst, 1933). Les particules virales ont été mises en évidence par microscopie électronique dans la couche épithéliale de condylomes (Straus *et al.* 1950; Dunn et Ogilvie, 1968; Boyle *et al.* 1973) et dans les dysplasies cervicales (Della Torre *et al.* 1978; Laverty *et al.* 1978). Il y a quelques années, Kreider et ses collaborateurs (1985) ont obtenu des particules virales matures en combinant des techniques *in vitro* et *in vivo*. Ces auteurs ont infecté *in vitro* des cellules issues d'une biopsie, par une suspension virale obtenue de condylomes et après greffe au niveau de la capsule surrénale de souris athymiques ils ont obtenu une prolifération des cellules cultivées infectées ce qui leur a permis d'obtenir des particules matures (Kreider *et al.* 1985). La détermination de la structure et du poids moléculaire de l'ADN du virus du papillome a été faite à partir d'un isolat de verrue (Crawford, 1965; Klug et Finch, 1965). L'induction de tumeurs bénignes pouvant évoluer en tumeurs malignes a été démontrée depuis plus de 50 ans (Rous et Beard, 1935). Plusieurs types de cancers ont été développés chez le lapin domestique à partir de l'agent de Shope (virus du papillome de lapin). Le rôle important des carcinogènes et des virus de papillome dans l'induction de cancers a été souligné (Rous et Kidd, 1936; Rous et Friedewald, 1944). Chez l'homme, la conversion des papillomes humains en carcinomes des cellules des muqueuses survient dans trois cas 1) dans la maladie de la peau: *épidermis dysplasia verruciformis* (EV) (Jablonska *et al.* 1972), le papillome laryngial chez l'adulte (Kleinsasser et Cruz, 1973) et la dysplasie cervicale (Zur Hausen, 1977; Meisels et Fortin, 1976).

Le rôle possible des virus du papillome (HPV) dans le développement de cancers a été renforcé durant les dix dernières années par la démonstration de la persistance de l'ADN viral et de l'expression des gènes de virus de papillomes humains dans les carcinomes de patients atteints de l'*épidermodysplasia verruciformis* (EV) et de cancer ano-génital (Macnab *et al.* 1986; Shirasawa *et al.* 1988; Grubendorf-Conen, 1987). Le cancer génital notamment du cervix a atteint actuellement presque le premier rang dans les pays développés (Parkin et Muir 1988; Chan *et al.* 1992).

Les virus de papillomes ont été caractérisés sur le plan cellulaire et moléculaire. Au niveau cellulaire, l'analyse cytologique des dysplasies cervicales montre des structures typiques de l'infection par les HPV appelées koilocytes selon la première description de Meisels et Fortin, 1976. L'application des techniques issues de la biologie moléculaire a permis d'améliorer grandement l'état des connaissances des virus de papillomes: d'abord par l'établissement de la pluralité de type de ces virus (Gissmann et Zur Hausen, 1976; Gissmann *et al.* 1977; Orth *et al.* 1977), ensuite par la caractérisation de ces virus (Gissmann et Zur Hausen, 1980; Gissmann *et al.* 1982; Dürst *et al.* 1983; Boshart *et al.* 1984; Lorincz *et al.* 1986; Beaudenon *et al.* 1986) et enfin par le clonage de leur ADN dans des vecteurs appropriés (De Villiers *et al.* 1981, Gissmann *et al.* 1982, Dürst *et al.* 1983).

Le courant actuel des recherches sur les virus de papillomes tend à mettre le focus sur la prévention et sur le rôle du HPV durant la conversion maligne et les

approches cliniques pour éviter la conversion des dysplasies en tumeurs (Zur Hausen, 1986).

1.3 Classification

Les virus du papillome sont classés dans le genre papillomavirus à l'intérieur de la famille Papoviridae sur la base de la structure de leur capsid et de leur composition biochimique (Matthews, 1982). Les virus du papillome sont originellement groupés avec les polyomavirus, second genre dans la famille Papoviridae (Matthews, 1982). Chaque genre possède des antigènes spécifiques de groupe (Jenson *et al.* 1980; Shah *et al.* 1977). Il n'y a pas de réaction croisée entre les papillomavirus et les polyomavirus. L'analyse des séquences d'ADN des virus de papillome et des polyomavirus révèle une différence fondamentale dans l'organisation de leur génome. Dans le cas des virus de papillome il y a seulement un brin codant (Engel *et al.* 1983). Dans le cas des polyomavirus les séquences d'ADN qui codent pour les protéines fonctionnelles et structurales du virus sont situées sur des brins d'ADN différents (Griffin, 1980). Ceci prouve que les papillomavirus représentent un groupe distinct.

Les virus du papillome sont extrêmement répandus. On en trouve en particulier chez de nombreux mammifères comme l'homme, le chien, le boeuf, le renne, le lapin, le mouton, la souris etc. La classification de ces virus est basée sur leur hôte naturel et leur parenté en rapport avec leurs séquences d'ADN (Coggin et Zur Hausen, 1979). Présentement, chez l'homme, 60 types sont caractérisés sur cette

base (Broker et Botchan, 1986; Kawashima *et al.* 1986; Beaudenom *et al.* 1987a et b; De Villiers *et al.* 1989; Grimmel *et al.* 1988; Naghashfar *et al.* 1987; Gross *et al.* 1988; Adachi *et al.* 1986; Nuovo *et al.* 1988; Shimoda *et al.* 1988). Le Tableau 1 indique les lésions associés à ces HPV. La classification au niveau de l'ADN a été confirmée par une classification sérologique, mais ceci seulement pour les virus de papillome humain de types 1 à 5 (Pfister *et al.* 1987).

Les différents types de HPV forment une vingtaine de groupes basés sur leur identité de séquence d'ADN. Les membres de ces groupes montrent une réaction croisée de 1 à 40%. Cependant, les différents groupes ne montrent pas de relation sous des conditions d'hybridation de "stringency" élevée.

Les types d'HPV des groupes A,B,C,D,O,Q, et R infectent la peau (Pfister et Fuchs, 1987). Les membres de ce groupe occupent une position spéciale et sont associés à des patients EV. Les membres des groupes E,G,H,J,K,M,N,P,S et T comprennent l'ADN de HPV isolé à partir de lésions anogénitales ou de muqueuses orales (Broker et Botchan, 1986; Beaudenon *et al.* 1987a; Beaudenon *et al.* 1987b; Naghashfar *et al.* 1987; Shimoda *et al.* 1988). Le groupe L composé du HPV34 représente un virus dont l'ADN a été détecté dans des maladies de la peau et des organes génitaux (Pfister, 1987). La relation génétique entre les membres de ces groupes est souvent largement corréllée à leurs propriétés pathologiques mais il y a beaucoup d'exceptions. Par exemple, les virus membres des groupe F et I, une fois examinés sur le plan de leurs propriétés pathologiques suivent plutôt une autre classification: HPV7 et HPV26 affectant la peau et les HPV40 et HPV51

TABLEAU 1. Manifestations pathologiques des principaux papillomavirus humains (HPV).

Types de papillomavirus	Lésions	Oncogénicité
1	Verrues plantaires profondes	-
2	Verrues communes	-
3,10,28	Verrues planes des jeunes enfants Cas rares d'épidermodysplasie verruciforme	-
4	Verrues en dôme	-
5,8	Lésions maculeuses de type <i>pityriasis versicolor</i> Sujets atteints d'épidermodysplasie verruciforme Association avec immunodéficit (par exemple, malades transplantés)	+/-
6,11	Condylomes ano-génitaux, papillomes laryngés Condylomes plats du col de l'utérus	-
7	Verrues des bouchers	-
9,12,14,15,17, 19,20,21,22,23 24,25,36,40	Epidermodysplasies verruciformes : 12,17,20 et autres	+++ +/-
13,32	Hyperplasies focales orales	+/-
16,18,31,33 35,39	Néoplasies intra-épithéliales de la muqueuse génitale Carcinomes épidermoïdes du col, cancers de la vulve ou du pénis	+++
26,27	Verrues cutanées chez des malades immunodéprimés	

HPV oncogénique (+).

HPV non oncogénique (-).

Adapté de Pfister 1987.

affectant les muqueuses (Broker et Botchan, 1986; De Villiers *et al.* 1987; Nuovo *et al.* 1988).

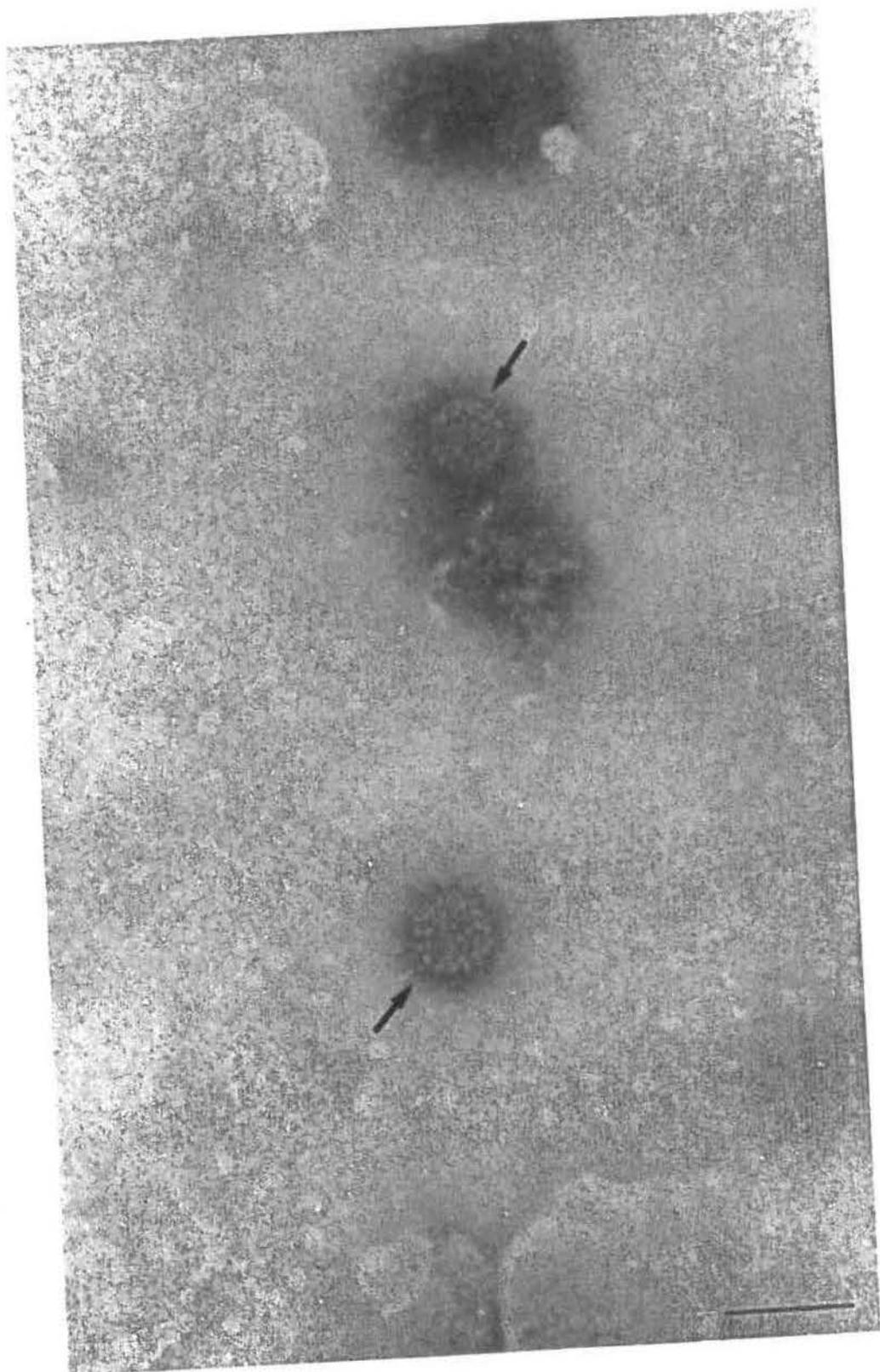
1.4 Propriétés du virus du papillome

1.4.1 Structure de la capside

Le virus du papillome possède une capside cubique de 55 nm de diamètre (Figure 1) (Finch et Klug, 1965; Klug et Finch, 1965). La capside est composée de deux protéines structurales codées par le virus (Pfister et Fuchs, 1987). La masse moléculaire de la capside vide est de 2.35×10^7 déterminée sur la base du coefficient de sédimentation ($S_{20,w}$) qui est de 168 (Crawford et Crawford, 1963) et sa densité dans le chlorure de césium de 1.29 g/mL (Breedis *et al.* 1962). La protéine majeure de la capside du virus du papillome humain type 1 (HPV1) possède une masse moléculaire (M_R) de 57,000 tel que déduit de la séquence nucléotidique (Danos *et al.* 1982). Cette M_R est en accord avec les données expérimentales (Gissmann *et al.* 1977; Salzman et Howley, 1987; Syrjänen *et al.* 1987; Gross *et al.* 1989; Pfister 1990).

La capside contenant le génome viral possède un coefficient de sédimentation ($S_{20,w}$) de 300 et une densité dans le gradient de chlorure de césium de 1.34 g/mL (Breedis *et al.* 1962, Crawford et Crawford, 1963). Le virus ne possède pas de membrane lipidique (Figure 1), par conséquent il est résistant à l'éther et aux autres solvants organiques (Salzman et Howley, 1987; Syrjänen *et al.* 1987; Gross *et al.* 1989; Pfister 1990).

FIGURE 1 Microscopie électronique du virus du papillome humain type 16 (Grossissement 187500 X). Coloration négative à l'acide phosphotungstique. (La barre représente 100 nm)



1.4.2 Les protéines structurales de la capsid

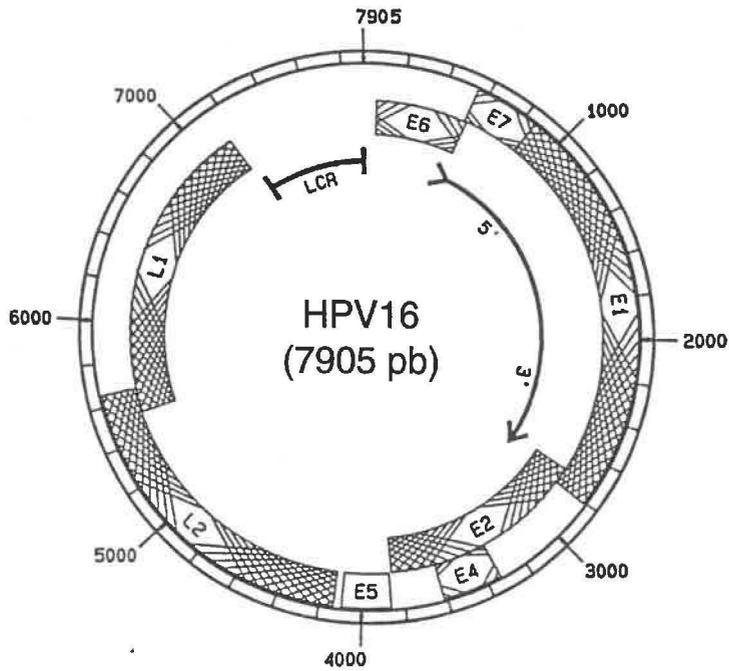
La capsid des virus de papillome est composée d'au moins deux protéines. Une protéine de masse moléculaire (M_R) de l'ordre de 53 à 59 kDa (Favre *et al.* 1975; Gissmann *et al.* 1977; Orth *et al.* 1977; Lancaster et Olson, 1978; Müller et Gissmann, 1978; Pfister *et al.* 1979) qui représente 80% des protéines virales totales (Favre *et al.* 1975; Salzman et Howley, 1987; Gross *et al.* 1989; Pfister, 1990).

La protéine mineure a également une masse moléculaire attendue de l'ordre de 50 à 60 K conformément à la séquence nucléotidique de la région codante (Favre *et al.* 1975; Meinke et Meinke, 1981; Larsen *et al.* 1987; Pilacinski *et al.* 1984; Doorbar et Galpimore, 1987; Banks *et al.* 1987a). Cependant une protéine mineure de 76 kDa a été détectée (Komly *et al.* 1986; Doorbar *et al.* 1987). Les protéines de la capsid portent des déterminants antigéniques spécifiques de genre et de type et il est possible d'obtenir un anticorps polyclonal dirigé contre ces déterminants antigéniques à partir de la particule virale complète (Jenson *et al.* 1980; Yaegashi *et al.* 1992).

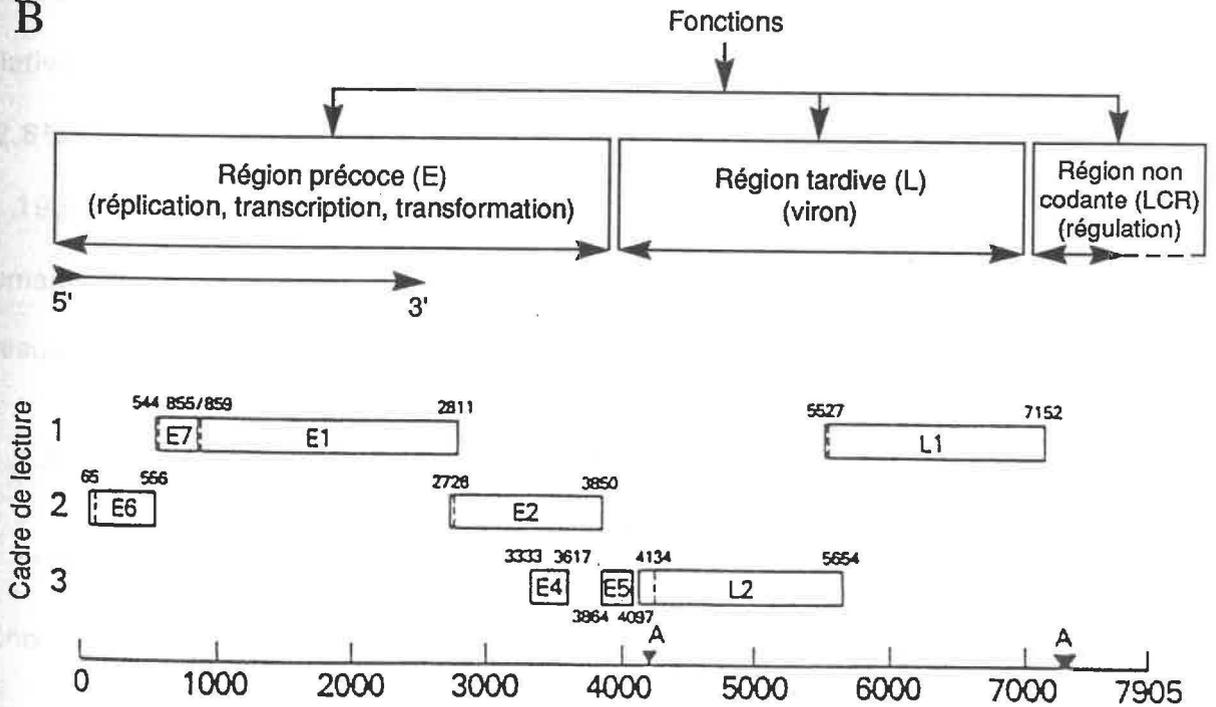
Les gènes qui codent pour ces protéines structurales majeures et mineures occupent 31% du génome total du virus et ils ne semblent pas nécessaires pour la transformation (Figure 2). La transcription de ces gènes chez le virus du papillome bovin (BPV) produits des messagers en grande quantité dans les cellules kératinocytes bovines au stade de différenciation terminale (Engel *et al.* 1983; Baker et Howley, 1987). Cependant, très peu de transcripts correspondant à ces

FIGURE 2 Organisation génomique du virus du papillome humain type 16 (HPV16). Représentation des formes circulaire (A) et linéaire (B) des différents cadres de lecture du HPV16 et indication des fonctions de ces différentes régions (B).
A (Adapté de Gross *et al.* 1990)
B (Adapté de Pfister 1990)

A



B



gènes sont produits dans les cellules transformées *in vitro* (Heilman *et al.* 1982; Amtmann et Sauer, 1982; Salzman et Howley, 1987; Syrjänen *et al.* 1987; Gross *et al.* 1989; Pfister, 1990).

1.4.3 Acide nucléique

La capside virale renferme le génome qui est composé d'une molécule d'ADN, circulaire, double brin (Figure 2). Il est complexé dans le noyau avec des histones et condensé en nucléosomes (Orth *et al.* 1978; Chen *et al.* 1982; Danos *et al.* 1982). Pour la plupart des isolats de virus de papillome connus, la taille du génome est de l'ordre de 7900 paires de bases (Orth *et al.* 1977, 1978; Chen *et al.* 1982; Danos *et al.* 1982; Schwartz *et al.* 1983). La variation est de l'ordre de 10% parmi les virus de papillomes animaux (Pfister *et al.* 1979; Campo *et al.* 1980; Pfister et Meszaros, 1980; Jarrett *et al.* 1984; Kremsdorf *et al.* 1984). Le pourcentage de la composition en GC du génome du virus de papillome est relativement bas. La valeur moyenne chez les virus séquencés est de l'ordre de 42,6%. Dans le cas du HPV16 il est seulement de l'ordre de 36,5% (Seedorf *et al.* 1985). Par ailleurs, des séquences d'homologie d'ADN des virus de papillomes humains et animaux, ont été rapportées, par hybridation non spécifique, montrant presque 30% de "mismatch" (Law *et al.* 1979).

1.4.3.1 Organisation du génome du virus du papillome

L'ADN de plusieurs papillomavirus a été séquencé et révèle une organisation génomique comparable (Figure 3). Le génome de ces virus peut se diviser en trois

FIGURE 3 Organisation comparée de différents génomes de papillomavirus humains (HPV). Compilation des données sur l'organisation des génomes de 8 HPV, impliqués dans des pathologies différentes. Les gènes précoces fonctionnels sont indiqués par E et les gènes tardifs structuraux par L.

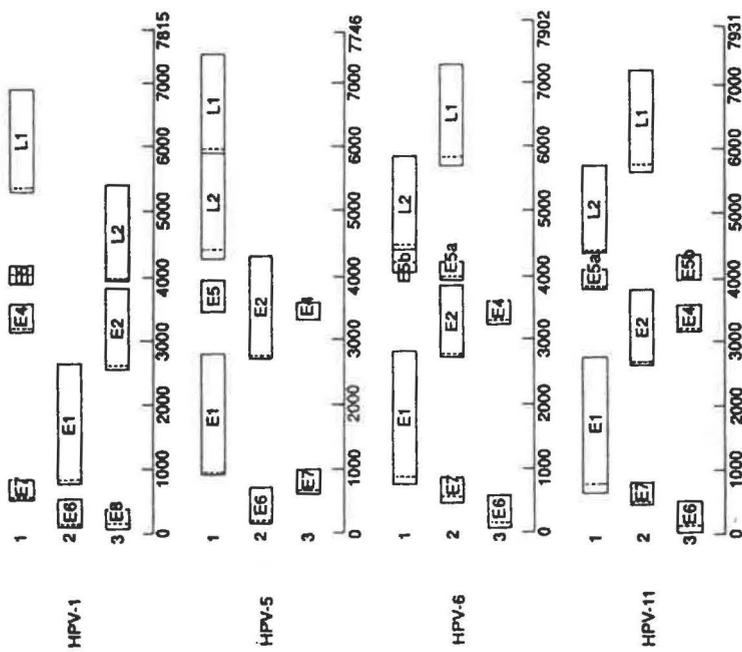
Noter la conservation globale de l'organisation génétique, contrastant avec les différences notables de séquence entre ces virus.

HPV non oncogéniques (A)
HPV oncogéniques (B)

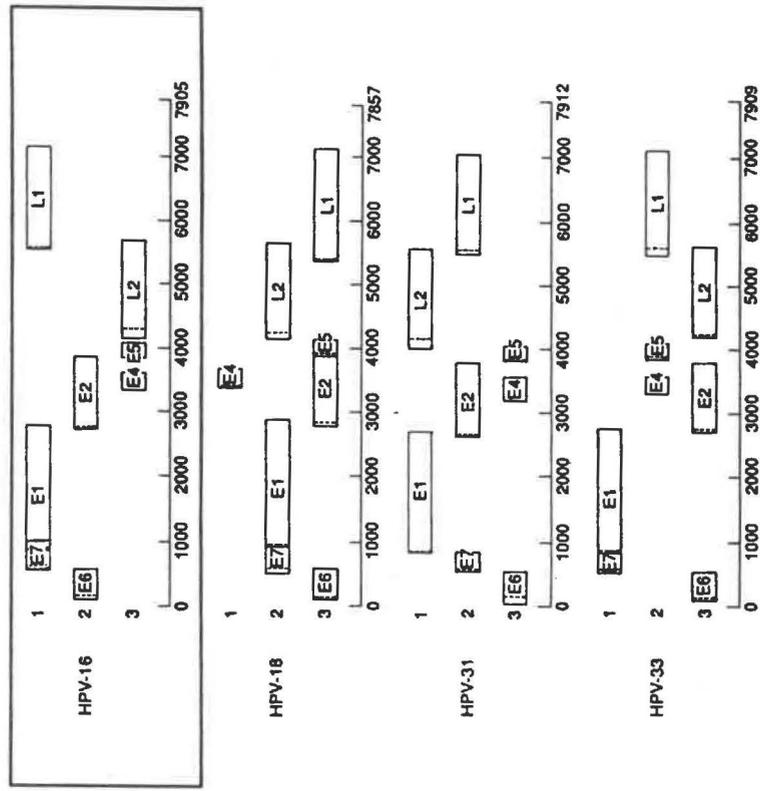
Les tailles sont relativement similaires d'un groupe à l'autre. L'organisation du génome n'est pas non plus indicative du potentiel d'oncogénicité.

Adapté de Pfister et Fuchs, 1987.

A



B



régions (Figure 2). Une région non codante, de 500 à 1000 paires de bases, contenant l'origine de réplication de l'ADN et les éléments promoteurs. Les séquences qui contrôlent la transcription apparaissent dispersées à travers les régions codantes. Une région précoce, qui code pour 8 polypeptides fonctionnels, E1 à E8 (E pour "early") de 4000 nucléotides de longueur compose plus de 60% du génome. Elle code pour des protéines qui sont impliquées dans la réplication de l'ADN, la transcription et la transformation cellulaire (Figure 2). Une région tardive, de 2500 à 3000 paires de base code pour deux polypeptides structuraux (L pour "late"). Les produits de la transcription sont sujets à l'épissage. Les protéines forment souvent des hybrides, dérivés de plus d'un cadre de lecture ouvert (ORF). De même, un ORF peut contenir de l'information pour plus d'une protéine (Salzman et Howley, 1987; Syrjänen *et al.* 1987; Gross *et al.* 1989; Pfister, 1990).

1.4.3.2 Fonction des régions codantes

1.4.3.2.1 Région précoce

Jusqu'à huit cadres de lecture ouvert (ORF) montrant un chevauchement peuvent être détectés dans la région précoce de plusieurs types de papillomovirus. Tel que proposé par Danos *et al.* 1983, ces ORFs, sont numérotés de E1 à E8. Les ORFs E1, E2, E4, E6 et E7 ont été trouvés dans tous les génomes de virus de papillomes analysés jusqu'à présent. E3 a été trouvé seulement chez le virus du papillome bovin type 1 (PBV1). La localisation de E5 et E8 varie et la séquence d'acides aminés montre très peu d'homologie.

L'expression de tous ces gènes passe par des processus d'épissage et de maturation très complexes. Les fonctions de ces différents gènes sont décrites ci-dessous. Les indications apportées sont très générales et résument des données acquises sur des HPV différents (Salzman et Howley, 1987; Syrjänen, 1987; Gross *et al.* 1989; Pfister, 1990).

a) **Fonction du cadre de lecture ouvert E1**: Cet ORF E1 est le plus long qui soit ouvert dans le génome de tous les papillomavirus. C'est également l'un des plus conservés (Seedorf *et al.* 1985). Ce gène est impliqué dans la réplication extrachromosomique du génome viral (Lusky et Botchan 1984; Waldeck *et al.* 1984) et dans son maintien à l'état de plasmide dans les cellules infectées (Lusky et Botchan, 1985). Il code pour une protéine de 600 résidus, dont le domaine C-terminal hautement conservé est riche en acides aminés basiques ce qui suggère une possibilité d'interaction de cette protéine avec l'ADN. Cette partie C-terminale présente une certaine homologie avec les séquences des antigènes T du SV40 et du polyome et plus particulièrement avec les séquences codant pour la région de la protéine se fixant à l'ADN (Clertant et Seif, 1984).

b) **Fonction du cadre de lecture ouvert E2**: Cet ORF est composé de trois domaines conservés de façon très différente parmi les différents papillomavirus (Giri *et al.* 1985; Dartmann *et al.* 1986; McBride et Howley, 1991). Par exemple, la région codante pour la partie N-terminale de la protéine est très bien conservée, alors que la partie codant pour la partie C-terminale est plus variable. Ce gène complexe contient lui même une séquence du type "TATA Box", qui pourrait

permettre une initiation interne de la transcription (Spalholz *et al.* 1985; Kleiner *et al.* 1986) et l'utilisation d'un codon ATG d'initiation situé environ au niveau du premier tiers du gène. La position exacte varie avec le type de PV. La région E2 pourrait ainsi générer deux protéines, de masses molaires de 41 et 35 kDa.

Les produits du gène E2 exercent des fonctions de régulation de première importance (Seeberger *et al.* 1987). Le premier correspondant à la totalité du gène (protéine de 45 kDa) est un transactivateur qui interagit avec une région activatrice de la transcription située dans la région non codante du génome et active l'expression des gènes viraux (Spalholz *et al.* 1985; Haugen *et al.* 1987). Ceci a été particulièrement bien étudié dans le système BPV où la région E2 code pour une protéine régulatrice de la transcription mais ces effets peuvent être différents selon le type de virus considéré. Ainsi, le produit E2 peut être inhibiteur en position *trans* chez les HPV16 et HPV18. La protéine de 35 kDa, codée par les deux tiers du gène dans la partie 3' terminale, semble être un inhibiteur de la transcription. Ces deux produits d'un même gène exercent donc des effets compensateurs sur la régulation de la transcription. L'expression des gènes viraux dépendrait ainsi du rapport de masse entre ces deux produits, donc du rapport entre les types de transcription, complète ou partielle, de E2.

c) **Fonction du cadre de lecture ouvert E3 et E8**: Ces gènes n'ont qu'une existence théorique. Ils sont détectés dans les séquences de plusieurs papillomavirus. Cependant, ils ne sont définis que par les analyses de séquence qui font apparaître des cadres de lectures ouverts dans certains cas.

d) **Fonction du cadre de lecture ouvert E4:** L'ORF E4 chevauche le cadre de lecture E2 dans tous les génomes des papillomavirus connus. Le produit de E4 pourrait intervenir dans la maturation de la particule virale, donc au niveau d'un mécanisme tardif, et serait alors improprement classé parmi les fonctions précoces (Doorbar *et al.* 1986; Nasser *et al.* 1987). Il s'agit d'une protéine de 17 kDa qui est abondamment exprimée dans le cytoplasme des cellules (Doorbar *et al.* 1986).

e) **Fonction du cadre de lecture ouvert E5:** L'ORF E5 correspond à une courte région traductible, que l'on ne trouve que chez certains papillomavirus et dont la localisation dans le génome est variable et qui est impliqué dans la transformation (Goldstein *et al.* 1991; Leechanachai *et al.* 1992). Le gène E5 semble plus spécifique des virus présentant le double tropisme épithélial et fibroblastique (Yang *et al.* 1985; Schiller *et al.* 1984). Ce gène est systématiquement conservé chez les virus induisant des fibropapillomes, tel que le papillomavirus bovin, et peut transformer *in vitro*, à lui seul, des cellules fibroblastiques de souris. Il code pour une petite protéine membranaire hydrophobe de 50 acides aminés, dont la séquence n'est pas très conservée parmi les différents papillomes, mais dont les propriétés physicochimiques sont similaires: en particulier, ce polypeptide de 7 kDa (Schlegel *et al.* 1986) est capable de se dimériser pour donner une masse moléculaire de 15 kDa.

f) **Fonction du cadre de lecture ouvert E6:** Cette région est importante pour la transformation cellulaire (Androphy *et al.* 1985; Schiller, 1984; Kanda *et al.* 1991). On trouve systématiquement des produits de transcription de E6, dans les cellules

de carcinome de certains animaux ou humains, comme les carcinomes cervicaux à HPV (Banks *et al.* 1987; Halbert *et al.* 1992), notamment le HPV16 (Androphy *et al.* 1987; Smotkin et Wettstein, 1987). Le gène E6 peut transformer certaines cellules en culture à condition de le placer sous le contrôle d'un promoteur fort (Matlashewski *et al.* 1987a). Ce gène code pour une protéine basique de 15.5 kDa, se fixant à l'ADN et exerçant vraisemblablement des fonctions de régulation.

g) **Fonction du cadre de lecture ouvert E7**: Comme l'ORF E6, l'ORF E7 joue un rôle important dans la capacité du virus à transformer les cellules hôtes (Smotkin *et al.* 1987, Seedorf *et al.* 1987; Phelps *et al.* 1992). Les deux cadres E6 et E7 sont d'ailleurs toujours localisés de la même façon sur le génome de différents papillomavirus et codent pour des protéines présentant globalement les mêmes caractéristiques (Berg *et al.* 1986). Le gène E7 intervient dans le maintien de la réplication (Lusky et Botchan, 1985) du virus à l'état épisomal en augmentant le nombre de copies présentes dans le noyaux des cellules infectées, et joue également un rôle dans la transformation. Il code pour une protéine cytoplasmique phosphorylée (Smotkin et Wettstein, 1986) d'environ 17 à 20 kDa chez le HPV16.

1.4.3.2.2 **Région tardive**

a) **Fonction du cadre de lecture ouvert L1**: Cet ORF est hautement conservé entre les différents papillomavirus (Fuchs *et al.* 1986). Ce cadre correspond à un gène tardif qui code pour une protéine majeure de la capsid virale. Il porte les antigènes de groupes communs à tous les papillomavirus, ainsi que certains

antigènes spécifiques (Pfister, 1984; Salzman et Howley, 1987; Syrjänen *et al.* 1987; Gross *et al.* 1989; Pfister, 1990).

b) Fonction du cadre de lecture ouvert L2: Cet ORF est moins conservé que le cadre L1. Il correspond à un autre gène tardif codant pour la protéine mineure de la capsidie et portant également certains déterminants antigéniques (Meinke et Meinke, 1981; Chen *et al.* 1982; Salzman et Howley, 1987; Syrjänen *et al.* 1987; Gross *et al.* 1989; Pfister, 1990).

1.4.3.3 Fonction de la région non-codante

Tous les génomes de papillomavirus comportent une région non codante située entre la fin du cadre L1 et le début du cadre de lecture E6. Cette localisation est invariable, mais sa taille est variable allant de 500 à 1000 pb. Cette région non-codante est complexe et comporte vraisemblablement un ensemble de signaux de régulation gouvernant l'expression du génome viral et sa multiplication. Cette région comporte à la fois des signaux de polyadénylation permettant par exemple la terminaison de la transcription des ORF tardifs, et les signaux d'initiation impliqués dans la transcription de nombreux messagers précoces. On y trouve une structure de type promoteur comportant une "TATA box", ainsi que des activateurs de la transcription. Chez certains virus de papillome, notamment les HPVs impliqués dans les carcinomes on y trouve un site homologue de l'activateur des gènes sensibles aux corticostéroïdes. Cette séquence permettrait un contrôle positif par les récepteurs des hormones stéroïdiennes (Salzman et Howley, 1987; Syrjänen *et al.* 1987; Gross *et al.* 1989; Pfister, 1990).

2. PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES PAPILLOMAVIRUS ET IMPORTANCE DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE

2.1 Interaction virus du papillomé - cellule hôte

Les papillomavirus présentent *in vivo* un tropisme strict pour les kératinocytes des épithéliums en cours de différenciation (Croissant *et al.* 1985; Jarrett 1985, Kreider et Bartlett, 1985; Halbert *et al.* 1992; Hummel *et al.* 1992; Meyers *et al.* 1992). Ils ne s'expriment et ne se répliquent qu'en association étroite avec les processus de différenciation terminale des épithéliums stratifiés (Figure 4), soit de la peau, soit des muqueuses (Kreider et Barlett, 1985; McCance 1986; Hummel *et al.* 1992; Meyers *et al.* 1992). Avant de décrire ces interactions, rappelons la morphologie générale de la peau et les processus de différenciation épidermique chez l'homme (Orth et Favre 1985; Alberts *et al.* 1986; Darnell *et al.* 1988).

2.1.1 Structure et différenciation des épithéliums stratifiés

2.1.1.1 La peau

La peau est un organe complexe composé d'un épiderme séparé du derme sous-jacent par une membrane basale riche en collagène, en laminine et en glycosaminoglycanes (Alberts *et al.* 1986; Darnell *et al.* 1988).

L'épiderme est constitué de plusieurs couches cellulaires superposées, représentant différentes étapes de différenciation des kératinocytes. Reposant directement sur la membrane basale, se trouvent les cellules basales, en

prolifération active, *stratum germinativum*. Les cellules filles issues de la divisions des cellules basales ou (cellules supra-basales) ne se divisent plus, mais entament un processus de différenciation et de migration vers la surface de l'épiderme qui les conduira à former successivement le *stratum spinosum* (*couche de Malpighi*), le *stratum granulosum* puis le *stratum corneum* (encore appelé *couche cornée*). Le *stratum spinosum* est ainsi nommé par référence aux structures d'aspect épineux présentes à la surface des kératinocytes et correspondant aux nombreux dermosomes. La couche granuleuse doit son nom à la présence de granules de kératohyaline, riches en filagrine. Le *stratum corneum* est composé de cornéocytes anuclées contenant des réseaux denses de kératine et de filagrine et d'une enveloppe formée de protéines polymérisées par pontages inter-protéiques. Cette couche cornée est la barrière isolante conférant à la peau sa résistance à l'eau, à la chaleur, à l'abrasion. Les cellules cornées se desquament et sont remplacées régulièrement par de nouvelles cellules sous-jacentes. La différenciation des cellules épidermiques est donc un processus continu; elle s'accompagne, depuis la membrane basale jusqu'à l'enveloppe cornée, de l'activation et de l'extinction successives de gènes codant pour différentes kératines caractéristiques. Ces kératines sont des constituants du cytosquelette cellulaire que l'on trouve spécifiquement dans les cellules épithéliales (Alberts *et al.* 1986; Breitburd, 1987; Taichman et Laporta, 1987; Darnell *et al.* 1988).

Le derme est une matrice fibreuse complexe, de nature conjonctive, contenant principalement des fibroblastes (qui servent de support et élaborent le collagène,

l'élastine, les glycosaminoglycanes et les glycoprotéines de structure), des histiocytes et des cellules sanguines (Alberts *et al.* 1986; Darnell *et al.* 1988).

2.1.1.2 Les muqueuses

Les épithéliums muqueux se différencient globalement de la même manière, mais ils contiennent des kératines différentes et ne forment jamais de couche cornée. De plus, ces épithéliums internes sont maintenus dans un état humidifié grâce à des glandes sécrétrices (Alberts *et al.* 1986; Darnell *et al.* 1988).

2.2 La dépendance de la réplication du virus sur la différenciation cellulaire

La différenciation des épithéliums stratifiés est donc un processus complexe, progressif, qui fait intervenir l'expression successive de programmes génétiques différents. On connaît de nombreux marqueurs de différenciation dont les expressions sont modulées, au niveau transcriptionnel, dans les différentes couches de l'épiderme. L'obligation, pour le virus, de se développer de façon séquentielle dans ces différentes cellules et de parcourir les différentes étapes de son cycle de multiplication en relation étroite avec des niveaux précis de différenciation (Figure 4), implique que son expression dépend de signaux semblables à ceux gouvernant la mise en oeuvre des programmes de différenciation successifs. C'est là un exemple d'adaptation particulièrement sophistiqué d'un virus à un contexte physiologique particulier (Orth *et al.* 1977; Breitbart, 1987; Taichman et Laporta, 1987).

2.3 Cycle de développement du virus de papillome et différenciation cellulaire

Après infection, les virus du papillome peuvent se maintenir à l'état latent dans les cellules basales (Frenzy *et al.* 1985), mais se développent et se multiplient dans les kératinocytes en cours de différenciation (Figure 4) (Taichman et Laporta, 1987; Orth *et al.* 1977; McCance *et al.* 1988). Par hybridation *in situ*, on peut détecter une répllication végétative de l'ADN viral dans les couches supra-basales, mais la production des protéines de capsid et les assemblages de virions n'ont lieu que dans les couches superficielles de l'épiderme. Le cycle de développement du virus est étroitement synchronisé avec la différenciation en strates des épithéliums (Figure 4) (Orth *et al.* 1977; Taichman et Laporta, 1987; Breitburd, 1987).

Le cycle infectieux d'un virus de papillome humain est schématisé dans la Figure 4. Après infection des cellules basales, le virus se réplique dans les kératinocytes pour donner des particules virales au niveau des couches supérieures de l'épiderme. Ces particules virales sont disséminées lors de la desquamation des cornéocytes et peuvent réinfecter un nouvel hôte. L'infection par un virus de papillome n'aboutit cependant pas systématiquement à la production de nouveaux virions. Dans certains cas, l'infection par certains types particuliers de ces virus peut aboutir à un développement non-productif et induire alors un état pré-tumoral pouvant évoluer vers un carcinome sous l'influence de facteurs génétiques ou épigénétiques (Figure 4) (Ikenberg, 1989).

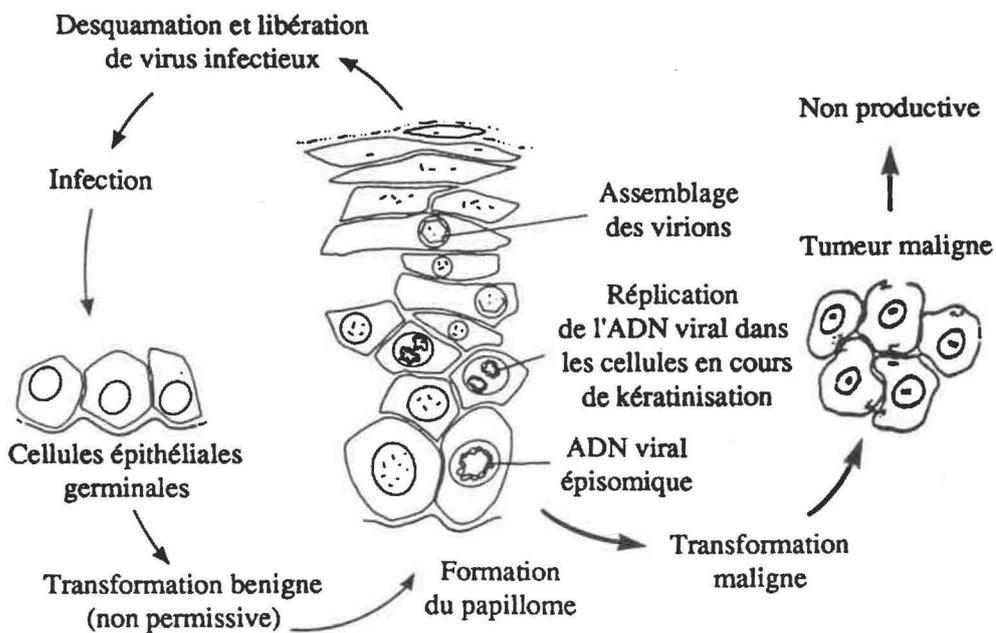
FIGURE 4 Cycle de développement du virus du papillome dans les lésions bénignes et malignes (A) et synchronisation de la réplication virale en fonction de la différenciation cellulaire (B).

On voit que in vitro, l'assemblage des virions ne se produit que dans les cellules en voie de différenciation terminale. L'infection, par contre, atteint seulement les cellules basales peu différenciées (A). La synchronisation entre la maturation de la particule virale et la différenciation des cellules infectées est explicitée en B.

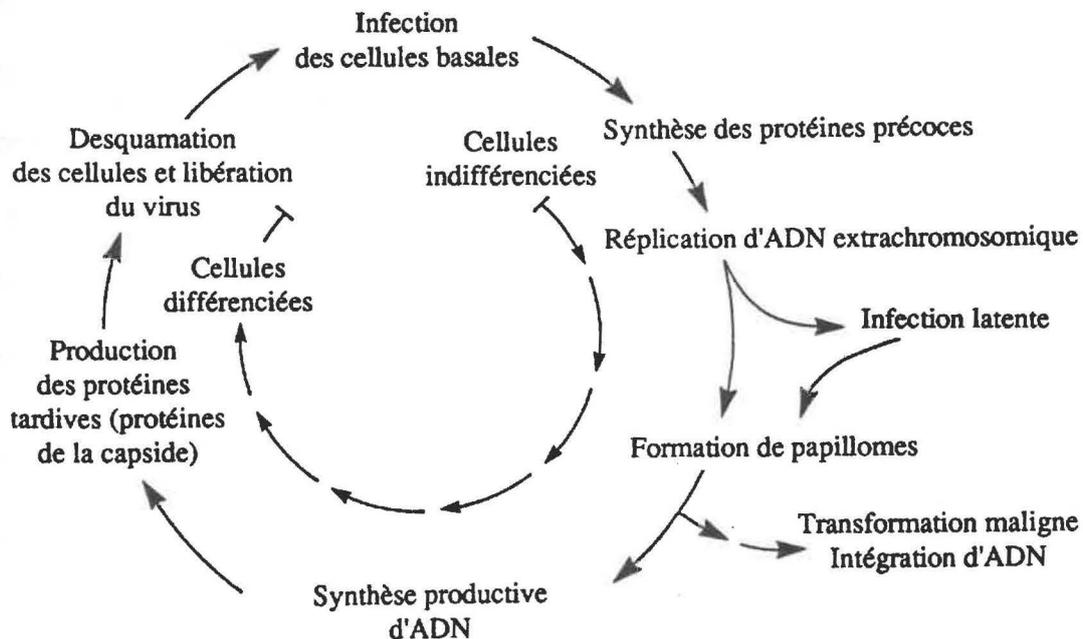
(A) Adapté de Taichman et Laporta, 1987.

(B) Adapté de Auborn et Steinberg, 1990.

A



B



2.4 Expression du virus du papillome et différenciation cellulaire

L'expression du virus dans les épithéliums en voie de différenciation entraîne toute une série de modifications anatomiques, comme l'épaississement des couches spineuses et granuleuses et l'hypertrophie des couches cornées. Ceci semble indiquer un blocage de la différenciation terminale responsable de la desquamation. Au niveau intracellulaire, les infections par les virus de papillomes se caractérisent par des modifications diverses, variables selon le type de virus et l'organe affecté. On observe par exemple des inclusions cytoplasmiques, des vacuolisations (ou koïlocytoses) (Meisels *et al.* 1981; Salzman et Howley, 1987; Syrjänen *et al.* 1987; Gross *et al.* 1989; Pfister, 1990) et des modifications du spectre d'expression des kératines. La koïlocytose est une modification caractéristique de l'infection par les virus de papillome : c'est une vacuolisation cytoplasmique des cellules provoquant l'apparition de cavitations périnucléaires, avec des bords irréguliers et présentant des amas denses autour de la cavitation; les cellules portant ces modifications sont appelées koïlocytes. Enfin, on a trouvé des antigènes viraux dans les noyaux des cellules infectées (Meisels et Fortin, 1976; Meisels *et al.* 1977; Salzman et Howley, 1987; Syrjänen *et al.* 1987; Gross *et al.* 1989; Pfister, 1990).

Ces associations étroites entre les processus de différenciation et le développement du virus expliquent l'insuccès des essais de culture du virus *in vitro* (Taichman *et al.* 1984; Kreider *et al.* 1985; Salzman et Howley, 1987; Syrjänen *et al.* 1987; Gross *et al.* 1989; Pfister, 1990).

3. LES VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN (HPV)

3.1 Étude et caractérisation des virus de papillome humain (HPV)

Chez l'homme, les effets pathologiques des papillomes dépendent à la fois du sous-type viral et de sa cible tissulaire (Pfister et Fuchs, 1987). L'infection peut se produire au niveau de brèches cutanées, par contact direct ou indirect (le virus est très résistant), par transmission sexuelle ou encore par infection péri-natale. Le rôle du système immunitaire dans le développement de ces infections n'est pas encore clarifié (Seski *et al.* 1978; Jablonska *et al.* 1979; Obalek *et al.* 1980; Jablonska et Orth, 1983; Zur Hausen, 1986). Il semble cependant que les infections latentes soient communes, et que l'on observe souvent le déclenchement brutal de verrues chez des malades immunodéprimés (Hsu, 1974), soit chimiquement à l'issue de traitements post greffes (Penn, 1986; Blohme et Bryuger, 1985), soit spontanément comme au cours de la grossesse (Berg et Lampe, 1981; Sillman *et al.* 1984), ou de certains cancers et plus récemment du SIDA (Rudlinger *et al.* 1988). Les facteurs d'activation du développement de ces virus sont inconnus. De plus, les virus des papillomes humains comprennent de nombreux types différents et l'infection par l'un quelconque de ces virus ne confère aucune résistance vis-à-vis des autres. On connaît ainsi des cas où plus de dix types différents d'HPV se sont développés simultanément chez le même malade notamment dans des cas d'*épidermodysplasia verruciformis* (Jablonska et Orth, 1985).

Jusqu'à ce jour les papillomavirus humains ne peuvent pas être cultivés *in vitro* (Broker et Botchan, 1986; Gross *et al.* 1989; Pfister, 1990). La seule possibilité d'étudier leur fonctionnement est de construire des plasmides chimériques, comportant des gènes provenant de virus HPV associés à un marqueur dominant permettant une sélection positive des cellules portant ce type de plasmide. Les connaissances sur le fonctionnement moléculaire de ces virus proviennent presque exclusivement des données de séquences obtenues à partir de génomes viraux clonés (De Villiers *et al.* 1981; Gissmann *et al.* 1982; Durst *et al.* 1983; Law *et al.* 1979; Boshart *et al.* 1984; Lorincz *et al.* 1986; Beaudenon *et al.* 1986).

L'utilisation de sondes moléculaires clonées a également permis de mettre en évidence l'existence de nombreux sous-types viraux dans des lésions bénignes ou malignes de la peau et des muqueuses (Law *et al.* 1979; De Villier *et al.* 1981; Gissmann *et al.* 1982; Dürst *et al.* 1983; Boshart *et al.* 1984; Beaudenon *et al.* 1986; Manos *et al.* 1989). Contrairement à la démarche classique suivie pour tous les autres virus, on ne dispose pratiquement pas d'anticorps ayant permis de définir des groupes et des différences sérologiques entre les virus. Seuls, les types 1 et 4 sont connus pour être sérologiquement différents (Pfister, 1990). Les distinctions sont basées sur les différences que l'on mesure par hybridation entre les génomes viraux. Les génomes viraux, ainsi typés par hybridation, clonés et séquencés à partir de prélèvements provenant de lésions variées, présentent une extraordinaire diversité. Si l'on retrouve une organisation globale identique des cadres de lecture (Figure 3), les homologies de séquences nucléiques descendent fréquemment au-dessous de 50%. Les ADN de certains types d'HPV ne

présentent aucune réaction d'hybridation croisée (types 1, 2, 4, 7), alors que d'autres présentent des hybridations partielles (par exemple, environ 30% entre les HPV 2, 3, 10 et 28, ou encore de 5 à 40% d'homologie entre les HPV 5, 8, 12, 14, 19, 23 et 26). On dénombre actuellement chez l'homme une soixantaine de sous-types différents (Pfister, 1990). Deux papillomavirus sont reconnus comme différents lorsque les homologies de séquences entre leur génome respectif descendent au dessous de 50% (Wickenden *et al.* 1985).

3.2 Aspects pathologiques des virus de papillome humain (HPV)

Les syndromes cliniques et les manifestations pathologiques des infections par HPV, sont variées et difficiles à décrire succinctement. On peut cependant souligner la grande variété des pathologies dans lesquelles tous ces virus sont impliqués (Tableau 1). Ces virus sont les agents étiologiques de verrues palmaires, plantaires, profondes ou superficielles, de verrues ano-génitales, de condylomes, de papillomes laryngés, de l'épidermodysplasie verruciforme ainsi que de certaines hyperplasies focales orales. Enfin, certains sous-types des virus de papillomes sont également impliqués dans le développement des cancers du tractus génital mâle et femelle (Gross, 1987; Oriel, 1987; Phelps *et al.* 1992; Chan *et al.* 1992).

3.2.1 Virus de papillome humain (HPV) et cancers génitaux

3.2.1.1 Epidémiologie

Nous évoquerons principalement dans cette partie l'historique des relations entre les cancers génitaux humains et les papillomavirus (Syrjanen, 1987). Ces

relations sont maintenant bien établies sur la base de nombreuses données épidémiologiques et biochimiques. A titre d'exemple, on peut rappeler que les fameuses cellules HeLa, mises en culture il y a près de 40 ans à partir d'un adénocarcinome du col de l'utérus, se sont avérées des cellules transformées par le HPV18, contenant de l'ADN viral à l'état intégré et exprimé dans ces cellules de façon constitutive (Schwartz *et al.* 1987).

Depuis longtemps, le développement de cancers du col de l'utérus et d'autres cancers de la femme ou de l'homme est associé à des facteurs de risque évoquant une étiologie infectieuse (Oriel, 1987; Syrjänen, 1987). La fréquence de ces cancers est reliée à la promiscuité sexuelle, à la précocité dans les rapports, au nombre de partenaires, à une mauvaise hygiène et à des épisodes infectieux multiples (Zur Hausen, 1977; Zur Hausen, 1982; Syrjänen 1984; Syrjänen *et al.* 1984). La fréquence des cancers cervicaux est aussi proportionnelle à la fréquence des cancers du pénis (Gross *et al.* 1986), bien que ces derniers soient beaucoup plus rares (Villa et Lopes, 1986). Dans les régions où le nombre de cancers cervicaux est élevé, le nombre de cancers du pénis l'est proportionnellement. Des études statistiques ont également montré que la probabilité d'apparition de cancers du pénis est plus élevée chez les hommes dont la partenaire a développé un cancer du col que dans une population témoin. Tous ces facteurs suggèrent fortement l'intervention d'un agent contagieux, dont la transmission se ferait par voie vénérienne (Syrjänen, 1987).

La recherche d'un agent infectieux transmissible sexuellement a conduit à suspecter des virus tels que l'herpès et le cytomégalovirus, mais sans qu'aucune relation réellement convaincante n'ait jamais été établie avec ces agents infectieux (Salzman et Howley, 1987; Syrjänen *et al.* 1987).

L'idée d'une association entre des lésions papillomateuses et le développement de cancers était une autre hypothèse. Il est extrêmement difficile d'établir avec certitude qu'un virus est impliqué dans une étiologie tumorale humaine pour des raisons pratiques et éthiques évidentes. Les critères classiques (association systématique du virus avec la tumeur, induction de tumeur de même type chez l'animal par le virus isolé, étude des effets transformants *in vitro* ne sont que partiellement remplis dans le cas des HPV et des cancers génitaux, et la mise en évidence de cette association a été un long processus, faisant intervenir de nombreuses observations cliniques et histologiques (Pfister, 1990).

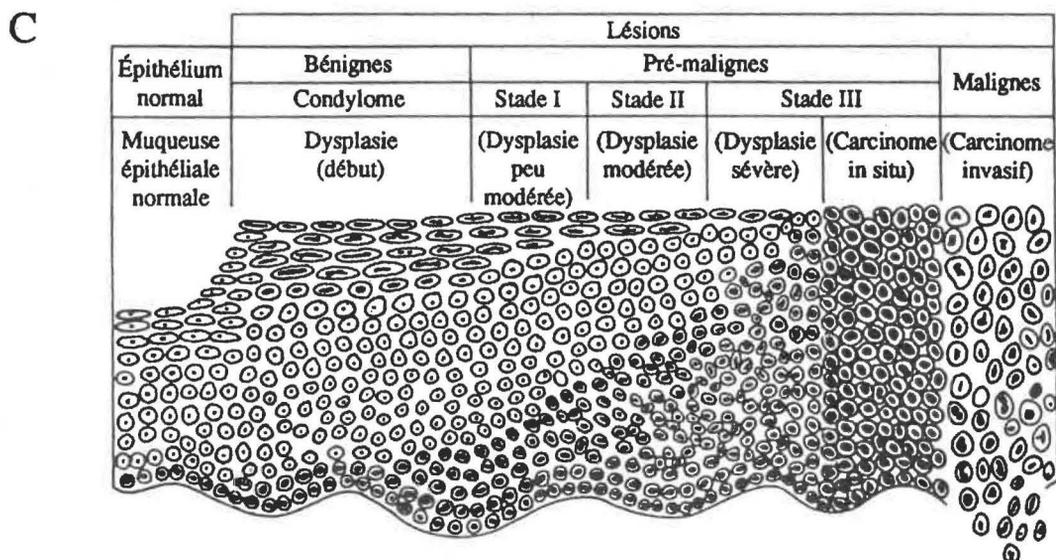
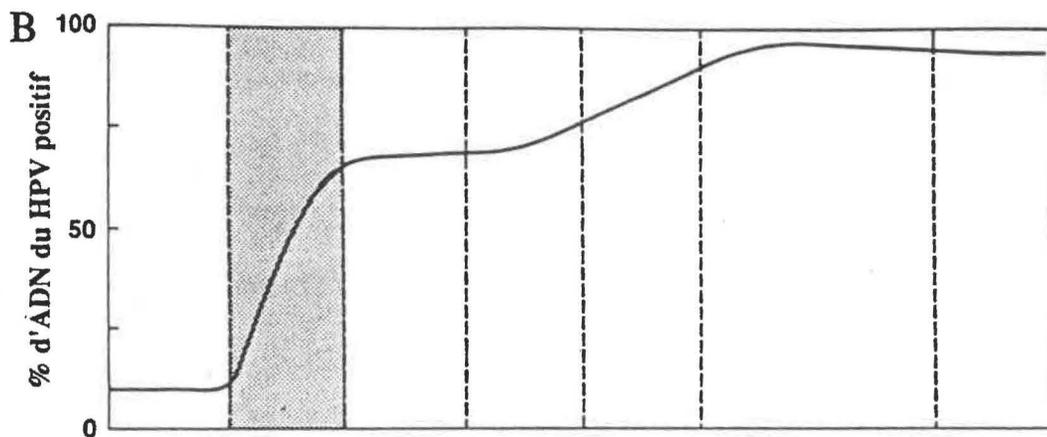
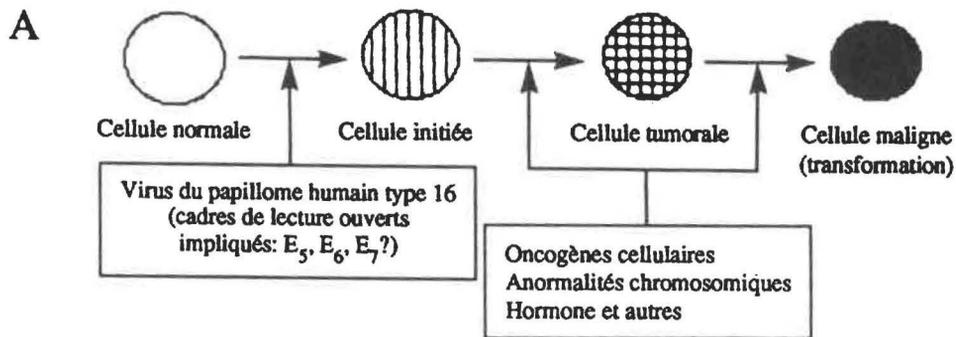
Il fallait tout d'abord comprendre l'étiologie infectieuse des lésions génitales bénignes ou malignes. Les condylomes et verrues des voies génitales sont des MST communes et font partie des maladies vénériennes transmissibles connues depuis l'Antiquité. On sait à présent que ce sont les virus des papillomes qui sont les agents de ces dysplasies affectant les muqueuses de l'appareil génital. Les papillomavirus provoquent également des lésions au niveau d'autres muqueuses, comme des papillomes laryngés (type 6 et 11, 30 et 40) et des hyperplasies épithéliales focales orales (type 13, 32). Les papillomes laryngés apparaissent surtout sur les cordes vocales, la muqueuse laryngée et au niveau de la trachée.

L'hyperplasie épithéliale hyperfocale orale, quant à elle, est une affection rare de la muqueuse buccale, ne touchant que certaines populations (Syrjänen, 1987).

De nombreuses observations cytologiques suggéraient des corrélations entre l'aspect des lésions pré-cancéreuses et l'aspect de lésions à papillomavirus (Figure 5). C'est la présence de koïlocytes, cellules comportant des inclusions cytoplasmiques caractéristiques, qui évoqua une infection par un papillomavirus. Des koïlocytes étaient en effet fréquemment présents dans des frottis provenant de femmes affectées de lésions génitales bénignes ou malignes (Meisels *et al.* 1984). Ces hypothèses sur le rôle des papillomavirus ne trouvèrent leur confirmation que grâce au clonage des génomes des HPV et aux hybridations entre ces sondes et l'ADN de cellules provenant des lésions génitales (Gismann *et al.* 1982; Dürst *et al.* 1983).

C'est dans des verrues génitales (condylomes) dont on connaissait la nature infectieuse que furent observées pour la première fois des particules virales de type papillome, et c'est également à partir de ces lésions que fut cloné le virus HPV6 (De Villier *et al.* 1981). A partir de cette première sonde, de nombreux autres virus furent isolés qui permirent à leur tour le clonage d'autres types de virus HPV (Dürst *et al.* 1983; Gismann *et al.* 1982; Boshart *et al.* 1984; Lorincz *et al.* 1986; Beaudenon *et al.* 1986). La présence de génomes d'HPV, intégrés dans l'ADN cellulaire de tumeurs ou de lésions pré-cancéreuses génitales (Figure 4), est maintenant bien établie (Wettstein, 1990).

FIGURE 5 Modèle de progression de la transformation par le virus du papillome humain type 16 (HPV16) (A). Fréquence d'infection du cervix par le HPV par analyse du type southern au cours de l'évolution vers la transformation maligne. L'axe de x dans le graphique B correspond aux différentes étapes de la transformation tel que schématisé en C. (B) et progression des lésions et changements histologiques au cours de la néoplasie intra-épithéliale cervicale (C).
(A) Adapté de Matlashewski, 1989.
(B) et (C) Adapté de Jenson et Lancaster, 1990.



Les études épidémiologiques ont également fait ressortir que la progression tumorale des lésions pré-néoplasiques pouvait se dérouler sur plus d'une dizaine d'années (Syrjänen *et al.* 1985). Une très longue latence peut donc séparer la primo-infection par un papillomavirus de l'apparition de la tumeur (Syrjänen *et al.* 1985). Cette observation est renforcée par les analyses des co-facteurs pouvant favoriser l'apparition des cancers génitaux (Zur Hausen, 1982; Vessy, 1986). En plus des épisodes infectieux multiples qui semblent nettement avoir un effet aggravant, certains facteurs d'environnement jouent également un rôle bien établi. L'environnement et les habitudes de vie pèsent sur le développement de ces cancers, et l'on mesure à présent l'importance de co-facteurs comme le tabac: la probabilité de développer un carcinome du col est plus élevée chez les femmes fumeuses que chez les non-fumeuses (Vessy, 1986). Cette association statistique a suscité des études biochimiques qui ont révélé la présence de nicotine et de produits de la combustion du tabac dans le mucus cervical. Cette localisation particulière de composés dont on connaît les effets carcinogènes suggère une intervention directe au niveau des cellules épithéliales et suggère aussi, maintenant que l'on a établi la présence et l'expression de virus dans ces tumeurs, un phénomène de co-cancérogénèse (Jablonska et Orth 1985).

3.2.2 Virus du papillome humain type 16 (HPV16), son importance et son implication dans le transformation cellulaire

3.2.2.1 Transformation *in vivo*

Ce sont les HPV de type 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39 (Tableau 1) et 42 qui affectent spécifiquement les muqueuses génitales. Ces différents sous-types peuvent se diviser en deux groupes selon leurs effets, estimés sur des bases anatomo-pathologiques. Le premier groupe comprend les types 6 et 11, virus à faible risque que l'on retrouve dans de nombreuses lésions différentes comme des condylomes du col, des condylomes ano-génitaux et aussi dans des papillomes du larynx et des dysplasies cervicales (Gissmann *et al.* 1982; Gissmann *et al.* 1983; Lehn *et al.* 1984; Halbert *et al.* 1992; Yaegashi *et al.* 1992). Ils ne sont jamais associés à des carcinomes épidermoïdes, on ne les retrouve que dans les lésions bénignes de type papillomateux (Gissmann et Zur Hausen, 1980). La présence de tels sous-types est donc un élément de pronostic très favorable pour la personne atteinte. Le second groupe comprend les autres types qui, en revanche, sont considérés comme des virus dangereux. On les trouve associés, par exemple, à des néoplasies intra-épithéliales aneuploïdes, à des carcinomes épidermoïdes du col et à des carcinomes de la vulve et du pénis (Boshart *et al.* 1984; Schwartz *et al.* 1985; Yee *et al.* 1985). Les HPV 16 et 18, par exemple, ont été isolés à partir de carcinomes cervicaux et semblent des virus dont la présence conduit à un pronostic d'évolution défavorable. La détection de papillomavirus de type 16 et

18 dans des lésions précancéreuses devrait donc amener à prendre des attitudes préventives particulières (Zur Hausen et Schneider, 1986).

L'utilisation de sondes moléculaires a permis le développement des recherches épidémiologiques et a abouti à montrer que plus de 90% des cellules cancéreuses provenant de carcinomes du col contenaient bien des génomes de virus HPV intégrés dans le génome cellulaire. En particulier, ces sondes ont permis d'établir des corrélations entre les infections à HPV et les probabilités de développement de carcinomes cervicaux (Law *et al.* 1979; De Villier *et al.* 1981; Gissmann *et al.* 1982; Dürst *et al.* 1983; Boshart *et al.* 1984; Beaudenon *et al.* 1986). Plus de 5% des femmes en bonne santé, apparemment asymptomatiques, sont actuellement porteuses de lésions génitales à HPV (De Villiers *et al.* 1987; Fuchs *et al.* 1988). Cette proportion s'élève à plus de 35% chez les femmes présentant des problèmes gynécologiques et suivies plus attentivement. Parmi les virus détectés, les types 16 et 18 sont largement représentés. La recherche d'infections virales chez les partenaires des femmes touchées par de telles infections s'est révélée positive, les mêmes types viraux étant alors présents dans des microlésions du pénis (Gross *et al.* 1986; Villa et Lopes, 1986).

Toutes ces études épidémiologiques, qui sont actuellement en plein essor, tendent à montrer qu'il n'y a pas de cancer du col utérin sans infection préalable à papillomavirus, attestée par la présence de génomes viraux intégrés à l'ADN cellulaire dans la majorité des cas (Manos *et al.* 1989).

3.2.2.1.1 Présence de génome du virus de papillome humain (HPV16) dans les cancers génitaux

Les études sur la structure et l'expression des génomes des papillomavirus dans les cellules cancéreuses ont surtout été menées à partir de carcinomes contenant les sous-types HPV 16 et 18 (Dürst *et al.* 1983; Lorincz *et al.* 1987; Band *et al.* 1991; Chan *et al.* 1992; Phelps *et al.* 1992). Ces deux virus présentent des organisations similaires, aussi bien dans leurs parties codantes que dans leur région régulatrice non-codante (Figure 3). La région régulatrice comporte même des structures exactement identiques chez ces deux virus. Ces homologues se reflètent vraisemblablement dans la similitude des tropismes et des effets pathologiques de ces deux virus. On peut cependant noter certaines différences dans les cancers associés aux types 16 et 18. Le type HPV16 est surtout présent dans des carcinomes squameux, chez les femmes âgées, alors que le type HPV18 est retrouvé principalement dans les adénocarcinomes de femmes plus jeunes, dont l'évolution est plus préoccupante. Les cellules HeLa, isolées dans les années 1950 à partir d'un adénocarcinome du col prélevé chez une jeune femme, comportent, comme on l'a déjà vu, un génome de type HPV18 intégré dans l'ADN cellulaire (voir section 3.2.1.1). Il peut donc être important de bien différencier ces deux virus, et l'on dispose pour cela de sondes spécifiques correspondant à des séquences différentes de leurs génomes.

Si les génomes viraux sont présents à l'état libre dans les verrues, les épidermodysplasies verruciformes et de façon générale dans la majorité des lésions

bénignes provoquées par les HPV (Gissmann *et al.* 1983; Lehn *et al.* 1984), en revanche, les génomes viraux sont intégrés au génome cellulaire dans les cellules cancéreuses, et en particulier dans les carcinomes génitaux (Wettstein, 1990). Les sites d'intégration de ces virus ne semblent pas, jusqu'à présent, correspondre à des *loci* particuliers comme chez d'autres *papoviridae*, bien que l'on ait trouvé certains proto-oncogènes cellulaires dans le voisinage de certains génomes viraux intégrés. Le pouvoir oncogène du virus semble donc dépendre surtout de ses propres gènes transformants et de leur dérégulation, plutôt que d'une quelconque activité de mutagenèse par insertion. Certains auteurs pensent même que l'intégration n'est pas une condition obligatoire à l'oncogenèse.

En effet, si les sites d'intégration dans le génome cellulaire semblent aléatoires, le site d'ouverture du génome viral est, lui, toujours localisé dans la même région (Schwartz, 1987). Dans les cellules de carcinomes, les génomes des HPV s'intègrent toujours de la même manière, parfois au niveau du gène E1 mais surtout au niveau du gène E2 (Schwartz *et al.* 1985; Schwartz, 1987). Dans le cas d'intégration des HPV16 ou 18 cartographiées, c'est toujours l'un de ces deux gènes qui est inactivé. Outre la perte de E2 par interruption du gène, on observe le plus souvent une délétion des régions tardives, mais le maintien systématique des cadres de lectures E6 et E7. Cette localisation particulière du site de cassure du génome viral, qui a pour effet de couper le cadre de lecture E2, supprimera ou modifiera profondément son produit. L'expression des gènes viraux, et en particulier celle des gènes transformants E6 et E7 qui sont normalement contrôlés par le produit de E2, sera ainsi dérégulée.

3.2.2.1.2 Expression du virus de papillome humain (HPV16) dans les cancers génitaux

a) Régulation de la transcription des gènes E6 et E7 du HPV16 associés à la transformation

On dispose actuellement de nombreuses lignées cellulaires provenant de carcinomes cervicaux permettant d'analyser à la fois les structures des sites d'intégration et l'expression des gènes viraux. Dans toutes ces lignées, les gènes E6 et E7 sont exprimés à des niveaux élevés (Schneider Grändicke et Schwartz, 1986; Smotkin et Wettstein, 1986; Shirasawa *et al.* 1991; Reuter *et al.* 1991; Phelps *et al.* 1992). Cette transcription extrêmement active contraste avec les niveaux d'expression beaucoup plus discrets que l'on trouve dans les cellules transformées par le BPV. Cette transcription intense se produit en l'absence de tout transactivateur viral et semble due à des activateurs constitutifs et spécifiques des cellules des épithéliums génitaux (Syrjänen, 1987; Band *et al.* 1991; Halbert *et al.* 1992).

L'absence ou la destruction du cadre de lecture E2, que l'on retrouve dans la très grande majorité des insertions des génomes viraux, est certainement à l'origine de cette transcription intense (Smotkin *et al.* 1986). En effet, le cadre E2 code à la fois pour un trans-activateur et pour un répresseur, grâce à l'utilisation d'un site alternatif d'initiation de la transcription. Il est probable que la régulation par ce dernier produit ne peut plus s'exercer dans les cellules contenant des génomes d'HPV intégrés au niveau de E2. Les activateurs constitutifs ou inductibles peuvent

alors fonctionner sans retenue. La région non-codante des HPV16 et 18 contient en effet une série de motifs pouvant stimuler la transcription et en particulier, un activateur dont le fonctionnement est stimulé par la présence des glucocorticoïdes (Syrjänen, 1987). Ces hormones peuvent transmettre leurs signaux grâce à des récepteurs nucléaires. Les hormones diffusent dans la cellule et se fixent sur une protéine nucléaire ayant de l'affinité pour l'ADN. La fixation de l'hormone sur son récepteur provoque une transition allostérique dans cette protéine, qui lui permet alors de reconnaître spécifiquement des séquences situées en amont de certains gènes. L'interaction entre le récepteur nucléaire et ces séquences activera alors la transcription des gènes adjacents. Ainsi, les hormones diffusibles, dont font partie les glucocorticoïdes, agissent directement au niveau de l'expression génétique par l'intermédiaire de ces récepteurs. La présence des récepteurs est indispensable à cette action, ce qui implique que les cellules capables de répondre à un effecteur donné seront exclusivement celles exprimant le récepteur nucléaire correspondant (Pater *et al.* 1988; Gross *et al.* 1987).

Les régions non codantes des HPV16 et 18 comportent une séquence de type GGTACANNNTGTTCT, reconnue par le récepteur nucléaire des glucocorticoïdes (Gross, 1987; von Knebel Doeberitz *et al.* 1991; Pater *et al.* 1992). Il a été montré par des expériences de protection contre les attaques nucléasiques, que cette séquence est bien reconnue par un récepteur des glucocorticoïdes (von Knebel Doeberitz *et al.* 1991). Lorsque le gène CAT est placé sous le contrôle de la région non-codante de l'HPV16, son expression devient dépendante de la présence de glucocorticoïdes et dépend étroitement du type cellulaire (Pater *et al.* 1992). Des

expériences de dissection moléculaire de la région non-codante montrent en effet que, chez les HPV16 et 18, cette région contient de multiples séquences d'activation de la transcription, soit inductibles, soit constitutives, mais spécifiques de certaines cellules. La combinaison de ces différents éléments aboutit à une stimulation intense de la transcription, pouvant multiplier plus de 100 fois son niveau de base (von Knebel Doeberitz *et al.* 1991).

b) Produit de la transcription de gène E6 et E7

Les transcripts exprimés dans les cellules cancéreuses font également l'objet de modifications post-transcriptionnelles particulières. Dans les carcinomes cervicaux, le produit primaire de transcription du gène E6 subit un épissage facultatif, générant ainsi un sous-messager codant pour une protéine E6* (Cornelissen *et al.* 1990; Shirasawa *et al.* 1991). Cette protéine, qui n'est produite que dans les lignées tumorales et exclusivement par les HPV16 et 18, partage avec E6 la séquence du côté N-terminal, mais est différente et plus courte du côté C-terminal. Enfin, l'on observe souvent l'expression d'ARN messagers hybrides, transcrits à la fois à partir de séquences cellulaires adjacentes au point d'insertion du génome virale et à partir des gènes viraux E6/E7 (Shirasawa *et al.* 1989).

Les gènes E6 et E7 des HPV16 et 18 peuvent transformer des cellules *in vitro* (Banks *et al.* 1991, Matlashewski *et al.* 1987, 1988; Matlashewski 1989; Halbert *et al.* 1992; Phelps *et al.* 1992). Les fonctions et les effets des protéines codées par ces deux gènes sont encore inconnus, mais l'on sait que leur pouvoir transformant nécessite un niveau élevé d'expression (expression de leurs gènes

sous le contrôle d'un promoteur fort, comme celui de SV 40) et la coopération d'un autre oncogène, comme *v-ras v-fos*, p 53 et *Rb* (Band *et al.* 1991). Cette coopération supporte l'idée que la présence d'un génome viral exprimant E6 et E7 est nécessaire, mais pas suffisante pour le développement de cancers génitaux (Matlashewski *et al.* 1987; Dyson *et al.* 1989; Band *et al.* 1991; Crook *et al.* 1991). *In vivo*, le long temps de latence pouvant séparer le moment de l'infection par le virus de celui du développement de la tumeur, indique que des événements génétiques supplémentaires sont certainement requis. Le virus, par l'intermédiaire de l'expression des gènes E6 et E7, joue probablement un rôle d'initiation, propice à une progression tumorale ultérieure. Le rôle oncogénique du gène E5 du HPV16 a été également rapporté (Leechanachai *et al.* 1992; Pim *et al.* 1992).

On sait que la présence de certains composés provenant de l'alimentation ou de certains modes de vie (tabac) favorisent l'apparition des cancers du col (Zur Hausen, 1982; Vessy, 1986). Les effets potentialisateurs de substances comme le tabac correspondent vraisemblablement à des actions de type mutagène, pouvant entraîner des activations oncogéniques. La mise en évidence *in vitro* d'effets directs de dérivés de goudrons sur des proto-oncogènes pouvant être activés par mutation fournit un modèle presque trop simple des événements de co-cancérogénèse qui sont vraisemblablement responsables de l'apparition des cancers papillomavirus-dépendants (Land *et al.* 1983; Ruley, 1983; Syrjänen et Kellokoski, 1990).

3.2.2.2 Transformation cellulaire *in vitro*

La première tentative de transformation *in vitro* avec du HPV a été rapportée en 1972 par Butel sur des cellules dérivées de plusieurs espèces (humain, singe, lapin, souris et cochon d'Inde). Aucun changement morphologique n'a été observé mais la durée de vie a été prolongée. Une stimulation de la synthèse d'ADN cellulaire a été observée après l'injection du HPV dans des cellules embryonnaires de rein humain et dans des fibroblastes de prépuce humain (Lancaster et Meinke 1975). Il faut noter qu'à cette époque, le problème d'hétérogénéité et de types de HPV n'était pas encore connu.

Les virus du papillome ne peuvent pas être propagés en culture *in vitro*. Les propriétés de transformation du HPV ont donc été étudiées essentiellement par transfection d'ADN de HPV cloné et la plupart des données sur la transformation cellulaire *in vitro* par le HPV ont été obtenues sur des modèles cellulaires murins (Matlashewski *et al.* 1988; Denis *et al.* 1989; Matlashewski, 1989; Banks *et al.* 1991).

Le Tableau 2 résume la littérature concernant la transformation cellulaire *in vitro*. Les kératinocytes et les fibroblastes humains ont été transformés *in vitro* par le HPV16 (Dürst *et al.* 1987; Pirisi *et al.* 1987). L'immortalisation par le HPV16 a été démontrée sur des kératinocytes de prépuce (Dürst *et al.* 1987; Sterling *et al.* 1990). Par ailleurs, aucune des lignées cellulaires de kératinocytes transformées par le HPV16 n'ont montré d'activité tumorigénique dans les souris nues (Dürst *et al.* 1987; Pirisi *et al.* 1987; Kaur and McDougall, 1988). Cette

TABLEAU 2. Transformation *in vitro* des cellules animales et humaines par le virus du papillome humain type 16 (HPV16).

Hôte	Cellules	Génome* Complet	Sousgénomique*	Transformation	Références
Souris	C127	+	nd	+	Watts <i>et al.</i> , 1984 Taniguchi <i>et al.</i> , 1990
Souris	NIH 3T3	+	nd	+	Yasumoto <i>et al.</i> , 1986
Souris	NIH 3T3	nd	+	+	Tsumukawa <i>et al.</i> , 1986
Souris	NIH 3T3	+	nd	+	Noda <i>et al.</i> , 1988
Souris	NIH 3T3	+	E6,E7	+(E7)	Vousden K., 1987 Gissmann et Dürst 1990
Rat	3 y1	+	nd	+	Kanda <i>et al.</i> , 1987
		nd	E6,E7,E6E7	+(E7,E6,E7)	Sato <i>et al.</i> , 1989
Rat	3 y1	nd	E6,E7	+(E7)	Kanda <i>et al.</i> , 1987 Watanabe <i>et al.</i> , 1992
Homme	Fibroblastes	+	nd	+	Pirisi <i>et al.</i> , 1987
Homme	Kératinocytes	+	nd	+	Pirisi <i>et al.</i> , 1987
Homme	Kératinocytes	+	nd	+	Kanda <i>et al.</i> , 1988 Romanezuk <i>et al.</i> , 1991

E (Gène precoce "Early").

nd (non déterminé).

* (Adapté de Gissmann et Dürst, 1990).

observation n'est pas suprenante du fait que la carcinogenèse en général est un processus qui procède par étapes successives. Le HPV est un facteur nécessaire mais pas suffisant dans le développement du cancer génital humain (Gissmann, 1988).

3.3 Biologie moléculaire: outil de prévention systématique dans les cancers génitaux associés au virus de papillome humain (HPV)

Paradoxalement, c'est avec les virus des papillomes, dont on ne connaît encore que peu de chose par rapport aux masses de données accumulées sur d'autres virus, que des applications des techniques de diagnostic dérivées de la biologie moléculaire pourraient se développer le plus rapidement. Les observations épidémiologiques, qui mettent en évidence une association entre un pronostic défavorable d'évolution de lésions prénéoplasiques du tractus génital et la présence de certains types de HPV, peuvent en effet conduire à des mesures de prévention systématiques. Des sondes correspondant aux différents types de HPV sont dès à présent disponibles, et les techniques d'analyses se simplifient de plus en plus (Banks *et al.* 1987a). On peut citer, en particulier, la mise au point de la technique de polymérisation en chaîne dite de "PCR" (polymerase chain reaction) (Saiki *et al.* 1985), qui permet d'envisager des détections de séquences virales rares de manière routinière. Cette technique consiste à amplifier la séquence que l'on recherche en utilisant deux oligonucléotides de synthèse (Grégoire *et al.* 1989; Manos *et al.* 1989). Les deux oligonucléotides s'hybrident de part et d'autre de la séquence, ce qui fournit des amorces pour une ADN polymérase. Chaque

séquence est ainsi dupliquée une première fois. On dénature ensuite, et les oligonucléotides en excès vont à nouveau s'hybrider sur les ADN d'origine et les ADN néosynthétisés pour permettre un nouveau cycle de réplication. Par une multiplication de ces cycles de dénaturation/-hybridation/élongation, on arrive rapidement à amplifier le signal par un facteur de 10^6 (Saiki *et al.* 1985; Mullis et Faloona, 1987). Une séquence unique devient ainsi facilement détectable par des sondes froides. Il est possible d'imaginer par cette méthode une recherche de génomes viraux dans des frottis et un typage précis. Des actions thérapeutiques et préventives peuvent alors être élaborées avec un ciblage bien défini, en fonction du sous-type viral détecté (Rotenberg *et al.* 1989; Young *et al.* 1989; Johnson *et al.* 1990; Snijders *et al.* 1990; Bavin *et al.* 1993; Margall *et al.* 1993). Toutes ces approches et ces exploitations pratiques sont actuellement en pleine évolution.

4. GÉNÉRALITÉS SUR LA PROLIFÉRATION ET LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE

4.1 Concept de la différenciation cellulaire

La différenciation d'une cellule déterminée est due à des gènes exprimés de manière sélective et temporelle et dont les produits permettent à la cellule d'exprimer un phénotype distinct. La différenciation terminale constitue donc l'étape finale du développement cellulaire. Sur le plan moléculaire, la différenciation est un ensemble continu d'évènements agissant sur une série de gènes différents dont le produit final est identifiable.

La différenciation cellulaire est un processus continu de développement de la spécificité cellulaire depuis le stade de l'oeuf fécondé jusqu'à l'acquisition d'un type cellulaire précis. Un oeuf fécondé est qualifié de totipotent parce qu'il donne naissance à un organisme entier par une succession de divisions et de spécialisations cellulaires. Au fur et à mesure de la progression du développement, le nombre et le type de cellules que peut former une cellule parentale sont de plus en plus restreints. Les cellules souches de deux ou trois lignées sont dites pluripotentes. Enfin, les cellules destinées à développer un seul type cellulaire, bien qu'elles soient encore embryonnaires, sont appelées unipotentes.

Le degré de différenciation cellulaire peut être évalué par l'expression de certains marqueurs au cours du programme de différenciation d'un type cellulaire donné. Il est possible de distinguer deux grands groupes de marqueurs de différenciation cellulaire:

- les marqueurs de différenciation cellulaires universels
- les marqueurs de différenciation cellulaires spécifiques

4.1.1 Marqueurs de différenciation cellulaire universels

Il s'agit de protéines normalement exprimées chez toutes les cellules, d'où le nom de marqueur cellulaire universel dont l'exemple type est l'actine. Plus en détail, l'actine des muscles squelettiques ne représente que l'un des six types différents d'actine synthétisées dans les cellules des vertébrés. Toutes les espèces d'eucaryotes, sauf les plus primitives, possèdent de multiples gènes d'actine

codant pour des protéines légèrement différentes, exprimées dans des tissus différents ou à des stades différents du développement. Les gènes d'actine sont extrêmement conservés. Les molécules d'actine d'origine radicalement différente sont fonctionnellement interchangeables. Les principales propriétés des molécules d'actine extraites du muscle squelettique sont donc partagées par les molécules d'actine de tous les autres tissus, d'où la qualification de l'actine comme marqueur de différenciation universel (Huxley, 1969; Franke *et al.* 1978).

4.1.2 Marqueurs de différenciation cellulaire spécifiques

Il s'agit de marqueurs de différenciation cellulaires qui sont exprimés de façon différentielle au cours du programme de différenciation ou qui sont propres à un type cellulaire. Par exemple, la kératine est spécifique des cellules épithéliales, la myosine des cellules musculaires, les neurofilaments (Vielkind *et al.* 1989) des cellules neurales. Parmi les protéines que l'on rencontre dans la plupart des cellules et qui sont exprimées de façon différentielle au cours du programme de différenciation, il y a la fibronectine (Hynes, 1982), la vimentine (Franke *et al.* 1979) et le N-CAM (Moore *et al.* 1987).

La fibronectine est une composante majeure de la matrice extracellulaire que l'on trouve dans tous les tissus (Hay, 1981). Il s'agit d'une glycoprotéine qui se trouve sous forme d'aggrégats de grandes dimensions dans l'espace extracellulaire. La majeure partie de la protéine n'est pas directement liée aux cellules, une fraction se fixe à la surface des fibroblastes et à celle d'autres cellules lorsqu'elles sont cultivées. La fibronectine commença à attirer l'attention dès qu'on découvrit

qu'elle était présente en quantité infime à la surface de fibroblastes dérivés de tumeurs contrairement à un taux élevé chez les fibroblastes normaux (Yamada et Olden, 1978; Ruoglahti *et al.* 1981; Hynes, 1982).

La vimentine est une composante des filaments intermédiaires de masse moléculaire de 55 kDa qui pourrait être copolymérisée avec d'autres sous-unités spécifiques du type cellulaire. C'est une protéine retrouvée dans les fibroblastes et beaucoup d'autres types cellulaires (Franke *et al.* 1979).

Les N-CAM sont des molécules intercellulaires d'adhésion originellement identifiées dans des cellules neurales (N-CAM). Ce sont des glycoprotéines de masse moléculaire de 145 kDa responsables des liaisons entre cellules. Les N-CAM sont également exprimées dans les myoblastes (Covault *et al.* 1986; Moore *et al.* 1987).

La kératine est une protéine fibreuse insoluble exprimée dans les cellules épithéliales. Il y a de nombreux types différents de kératines codés par une importante famille de gènes, qui a probablement évolué par duplications et mutations à partir d'un gène ancestral. Différents types de kératines sont produites dans différentes couches de l'épiderme. Elles sont donc fonction du degré de différenciation des cellules épithéliales (Fuchs et Green, 1980).

L'évaluation qualitative et quantitative des produits d'expression de ces marqueurs de différenciation cellulaire constitue une bonne indication sur l'état de la cellule.

4.2 Corrélation entre la croissance et la différenciation cellulaire

Traditionnellement, la croissance et la différenciation ont été considérées comme mutuellement exclusives. Au début de l'embryogénèse, la croissance cellulaire est intense mais plus tard, au moment de la différenciation, les cellules ne se divisent pas aussi fréquemment. Les cellules différenciées de manière terminale ont perdu leur potentiel de réplication. Un bon exemple est celui des cellules de la peau; les kératinocytes. Cette relation négative entre la croissance et la différenciation peut également être observée dans les cellules en culture *in vitro*. Par exemple, les myoblastes continuent leur croissance en culture cellulaire *in vitro*, mais lorsqu'ils sont soumis à certaines conditions réduisant leur croissance, la différenciation terminale en syncytium puis en myocytes se produit (Yaffe, 1968). L'état terminal de la différenciation est clairement incompatible avec la croissance et la division cellulaire (Cheng *et al.* 1974).

4.3 Modèles cellulaires d'étude de la prolifération et de la différenciation

4.3.1 Les myoblastes

En culture cellulaire *in vitro*, les myoblastes gardent leur capacité de prolifération, et leur capacité de fusionner et de se différencier en myotubes en réponse à un changement approprié dans les conditions de culture (Yaffe, 1969) et ce modèle a été utilisé notamment par Kubo (1991c).

4.3.2 Différenciation des myoblastes

Les myoblastes en culture *in vitro* se différencient de façon synchrone si l'on modifie de façon appropriée le milieu de culture (par exemple en substituant le sérum de cheval au sérum bovin). Ils représentent donc un modèle pratique pour l'étude moléculaire du contrôle de l'expression génique pendant la différenciation. La différenciation des myoblastes nécessite des changements coordonnés de l'expression de nombreux gènes. Dans l'état prolifératif, le produit de ces gènes est absent ou présent en très faible quantité. Cependant, une fois la différenciation induite, un grand nombre de protéines caractéristiques apparaissent tels que les récepteurs d'acétylcholine (Merlie *et al.* 1977). La synthèse de ces protéines devient détectable juste avant la fusion (Yaffe, 1969).

4.4 Interaction virus et prolifération/différenciation cellulaire

Plusieurs mécanismes ont été proposés afin de tester la transformation cellulaire qui aboutit à la stimulation de la prolifération et l'inhibition de la différenciation (Reiss *et al.* 1989). Les polypeptides codés par les virus oncogènes peuvent altérer un composant cellulaire unique qui à son tour affecte une grande variété de fonctions cellulaires pour donner naissance au phénotype néoplasique ou bien le produit de l'oncogène peut lui même altérer directement différents composants de la cellule. De nombreux chercheurs pensent que la deuxième alternative est plus vraisemblable (Band *et al.* 1991; Inoue *et al.* 1992; Shay *et al.* 1993).

Même si les produits de la traduction de nombreux oncogènes semblent affecter beaucoup de fonctions cellulaires différentes, il est possible que seuls quelques uns de ces effets soient nécessaires à la cancérisation (Shay *et al.* 1993). Si la division anarchique se trouve au coeur du phénotype néoplasique, la différence fondamentale distinguant une cellule cancéreuse d'une cellule normale pourrait être son incapacité à s'arrêter au point de restriction (R) du cycle dans les conditions qui provoquent l'arrêt des cellules normales. Peu ou pas de cellules néoplasiques cultivées *in vitro*, ne sont arrêtées de manière préférentielle au point R (Shay *et al.* 1993). Au lieu de cela, elles arrêtent leur croissance en des points très divers du cycle cellulaire en particulier quand elles sont privées de nourriture ou soumises à des conditions toxiques. Une manière pour les oncogènes de perturber le mécanisme normal de régulation de la croissance est d'empêcher la différenciation cellulaire normale dans une cellule qui conserve ainsi un potentiel de croissance illimité. En fait, de nombreuses cellules tumorales sont moins bien différenciées que leurs équivalents normaux (Smith *et al.* 1979). Les cellules cancéreuses sont immortalisées et à la différence des cellules normales, elle n'ont pas une durée de vie limitée en culture. Beaucoup de virus associés à l'oncogénèse peuvent conférer l'immortalité à leur cellule hôte (Auersperg *et al.* 1991; Rochford *et al.* 1993).

Par ailleurs, un virus tumoral peut simplement surcharger la cellule hôte avec le produit d'un gène cellulaire normal intervenant dans le contrôle de la division cellulaire (ou non). Il semble que ce soit uniquement à cause de la présence excessive de ce produit que la cellule transformée soit entraînée à proliférer de façon anarchique, ce qui engage la cellule sur une voie de la malignité et inhibe son

potentiel d'évolution dans son programme de différenciation (Bishop, 1981; Oskarsson *et al.* 1980).

5. MÉTHODES D'ÉTUDES DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE

5.1 Méthodes d'études usuelles

Il existe plusieurs lignées de cellules embryonnaires peu différenciées telles que les myoblastes L6 de rat (Yaffe, 1968; Yaffe, 1969; Kidokoro 1975), C2 de souris (Caffrey *et al.* 1989) qui permettent de suivre certaines étapes de la différenciation. Des cultures primaires de plusieurs types d'animaux tel que le poulet (Kano *et al.* 1987; Hune et Thomas 1989; Kano *et al.* 1989), le rat (Frelin *et al.* 1984; Ganoi *et al.* 1985; Cognard *et al.* 1986; Weiss et Horn, 1986, Beam et Knudson, 1988) la souris (Beam et Knudson, 1988; Ganoi et Hasegawa, 1988) et aussi l'homme (Trautmann *et al.* 1986) sont aussi utilisées dans ce but. Toutes les études citées ci-dessus ont été axées sur les modifications morphologiques qui accompagnent les différents stades de la différenciation. Chaque stade est associé à l'expression génétique de marqueurs spécifiques. Il existe différentes techniques utilisant les marqueurs de différenciation. Elles sont liées soit à des antigènes spécifiques soit à des réactions enzymatiques également spécifiques comme la transglutaminase pour les kératinocytes (Lichti *et al.* 1988). La microscopie électronique (Abercrombie *et al.* 1971; McNutt *et al.* 1971; Goldman et Knipe, 1972; McNutt, 1973; Izzard et Lochner, 1976) ou optique permettent de suivre par marquage immunologique le produit d'un gène donné. Les analyses en microscopie de fluorescence sont cependant le plus souvent utilisées (Hynes,

1973; Hynes et Bye, 1974; Ali *et al.* 1977; Mautner et Hyne, 1977; Naheri et Mosher, 1978). L'analyse qualitative et quantitative d'antigènes se fait souvent par marquage immunologique en cytométrie de flux (Horan *et al.* 1975; Hand *et al.* 1978; Leary *et al.* 1976; Elmendorf *et al.* 1988). L'expression génétique peut être également étudiée au niveau du produit de la transcription. Son évaluation transcription à l'aide des techniques d'hybridation standard est souvent limitée à cause de son manque de sensibilité (Thomas *et al.* 1989; Singer-Sam *et al.* 1990). Pour cette raison plusieurs groupes ont préféré la réaction de polymérisation en chaîne pour la détection des ARN messagers spécifiques après transcription reverse en ADN (Harbarth et Vosberg, 1988; Murakawa *et al.* 1988; Rappolee *et al.* 1989; Doherty *et al.* 1989; Becker-André et Hahlbrock, 1989; Singer-Sam *et al.* 1990).

5.2 Mécanismes impliqués dans la différenciation cellulaire

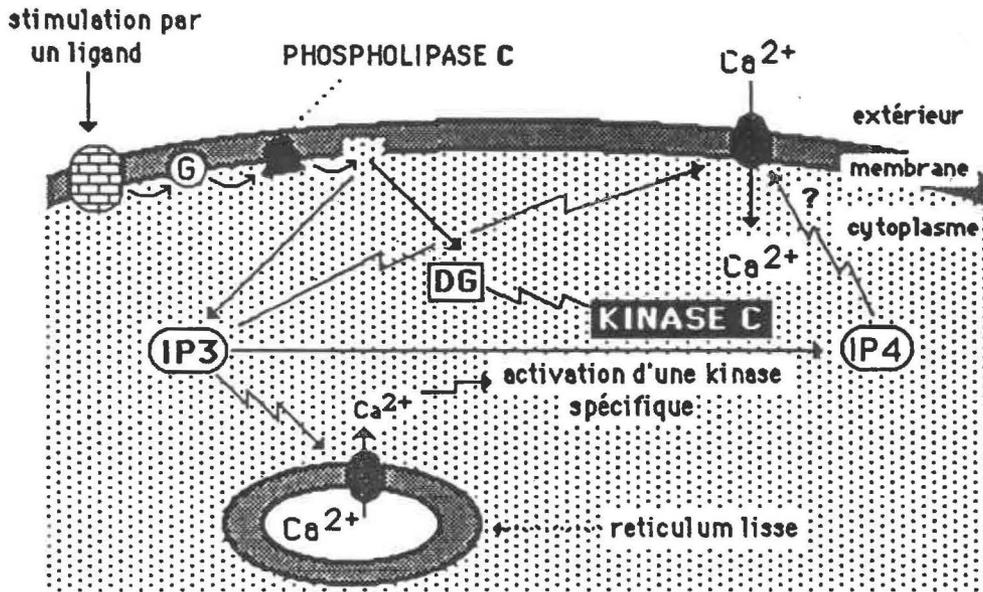
Aussi bien les processus liés à la prolifération que ceux liés à la différenciation sont contrôlés par la signalisation cellulaire. Les principaux rôles y sont tenus par les kinases, qui transmettent les signaux extracellulaires et les amplifient, et les messagers secondaires comme: cAMP, GTP et Ca^{2+} . La figure 6 indique comment la phospholipase produit le diacylglycerol (DAG) et l'inositol phosphate (IP3) qui mobilise le calcium. Le DAG est un effecteur obligatoire des protéines kinase C et le calcium est un activateur de ces même kinases.

FIGURE 6 Relations entre l'ion calcium et l'activation de la protéine kinase C (PKC). (A) Effecteurs et domaines de la protéine kinase C (B). D'après Pelmont, 1989.

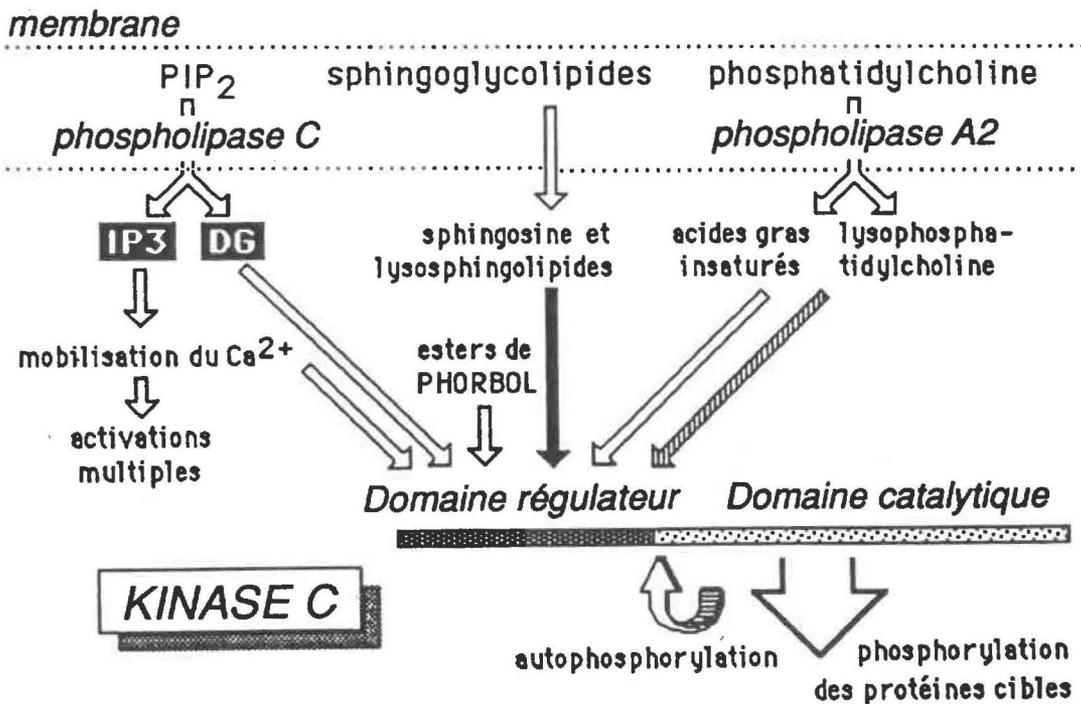
en A: on note que la phospholipase c dégrade son substrat en IP3 (inositol triphosphate) et DG (diacylglycérol). Ce dernier est un effecteur obligatoire de la PKC. L'enzyme conventionnelle est aussi dépendante du calcium. Le cation provient soit d'un influx exogène, soit de sa libération des compartiments intracellulaires.

en B: la réaction de la phospholipase C est détaillée ainsi que les effets de différents lipides et du calcium sur le domaine régulateur. C'est à ce niveau également qu'agissent les esters du phorbol, dont le TPA.

A



B



5.2.1 Protéine kinase C

Le rôle de la protéine kinase C (PKC) une thréonine/sérine phosphorylase dans les processus de prolifération et de différenciation est bien documenté (Nishizuka, 1984a; Nishizuka, 1984b). L'activité PKC au niveau de la membrane et du cytosol peut être analysée séparément (Chakravarthy *et al.* 1991). Plusieurs isoformes de la PKC ont été identifiées (Coussens *et al.* 1986; Ohno *et al.* 1988) et leur ADN complémentaire a été cloné et exprimé (Knopf *et al.* 1986; Ono *et al.* 1988 et Oliver et Parker, 1991). Le patron d'expression des isoformes de la PKC diffère d'un type de cellule à l'autre et est corrélé à leur origine (Bacher *et al.* 1991; Leibersperger *et al.* 1991; Koide *et al.* 1992; Saido *et al.* 1992). Le rôle possible de la PKC dans la différenciation des myoblastes et leur fusion a été rapporté (Farzaneh *et al.* 1989; David *et al.* 1990). L'évolution de la PKC au cours de la différenciation des myoblastes a été rapportée (Ennaji *et al.* 1992c). Récemment, un nouveau membre de la famille PKC spécifique des cellules musculaires squelettiques a été décrit (Osada *et al.* 1992).

5.2.2 Étude du calcium intracellulaire

Le calcium a des effets pléiotropiques et il est essentiel à la vie des organismes. L'impact du calcium sur la croissance cellulaire et la différenciation a été revu par Hennings *et al.* 1980 et de plus récemment par Whitfield (1990). Le calcium est inducteur de la différenciation dans les deux modèles cellulaires utilisés dans ce travail.

Le rôle du calcium (Ca^{2+}) comme messager intracellulaire a été souligné il y a 100 ans par les observations de Ringer 1883 sur les contractions du muscle cardiaque qui dépendent de la présence de Ca^{2+} extracellulaire. Par la suite, l'induction de la contraction des myofibrilles par le Ca^{2+} a été démontrée (Heilbrunn 1940, Heilbrunn et Wiercinski, 1947; Ebashi et Kodama, 1965; Szentgyörgy *et al.* 1973; Dabrowska *et al.* 1978).

Dans les muscles, l'importance du calcium dans la contraction est bien documentée. Nous nous limiterons ici aux études réalisées sur les canaux calciques au cours de la myogénèse dans les cellules musculaires squelettiques. Il existe plusieurs types de canaux calciques qui peuvent être présents dans différents types cellulaires. Les patrons de ces canaux évoluent au cours du développement et de la différenciation. De tels changements sont rapportés chez les cellules primaires cultivées *in vitro* de plusieurs espèces animales telles que le poulet (Kano *et al.* 1987, 1989), la souris (Gonoi et Hasegawa, 1988), le rat (Beam et Knudson, 1988). Pour les myoblastes, la réponse au calcium au cours des différentes étapes de la différenciation a été étudiée (Caffrey *et al.* 1989). Dans les myoblastes embryonnaires L6, Kubo, 1991a, 1991b signale une faible entrée de calcium en réponse à la dépolarisation de la membrane et l'absence probable de canaux de type T, mais il n'y a pas d'autre travaux détaillés concernant l'entrée de calcium dans les myoblastes L6. Dans la lignée C2 de myoblastes de souris un canal cationique dépendant du voltage a été identifié. Il apparaît quand les cellules sont orientées (Franco et Jeffrey, 1989, Caffery *et al.* 1989, Kubo, 1991c). Trois types de canaux apparaissent au stade préfusion.

Ce sont des canaux spécifiques opérés par des récepteurs muscarinique et purinergique sensibles à l'acétylcholine et aux prostaglandines, respectivement. Les trois voies métaboliques peuvent séparément induire la fusion ou agir en synergie (Cossu *et al.* 1987; Entwistle *et al.* 1988; Lohmann *et al.* 1991). Le calcium peut aussi être libéré des compartiments du réticulum sarcoplasmique, par deux sortes de canaux liés à des récepteurs de phosphate inositol (iP_3R) et de la ryanidine (RYR) (Endo et Nadel-Ginard, 1987; Berridge, 1988, 1993). Dans les kératinocytes, si le rôle du Ca^{2+} dans la prolifération et la différenciation a été étudié (Hennings *et al.* 1980; Lichti et Yuspa, 1988) on n'a pas beaucoup d'information sur les canaux calciques correspondants.

Récemment, le développement de nouvelles technologies a permis d'associer les changements de la concentration du Ca^{2+} intracellulaires [Ca^{2+}] aux stimuli extracellulaires et aux réponses cellulaires. La mesure de la réponse calcique peut être suivie à l'aide de l'imagerie (Timothy 1989, 1992). Une autre technique, la spectrophotométrie permet également la mesure de calcium intracellulaire (Morley *et al.* 1992). Ces techniques n'ont été appliquées aux cellules L6 que par Chandra *et al.* 1989 pour mesurer le calcium intracellulaire. Par ailleurs, les variations de la concentration en [Ca^{2+}] ont été mesurées dans d'autres modèles cellulaires (Cheung 1980; Tsien 1981).

5.2.3 Communication intercellulaire

Les jonctions lacunaires (GJ) permettant la communication intercellulaire ont été démontrées pour la première fois par des études structurales et

électrophysiologiques dans des synapses de neurones (Furchpan et Potter, 1959; Robertson, 1960; Hama, 1961; Watanaba et Grundfest, 1961). Ces structures sont bien caractérisées en microscopie électronique (Robertson, 1963). Les jonctions lacunaires ont été par la suite observées dans tous les types de tissus comme le tissu nerveux de plusieurs poissons, les muscles lisses et cardiaques (Dewery et Barr, 1962) et entre les épithéliums et les glandes sécrétrices (Loewenstein, 1966). Le clonage moléculaire des ADN complémentaires de certaines connexines (la protéines des jonctions lacunaires) a été réalisé par Paul, 1986. Les connexines sont hautement conservées dans tout le règne animal et végétal. Ces canaux permettent le passage de molécules de petit poids moléculaire (jusqu'à 1000 Da) entre cellules adjacentes (Loewenstein, 1966). Elles contribuent ainsi à l'homogénéisation de la concentration des petites molécules dans un champ cellulaire. Elles sont maintenant considérées comme une véritable voie de signalisation car elles régissent le transfert de cellule à cellule de tous les messagers secondaires (Muallem *et al.* 1993). Leur contrôle par les hormones de croissance et leur régulation intra-cellulaire positive ou négative résulte de la phosphorylation de sites spécifiques par diverses kinases et par la protéine d'adhésion N-CAM. C'est ainsi que l'activation de la protéine kinase C diminue les échanges intercellulaires. Le fonctionnement des jonctions lacunaires est aussi modulé par les effecteurs de la différenciation cellulaire (Guo *et al.* 1992). Par exemple, l'acide rétinoïque augmente l'ouverture des canaux lacunaires et exerce donc une action positive sur la différenciation alors que les ions calcium et la protéine kinase C ont une action plus complexe.

MATERIEL ET METHODES

PARTIE A: Établissement de lignées cellulaires contenant le génome complet du HPV16

1. CULTURE CELLULAIRE

Les cellules embryonnaires utilisées dans le cadre de ce travail sont dans un état relativement indifférencié. Il s'agit de systèmes cellulaires inductibles. Le modèle des cellules murines: myoblastes de rat sera désigné par l'abréviation L6 dans le texte. Ces mêmes cellules transfectées par le virus du HPV16 elles seront désignées par HPV16-L6. De la même manière l'autre modèle des kératinocytes isolés de l'épiderme de souris nouveau-né Balbc/MK sera appelé Balbc/MK. Les cellules transfectées par le HPV16 seront nommées HPV16-Balbc/MK. On fera référence à des cellules transformées quand les cellules transfectées formeront des colonies dans l'agar semi-solide ou qu'elles deviendront indépendantes des facteurs de croissance.

1.1 Conditions générales de culture

Les cellules ont été maintenues en culture en flacons de 25, 75 ou 150 cm² de surface. Pour divers tests, les cellules ont été également cultivées en boîtes de Petri de 35, 60 et 100 mm de diamètre (Corning Glass Work, Corning, NY, USA).

Afin de maintenir les cellules dans un état indifférencié, nous avons utilisé le milieu de culture EMEM (Eagle minimum essential medium), à faible teneur en calcium (0,05 mM Ca²⁺) additionné de 10% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) (Gibco Canada, Burlington, Ont., Canada). Les milieux comportent les additions

suivantes: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamycine, 1% de pyruvate de sodium (100 mM) (Gibco Canada), 1% de solution de nucléosides (Gibco Canada), 1% d'une solution d'acides aminés non essentiels (Gibco Canada) et 1% de glutamine (100 mM) (Gibco Canada) renouvelée toutes les deux semaines.

À confluence du feuillet cellulaire, les cellules ont été dispersées à l'aide d'une solution de trypsine (0.25% p/v) dans un tampon salin phosphate (PBS) sans calcium ni magnésium, pH 7.8 (Gibco Canada) et réensemencées à une concentration de 0.5 à 1×10^5 cellules/cm² de surface suivant la lignée cellulaire: les cellules viables ont été énumérées à l'aide d'un hématimètre, en utilisant l'exclusion du trypan bleu (1% (p/v)) selon la méthode décrite par Payment et Trudel 1989.

Une banque de cellules, pour chaque type de lignée cellulaire utilisée, a été préparée dans du milieu EMEM contenant 10% (v/v) de SVF et 10% (v/v) de diméthyl sulfoxyde (DMSO) et conservée à -192°C dans un congélateur à azote liquide (Union Carbide, USA). Les cultures cellulaires ont été incubées en atmosphère contenant 5% de CO₂ à 37°C dans une étuve humidifiée.

1.2 Sérum

Le sérum utilisé au cours de ce travail est le SVF (Gibco Canada). Le sérum a été d'abord décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes et ensuite dialysé pour éliminer le calcium. Finalement le sérum est filtré ($.22 \mu$) et congelé à -20°C jusqu'à son utilisation.

1.3 Déscription des lignées cellulaires

1.3.1 Cellules murines L6

Ces cellules provenant d'une culture primaire de myoblastes de rat ont été gracieusement fournies par le Dr. Yaffe (Salk Institute, San Diego, CA, USA) (Yaffe, 1968). Elles étaient à leur 3^e passage au moment de leur réception au laboratoire. Les cellules ont été mises en culture tel que décrit dans le section 1.1. et précédemment (Ennaji *et al.* 1992a). Ces cellules ont été utilisées entre les 3^e et 10^e passages *in vitro* car que leur capacité à former un syncytium diminue avec le nombre de passages. Les cultures cellulaires ont été trypsinisées une à deux fois par semaine tel que décrit dans le section 1.1.

1.3.2 Cellules murines kératinocytes

Ces cellules nous ont été fournies gracieusement par le Dr. James Whitfield (Institut des Sciences Biologiques, Conseil National de Recherche du Canada, Ottawa., Ont., Canada). Ce sont des kératinocytes, de souris Balbc/MK (Yuspa et Harris, 1974). Ces cellules ont été mises en culture de la même façon que décrit en 1.1 sauf que le milieu de culture est additionné de 10 ng/mL de facteur de croissance épidermique de souris (EGF) (UBI, N.Y., USA). La trypsinisation a été réalisée comme suit: les cellules ont été lavées 3 fois avec une solution saline tamponnée (PBS sans calcium ni magnésium), à un pH de 7.4, puis incubées en présence de 0.15% (p/v) de trypsine dans du tampon PBS, 1 mM EDTA durant 10 minutes à 37°C. Lorsque les cellules commencent à se soulever, la trypsine est

aspirée et remplacée par 5 mL du milieu de culture contenant 10% de SVF dialysé (v/v) frais pour inhiber la trypsine. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 1000 rpm. Le culot est resuspendu dans du milieu et les cellules réensemencées tel que décrit en 1.1.

Pour ce système cellulaire, le milieu de culture et ses additions sont amenés à 37°C avant leur utilisation.

1.4 Inducteurs potentiels de différenciation des systèmes cellulaires utilisés

Les modèles utilisés dans ce travail peuvent être maintenus, pour plusieurs passages, à l'état prolifératif dans les conditions décrites dans les sections 1.3.1 et 1.3.2.

Par contre, la différenciation cellulaire terminale, peut être induite par remplacement du SFV par le sérum de cheval 3% (Gibco, Canada) pour les cellules L6 et par le calcium 1.8 mM pour les Balbc/MK (section 1.3.2).

2. VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN TYPE 16 (HPV16)

Le génome du virus du papillome humain type 16 (HPV16) nous a été fourni gracieusement par Dr. Zur Haussen (Institut für Virusforschung, Heidelberg, Germany) par l'intermédiaire du Dr. Ranko Skvorc-Ranko de l'IAF. L'ADN du HPV16 a été décrit précédemment (Dürst *et al.* 1983; Seedorf *et al.* 1985; Baker 1987). L'ADN total du HPV16 a été cloné dans le plasmide pUC18 dans le site de restriction unique BamHI.

2.1 Digestion des molécules d'ADN du virus du papillome humain type 16 (HPV16) par des endonucléases de restriction

L'ADN du virus du papillome humain type 16 (HPV16) a été digéré par plusieurs endonucléases de restriction en respectant les conditions recommandées par le fournisseur. Ces digestions ont été réalisées dans des tubes Eppendorf de 1.5 mL, dans des volumes de 25 à 100 μ l. Les principales enzymes utilisées dans le travail ont été BamH I, Xba I, Xho I, Hind III et Pst I (Boehringer Mannheim, Dorval, Que., Canada). Les réactions enzymatiques ont été stoppées par l'addition de 0.1 volume d'une solution contenant 5% p/v de SDS, (25% p/v) de saccharose et (0.05 p/v) de bleu de bromophénol.

2.2 Électrophorèse de l'ADN du virus du papillome humain type 16 (HPV16) sur gel d'agarose

Des échantillons de 20 μ l d'ADN contenant 2 μ l de solution d'arrêt tel que décrit dans la section 2.1 ont été déposés dans les puits d'un gel d'agarose 0.7% (p/v) préparé dans un tampon TAE 1x (Tris-acétate 0.04 M et EDTA 1 mM) de dimension approximative 14 x 18 x 0.35 cm. Après solidification, le gel à été immergé dans le réservoir de l'appareil d'électrophorèse (International Biotechnology [IBI], contenant le tampon TAE 1x. L'électrophorèse à été effectuée à 75 volts durant 4 heures. Les molécules d'ADN marqueur les plus souvent utilisées pour ces gels avaient une taille s'échellonnant de 125 à 24000 pb (ADN λ /HindIII Ladder, Promega Corporation, Madison, WI., USA).

2.3 Récupération de l'ADN viral du HPV16 par électro-élution

La bande d'ADN qui correspond à la taille de l'ADN de virus de papillome humain type 16 (HPV16) à l'état linéaire a été découpée du gel et placée dans un tube à dialyse (Molecular weight cut off value of 35000, Fisher Scientifique, Montreal, P. Que., Canada). Le sac a été ensuite rempli d'une solution de tampon 1x TBE, fermé aux deux extrémités, placé dans l'appareil à électrophorèse et immergé dans le tampon 1x TBE. Un voltage de 120 volts a été appliqué pendant 20 à 30 minutes suivi d'une inversion de polarité pendant 10 secondes. La solution dans le tube à dialyse a été transférée dans un tube eppendorf et l'ADN élué a été précipité avec de l'éthanol absolu.

3. TRANSFECTION DES CELLULES

3.1 Précipitation de l'ADN du virus de papillome humain type 16 (HPV16) en présence de chlorure de calcium (CaCl₂)

Environ 5×10^5 cellules ont étéensemencées dans des boîtes de pétri de 100 mm de diamètre cultivées à 37°C, et transfectées 48 heures plus tard. Nous avons d'abord préparé des solutions contenant 25 à 250 μg d'ADN dans 469 μl de tampon HBS "HEPES buffered saline" pH 7.05 (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0.88 mM, dextrose 5.6 mM et HEPES: acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique, 19 mM dissout dans de l'eau stérile déionisée) dans des tubes Eppendorf. Un volume de 31 μl d'une solution de CaCl₂ 2M a ensuite été ajouté à chacun des tubes (concentration finale 125 mM CaCl₂) et les préparations

ont été laissées 20 à 30 minutes à la température de la pièce pour permettre la formation du précipité de phosphate de calcium et d'ADN (Graham et van der Eb, 1973). Les cultures ont été rincées rapidement avec 1 mL de tampon HBS puis recouvertes avec la solution d'ADN. Elles ont ensuite été incubées à 37°C pendant 30 minutes pour assurer la pénétration de l'ADN dans les cellules. Un volume de 10 ml de milieu de culture (Section 1) à été ajouté à chaque boîte après la période d'incubation.

3.2 Électroporation

Alternativement, l'électroporation à été utilisée pour la transfection au cours de ce travail. Les conditions optimales de cette méthode de transfert indirect d'ADN exogène dans les cellules ont été décrites en détail précédemment (Ennaji *et al.*, 1992a). Les conditions optimales déterminés empiriquement sont les suivantes: concentration en ADN 10 μ g de forme linéaire, voltage: 200 volts, durée 100 msec.

PARTIE B: Étude de l'expression génétique du virus de papillome humain type 16 (HPV16) et de la prolifération et de la différenciation cellulaires

4. CARACTÉRISATION DES CELLULES TRANSFECTÉES PAR L'ADN DU VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN TYPE 16 (HPV16)

4.1 Morphologie des cellules

Les cellules ont étéensemencées dans des boites de pétri de 35 mm de diamètre à raison de 1×10^5 cellules par boite dans 2 ml de milieu complet (section 1.1.). Les cellules ont été fixées au glutéraldéhyde 2.5% (v/v) dans un tampon cacodylate de sodium 50 mM, pH 7.2. Les cellules ont été ensuite colorées avec une solution de Giemsa 10% (v/v) (BDH Chemicals, Toronto, Ont., Canada) pendant 15 minutes à la température de la pièce, rincées avec du PBS et photographiées (section 5.)

4.2 Évaluation de la densité de saturation

Les lignées cellulaires ont été mises en culture comme indiqué dans le paragraphe précédant et maintenues à 37°C pendant 15 jours consécutifs.

Chaque jour les cellules de 4 boites de pétri ont été trypsinisées et énumérées séparément en utilisant l'exclusion du trypan bleu. Chaque valeur à été déterminée à partir de la moyenne de saturation correspondant aux valeurs obtenues durant la période de culture. Un test métabolique (Promega Fisher Scientific, Ont. Canada) a été également utilisé. Il est basé sur l'activité déshydrogénase cellulaire

qui réduit les sels de tétrazolium en formazan bleu. Après solubilisation (selon les indications du fabricant, les densités optiques sont mesurées sur un lecteur de plateau Elisa à 570 nm. Les calculs statistiques sont effectués directement par le lecteur.

4.2.1 Croissance des cellules en milieu semi-solide

Les cellules ont été trypsinisées, comptées à raison de 1×10^5 cellules/mL dans du milieu de culture complet (Section 1.1). Les échantillons ont été dilués 10 fois et maintenus à 0°C. Un volume de 0.5 mL de chaque dilution a été additionné à un volume de 2.5 mL d'une solution d'agar 0.4%, préparée dans du milieu de culture complet à partir d'une solution stock d'agar 2% préalablement autoclavée et maintenue à 45°C. Le mélange obtenu est rapidement déposé dans une boîte de pétri de 100 mm de diamètre (Gibco Canada) contenant une couche gélifiée (6 mL) de milieu à 0.33% (p/v) d'agarose. Les cultures ont été ensuite incubées à 37°C dans une étuve pendant 6 à 8 semaines.

4.3 Immunofluorescence

4.3.1 Techniques d'immunofluorescence

L'immunofluorescence (IF) consiste à révéler les motifs antigéniques présents sur ou dans une cellule grâce à des anticorps primaires spécifiques correspondants. Dans le cas de l'IF indirecte utilisé dans ce travail (Ennaji *et al.* 1992a), la fixation des anticorps est révélée à l'aide d'un conjugué secondaire anti immunoglobuline couplé à un fluorochrome (Fisher Scientific, Ottawa, Ont., Canada).

4.3.2 Immunofluorescence sur des cellules fixées

Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de pétri 35 mm de diamètre sur des lamelles de type MAGMA (Aldemic Ltd., Canada) spécialement conçues pour les essais. Les lamelles ont été préalablement traitées au NaOH 1M pendant 4 heures. Après neutralisation avec une solution HCl 1N et lavage à l'eau distillée courante pendant 30 minutes elles ont été stérilisées au four à une température de 200°C pendant 4 heures. Les cellules ont été cultivées sur lamelle jusqu'à confluence. Après lavage au PBS stérile, les cellules ont été fixées à l'acétone pendant 30 minutes à -20°C tel que décrit précédemment (Ennaji *et al.* 1992a). Les sites non spécifiques ont été bloqués avec une solution de BSA à 1% (p/v). Les cellules ont ensuite été exposées à une solution d'anticorps primaire (Tableau 4) dilué dans du PBS, pendant 30 minutes à 37°C. Après 3 lavages au PBS les cellules sont exposées à l'anticorps secondaire conjugué à l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC) dilué dans du PBS pendant 30 minutes à 37°C. Après 3 lavages au PBS, les cellules sont contre colorées avec le fluorochrome de Haechst 3358 (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) dans le PBS 1.5 µg/mL pendant 2 minutes. Après 3 lavages et séchage, les lamelles ont été déposées sur une goutte de milieu de montage semi-permanent (Elvanol/Tris/Glycerol, pH 8.6). Les cellules sont examinées immédiatement ou congelées à -20°C pour quelques semaines. L'examen des cellules a été effectué à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence et contraste de phase (Ortholux-Leitz Wetzlar, Germany) en utilisant une combinaison appropriée de filtres pour la détection de la fluoresceine et du fluorochrome de Hoeschst.

4.3.3 Immunofluorescence sur des cellules non fixées

L'immunofluorescence indirecte sur des cellules non-fixées a été réalisée pour les marqueurs qui sont exprimés à la surface. Les cellules cultivées en flacon de 25 cm² ont été trypsinées, resuspendues dans 5 mL de milieu puis distribuées, dans des tubes eppendorf afin d'avoir 1-2 x 10⁶ cellules par tube. Les tubes ont été ensuite centrifugés à 500 x g pendant 5 minutes, les culots ont été lavés deux fois au PBS stérile et les cellules resuspendues en présence de l'anticorps primaire pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules ont été lavées trois fois et mises en présence de l'anticorps secondaire pendant 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière. Après trois lavages additionnels, un échantillon de cellules (25 à 50 µl du culot) a été déposé sur une lame et recouvert d'une lamelle. L'ensemble est examiné au microscope à épi-fluorescence tel que décrit en 2.1.

4.4 Cytométrie de flux

4.4.1 Technique de cytométrie de flux

La cytométrie de flux est un type d'analyse immunologique, bien documentée (Melamed *et al.* 1979; Shapiro et Hawaro, 1988; Ormerod, 1990). Elle repose sur trois principes:

1. L'analyse multiparamétrique cellule par cellule.
2. La rapidité d'analyse d'échantillons en grand nombre.
3. Ainsi que la quantification des mesures.

Le principe général de fonctionnement est de guider de manière hydrodynamique et à vitesse constante, une suspension de cellules isolées vers une zone de détection qui permet la génération de signaux optiques et électriques caractérisant les cellules étudiées. Le cytofluormètre utilisé au cours de ce travail est de type Becton Dickinson (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

4.4.2 Détection des antigènes de surface

Les cellules sont trypsinisées, comptées (Section 1) et resuspendues dans le milieu adéquat à 37°C pendant 2 à 4 heures. Les cellules sont ensuite réparties dans les tubes eppendorf à raison de 1×10^5 par essai, lavées deux fois avec un tampon PBS/albumine de sérum bovin 1% (BSA) (Boehringer Mannheim, Dorval, Que., Canada)/azide de sodium (Na-azide), 0,1% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) et centrifugées à 500 xg à 4°C pendant 5 minutes. Après la préparation de l'anticorps aux dilutions adéquates, on ajoute un volume de 100 μ l d'anticorps primaire par tube. L'ensemble est incubé à 4°C pendant 30 minutes. Les cellules sont lavées deux fois avec le tampon précédant et mises en présence de 100 μ l du second anticorps conjugué à la fluorescéine (FITC) puis incubées à 4°C pendant 5 à 30 minutes à l'abri de la lumière. Les cellules sont de nouveau lavées deux fois, resuspendues dans le même tampon et conservées à l'obscurité jusqu'à leur analyse au plus tard 24 heures après.

4.4.3 Détection des antigènes intracytoplasmiques

Les cellules sont préparées et marquées de la même façon que décrit en 1.1, mais perméabilisées pendant la fixation. Les conditions optimales de fixation et perméabilisation des cellules ont été préalablement déterminées à l'aide d'une solution de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromure de propidium (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Un meilleur résultat a été obtenu en utilisant l'éthanol 70% à -20°C pendant 10 min. Les cellules ont été ensuite marquées ainsi que décrit dans la Section 4.4.2.

Les différents anticorps utilisés dans ce travail ainsi que leur provenance et dilutions pour la cytométrie de flux sont indiqués ci-dessous:

i) anticorps monoclonaux: anti-actine (Chemicon International Inc., Temecula, Ca, USA) 1:50; anti-vimentine (Chemical Credential, Lisle, Il, USA) 1:50; anti-connexine 43 (Zymed Lab., San Francisco, Ca, USA) 1:100; anti-HPV16 (Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) 1:100.

ii) anticorps polyclonaux: lapin anti-fibronectine (Chemicon International, USA) 1:200; lapin anti-N-CAM (Chemicon International, USA) 1:100; lapin anti virus du papillome bovin type I (Dimension Lab., Mississauga, Ont., Canada) 1:250.

iii) anticorps secondaires conjugués: Âne anti-lapin-FiTC (BIO/CAN Scientific, Mississauga, Ont., Canada) 1:100; chèvre anti-lapin FiTC (Chemicon, USA) 1:100; chèvre anti-souris-FiTC (Chemicon, USA) 1:100.

4.5 Étude ultra-structurale de l'effet du virus du papillome humain type 16 (HPV16) en immunoélectromicroscopie (IEM)

Les modifications morphologiques et moléculaires associées à la transformation des cellules L6 par le HPV16 ont été évaluées par localisation immunologique à l'or colloïdal et des anticorps dirigés contre les marqueurs de différenciation. Les coupes ultra-minces ont été préparées tel que décrit par Nickerson *et al.* 1990. Cette étude en IEM a été réalisée suivant la méthode décrite par Garzon *et al.* 1990 et Garzon et Bendayan, 1993. Brièvement, l'immunolocalisation du site récepteur N-CAM a été effectuée comme il suit: les cellules ont été rincées avec du milieu de culture EMEM ne contenant pas de sérum foetal puis incubées 30 min. dans du EMEM contenant de sérum de Chèvre 1% et ovalbumine 1%. Le milieu a été ensuite remplacé par des anticorps polyclonaux de lapin anti N-CAM (Chemicon, Temecula, California, USA) (Tableau 4) dilués 1:50 dans l'EMEM contenant ovalbumine 1% suivi de trois rincages pendant 15 min avec l'EMEM contenant ovalbumine 1%, suivi d'une incubation des cellules avec du sérum de chèvre anti immunoglobuline de lapin couplé à de l'or colloïdal de 15 nm de diamètre (Janssen Cedarlane, Ont., Canada) pendant une heure à la température de la pièce suivi de trois rinçages avec l'EMEM contenant 1% d'ovalbumine. La préfixation au glutaraldehyde 2.5% a été suivie de la post fixation par la tetroxyde d'osmium et le ferricyanure de potassium (Sigma).

Les cellules pour l'examen ultrastructural ont été détachées des bouteilles par grattage, centrifugées à 800 g et resuspendues dans de l'agarose à 2%. Après

une nouvelle centrifugation à 1500 g le culot gélifié renfermant les cellules est découpé en petits cubes de 1 mm³ dans de l'alcool à 50%. La déshydratation a été poursuivie dans une série de bains d'alcool, 15 min chaque, de concentration croissante 75%, 80%, 95 et 100% puis dans du propylène oxyde, trois fois pendant 15 minutes. L'infiltration de la résine (Araldite 502: Sigma) s'est effectuée progressivement d'abord dans un mélange propylène oxyde: araldite (4:4 v/v) puis addition d'un volume de résine et les fioles ont été maintenues ouvertes avec agitation rotative pour la nuit permettant l'évaporation du propylène oxyde. Les spécimens ont été transférés dans de la résine pure dans des capsules puis mis à polymériser à 37°C pendant 1 jour, 45°C pendant 6 heures et 60°C pendant 2 jours. La préparation de coupes ultrafines a été effectuée sur ultramicroton LKB III. La coloration des coupes à l'acétate d'uranyle saturé dans alcool 50% pendant 5 minutes a été suivie de citrate de plomb (Reynolds) pendant 5 minutes à l'abri de l'air.

5. PHOTOGRAPHIE

Les photographies au microscope photonique et au microscope à épifluorescence ont été prises respectivement à l'aide de film Kodak TRI-X pan 400 ASA et du film à diapositive couleur 3M - 640-T en utilisant l'exposition automatique à 640 ASA.

6. EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES

La plupart des techniques de biologie moléculaire décrites ci-après ont été extraites de Sambrook *et al.* 1989 et Davies *et al.* 1986.

6.1 Extraction d'ADN

6.1.1 Extraction des ADN cellulaires

Les cellules ont été cultivées tel que décrit (Section 1). À confluence de feuillet cellulaire, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS glacé sans Ca^{2+} et Mg^{++} . Les cellules sont lysées par 2 mL de tampon (TRIS-HCl pH 7.5, 10 mM, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, protéinase K (BRL, Canada) 0.1 mg/mL et SDS 0.5 g/100 mL). À l'aide d'une tige caoutchoutée les cellules sont récoltées dans un tube de polypropylène et incubées à 37°C toute la nuit. Pour éliminer les protéines, la solution a été extraite deux fois avec un volume de phénol saturé de TRIS (Maniatis *et al.* 1989), puis deux fois avec du chloroforme: Isoamyl alcool (24:1) pour éliminer les traces de phénol de la solution. L'ensemble est incubé 30 minutes à 37°C en présence de RNase A (Promega, Canada) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) puis extrait une fois par le mélange chloroforme : Isoamyl alcool (24:1) et finalement dialysé toute la nuit à 4°C dans la tampon TRIS-HCl, pH 7.5 10 mM et EDTA 1 mM). L'ADN a finalement été précipité avec 1/10 de volume d'acétate de sodium (NaOAc 3M) et double volume d'éthanol 100% (IBI, Toronto, Canada) toute la nuit à -20°C. Le tube a été centrifugé 20 minutes à 4°C à 10,000 RPM et le culot a été rincé avec de l'éthanol 70% pour enlever les traces de sels. Le culot a été

séché dans une centrifugeuse sous vide (speed vac concentrator, Savant Instrument Inc., Hicksville, NY, USA) ou à l'air libre. L'ADN a été redissout dans un volume de 100 μ l d'eau et quantifié par spectrophotométrie. L'absorption a été mesurée à 260 et 280 nm et la concentration d'ADN est déterminée (sachant que $10D_{260} = 50 \mu\text{g/mL}$ d'ADN). L'ADN est alors alliqué et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

6.1.2 Extraction analytique des ADN plasmidiques recombinants

6.1.2.1 Extraction des plasmides recombinants à petite échelle

Les colonies bactériennes recombinantes ont été inoculées dans 2 ml de bouillon Luria-Bertani (LB; 10 g/l bacto-tryptone, 5 g/l extrait de levure, 10 g/l NaCl, pH 7,5, Difco, Detroit, Michigan, USA) contenant 75 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline (Boehringer Mannheim). Les cultures ont été incubées à 37°C pendant 18 h avec agitation (250 rpm), puis centrifugées à 10,860 xg durant 1 min. dans une microcentrifugeuse Eppendorf (Brinkmann, Westbury, New York, USA). Pour l'isolement du plasmide recombinant, la méthode de Birnboim et Doly (1979) a été utilisée. Les culots bactériens ont ensuite été resuspendus dans 100 μ l d'une solution glacée de 50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0). Les tubes sont incubés à la température de la pièce pendant 5 min. Un volume de 200 μ l d'une solution contenant 0.2 N NaOH plus 1% p/v SDS est ajouté aux tubes qui sont ensuite incubés 5 minutes sur de la glace. Finalement, un volume de 150 μ l d'acétate de potassium (pH 4.8) à 0° est ajouté. La solution est préparée comme suit: à un volume de 60 mL d'acétate de potassium 5M on mélange 11.5 mL

d'acide acétique glacial et 28.5 mL d'eau. Les solutions ont été mélangées et placées sur glace pendant 5 min. Les échantillons ont été centrifugés pendant 5 min. et le surnageant transféré dans d'autres tubes. L'extraction se déroule comme suit:

Pour éliminer les protéines, la solution a été extraite deux fois avec 1 volume de phénol saturé de Tris (Sambrook *et al.* 1989), puis deux fois avec du phénol/chloroforme (1:1), et finalement deux fois avec du chloroforme/alcool isoamylique (24:1) pour éliminer les traces de phénol de la solution. L'ADN a finalement été précipité avec 1/10 en volume d'acétate de sodium (NaOAc 3M) ou 1 volume d'acétate d'ammonium (NH₄OAc 5M) et 2,5 volumes d'éthanol absolu (IBI, Toronto, Canada) à -20°C, pendant 1h (ou -70°C, pendant 20 min). Le tube a été centrifugé 10 min et le culot a été rincé avec de l'éthanol 70%, pour enlever les traces des sels. Le culot a été séché dans une centrifugeuse sous vide (Speed Vac Concentrator, Savant Instrument Inc., Hicksville, NY, USA). L'ADN a été redissout dans 20-50 µl d'eau et quantifié tel que décrit en (6.1.1.).

6.1.2.2 Extraction semi-préparative des plasmides recombinants

Les colonies bactériennes ont été préparées dans un volume de 50 mL tel que décrit en 6.1.2.1. Les cultures ont été incubées à 37°C pendant 16 h avec agitation (250 rpm), puis centrifugées à 4000 rpm pendant 20 min. à 4°C. Le culot est lavé deux fois avec du tampon "STE". Ensuite, le culot est resuspendu dans 5 ml de tampon contenant du lysozyme (5 mg/mL). L'ensemble est transféré dans des tubes d'ultracentrifugation de 35 mL et conservé environ 15 à 20 min.

sur la glace. Un volume de 10 ml d'une solution de NaOH 0.2 N contenant 1% de SDS est ajouté. L'ensemble est bien mélangé et conservé sur glace pendant 5 min. Ensuite, un volume de 7.5 mL d'acétate de potassium 5M pH 4.8 est ajouté. L'ensemble est bien mélangé et conservé sur de la glace pendant 10 min. et centrifugé à 18,000 rpm à 4°C pendant 30 min. La suite du protocole d'extraction est décrite dans les sections (6.1.2.1).

6.2 Extraction des ARNs

Les précautions à prendre pour limiter la dégradation des ARNs sont décrites dans Sambrook *et al.* 1989 et Davis *et al.* 1986.

Brièvement: afin d'inhiber l'activité ribonucléasique au cours de la manipulation des ARN, la vaiselle en verre a été traitée au four Pasteur à 180°C pendant 2 h. L'eau tridistillée et les solutions ont été traitées avec 0,2% (v/v) de diéthylpyrocarbonate (DEPC; Sigma) durant 20 min., puis autoclavées à 121°C pendant 20 min. Les appareils à électrophorèse ont été traités avec 1% (p/v) de dodécyl sulfate de sodium (SDS; Sigma) pendant 16 h, puis rincés avec de l'eau traitée au DEPC.

6.2.1 Extraction des ARN totaux

Deux procédés ont été employés pour l'extraction des ARN totaux: le premier utilisant le guanidinium isothiocyanate et le deuxième la protéinase K et le phénol.

6.2.1.1 Méthode au guanidinium isothiocyanate

Les cellules transfectées et non-transfectées par l'ADN du virus du papillome humain (HPV16) ont été cultivées dans des boîtes de pétri (90 cm de diamètre). Les couches de cellules ont été lavées avec du PBS glacé et les cellules ont été recueillies à l'aide d'une tige caoutchoutée, puis centrifugées à 1000 xg durant 10 min. à 4°C. Aux culots cellulaires, 5 volumes d'une solution de guanidinium isothiocyanate 4M (BRL, Gaithersburg, Maryland, USA), de citrate de sodium 5 mM pH 7, de β -mercaptoéthanol 0,1 M et de n-lauroyl sarcosinate de sodium 0,5% (p/v) (Sigma) ont été ajoutés. À l'aide d'un homogénéiseur de type Fisher Sonic Dismembrator Model 300, les cellules ont été lysées, puis 0,25 g de chlorure de césium (CsCl; Pharmacia) par ml d'homogénat ont été ajoutés. Les homogénats ont été déposés sur des coussins de CsCl 5,7 M et EDTA 0,1 M pH 8, puis centrifugés à 38,000 RPM pendant 18 h à 20°C. Les culots d'ARN ont été resuspendus dans un tampon d'extraction contenant Tris-HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 5 mM et SDS 1% (p/v), puis les protéines ont été extraites avec 2 volumes de chloroforme: n-butanol (4:1) (Anachemia, Montréal, Québec, Canada). La phase organique a été réextraite et les ARN ont été précipités avec l'acétate de sodium 0,3M pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol à 100% (IBI, Toronto, Ontario, Canada) à -20°C durant 2 à 24 h. Les culots d'ARN ont été lavés avec l'éthanol 70%, puis séchés dans une microcentrifugeuse sous vide. La concentration et la pureté des ARN ont été estimées par spectrophotométrie à 260 et 280 nm: quand $A_{260} = 1$, la concentration des ARN est approximativement de 50 μ g/ml; quand $A_{260/280} = 2$,

la préparation d'ARN est pure. Les ARN ont été conservés à -70°C dans l'éthanol 70%.

6.2.1.2 Méthode à la protéinase K et au phénol

Les cellules transfectées et non-transfectées ont été cultivées dans des boîtes de pétri (90 mm de diamètre). Les couches de cellules ont été lavées avec du PBS et les cellules ont été recueillies, puis centrifugées à 2000 xg pendant 5 min. à 4°C. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans un tampon de lyse glacé contenant 10 mM Tris-HCl pH 8,6, 140 mM NaCl, 1,5 mM MgCl, 0,5% (v/v) nonidet P40 (NP-40) et 10 mM de complexe vanadyl-ribonucléosides (VRC; BRL). Les cellules ont été lysées à l'aide d'un sonicateur, puis centrifugées à 10,000 xg durant 20 min. à 4°C dans un volume égal de tampon de lyse contenant 24% (p/v) de saccharose et 1% (v/v) NP-40. Le cytosol a été incubé à 37°C pendant 30 minutes en présence de Tris-HCl 0,2M pH 7,5, EDTA 25 mM, NaCl 0,3M, SDS 2% (p/v) et 200 µg/ml de protéinase K (BRL, Canada). Les protéines ont ensuite été extraites avec 1 volume de phénol: chloroforme (1:1) (BRL, Canada), puis les ARN ont été précipités avec 2,5 volumes d'éthanol durant 2 h à -20°C. Après une centrifugation à 5000 xg pendant 30 min. à 4°C, les ARN ont été lavés avec de l'éthanol 70% contenant l'acétate de sodium 0.1M pH 5,2, puis resuspendus dans du Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, MgCl₂ 10 mM et VRC 2 mM. Les préparations d'ARN ont ensuite été traitées avec l'ADNase I pancréatique exempte d'ARNases (BRI, Canada) à raison de 0,1 µg/mg d'acides nucléiques pendant 30 min. à 37°C. L'enzyme a été extraite avec 1 volume de phénol: chloroforme (1:1)

en présence d'EDTA 10 mM et SDS 0,2% (p/v), puis les ARN ont été précipités avec 2,5 volumes d'éthanol et d'acétate de sodium 0,3M pH 5,2 à -20°C durant 2 à 24 h. Les culots d'ARN ont été lavés avec l'éthanol 70% et séchés sous vide. La concentration et la pureté des ARN ont été estimées par spectrophotométrie à 260 et 280 nm. Les ARN ont été conservés à 70°C dans l'éthanol 70%.

7. ÉLECTROPHORÈSE

7.1 Électrophorèse des ADN

Les gels d'agarose ont été préparés en portant à ébullition 1.5% d'agarose dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate 0,04M et EDTA 0,001M) et en coulant la quantité appropriée dans les moules à cet effet. Après solidification, le gel a été immergé dans le réservoir de l'appareil d'électrophorèse (International Biotechnologies [IBI], modèle MPH), contenant du tampon TAE 1X.

L'échantillon d'ADN à analyser a été mélangé à un tampon de chargement 6x (bleu de bromophénol 0,25%, xylène cyanol 0,25%, ficoll 400 15%) et a été déposé dans un puits du gel. Un voltage de 85 V a généralement été appliqué jusqu'à ce que le front de bleu de bromophénol ait atteint environ les trois quarts de la longueur du gel.

7.2 Électrophorèse des ARN

Les ARN ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (BRL, Canada). Les gels d'agarose ont été préparés en portant à ébullition le mélange suivant: 3g d'agarose, 30 mL du tampon MOPS 10X et 255 mL d'eau. Le mélange est refroidi jusqu'à 50°C et un volume de 16.2 mL d'une solution de formaldéhyde (37%) est additionné au mélange sous la hôte laminaire. L'ensemble du mélange est agité légèrement. Un volume de 20 μ l de bromure d'éthidium est ensuite ajouté au mélange. Une quantité suffisante du mélange est coulée dans les moules appropriés. Après solidification, le gel a été immergé dans le réservoir de l'appareil d'électrophorèse (International Biotechnologie [IBI]) contenant le tampon MOPS 1X. Les échantillons d'ARN à analyser ont été séchés dans une microcentrifugeuse sous vide (Speed Vac Concentrator). On obtient 10 à 15 μ g d'ARN total par échantillon. Chaque échantillon d'ARN a été resuspendu dans un volume de 20 μ l de tampon de chargement fraîchement préparé selon les rapports de volumes suivants: pour un volume total de 10 ml: 0.72 mL formamide, 0.16 mL tampon MOPS 10X, 0.26 mL formaldéhyde 37%, 0.18 mL d'eau, 0.1 mL de glycérol (80%) et 0.08 mL de bleu de bromophénol. L'ARN a été dénaturé en chauffant à une température de 95°C pendant 2 min. Les échantillons d'ARN ont été ensuite déposés dans les puits de gel. Un voltage de 200 volts à généralement été appliqué approximativement pendant 2 à 3 heures jusqu'à ce que le front de migration du bleu de bromophénol ait atteint environ les trois quarts de la longueur du gel. La migration achevée, les gels ont été photographiés sous illumination ultraviolette (Transluminateur, Ultraviolet product, CA, U.S.A.).

7.3 Électrophorèse des protéines

Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS selon Laemmli (Laemmli *et al.* 1985). Les gels de séparation de 12,5 à 15% (p/v) ont été préparés avec un mélange d'acrylamide: bisacrylamide (30:1), (Bio-Rad, Mississauga, Ont. Canada) dans un tampon contenant 0.1% (p/v) SDS, 0.375M Tris-HCl pH 8.8; 0.03% (v/v) TEMED et 0.07% (p/v) persulfate d'ammonium. Avant d'être déposés sur le gel, les échantillons resuspendus dans du tampon de chargement (0.625 M Tris pH 6.8 contenant 2% (p/v) SDS, 5% (p/v) beta-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycérol et 0.02% (p/v) de bleu de bromophénol) ont été chauffés à 100°C pendant 3 minutes, puis chargés sur le gel de compaction (5% de polyacrylamide dans 0.5M Tris pH 6.8, 0.03% (v/v) TEMED et 0.07% (p/v) persulfate d'ammonium. L'électrophorèse a été réalisée dans un tampon contenant 0.025M Tris-HCl pH 8.3, 0.2M glycine et 0.1% (p/v) SDS. Les gels ont ensuite été fixés et teints dans une solution à 0.2% (p/v) de bleu de Coomassie R250 dans une solution de 40% méthanol et de 10% d'acide acétique glacial pendant 20 min à 60°, puis décolorés pendant 16 heures avec agitation dans le mélange précédant sans colorant. Les gels ont été séchés sous vide dans le BioGelWrap (BioDesign Inc. , New York USA)selon les conseils du fabricant. Le Rainbow marker (Amersham, Canada) a été utilisé comme standard pour évaluer les poids moléculaires.

8. RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE ("PCR")

8.1 PCR à partir d'une matrice à ADN: Préparation de sondes moléculaires spécifiques au virus du papillome humain type 16 (HPV16)

8.1.1 Amorces utilisées pour amplification des ORFs du HPV16

Les cadres de lecture ouverts (ORFs) à amplifier ont été décrits par Seedorf *et al.* 1985 et Baker 1987. Pour chaque ORF, deux amorces ont été élaborées dont la séquence complète est indiquée dans le Tableau 3. Chaque amorce est munie de 3 sites de restriction (Bgl II, XbaI et HpaI) à l'extrémité 5' dans le but d'une utilisation clonage dirigé (Ennaji *et al.* 1992b). Ces amorces ont été synthétisées par le service du Dr F. Shareck de l'Institut Armand Frappier.

8.1.2 Conditions de réaction du PCR à partir d'ADN comme matrice

Les différents ORFs du HPV16 ont été amplifiés en utilisant la méthode originale de PCR (Saiki *et al.* 1988) modifiée. Un volume de 10 μ l d'ADN du HPV16, linéarisé, soit environ 10 ng/ μ l ont été ajoutés à un mélange réactionnel de 90 μ l (1x du tampon) ADN polymérase Taq (Bio/Can Scientific, USA), 20 μ M de chaque amorce A et B, 1.25 mM de chaque déoxyribonucléotide, 1.3 mM de MgCl₂ et 2 unités d'ADN polymérase Taq de *Thermus aquaticus* (Bio/Can Scientific, USA). L'appareil utilisé est de type Cétus 1^{re} et 2^e génération (Perkin Elmer, Cétus, USA). Les cycles d'amplification varient entre 30 et 50. Chaque cycle est composé de trois étapes. Une première étape à 95°C pendant une min. pour la dénaturation de l'ADN, une deuxième étape à 50°C pendant 2 min. pour l'appariement des

TABLEAU 3. Amorces utilisées pour l'amplification des cadres ouverts de lecture (ORFs) du HPV16.

Amorces et ORFs à amplifier	ORFs	Séquence des amorces (5'-3')	Taille du produit amplifié (bp)	Localisation du produit amplifié*
E1a/HPV16/a	E1a	AAC AGA TCT AGA A ATG GCT GAT CCT GCA GGT	305	865-1170
E1a/HPV16/b		AAC AGA TCT AGA CTA CAC ATC CAC TAA TAT		
E1b/HPV16/a	E1b	AAC AGA TCT AGA AATG TTA CAG GTA GAA GGG CGC	1709	1104-2813
E1b/HPV16/b		AAC AGA TCT AGA TCA TAA TGT GTT AGT ATT TTG		
E4/HPV16/a	E4	AAC AGA TCT AGA A ATG TCC TAC ATC CTG TGT TTA GCA	287	3332-3619
E4/HPV16/b		AAC AGA TCT AGA CTA TGG GTG TAG TGT TAC TAT TAC		
E6/HPV16/a	E6	AAC AGA TCT AGA AATG CAC CAA AAG AGA ACT GCA	476	83-559
E6/HPV16/b		AAC AGA TCT AGA TTA CAG CTG GGT TTC TCT ACG		
E7/HPV16/a	E7	AAC AGA TCT AGA AATG CAT GGA GAT ACA CCT ACA	293	562-855
E7/HPV16/b		AAC AGA TCT AGA TTA TGG TTT CTG AGA ACA GAT		
L1/HPV16/a	L1	AAC AGA TCT AGA AATG CAG GTG ACT TTT ATT TAC	1595	5559-7154
L1/HPV16/b		AAC AGA TCT AGA TTA CAG CTT ACG TTT TTT CCG		
L2/HPV16/a	L2	AAC AGA TCT AGA AATG CGA CAC AAA CGT TCT GCA	1422	4235-5657
L2/HPV16/b		ACC AGA TCT AGA CTA GGC AGC CAA AGA GAC ATC		

E (Gène precoce "Early").

L (Gène tardif "Late").

ORFs (cadres ouverts de lecture).

HPV16 (virus du papillome humain type 16).

* Calculée selon la séquence du HPV16 (d'après Seedorf *et al.*, 1985; Baker 1987).

amorces ADN et une troisième étape d'extension à 72°C pendant 2 min. Dans le but de compléter les brins d'ADN une étape d'extension de 10 min. à 72°C supplémentaire a été programmée. Un volume de 10 μ l des produits amplifiés a été analysé par électrophorese sur gel d'agarose après coloration au bromure d'éthidium et observation en UV.

8.2 PCR à partir d'une matrice ARN: Analyse des produits de transcription du virus du papillome humain type 16 (HPV16)

8.2.1 Amplification par PCR à partir d'une matrice a ARN: "RT-PCR"

Les amorces pour l'amplification par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) des cadres de lecture ouverts (ORFs) du HPV16 ont été décrites dans la section 8.1.1. Les amorces utilisées comme témoin positif dans le test du "RT-PCR" ont été gracieusement fournies par les Drs. P. Boer et Rassi (Institut de Cardiologie, Université d'Ottawa, Ottawa, Ont., Canada). Les amorces du témoin positif phosphoglycérate kinase (PGK) et celles du témoin négatif facteur artrial natriurétique (ANF) ont été décrites respectivement par Boer *et al.* 1987, 1990 et Argentin *et al.* 1985 et Dagnino *et al.* 1991.

Le mélange réactionnel de 50 μ l directement préparé dans les tubes de PCR contient 2.5 à 5 μ g d'ARN dans du tampon 1X PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, pH 8.3), 200 μ M de chaque type de dNTP, 25 pmol de chaque type d'amorce (A et B), 1 unité par μ L de RNasin, 10 unités de reverse transcriptase MuLV (BRL) et 1 unité de la Taq l'ADN polymerase. Un volume de

100 μ l d'huile minérale a été déposé sur chaque mélange réactionnel. Le PCR a été effectué pendant 31 cycles. Le 1^{er} cycle produit l'ADN complémentaire à partir de l'ARN (ADNc). Les échantillons ont été incubés 15 minutes à 42°C suivi du chauffage à 95°C pendant 5 minutes dans le but de dénaturer la reverse transcriptase. Les cycles suivants comportaient une étape de dénaturation à une température de 94°C pendant 1 min, une étape d'appariement à 50°C pendant 1 min et une dernière étape d'extention à 72°C pendant 2 minutes. À la fin des 30 cycles une incubation supplémentaire à 72°C pendant 10 minutes servait à terminer l'extention des brins incomplets d'ADN. Cette méthode a été utilisée pour la caractérisation des produits de transcription du HPV16 à partir des ARNs isolés tel que décrit en 6.2.

9. CLONAGE DES ORFS DU HPV16: PRÉPARATION DE SONDÉS MOLÉCULAIRES SPÉCIFIQUES DU VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN TYPE 16 (HPV16)

9.1 Clivage de l'ADN plasmidique par endonucléases de restriction

La digestion de l'ADN a généralement été effectuée comme suit. Dix unités d'enzyme de restriction (10 U/ μ L, Bethesda Research Laboratories [BRL], Gaithersburg, MD., USA) ont été ajoutées au mélange d'ADN ($\leq 3 \mu$ g) et de tampon (1X final) dans un volume réactionnel de 10 μ L. Le mélange a été incubé pendant 1-2 h à 37°C avec le tampon de réaction approprié fourni par le fabricant. Dans le cas de doubles digestions avec des enzymes nécessitant des tampons différents, le tampon "One-Phor-All" (Pharmacia, Uppsala, Suède) a été utilisé.

9.2 Isolement et purification de fragments d'ADN séparés par électrophorèse sur gel d'agarose

Après électrophorèse, le gel a été trempé dans une solution de bromure d'éthidium et examiné à l'aide d'une lampe UV à ondes longues et la bande d'intérêt a été soigneusement découpée à l'aide d'un scalpel. L'élution a été effectuée à l'aide de la trousse "Gene Clean" (Bio 101, La Jolla, Ca, USA), sur le principe d'une absorption sélective de l'ADN sur une matrice de silice en présence d'iodure de sodium. Le protocole du manufacturier a été utilisé (Annexe III).

9.3 Clonage des fragments d'ADN du HPV16

Des banques de fragments d'ADN du HPV16 ont été générées (Tableau 6) tel que décrit dans la Section 8. Chaque fragment d'ADN a été cloné dans le but de générer des sondes spécifiques. Une quantité de 25 μg d'ADN viral amplifié ont été digérés avec l'enzyme Xba I dans un volume final de 100 à 200 μl . L'ADN ainsi digéré a ensuite été précipité par l'éthanol et redissout dans un volume de 25 μl d'eau. Il a ensuite été déphosphorylé par la phosphatase intestinale de veau (CIP) comme suit: dans un volume final de 50 μl , 16 μl de l'ADN redissout, 5 μl du tampon CIP 10X (Tris HCl (pH 9,0) 0,5M, MgCl_2 10 mM, ZnCl_2 1 mM, spermidine 10 mM, Sigma, USA) et 0,2 U de CIP ont été incubés durant 1 h à 37°C. L'enzyme a été inactivée en ajoutant 40 μL d'eau, 10 μL de TNE (Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), NaCl 1M, EDTA 10 mM)) et 5 μL de SDS 10% et en incubant 15 min à 68°C. Le mélange a été ensuite extrait deux fois au phénol/chloroforme et une fois au chloroforme avant d'être centrifugé sur une colonne de Sephadex

G-50 ("spun column chromatography"). Le vecteur pUC18, portant le gène de résistance à l'ampicilline et le système de sélection *lacZ*, a été utilisé pour le clonage. Pour la ligation, 12,5 μL d'un mélange de vecteur pUC18 linéarisé par Xba I (ou Bam HI) et d'insert déphosphorylé (125 ng total), avec des rapports variant de 4:1 à 1:4, ont été ajoutés à 5 μL de tampon de ligation 10X (Tris-HCl (pH 7,5) 0,66 M, MgCl_2 50 mM, dithiothreitol 50 mM, ATP 10 mM), 1 μL (0,1 U) de T4 ADN-ligase dans 50 μL final et incubé 24 h à 15°C.

9.4 Préparation de cellules bactériennes compétentes

La transformation de *E. coli* souche JM101 a été réalisée selon la méthode décrite par Maniatis *et al.* 1989. Les bactéries ont été cultivées dans un volume de 100 mL du milieu Luria Broth (LB). Lorsque la culture bactérienne atteint une densité optique de 0.3-0.4 mesurée à une longueur d'onde de 550 nm, la culture est centrifugée à 2000 x g pendant 5 min et resuspendue dans 50 mL d'une solution froide de 50 mM de CaCl_2 . Les cellules en suspension ont été placées sur glace pendant 30 min., recentrifugées et resuspendues dans un volume de 10 mL dans une solution glacée de CaCl_2 50 mM. Les cellules bactériennes compétentes sont prêtes à être utilisées pour la transformation ou la congélation à -70°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

9.5 Transformation bactérienne

Un volume de 200 μl de bactéries *E. coli* JM101 compétentes (Section 9.4) a été ajouté au mélange de ligation et incubé dans un bain de glace pendant 40 min.

Après un choc thermique à 42°C pendant 2.5 min., les bactéries transformées ont été laissées à la température ambiante durant 5 min., ensuite 2 ml de bouillon LB (Gibco) ont été ajoutés, et les tubes maintenus à 37°C pendant 90 min. Les bactéries JM101 transformées ont été étalées sur du milieu LB contenant 1,5% (p/v) d'agar (Difco), 150 µg/ml d'ampicilline (Boehringer Mannheim), 100 mM d'isopropylthio-β-galactoside (IPTG; BRL) et 4% (p/v) de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal; BRL), puis incubées à 37°C durant 18 h. Les colonies bactériennes recombinantes blanches ont été repiquées sur du milieu LB contenant 250 µg/ml d'ampicilline et conservées à -70°C dans du bouillon LB renfermant 250 µg/ml d'ampicilline et 40% (v/v) de glycérol.

9.6 Sélection de clones recombinants

La sélection de clones recombinants est basée sur la présence ou l'absence de l'enzyme β-galactosidase fonctionnelle. L'hôte cellulaire, *E. coli*, transformé avec l'ADN du vecteur de clonage pUC18, contient le fragment d'ADN de la région Lac Z, qui produit l'enzyme β galactosidase fonctionnelle en présence de l'inducteur, IPTG, de l'operon Lac, qui interagit avec le represseur Lac Z. Les cellules vont hydrolyser le substrat X gal et produire une coloration bleue (bromochlore, Indole). L'insertion de l'ADN exogène dans un site approprié dans le vecteur de clonage, interfère avec la production de la β galactosidase dans les cellules transformées. Une coloration blanche en résulte dans les colonies recombinantes. Une deuxième sélection est associée à la présence du gène qui code pour la résistance à l'ampicilline présente dans le milieu de culture. Seules, les cellules transformées

vont pousser dans le milieu qui contient l'ampicilline du fait qu'il contient le gène de résistance de cet antibiotique (β -lactamase) présent dans le vecteur de clonage. Après une nuit en culture en présence de 50 μg à 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ d'ampicilline, les clones recombinants blancs sont sélectionnés et congelés à -70°C dans le glycérol 40% (v/v).

10. TRANSFERT DES ACIDES NUCLÉIQUES ET DES PRODUITS D'EXPRESSION SUR SUPPORT SOLIDE

10.1 Transfert des colonies sur filtre

Cette méthode a été développée par Grunstein et Hogness (1975). Le protocole décrit par Sambrook *et al.* 1989) a été employé avec quelques modifications. Les colonies sont cultivées directement sur gélose et la membrane (filtre de nylon Biotrans) est appliquée sur la surface de la gélose après la croissance bactérienne. Lorsque le filtre est retiré, les bactéries y adhèrent et sont ainsi transférées.

10.2 Technique du dépôt direct d'ADN "Dot Blot"

La solution d'ADN, dans un volume compris entre 50 et 200 μL , a été dénaturée à 90°C durant 5 min puis rapidement placée sur de la glace. Un volume de SSC 20X froid a été ajouté et mélangé au vortex. Cette solution a ensuite rapidement été déposée dans un appareil multi-puits pour "dot blot" (Minifold II Slot Blotter, Schleicher & Schüell, RDA) relié à une pompe à vide. Avant d'être insérée dans l'appareil, la membrane a été imbibée pendant une min. dans l'eau distillée, puis 15 min. dans du SSC 10X.

10.3 Transfert d'ADN de type "Southern"

Le transfert de type "Southern" a été décrit par Southern en 1975. Il s'agit de transfert capillaire directionnel par le tampon de transfert SSC 10X (SSC 20X: NaCl 3M et citrate de sodium 0.3M à pH 7). Les gels préparés tel que décrit en 7.1 ont été plongés dans une solution de 1.5M NaCl, 0.5M NaOH, pendant une demi-heure à la température de la pièce, dans le but de dénaturer l'ADN, puis le gel a été neutralisé avec une solution 1M Tris-HCl, pH 8.0 1.5M en NaCl. La membrane de nylon 66 Biotrans (0.45 μm , ICN, Irvine, CA, USA) a été généralement utilisée comme support solide. Le transfert d'ADN a été effectué en couvrant le gel par la membrane et une couche de papier filtre Whatman 3MM saturée avec une solution 2X SSC. L'ensemble est couvert avec du papier filtre. Le transfert a été poursuivi pendant 18 h suivi du séchage et de la fixation au four à 80°C sous vide ou sous UV. L'efficacité du transfert des ADN a été vérifiée sous lumière UV.

10.4 Transfert des ARN de type "Northern"

Les ARN totaux (14 μg) extraits des cellules transfectées par le HPV16 et non-transfectées ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% à 1.5% en présence de formamide tel que décrit dans la section 7.2. Les ARN ont ensuite été transférés sur des membranes de nylon "GeneScreen Plus" à l'aide de l'appareil VacuGene (Pharmacia-LKB) ou par capillarité tel que décrit en 10.3. Dans ce but, les gels ont été traités avec une solution contenant 1,5M NaCl et 0,05 ou 0,5N NaOH durant 3 min., puis avec une solution composée de 1M Tris-HCl, pH 5 et 2M

NaCl pendant 3 min. Le transfert a été effectué sous vide, durant 1 h et en présence de SSC 10X. Les membranes ont été portées au four à 80°C durant 2 hrs et l'efficacité du transfert a été vérifiée par visualisation des ARN sous lumière UV.

10.5 Transfert de protéines de type "Western"

Des lysats de cellules transfectées au HPV16 et non-transfectées au HPV16 ont été déposées à raison de 50 μ g de protéines totales par puits sur un gel de polyacrylamide-SDS avec un gel de séparation de 12.5 à 15% (p/v) d'acrylamide selon la taille des protéines (Section 7.3). Les échantillons ont migré en conditions réductrices à 25 mA, puis ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Trans-Blot transfer mini; Bio-Rad, Mississauga, Ont., Canada) 100 mV pendant 1 h.

10.6 Immunodétection indirecte

La membrane de transfert rincée dans le tampon TBST (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 (v/v) incubée à la température ambiante pendant 30 min. avec agitation dans une solution d'albumine bovine à 1% dans du TBST. Cette solution de blocage est ensuite remplacée par la solution d'anticorps primaire (Tableau 4) dilué dans un tampon TBST et mise à incuber pour 30 min. Après 3 lavages de 5 min. avec le même tampon pour éliminer l'anticorps primaire, la membrane est exposée à l'anticorps anti-IgG conjugué à la phosphatase alcaline à une dilution de 1/1000, puis incubée à la température ambiante durant 1 h avec

agitation. Les membranes ont été lavées 3 fois pendant 5 min. avec le tampon TBST puis transférées dans une solution du chromogène [2 mg nitro - tetrazolium bleu et 4 mg 5 bromo, 4 chloro, 3 indolylphosphate dans 20 ml de tampon de réaction (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂). Après une incubation de 4 à 10 min. à la température ambiante la réaction a été arrêtée par immersion dans une solution d'acide acétique à 5%.

11. MARQUAGE DES SONDÉS

Il existe deux principales méthodes de marquage des sondes d'ADN et plusieurs trousse sont disponibles commercialement. Il s'agit du marquage par coupure-substitution ("nick-translation") et par amorces aléatoires ("random priming").

11.1 Coupure-substitution

La trousse de BRL ("Nick translation system") a été utilisée. Le protocole du fabricant a été suivi. Brièvement, dans un microtube placé dans de la glace, 5 μ L du mélange de déoxynucléotide-triphosphates (excluant le dCTP), 1 μ g d'ADN à marquer, 5 μ L d'alpha-³²P-dCTP (3000 Ci/-mmol; 10 mCi/ml) ont été mélangés dans un volume de 45 μ L. Après un léger vortex, 5 μ L du mélange enzymatique (DNA polymérase I, 0,4 U/ μ L; DNase I, 40 pg/ μ L) ont été ajoutés et le tube incubé à 16°C pendant 60 min. La réaction a été arrêtée avec 5 μ L d'EDTA 0,5M et le volume a été complété à 100 μ L avec de l'eau. Les nucléotides non-incorporés ont été éliminés en précipitant l'échantillon avec 2,5 volumes d'éthanol 100% et 0,1 volume de NaOAc à -70°C pendant, 20 min. Le culot était redissout dans 100 μ L

d'eau. La sonde marquée pouvait être conservée à -20°C . Le décompte est décrit dans le section 11.3.

11.2 Amorces aléatoires

Pour ce type de marquage, la trousse commercialisée par la firme Pharmacia ("Oligolabelling kit") fut utilisée. Avec cette méthode, il est possible de marquer de 10 ng à plus d'un microgramme d'ADN. De façon standard, 100 ng ont été utilisés pour le marquage. Dans un volume de 32 μL , l'ADN et 10 μL du tampon fourni (qui contient entre autre des hexanucléotides de séquence aléatoire et les 3 dNTP excluant le dCTP) ont été incubés à 95°C durant 5 min. Le microtube a ensuite rapidement été transféré sur de la glace, avant d'y ajouter 2 μL du mélange d'albumine de sérum bovin (BSA), 5 μL d'alpha- ^{32}P -dCTP et de 2 μL de l'enzyme de l'ADN polymérase du fragment Klenow. Ce mélange a été incubé à 37°C durant 90 min. La réaction a été arrêtée avec 5 μL d'EDTA 0,5 M et le volume complété à 100 μL avec de l'eau distillée. La purification et le décompte se fait de la même façon que pour la méthode de coupure-substitution (Sections 11.1 et 11.3).

11.3 Mesure de l'activité spécifique du marquage des sondes moléculaires

Pour mesurer l'incorporation, une partie aliquote de 1 μL de sonde a été précipitée dans environ 5 mL d'acide trichloroacétique (TCA) 5%, puis a été passée à travers un filtre de laine de verre (Whatman GF/C). Une fois sec, le filtre a été plongé dans un 5 mL de liquide à scintillation (4 g de 2,5-diphényloxazol), 0,1 g de 1,4-bis(2-(5-phényloxazolyl)benzène dans 1 L de toluène) dans un vial de plastique.

La mesure a été faite dans un compteur à scintillation Beckman. L'activité spécifique se mesure en CPM par μg d'ADN.

12. HYBRIDATION MOLÉCULAIRE

12.1 Hybridation non différentielle

Une fois prête pour l'hybridation, la membrane a été insérée et scellée dans un sac de plastique (BRL). Pour chaque centimètre carré de membrane, environ 0,1 mL de solution d'hybridation (50% de formamide déionisée, SSPE 5X [NaCl 0,75M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ 0,05M et EDTA 0,005M à pH 7,4]), solution de Denhardt (1,0 g/L de ficoll 400, 1,0 g/L de polyvinyl-pyrrolidone et 1,0 g/L de BSA), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ADN de sperme de hareng ou saumon dénaturé, et 5% de SDS ont été insérés dans le sac. La quantité totale de solution insérée a été notée. Le sac a été incubé à 42°C sur une plaque agitatrice rotative pendant au moins 4h. Cette préhybridation sature les sites d'attachement non-spécifiques de la membrane, par l'ADN de sperme de hareng ou saumon et la BSA contenus dans la solution.

La quantité de sonde ajoutée pour l'hybridation variait généralement de 10^5 à 10^6 CPM par mL de solution d'hybridation. Après avoir complété le volume à 150-200 μL avec de l'eau distillée, la sonde a été dénaturée à 95°C durant 5 min., puis immédiatement insérée dans le sac en prenant bien soin qu'elle se mélange rapidement et uniformément dans toute la solution d'hybridation. Le tout a été incubé à 42°C sous agitation durant 18 h. La membrane a été ensuite retirée et soumise à une série de lavages à 60°C. Les premiers lavages ont été effectués

avec du SSC 2X et ensuite avec une solution de SSC 0,2X et SDS 0,2%. Pour chacune des deux solutions, trois lavages de 10-15 min. avec environ 500 mL de tampon ont été effectués avec agitation. Les membranes ont ensuite été légèrement séchées à l'air.

12.2 Hybridation différentielle

Les ORFs du HPV16 amplifiés par PCR (Section 8.0, et clonés (Section 9.0)) ont été utilisés comme des sondes moléculaires dans le criblage par hybridation différentielle afin de caractériser d'une part les séquences d'ADN du HPV16 intégré dans les cellules et d'autre part la transcription des gènes du HPV16 en fonction du programme de différenciation des cellules hôtes. Le procédé de pré-hybridation, hybridation et lavage a été tel que décrit dans la section (12.1).

12.3 Autoradiographie

Les membranes hybridées ont été disposées dans des cassettes métalliques (Dupont Canada). L'exposition a été effectuée sur un film Kodak X-Omat RP (Picker International, St. Laurent, Canada) dans une cassette à autoradiographie en présence d'un écran amplificateur. L'exposition a généralement été effectuée à -70°C pour une période variant d'une heure à une semaine. La révélation du film est effectuée dans un appareil à développement automatique (X-Omat 20 processor, Kodak).

13. ÉTUDE DES MÉCANISMES CELLULAIRES

13.1 Études fluorographiques: Elucidation du rôle de l'ion calcium (Ca^{2+}) dans la signalisation cellulaire

13.1.1 Dosage du calcium intracellulaire (Ca^{2+}) par microspectrofluorométrie

13.1.1.1 Principe de la microspectrofluorométrie

Des composés fluorescents, capables de fixer le calcium (Ca^{2+}), sont utilisés pour mesurer la concentration des ions Ca^{2+} intracellulaires dans les cellules vivantes à l'aide d'un spectrophotomètre spécialement conçu (Spex Industries, CM3, New Jersey, USA). Les détails du principe de cette technique sont décrits par Grynkiewicz *et al.* 1985. Le composé fluorescent est le fura-2, un acetoxymethylester, (Molecular Probes, Eugène, Oregon, USA). Les cellules sont perméables à ce corps qui retourne à la forme libre non perméable sous l'influence des estérases cellulaires, ce qui l'emprisonne dans la cellule. Lors de la fixation des ions Ca^{2+} au fura-2, on observe un déplacement du maximum d'émission de fluorescence qui permet la quantification du Ca^{2+} intracellulaire.

Dans le but d'éliminer toute fluorescence non spécifique associée au colorant, rouge phénol, et l'interférence de certains acides aminés qui se trouvent dans le milieu de culture, nous avons préparé un milieu simplifié dont la composition a été déterminée par un programme d'ordinateur spécialement conçu pour les expériences d'électrophysiologie (Fabiato, 1985, 1988). Il tient compte des forces ioniques et permet l'élaboration d'un milieu de culture, simplifié.

13.1.1.2 Mode de chargement des cellules en Fura-2

Le fura-2, est utilisé en solution finale a 2 μM . Un volume de 50 μl d'une solution stock de 1 mM est ajouté à 50 μL de DMSO et mélangé au vortex pendant 10 min. à la noirceur, le fura-2 étant photosensible. Un volume de 20 μl est ajouté à 10 mL du milieu de culture (Section 1.0). L'ensemble est bien mélangé et un volume de 1 à 2 ml est alors ajouté à chaque boîte de pétri de 35 mm. Après incubation à 37°C pendant 30 min., les boîtes de pétri sont vidées de leur solution de fura-2, lavées deux fois au PBS stérile et un volume de 2 ml de milieu simplifié est alors ajouté à chaque boîte. Les cultures sont gardées dans ce milieu synthétique jusqu'à leur utilisation dans les 30 à 45 min. suivantes.

13.1.1.3 Mesure de la concentration du calcium intracellulaire (Ca^{2+})

Les concentrations du Ca^{2+} intracellulaire ont été déterminées par la mesure du signal de fluorescence à partir de l'indicateur fura-2 (Section 13.1.1.1). Les cellules sont chargées au fura-2 tel que décrit à la section 13.1.1.2). Les expériences ont été réalisées à la température de la pièce soit sur des cellules individuelles ou sur des groupes de 4 à 8 cellules. Les lamelles sur lesquelles les cellules ont été cultivées (Section 4.3.2) ont été transférées dans une chambre expérimentale spécialement conçue pour le microscope inversé (Carl Zeiss Canada, Don Mills, Ont., Canada) qui est couplé à un spectrophotomètre qui mesure les cations CM3 (Spex Inc., Newark, N.J., USA). Les mesures du Ca^{2+} ont été réalisées à des longueurs d'ondes d'excitation de 350 nm et 380 nm qui alternent à une fréquence de 1 Hz. L'échantillon est analysé à partir d'un objectif 40X d'un

microscope épifluorescent (UVF L40, Olympus Optical Co., Tokyo, JAPAN). La lumière émise, après sa réception par le même objectif, passe à travers un filtre d'interférence de 505 nm et son intensité est enregistrée par un compteur à photons (Spex Inc., Newark, N.J., USA) attaché au microscope.

Le $[Ca^{2+}]$ intracellulaire a été estimé à partir du rapport des intensités des émissions du fura-2 à 505 nm induite par des excitations alternées à des longueurs d'onde de 350 nm et 380 nm en se servant de la formule mathématique (Grynkiewicz *et al.* 1985) tel que décrit à dessous:

$$[Ca^{2+}] = K_d \times \frac{(F_{min})}{F_{max}} \times (R - R_{min}) (R_{max} - R)$$

où

R correspond au rapport de fluorescence enregistré durant l'expérience.

R min correspond au rapport de fluorescence durant le test de calibration sur des cellules non lysées en utilisant une solution 4 μ M d'ionomycine.

R_{max} correspond à un rapport de fluorescence enregistré durant le test de calcul sur les cellules non lysées en utilisant une solution 10 mM EGTA (pH 8.2).

F_{max}:F_{min} correspondent à des intensités de fluorescence pour des excitations à 380 nm.

K_d = constante de dissociation du Fura-2 à la température de la pièce (135 nm).

13.1.1.4 Modulation du taux de calcium intracellulaire

La variation du taux de Ca^{2+} intracellulaire sous l'effet de différents agonistes a été mesurée. Le rôle modulateur des agonistes a été testé comme suit. Une fois le niveau de base du Ca^{2+} mesuré, une certaine quantité de l'agoniste est ajoutée dans la chambre expérimentale (section 13.1.1.3).

13.1.1.5 Étude de la dépolarisation de la membrane cellulaire par microspectrofluorométrie

Une fois le niveau de base de Ca^{2+} déterminé selon le montage décrit en 13.1.1.3, un volume de 20 à 50 μl d'une solution de potassium très concentrée, 45 mM, est ajoutée. Les variations du taux de calcium sont enregistrées aux fins d'analyse.

13.1.2 Techniques d'imagerie

13.1.2.1 Principe d'imagerie

L'utilisation d'un système d'imagerie couplé au microscope à fluorescence permet de suivre l'évolution des l'ion Ca^{2+} *in vivo* selon le principe décrit en 13.1.1.1.

L'intensité de fluorescence du fura-2 associée aux cellules chargées préalablement au fura-2 (section 13.1.1.1.2 et 13.1.2.2) a été mesurée par appareil d'imagerie multisystème composé d'un microscope à fluorescence (Olympus, Carsen Medical Scientific Ltd., Markham, Ont., Canada) muni d'un

caméra vidéo (Imagina Research IMI, Ste Catherine, Ont., Canada) sous contrôle direct d'un ordinateur. Les détails sur cette technique ont été décrits précédemment (Miller, 1988; Chandra *et al.*, 1989).

L'analyse des images est effectuée à l'aide d'un système d'imagerie "imaging" spécialement conçu et assisté par ordinateur (Imagina Research IMI, Ste Catherine, Ontario, Canada).

13.1.2.2 Evaluation de la concentration du Ca^{2+} par imagerie

Les cellules sont chargées au fura-2 ainsi que décrit dans la section 13.1.1.2.

Les manipulations qui ont suivi le chargement des cellules ont été réalisées à température ambiante. Les variations d'intensité de fluorescence sont captées par une caméra vidéo. A intervalles de 10 secondes, 20 photos vidéo ont été prises à une excitation de 340 nm et 20 photos vidéo à une excitation de 380 nm. L'ensemble des photos prises en série ont été emmagasinées dans le disque dur pour être analysées plus en détail pour divers paramètres. Après la collecte des séquences des images, la fluorescence non spécifique est soustraite de la fluorescence de la cellule correspondante. Le rapport des images générées à des excitations de 340 et 380 nm (F340/F380) pour chaque cellule individuelle a été analysé par un programme d'ordinateur spécialement conçu pour l'analyse d'imagerie. Une carte d'image spatiale et temporelle est ainsi produite.

La concentration du Ca^{2+} intracellulaire libre ($[\text{Ca}^{2+}]$) a été calculée à partir de l'équation suivante:

$$[\text{Ca}^{2+}] = k_d [(R-R_{\min})/(R_{\max}-R)\beta]$$

où les paramètres représentent:

k_d = constante d'équilibre pour la liaison Ca^{2+} au fura 2 = 224 nm

$R = F_{340}/F_{380}$ avec F_{340} = Intensité de fluorescence à $\lambda = 340$ nm et

F_{380} = Intensité de fluorescence à $\lambda = 380$ nm

R_{\max} = R à un niveau de saturation de Ca^{2+} (2 mM)

R_{\min} = R à un niveau zéro de Ca^{2+} (2 mM EDTA) et

$\beta = \frac{F_{340} \text{ (à un niveau zéro } \text{Ca}^{2+})}{F_{380} \text{ (à un niveau de saturation du } \text{Ca}^{2+})}$

13.1.2.3 Modulation du taux de calcium intracellulaire libre

Le protocole expérimental est décrit dans la section 13.1.1.4. La modulation de la réponse calcique a été étudiée en analysant les effets des agonistes sur la réponse du Ca^{2+} . La réponse du Ca^{2+} et sa modulation a été étudiée pour les temps suivants: (0, 10 et 30) min. et (24, 48 et 72) h.

13.1.2.4 Étude de la dépolarisation de la membrane cellulaire en imagerie

La méthodologie employée pour tester la dépolarisation membranaire est la même que celle décrite dans la section 13.1.1.5.

Les divers agonists utilisées pour l'analyse de la réponse calcique sont les suivants: acetylcholine (Sigma, St. Louis, Mo, USA) 1 mM; U-73, 122 (Sigma, St. Louis, Mo, USA) 2.5 μ M; TMB-8 5 μ M et Carbachol 1.2 mM (Calbiochem, San Diego, Ca, USA); D600 (RBI, Natrick, Ma, USA) 50 μ M; Cobalt (Anachemia, Toront, Ont) 5 mM; Thapsigargine (Calbiochem, USA) 1.1 μ M; Ionomycine (Calbiochem, USA) 2 μ M; Cafeine (Sigma, USA) 4 mM; Lanthanum (Sigma, USA) 1 mM).

13.2 Essais enzymatiques de l'activité de la protéine kinase C (PKC): Étude de la modulation de la transduction du signal

13.2.1 Mode de préparation des cellules pour les essais enzymatiques de la PKC

Les cellules ont été cultivées dans des boites de pétri de 90 mm tel que décrit dans la section 1. Le milieu a été changé après 24 heures. Après 3 jours en culture, les substances à tester pour leur effet sur l'activité de la PKC selon les doses indiquées dans le Tableau 8 sont ajoutées (section 13.2.4) au milieu de culture. Différents temps d'exposition ont été retenus (0, 10 et 30) min., (24, 48 et 72) h et 7 jours. Le TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) a été utilisé comme témoin positif exogène (dans ce cas les cellules sont exposés 10 min. avant extraction des membranes) ou endogène (dans ce cas le TPA est ajouté au milieu réactionnel contenant la suspension des membranes (Chakravarthy *et al.* 1991).

13.2.2 Mode de préparation des membranes cellulaires

Les cellules sont rincées au PBS deux fois et un volume de 1 mL est additionné d'une solution de lyse hypotonique (1 mM NaHCO₃, 5 mM MgCl₂ et 100 μM PMSF, pH 7.5) pendant 2 min. sur de la glace. À l'aide d'une tige caoutchoutée, les cellules sont recoltées dans un tube conique à centrifugation et mélangées au Vortex pendant 2 min. Les noyaux et les cellules non lysées sont séparés des membranes par une centrifugation à 500 x g pendant 5 min. à 4°C. Le surnageant est transféré dans des tubes d'ultracentrifugation Beckman (Beckman Instrument Inc., Ca, USA). Il peut être centrifugé à 100,000 x g pendant 10 min à 4°C dans une ultracentrifugeuse de type TL-100 ou à 16,000 x g pendant 20 min. à 4°C dans une ultracentrifugeuse de type microfuge. Après centrifugation, le surnageant qui constitue la fraction cytoplasmique est recolté et le culot qui représente les membranes cellulaires est resuspendu dans 0.5 mL du tampon d'essai 2X (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 2 μM CaCl₂, 200 μM vanadate de sodium, 200 μM pyrophosphate de sodium, 2 mM fluorure de sodium et 200 μM PMSF) à l'aide d'une micropipette de type Eppendorf et mélangé vigoureusement afin d'obtenir une suspension homogène. Un volume de 20 μl de cette préparation contenant 5 à 6 μg de protéine membranaire (Test Bio-Rad) ont été testées pour l'activité PKC.

Le substrat utilisé avant la séquence en acides aminés FKSFKL-NH₂ (Graff *et al.* 1989) a été synthétisé par notre groupe de signalisation cellulaire par Dr. Ross Williams, Conseil National de Recherche du Canada, Ottawa, Ontario, Canada). Un volume de 10 μl est ajouté au mélange réactionnel tel que décrit en 13.2.8.

13.2.3 Inhibiteurs de la PKC

Un peptide dont la séquence en acides aminés est RFARKGALRQKNVHEVKN a été synthétisé par le Dr. R. Williams (IBS, CNRC, Ottawa, Canada) tel que décrit précédemment (Chakravarthy *et al.* 1991). Ce peptide agit comme inhibiteur compétitif spécifique de la PKC (Tableau 4). D'autres inhibiteurs ont été également testés. Le Tableau 4, en donne la liste et les doses utilisées dans ce travail. Un volume de 10 μ l est additionné au mélange de réaction tel que décrit en 13.2.4.

13.2.4 Mesure de l'activité PKC

L'activité PKC associée aux membranes ainsi que l'activité cytoplasmique ont été mesurées par le biais de l'incorporation du 32 P ATP type Gamma (γ) tel que décrit par Chakravarthy *et al.* 1991 et Ennaji *et al.* 1992c.

Le contenu en protéine de chaque échantillon a été déterminé par le test de Bradford (Bradford M. 1976). La quantité de protéine utilisée a été standardisée afin d'avoir 5 à 6 μ g de protéine par essai. Un volume de X μ l correspondant à cette concentration de protéine a été ajouté au mélange de réactionnel, qui a été préparé dans un tube eppendorf de 1.5 mL. Un volume de 10 μ l d'une solution 900 μ M à 1 mM de substrat (section 13.2.2) (dans un tampon 50 mM Tris) a été ajouté. Si nécessaire le volume total est ajusté à 90 μ l avec du tampon Tris 50 mM pH 7.5. Un volume de 10 μ l d'une solution 500 μ M du γ 32 P ATP (220 CPM/pmol dans du tampon Tris, 0.5 μ M/Tube) a été ajouté pour compléter le volume de réaction à 100 μ l. Le mélange final de réaction est mélangé et incubé

TABLEAU 4. Liste et effets des inhibiteurs de la protéine kinase C (PKC) utilisés sur des cellules L6.

Inhibiteurs** de la PKC	Concentration finale utilisée (μ M)	Références	n	% d'inhibition* de la PKC membranaire***	
				endogène	exogène
Témoin	0.0		4	0.0	0.0
U-73,122	5.0	Bleasdale <i>et al.</i> , 1989 Smith <i>et al.</i> , 1990	4	100.0	69.2 \pm 4.4
peptide synthétique	25.0	Graff <i>et al.</i> , 1989	4	36.0 \pm 3.6	32.0 \pm 6.1
chélérythrine	10.0	Herbert <i>et al.</i> , 1990	4	0.0	14.7 \pm 7.1
H-7	25.0	Hidaka <i>et al.</i> , 1984 Katayama <i>et al.</i> , 1992 Boulis et Davis, 1990	4	0.0	5.0 \pm 1.3
sphingosine	5.0	Senistera et Epanand, 1992	4	0.0	0.4 \pm 8.5
TPA (Témoin positif)	1.0	Chakravarthy <i>et al.</i> , 1991	4	Activation (le rapport des activités spécifiques de la PKC des cellules traitées et des témoins est de 2.5)	

L'activité de la PKC est exprimée en p moles de substrat phosphorylé par 0.1 mg de protéines membranaires totales. Le TPA a été utilisé comme témoin positif.

* % d'inhibition = $\frac{\Delta \text{activité spécifique de la PKC des cellules (témoin-traité)}}{\text{activité spécifique des cellules témoin}}$

** Les cellules ont été exposées aux inhibiteurs aux concentrations indiquées: i) soit 30 min. avant extraction des membranes (exogène) ii) ou ajoutés au milieu réactionnel (endogène) ainsi qu'il est décrit dans les sections 13.2.3 et 13.2.4. Les chiffres représentent une expérience typique (faite en triplicate). Les cellules étaient cultivées dans du milieu EMEM à faible teneur en Ca^{2+} (0.05 mM).

*** Seules les cellules témoin ont été utilisées dans cette expérience, dont le but était de tester la spécificité des PKCs présentes dans le modèle myoblastes.

n (nombre d'expériences)

TABLEAU 4. Liste et effets des inhibiteurs de la protéine kinase C (PKC) utilisés sur des cellules L6.

Inhibiteurs** de la PKC	Concentration finale utilisée (μ M)	Références	n	% d'inhibition* de la PKC membranaire***	
				endogène	exogène
Témoin	0.0		4	0.0	0.0
U-73,122	5.0	Bleasdale <i>et al.</i> , 1989 Smith <i>et al.</i> , 1990	4	100.0	69.2 \pm 4.4
peptide synthétique	25.0	Graff <i>et al.</i> , 1989	4	36.0 \pm 3.6	32.0 \pm 6.1
chélérythrine	10.0	Herbert <i>et al.</i> , 1990	4	0.0	14.7 \pm 7.1
H-7	25.0	Hidaka <i>et al.</i> , 1984 Katayama <i>et al.</i> , 1992 Boulis et Davis, 1990	4	0.0	5.0 \pm 1.3
sphingosine	5.0	Senistera et Eband, 1992	4	0.0	0.4 \pm 8.5
TPA (Témoin positif)	1.0	Chakravarthy <i>et al.</i> , 1991	4	Activation (le rapport des activités spécifiques de la PKC des cellules traitées et des témoins est de 2.5)	

L'activité de la PKC est exprimée en p moles de substrat phosphorylé par 0.1 mg de protéines membranaires totales. Le TPA a été utilisé comme témoin positif.

$$* \% \text{ d'inhibition} = \frac{\Delta \text{ activité spécifique de la PKC des cellules (témoin-traité)}}{\text{activité spécifique des cellules témoin}}$$

** Les cellules ont été exposées aux inhibiteurs aux concentrations indiqués: i) soit 30 min. avant extraction des membranes (exogène) ii) ou ajoutés au milieu réactionnel (endogène) ainsi qu'il est décrit dans les sections 13.2.3 et 13.2.4. Les chiffres représentent une expérience typique (faite en triplicata). Les cellules étaient cultivées dans du milieu EMEM à faible teneur en Ca^{2+} (0.05 mM).

*** Seules les cellules témoin ont été utilisées dans cette expérience, dont le but était de tester la spécificité des PKCs présentes dans le modèle myoblastes.

n (nombre d'expériences)

à 25 - 26°C pendant 10 min. La réaction est arrêtée par addition de 10 μ l d'une solution de 5% d'acide acétique. Les tubes ont été centrifugés rapidement et placés sur de la glace. Un volume de 90 μ L a été prélevé de chaque échantillon et placé sur des morceaux de 2 cm² de papier de type Whatman P81. Les papiers chargés sont lavés deux fois pendant 10 min. dans une solution à 5% d'acide acétique à raison de 10 mL par pièce. La radioactivité liée au papier Whatman lavé a été mesurée avec du liquide à scintillation (LKB, 1217, Rakbeta, Ontario, Canada) en utilisant le mélange à scintillation de type Formula - 989 (Dupont Biotechnology System, Boston, Mass., USA). Pour des fins de calcul, l'incorporation de la radioactivité non spécifique de ATP ³²P a été déterminé en absence du substrat tel que décrit ci-dessus.

Les modulateurs suivants de l'activité PKC ont été utilisées aux concentrations indiquées ci-dessous: Calcium Ca²⁺ (BDH, Montreal, PQ, Canada) 0.25 mM et 1.8 mM; Dimethylsulfoxyde, DMSO (Sigma, St. Louis, Mo, USA) 1% et 4%; acide rétinoïque, RA (BDH, Canada) 0.3 μ M et 3 μ M.

PARTIE C: Communications inter-cellulaires

14. MÉTHODES D'ANALYSE DES COMMUNICATIONS INTERCELLULAIRES

14.1 Cytométrie de flux

L'expression de la connexine 43, protéine hexamère qui compose les jonctions lacunaires, et qui joue un rôle majeur au niveau des échanges cellulaires, cytoplasme à cytoplasme a été analysée par cytométrie de flux tel que décrit

précédemment (Section 4.4). Le marquage immunologique a été réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé spécifiquement contre la connexine-43.

14.2 Microscopie électronique

L'analyse structurale des jonctions lacunaires a été réalisée par immunoélectromicroscopie (IEM) tel que décrit dans la section 4.5. La technique de l'or colloïdal a été utilisée sur un anticorps spécifique anti-connexine 43.

14.3 Technique du "scrape loading"

L'évaluation directe du degré d'échanges intercellulaires est effectuée à l'aide d'un colorant le "jaune lucifer", auquel les cellules sont imperméables (El Fouly *et al.* 1987). Les cellules sont lésées par une entaille faite dans la couche cellulaire. Les cellules sont ensuite exposées pendant 2 min à une solution à 0.5% de "jaune lucifer" (Sigma) dissout dans du PBS puis rincées rapidement au PBS. Les cellules lésées incorporent le colorant fluorescent. Après 5 min les cellules sont examinées au microscope photonique en épifluorescence. Le colorant ne peut circuler de cellule à cellule que par l'intermédiaire des jonctions lacunaires. Le nombre de cellules fluorescentes après un temps donné est une estimation directe de l'amplitude des échanges.

RÉSULTATS

PARTIE A: Établissement de lignées cellulaires contenant le génome complet du virus du papillome humain type 16 (HPV16)

1. MODÈLES CELLULAIRES

Les cellules embryonnaires relativement peu différenciées utilisés dans ce travail sont dérivées de cultures primaires: myoblastes de rat L6 (Yaffe, D. 1968) et kératinocytes de souris Balbc/MK (Hennings *et al.* 1980). Pour ces deux modèles la prolifération de ces cellules peut être stimulée et la différenciation cellulaire est inductible. Dans le cas des L6, à la confluence de la couche cellulaire, le remplacement du milieu de prolifération EMEM (0.05 mM de Ca^{2+}) additionné de 10% de SFV, par le milieu de différenciation: EMEM (1.8 mM de Ca^{2+}) additionné de 3% de serum de cheval (SH), conduit à la fusion des myocytes en syncytiums puis à la formation de myotubes (différenciation terminale) (Figures 7 et 8).

En ce qui concerne les Balbc/MK, le même milieu de prolifération que celui des L6 est utilisé, additionné de 50 nM de facteur de croissance épidermique "EGF". Il est remplacé à confluence du feuillet cellulaire par du milieu de différenciation: EMEM (1.8 mM de Ca^{2+}) dépourvu d'EGF (Figure 9). Le programme de différenciation est amorcé dans ces conditions. Cependant, le retour à l'état de prolifération décrit ci-dessus est possible: les kératinocytes exposés au calcium jusqu'à 72 h entrent dans une phase où le programme de différenciation est réversible. Après substitution d'un milieu pauvre en calcium (0.05 mM) au milieu riche en calcium (1.8 mM), les cellules retournent à l'état prolifératif. Il y a un

FIGURE 7 Évolution de la différenciation et de la morphologie des cellules L6 normales (L6) après coloration au GIEMSA. (Grossissement 400X) Myoblastes embryonnaires (A), acquisition de la bipolarité (B) acquisition de l'orientation et début de la préfusion (C), formation de syncytium et fusion après 3 jours en présence de l'inducteur de la différenciation des cellules L6, le sérum de cheval 2% (D) et formation de myotubes (E et F).

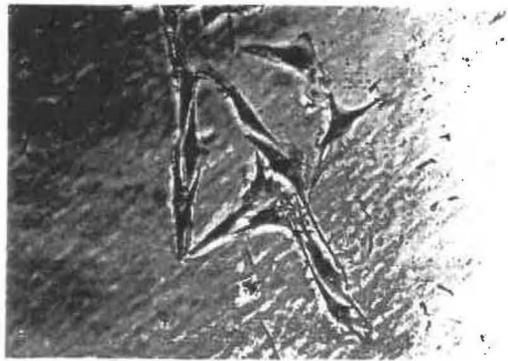
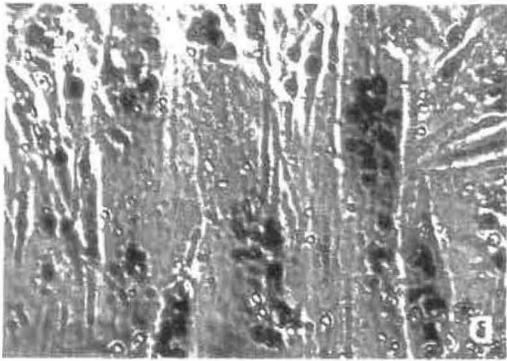
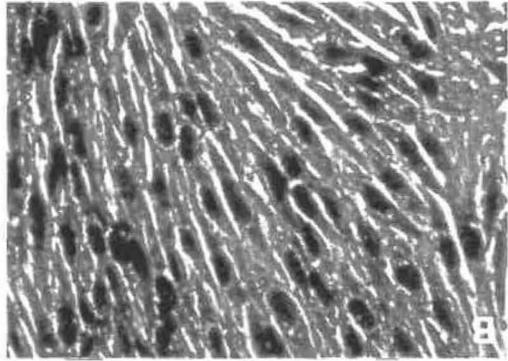
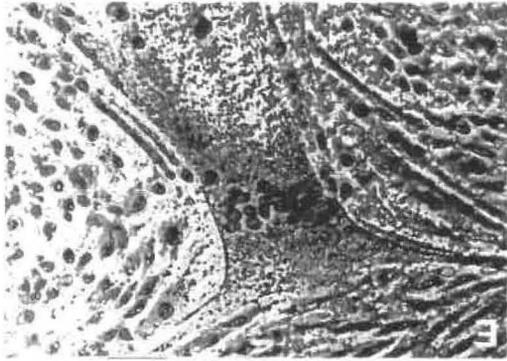
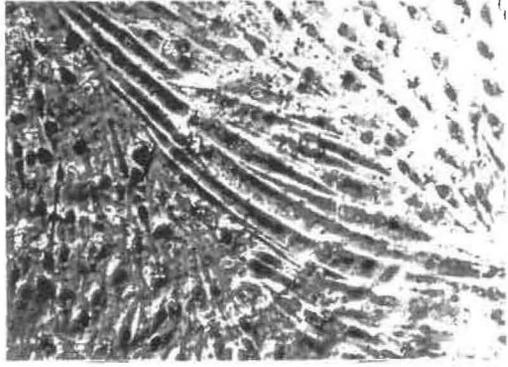


FIGURE 8 Évolution de la différenciation et de la morphologie des cellules L6 transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16) après coloration au GEMSA.

Myoblastes embryonnaires (A) (Grossissement 200X), acquisition de la bipolarité (B) (Grossissement 600X) et acquisition de l'orientation (C) et (D) (Grossissement 400X). Absence de formation de syncytium et de formation de myotubes après 3 jours en présence de l'inducteur de la différenciation des cellules L6, le sérum de cheval 2% (E, F) (Grossissement 200X) et (F) (Grossissement 400X).

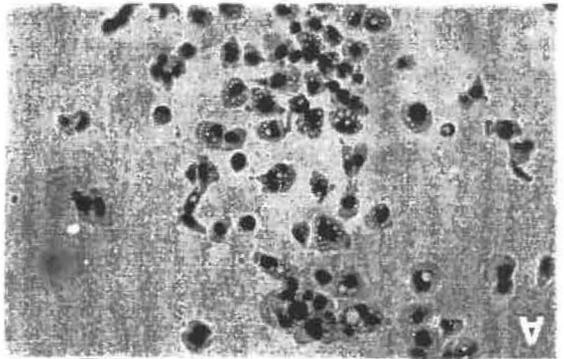
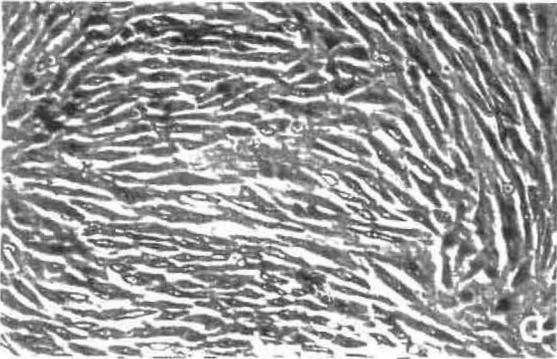
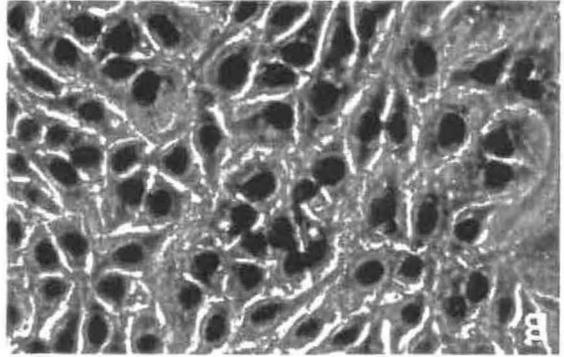
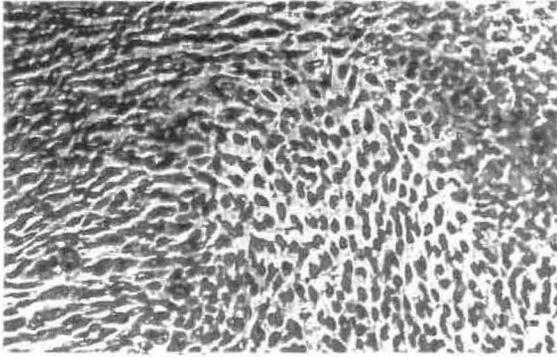
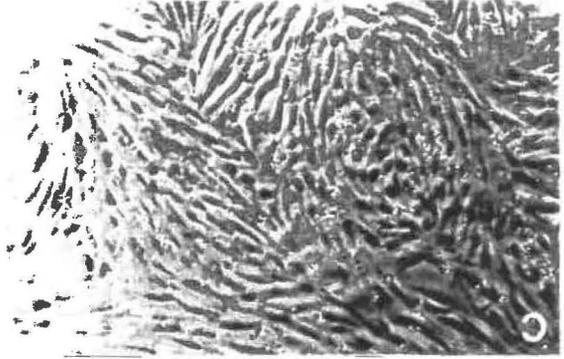
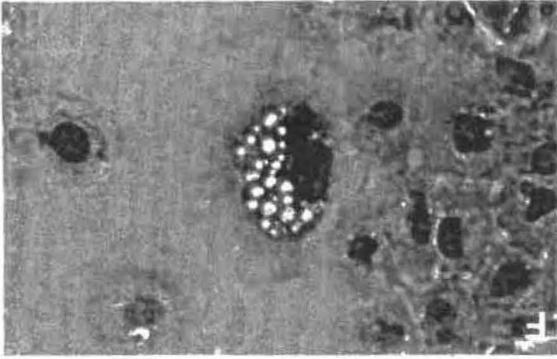
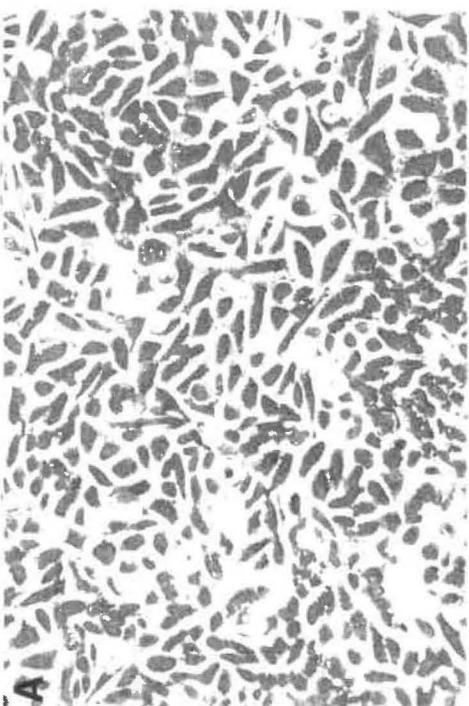
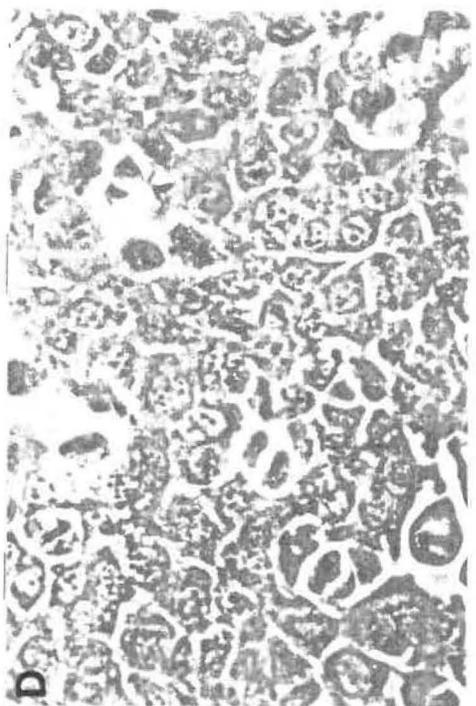
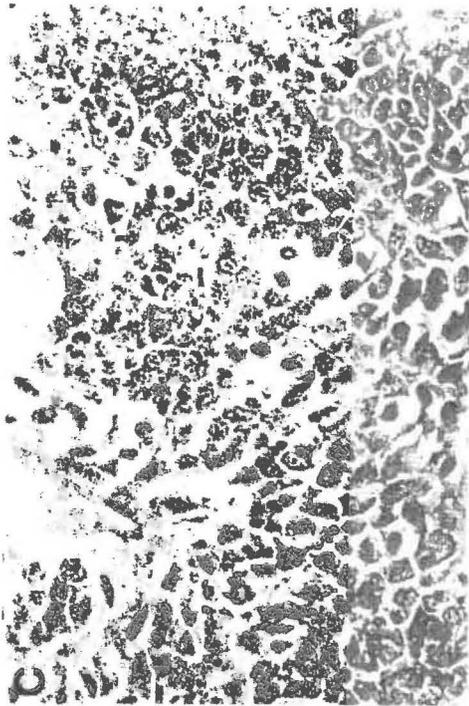


FIGURE 9 Morphologie des kératinocytes normales (Balbc/MK) (A,B) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16) (HPV16-Balbc/MK) (C,D). (Grossissement 400X). Balbc/MK en présence du milieu de culture de prolifération (Ca^{2+} 0.05 mM) (A), Balbc/MK après une semaine en présence du milieu de culture de différenciation (Ca^{2+} 1.8 mM) (B). HPV16-Balbc/MK en présence du milieu de culture de prolifération (C) et HPV16-Balbc/MK après une semaine en présence du milieu de culture de différenciation (Ca^{2+} 1.8 mM) (D).



temps de latence d'autant plus long que les cellules ont été plus longtemps exposées à une dose élevée de calcium. Après 72 h dans le milieu riche en calcium (1.8 mM), la différenciation est irréversible. La différenciation terminale des Balbc/MK est observée en général après une à deux semaines (Figure 9).

2. BANQUE DE GÉNOME COMPLET DU VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN TYPE 16 (HPV16) ET MARQUEURS DE SÉLECTION pSVtkneo β

Le génome complet du HPV16 est produit en grande quantité par amplification dans un vecteur de clonage. Le génome complet à l'état linéaire est ensuite obtenu par digestion du pHPV16 par l'endonucléase de restriction BamHI (Figure 2). Ce génome peut être recircularisé à l'aide de l'enzyme T4 ADN ligase. Les génomes du HPV16 ainsi linéarisés et recircularisés sont prêts pour la transfection et l'établissement de clones cellulaires correspondants complets du HPV16 (section 4). Le marqueur de sélection pSVtkneo β qui contient le gène néo codant pour la résistance à la néomycine a été également linéarisé par coupure unique à l'aide de l'endonucléase de restriction Pvu I. Les génomes complets du HPV16 et du pSVtkneo β ont été co-transfectés dans les cellules hôtes (section 4) selon le rapport 1:10. Le gène "néomycine" confère la résistance à la généticine (G418) utilisée par une première sélection des clones postifis.

3. DÉVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE DE TRANSFECTION DES CELLULES

Les techniques de transfection généralement utilisées pour introduire l'ADN dans les cellules en culture endommagent fréquemment les monocouches

cellulaires, ce qui réduit le nombre de cellules susceptibles d'être transfectées. Ce travail étant lié à l'étude de la prolifération et de la différenciation, il nous a paru nécessaire pour répondre à nos objectifs de travail de comparer l'efficacité de différentes méthodes de transfection et de sélectionner celles offrant la meilleure conservation des cellules.

3.1 Détermination de la sensibilité des cellules à la généticine (G418)

Dans le but d'éliminer l'interférence d'une toxicité non spécifique due à l'effet du marqueur de sélection, la généticine (G418), la concentration optimale à utiliser a été déterminée par des expériences préliminaires à 200 $\mu\text{g/ml}$ de G418.

Nous avons ensuite comparé quelques techniques de transfection basées sur la précipitation de l'ADN par le chlorure de calcium (Graham et Van der Eb, 1973) et l'électroporation (Reiss *et al.* 1986; Chu *et al.* 1987). Ces comparaisons ont été faites en utilisant comme indicateur la lignée cellulaire L6 transfectée avec l'ADN du pSVtkneo β qui code pour la résistance à la néomycine (Ennaji *et al.* 1992a).

3.2 Technique de précipitation au chlorure de calcium (CaCl_2)

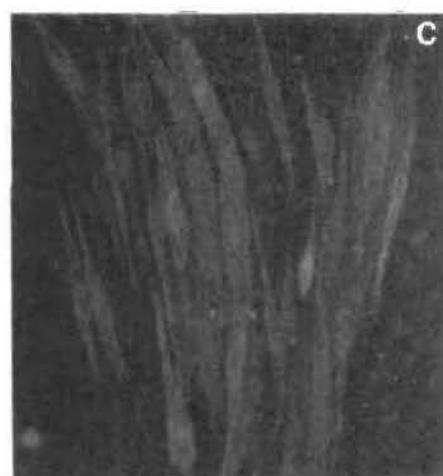
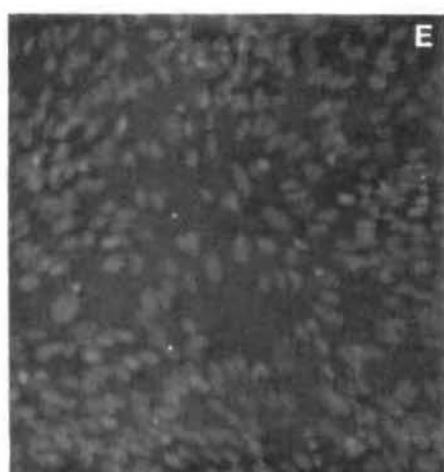
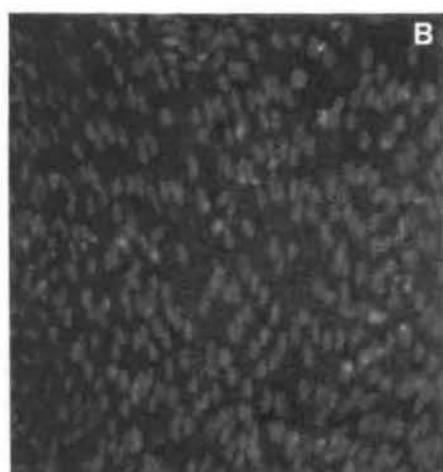
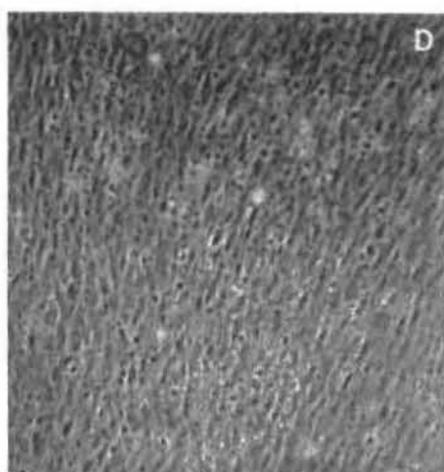
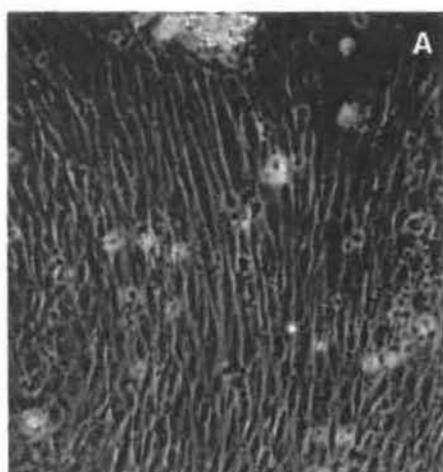
La première méthode de transfection au chlorure de calcium a provoqué une forte dégénérescence du feuillet cellulaire. Cette technique s'est révélée particulièrement toxique et a été rapidement abandonnée par la suite.

3.3 Technique d'électroporation: Optimisation des conditions des paramètres d'électroporation

L'électroporation est basée sur un processus réversible permettant l'altération de la barrière membranaire cytoplasmique par impulsion électrique contrôlée. La formation de pores permet l'introduction de macromolécules exogènes, dans notre cas: de l'ADN viral. L'efficacité de la transfection a été testées par la résistance à la généticine (G418) (Ennaji *et al.* 1992c). Ni le processus de différenciation cellulaire ni la prolifération ne semblent affectées dans nos conditions d'expérience [(Figure 10): survie cellulaire; figure 10 A-D, prolifération par coloration de Hoescht (Figure 10 B-E), présence de l'actine (Figure 10 C-F)].

À la lumière de ces résultats cette technique d'électroporation a été retenue pour la transfection après optimisation des paramètres (Ennaji *et al.* 1992c). L'isolement de souches cellulaires transfectées contenant le génome complet du virus du papillome humain type 16 (HPV16) (Section. 4) a été réalisée avec les conditions optimales préalablement établies pour l'électroporation du pSVtknéo β . Suite à ces travaux nous avons utilisé par la suite les paramètres suivants: concentration en ADN, 10 μ g; forme linéaire, 200V et durée de 100 m sec.

FIGURE 10 Effet de l'électroporation sur la croissance et la différenciation cellulaire: Évaluation en microscopie optique et à épifluorescence (Grossissement 200X).
Cellules traitées (A,B,C).
Cellules non traitées (D,E,F).
Le même champ des cellules traitées et non traitées est observé en microscopie optique (A,D), coloration de Hoesch (B,E) et immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre l' α -actine (C,F).



PARTIE B: Étude de l'expression génétique du virus du papillome humain type 16 (HPV16) et de la prolifération et différenciation cellulaires

4. CARACTÉRISATION DES LIGNÉES CLONALES

4.1 Production de sondes moléculaires spécifiques

La caractérisation des divers clones cellulaires d'une part et l'analyse de la transcription des gènes viraux au cours de la différenciation de ces clones, d'autre part, nécessitaient la génération de sondes spécifiques. Pour ce faire, nous avons généré deux catégories de sondes i) des sondes moléculaires du génome complet du HPV16 (Figure 2) et ii) des cadres ouverts de lecture (ORFs) du HPV16 dont les séquences des amorces ayant servi à leur amplification sont présentées dans le Tableau 3. À l'aide des amorces spécifiques, les différents ORFs du HPV16 ont été amplifiés par PCR (Figure 11). Chacun de ces ORFs a été inséré dans le vecteur de clonage pUC18. Ces sondes spécifiques ont été utilisées pour la caractérisation des séquences intégrées et des transcrits viraux spécifiques du HPV16.

4.2 Caractérisation de cellules L6 transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16)

À l'aide de la sonde génomique totale (Figure 2) nous avons isolé des clones cellulaires positifs au HPV16 par "Dot blot". L'identité du HPV16 dans ces clones cellulaires positifs a été confirmée par analyse de type "Southern blot". L'état physique du génome du HPV16 a ensuite été déterminé par analyse de restriction

FIGURE 11 Profils électrophorétiques des produits d'amplification par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) des cadres de lecture ouverts (ORFs) du virus du papillome humain type 16 (HPV16).
Témoin négatif (puits 1). Cadres ouverts de lecture (ORFs): ORF E₄ (puits 2,3), ORF E_{1a} (puits 5,4), ORF E_{1b} (puits 6,7), ORF L₁ (puits 8,9), ORF L₂ (puits 10,11), ORF E₆ (puits 12), ORF E₇ (puits 13) et marqueur de poids moléculaire λ /Hind III (puits 14).
L'ADN des cellules L6 transfectées par le HPV16 a été extrait tel que décrit dans la section 6.1.1. (Matériel et Méthodes). Les différents ORFs ont été amplifiés tel que décrit dans la section 8 (Matériel et Méthodes) à l'aide des amorces spécifiques dont la séquence est présentée dans le tableau 3.
La taille des produits de l'amplification de chaque gène est conforme à cell rapportée par Baker 1987.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 (pb)



-23130
-4361
-2322
-2027

et "Southern blot" (Figures 12 et 13). Les résultats montrent que l'état physique du HPV16 dans les clones cellulaires est principalement extrachromosomique (Tableau 5). Le nombre de copies du génome viral par cellule varie de 1 à 150 (Tableau 5). Une grande variation morphologique entre les clones positifs au HPV16 a été observée (Figure 14). Par ailleurs, quelques cas d'intégration ont été mis en évidence (Figure 13) et identifiés (Tableau 5).

5. ÉTUDE STRUCTURALE DES CELLULES NORMALES ET TRANSFECTÉES PAR LE VIRUS DE PAPILLOME HUMAIN TYPE 16 (HPV16)

5.1 Morphologie

Nous avons comparé la morphologie des cellules L6 (section 4) co-transfectées par les ADN du HPV16 et le pSVtkneo β à celle des témoins. Les cellules non transformées se caractérisent par leur aspect fibroblastique et étalé (Figures 7 A et B). Dans nos conditions d'expérience, les cultures se présentent comme une juxtaposition de colonies laissant entre elles des espaces vides qui peuvent persister après le 4^{ème} jour de culture. Les cellules ont tendance à devenir bipolaires et à s'orienter parallèlement les unes par rapport aux autres, dans les cultures sub-confluentes (Figure 7). À la confluence du feuillet cellulaire, les myoblastes normaux fusionnent pour former des syncytium multinuclées qui évolueront en myotubes (Figure 7).

Le passage du milieu de prolifération au milieu de différenciation s'effectue par substitution du SFV, contenant des facteurs de croissance, au HS qui n'en contient

TABLEAU 5. Caractérisation de l'état du génome du virus du papillome humain type 16 (HPV16) et son nombre de copies par génome cellulaire dans quelques clones cellulaires positifs du HPV16.

Clones cellulaires positifs au HPV16	ADN du HPV16 Extrachromosomique	ADN du HPV16 Intégré	Évaluation du nombre de copies du HPV16 par génome cellulaire*
H16C 24	+	-	100
H16C 28	+	-	10
H16C 23	+	-	1
H16C 22	+	-	1
H16C 29	+	-	1
H16C 25	+	-	10
H16C 26	+	-	5
H16C B1	+	-	10
H16C A1	+	-	150
H16C 21	+	-	10
H16C 27	+	-	50
H16C 19	-	+	1
H16C 7	+	-	10
H16C 1000	+	-	1
H16C 17	+	-	1
H16C 50	-	+	1
H16C 101	-	+	1
H16C α 1	+	-	10
H16C β 1	+	-	1
H16C 122	+	-	25

* D'après l'intensité d'hybridation à partir de dilutions standard du génome du HPV16.

FIGURE 12 Autoradiographie du transfert de type "Southern" des clones cellulaires positifs au virus du papillome humain type 16 (HPV16), (HPV16-L6), analysé à l'aide de différents enzymes de restriction. Etat extrachromosomique du HPV16 dans les cellules HPV16-L6. L'ADN total des clones cellulaires L6 positifs au HPV16 a été digéré par différents enzymes de restriction et séparé sur gel d'agarose à 0.7%, transféré sur membrane de nylon et marqué au ^{32}P à l'aide d'une sonde totale du HPV16. Témoin positif, ADN du HPV16 (puits 1), témoin négatif, ADN cellules L6 (puits 2), ADN des cellules L6 transfectées par du HPV16 (puits 3 à 5). L'ADN du HPV16 est caractérisé par les enzymes qui n'ont pas de site de restriction (Gel A), Hind III (puits 3), Xho I (puits 4) et Xba I (puits 5) et les enzymes qui ont un ou plusieurs sites de restriction (Gel B), Hind III (puits 3), Bam HI (puits 4) et Pst I (puits 5). Dans les séquences d'ADN du HPV16, il n'y a pas de sites de restriction pour les enzymes Hind III, Xho I et Xba I. Pour les enzymes BamH I et Pst I il existe respectivement de 1 à 6 sites de restriction.

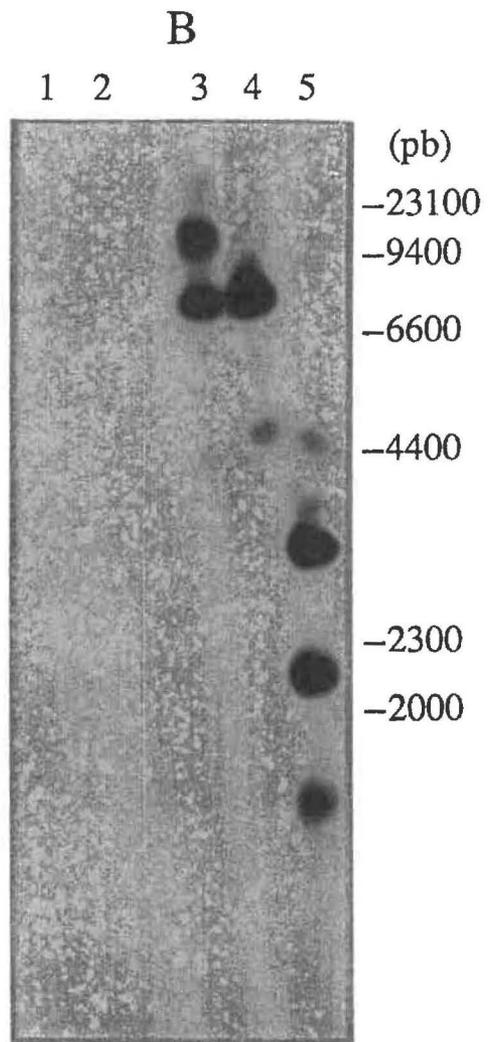
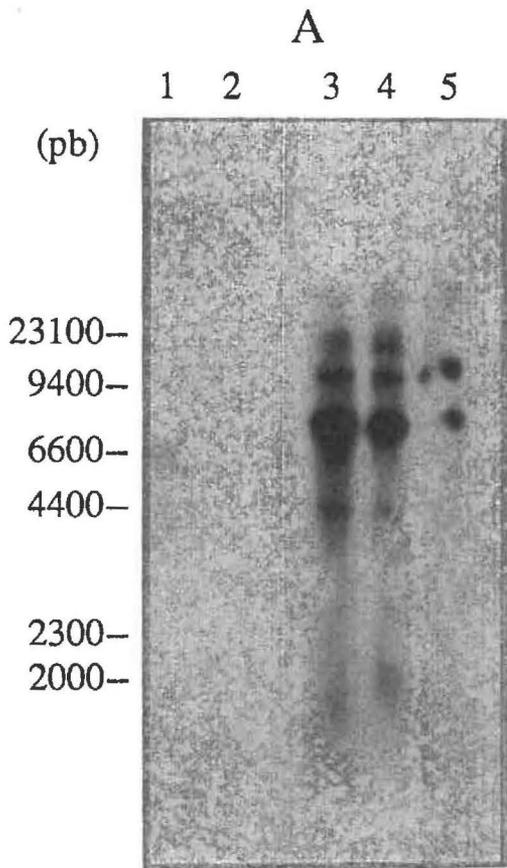
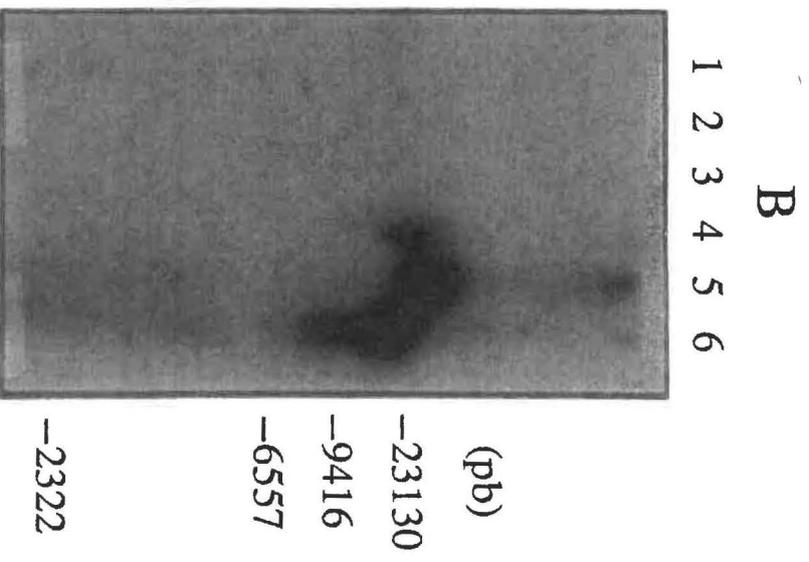
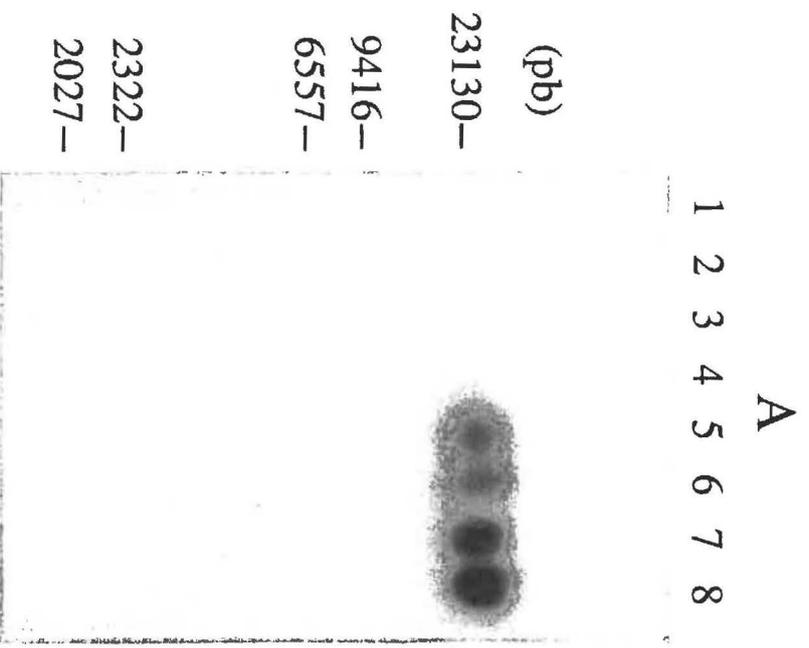


FIGURE 13 Autoradiographie du transfert de type "Southern" des clones cellulaires positifs au virus du papillome humain type 16 (HPV16), (HPV16-L6) analysés à l'aide de différents enzymes de restriction. Etat intégré du HPV16 dans les cellules HPV16-L6. L'ADN total des cellules normales L6 et des clones cellulaires L6 positifs au HPV16 a été digéré par différents enzymes de restrictions et séparé sur gel d'agarose 0.7%, transféré sur membrane de nylon et marqué au ³²P à l'aide d'une sonde totale du HPV16 ADN intact (Gel A): ADN de cellules L6 normales (puits 1 à 4). ADN de cellules L6 transformées par le HPV16 (puits 5 à 8). ADN digéré par enzymes de restrictions (Gel B): ADN de cellules L6 normales (puits 1 à 3). ADN de cellules L6 transformées par le HPV16 (puits 4 à 6). ADN intact (puits 1 et 4) ADN digéré par Xba I (puits 2 et 5) et ADN digéré par Bam HI (puits 3 et 6).



pas. Les clones cellulaires contenant le génome complet du HPV16 ont également, une morphologie de type fibroblaste en début de culture, mais sont sensiblement plus petites et arrondies que les témoins (Figure 8). Des cellules géantes multinuclées sont observées qui ne peuvent être confondues avec les syncytiums résultant de la fusion cellulaire des myoblastes normaux (Figures 7 et 14). Il s'agit de cellules où la karyokinèse s'effectue sans que la cytokinèse s'ensuive (Figure 14).

À confluence du feuillet cellulaire, la population des myoblastes transfectés est hétérogène. Certaines cellules sont bi-polaires et orientées, mais ne dépassent pas ce stade (Figure 8). Le phénomène d'inhibition de contact n'est plus observé. Les cellules continuent de se multiplier et forment des couches superposées.

En ce qui concerne l'autre modèle à l'étude, les kératinocytes Balbc/MK n'acquièrent une structure caractéristique "en pavage" qu'après exposition à des doses élevées de calcium (Figure 9). Lorsque transfectées par les HPV16, ces kératinocytes n'acquièrent jamais cette morphologie "en pavage" (Figure 9), leur croissance se fait en multicouches (Figure 15). De plus elles deviennent indépendantes de l'hormone EGF.

FIGURE 14 Effets cytopathiques (ECP) associés au virus du papillome humain type 16 (HPV16) dans les cellules HPV16-L6. Morphologie générale d'un clone positif au HPV16 (A) (Grossissement 200X). Vacuolisation (B) (Grossissement 600X), cellules géantes (C) (Grossissement 400X), et cellules multinuclées (D,E,F) (Grossissement 400X). Noter les différences morphologiques par comparaison avec la planche des cellules L6 témoin (figure 7). Les cellules ont été fixées et colorées par le réactif de Giemsa (Gurr) ainsi que décrit dans la section 4.1 (Matériel et Méthodes).

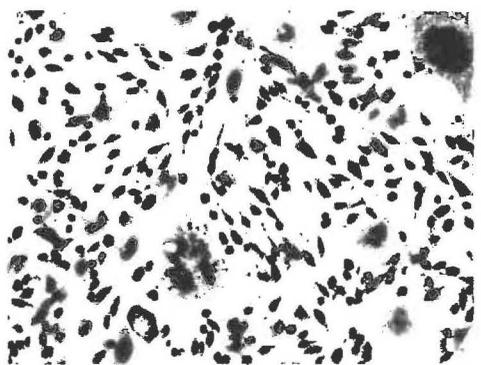
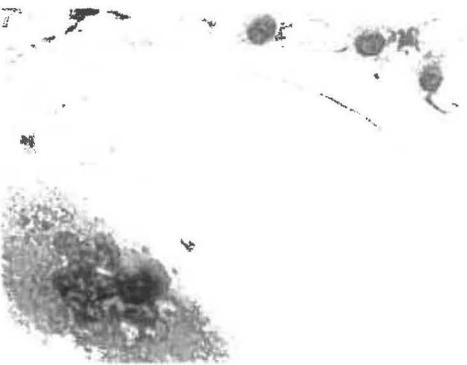
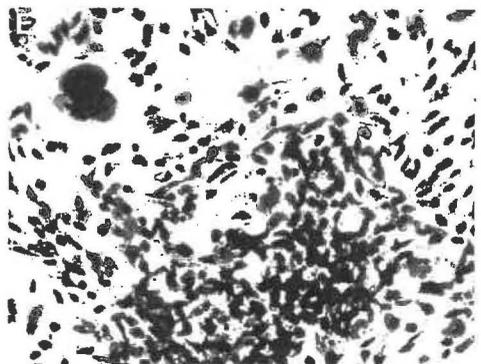
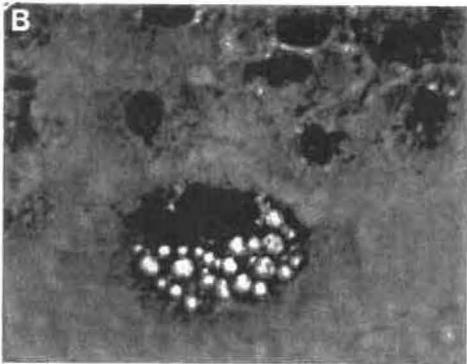
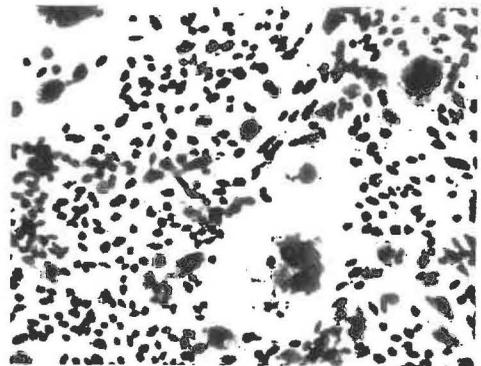
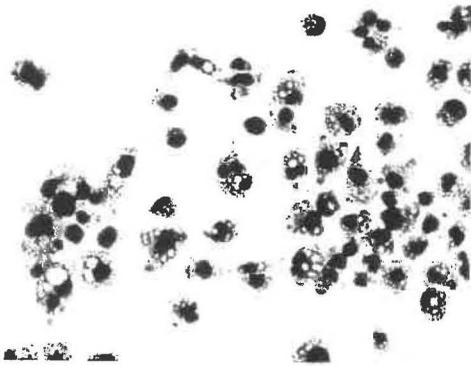
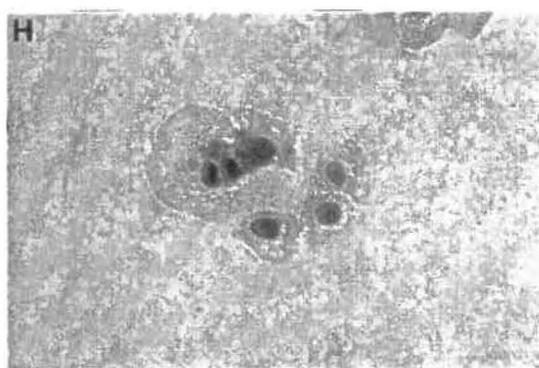
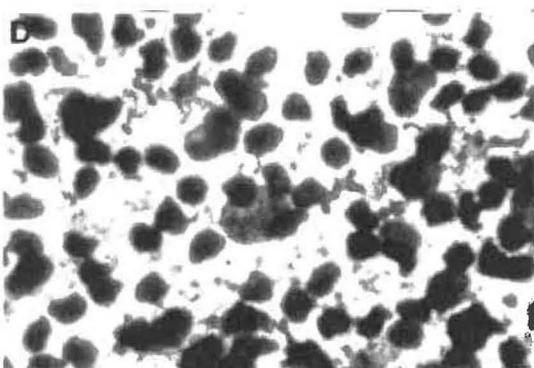
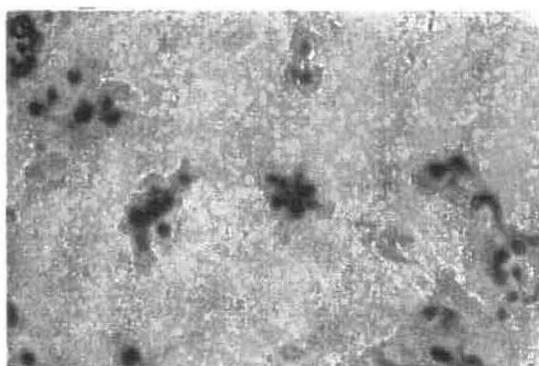
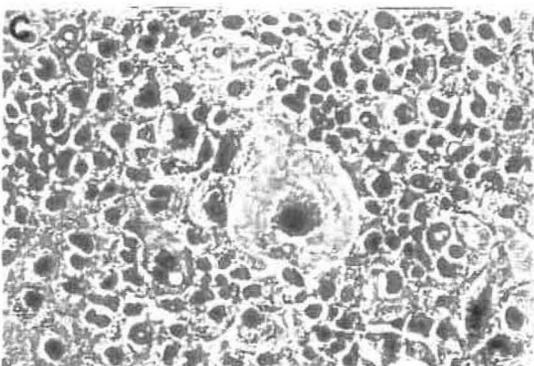
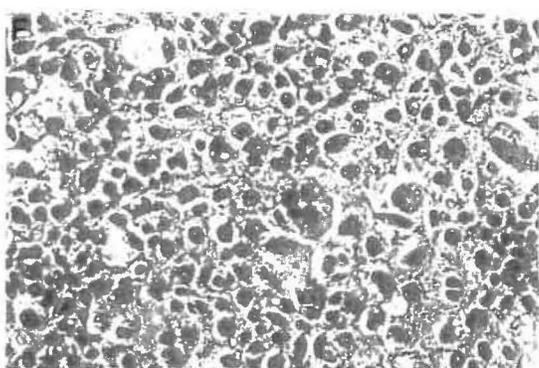
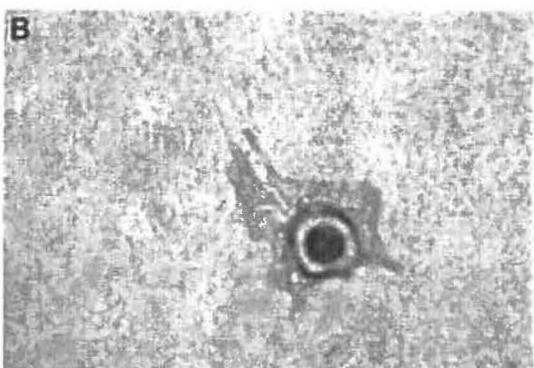
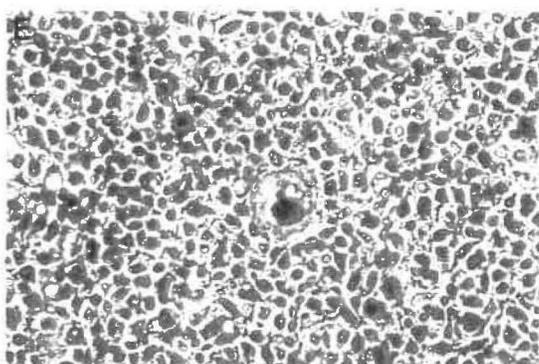
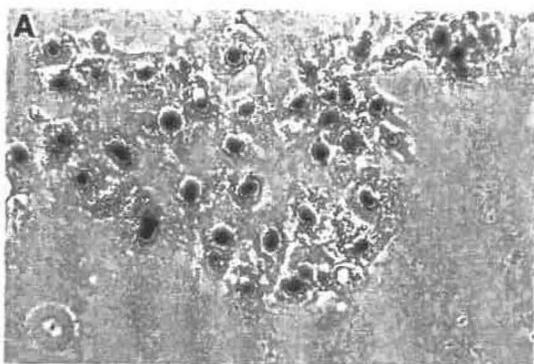


FIGURE 15 Effets cytopathiques (ECP) associés au virus du papillome humain type 16 (HPV16) dans les kératinocytes transformés par le HPV16 (HPV16-Balbc/MK).

Morphologie générale d'un clone Balbc/MK positif au HPV16 (HPV16-Balbc/MK) (A) (Grossissement 400X), cellule HPV16-Balbc/MK (B) (Grossissement 600X), cellules géantes (C,E) (Grossissement 400X), vacuolisation (E,F) (Grossissement 400X), cellules avec halo perinucléaires (A,C,E,F) (Grossissement 400X), couches de cellules HPV16-Balbc/MK superposées (D) (Grossissement 600X) et cellules HPV16-Balbc/MK multinuclées (F,G,H) (Grossissement 400X).



5.2 Cytopathie des cellules transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16)

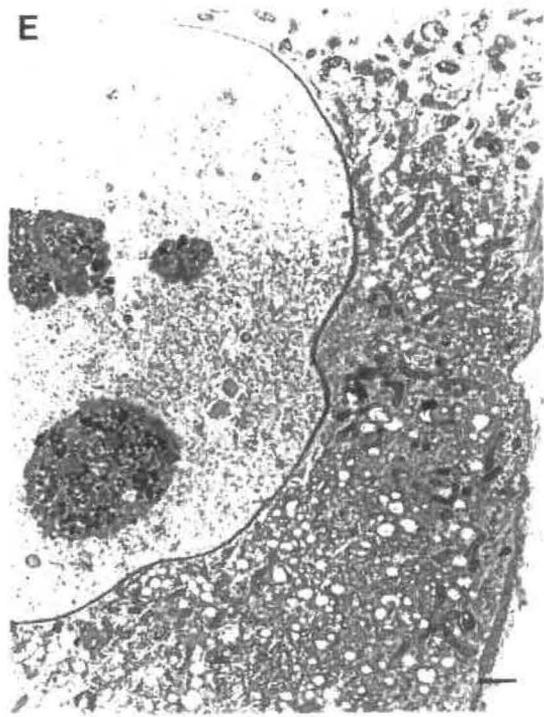
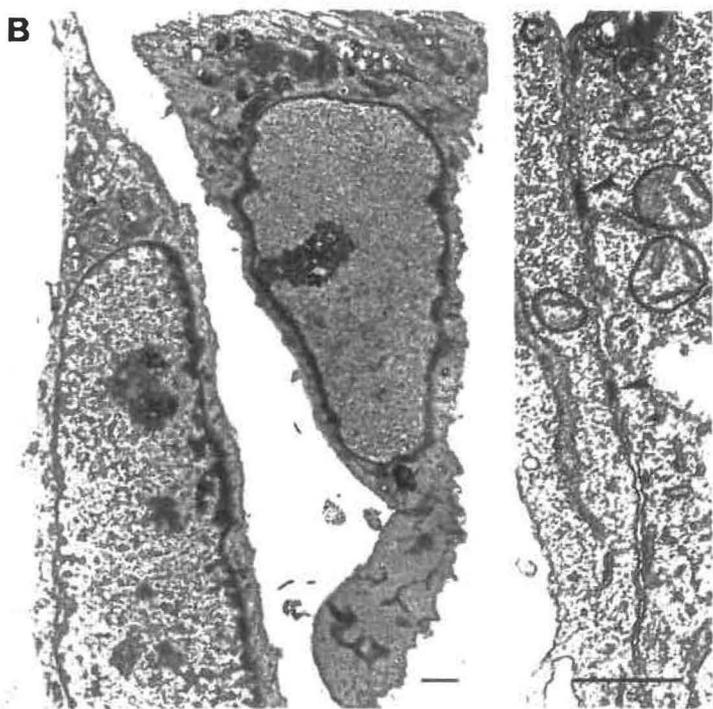
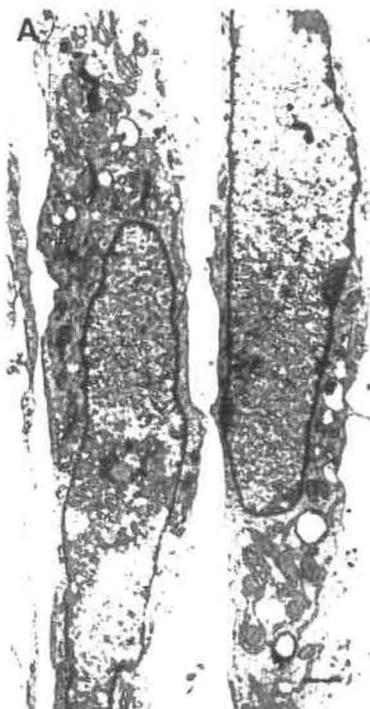
L'évolution des modifications morphologiques affectant les cellules transfectées par le HPV16, a été suivie par observation au microscope photonique après coloration au Giesma (Figures 8 et 14).

Dans les deux modèles cellulaires, les cellules ayant incorporé le génome du HPV16 apparaissent souvent plus foncées et de forme différente (Figures 14 et 15): elles sont arrondies, souvent polymorphes et plus petites que les témoins. Des cellules géantes multinuclées sont fréquemment observées (Figures 14 et 15). La grande majorité des cellules contient beaucoup de vacuoles (Figures 14 et 15), cette vacuolisation s'intensifié avec le temps. Également, un halo périnucléaire a été souvent observé (Figure 15). Nombre de cellules se détachent facilement de leur support solide et restent vivantes.

5.3 Analyse ultrastructurale des cellules L6 normales et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16)

Des changements morphologiques associés à la transformation par le HPV16 ont été également observés au microscope électronique (ME) dans les cellules L6 (Figure 16). Les cellules portant le virus ont une apparence fibroblastique selon ce qui a été confirmé par les altérations observées avec le marquage de la fibronectine. Ces cellules émettent des pseudopodes tout en étant plus grandes que les cellules normales. L'intensité de la vacuolisation périnucléaire est

FIGURE 16 Analyse de la morphologie et des changements ultrastructuraux en microscopie électronique des cellules L6 normales et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6). Cellules L6 normales (A) grossissement (6000X). Noyaux de cellules L6 normales (B) grossissement (8500X), noyaux de cellules HPV16-L6 (D et E) (grossissement 6000X et 8500X). On notera l'intensité de la vacuolisation périnucléaire dans les cellules transfectées ainsi que la granulosité de la chromatine (D). Jonction lacunaire des cellules L6 (C) grossissement (34000X). Les flèches indiquent les jonctions lacunaires entre deux cellules apposées. (La barre représente 100 nm) Les techniques utilisées sont explicitées dans la section 4.5 (Matériel et Méthodes)



remarquable. Au niveau des organelles, on note une augmentation du nombre des mitochondries et l'appareil de Golgi est plus volumineux (Figure 16). Dans les noyaux, la chromatine est plus uniforme et moins granuleuse dans les cellules normales que dans les cellules transfectées (Figure 16). Le nucléole est moins dense dans les cellules transfectées.

Afin de déterminer l'effet du virus sur les interactions cellulaires, nous avons étudié la répartition de la molécule d'adhésion intercellulaire N-CAM, par le marquage à l'or colloïdal (Figure 17). Comme nous l'avons observé en immunofluorescence (section 7), le marquage est très voisin dans les cellules L6 et HPV16-L6, mais l'évolution dans le temps diffère. Le nombre des cellules marquées chez les témoins diminue vers le jour 6 ce qui coïncide avec le stade de pré-fusion. Par contre, le marquage des cellules HPV16 marquée est toujours supérieur, même au stade de la sénescence (Figure 17).

Les jonctions lacunaires analysées par la technique précédente confirment les résultats obtenus par immunofluorescence et la perméabilité au colorant "jaune lucifer": les communications intercellulaires sont réduites chez les cellules transformées (Figure 18) malgré une bonne expression de N-CAM.

5.4 Réarrangements chromosomiques associés au virus du papillome humain type 16 (HPV16)

Les karyotypes de type G "(G binding)" et de type Q "(Q binding)" des cellules L6 témoins et des cellules HPV16-L6 ont été obtenus et analysés (Figure 19).

FIGURE 17 Analyses en immunoélectromicroscopie des marqueurs de différenciation cellulaire (N-CAM) dans des cellules L6 normales (A) (grossissement 13500X) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B (grossissement 15000X) C (grossissement 12500X) et D (grossissement 11000X). (La barre représente 100 nm)

Les flèches indiquent les particules d'or déposées sur les molécules N-CAM dans les membranes cellulaires. Le marquage est très similaire dans les cellules normales A et transfectées B. Le marquage décroît avec l'âge des cellules (comparez C à A). La technique immunologique à l'or colloïdal utilisée ici est décrit en détail dans la section 4.5 (Matériel et Méthodes).

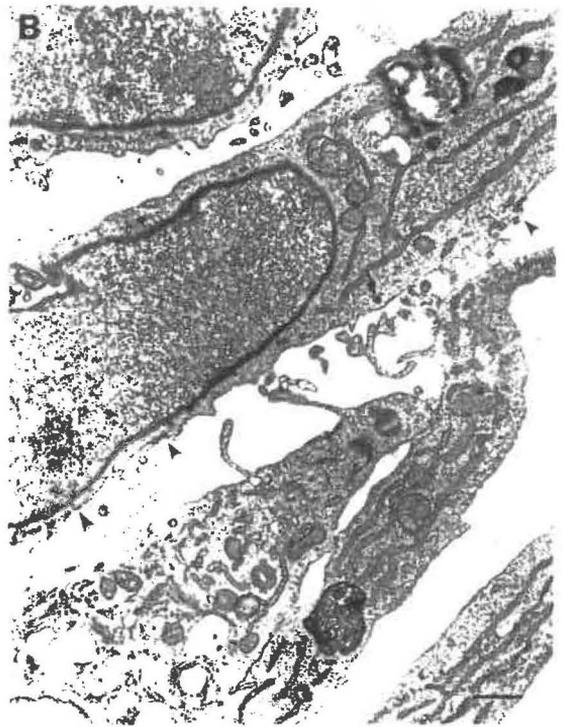
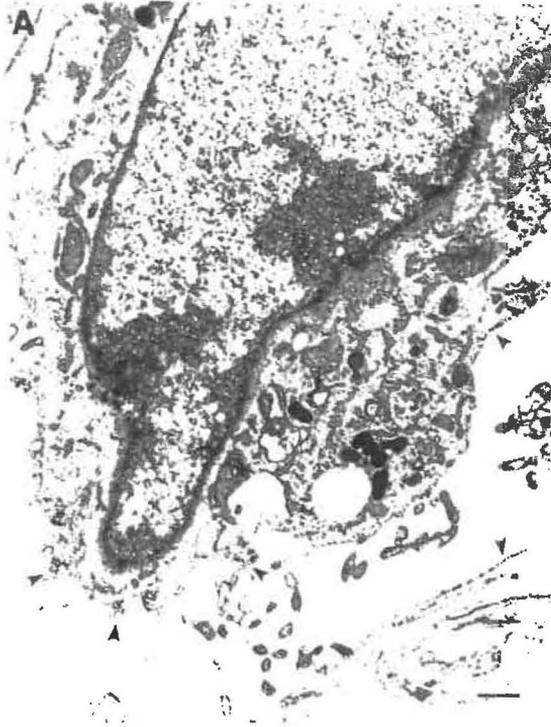
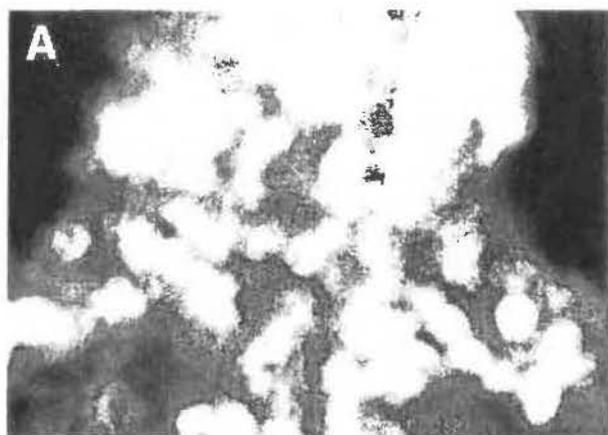


FIGURE 18 Évaluation des communications intercellulaires par chargement du colorant "jaune lucifer" dans les cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16) (HPV16-L6) (B).
(Grossissement 200X).



Dans le cas de cellules transformées par le HPV16, la carte chromosomique révèle des aberrations chromosomiques illustrées dans l'idéogramme de translocation (Figure 19).

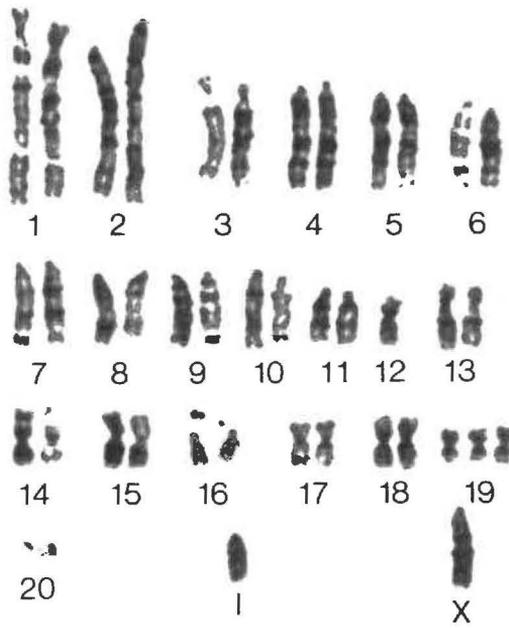
Les cellules L6 témoins présentent peu d'aneuploidie. La majeure partie des cellules possèdent le nombre normal de 42 chromosomes et la lignée est diploïde.

La lignée transfectée au HPV16 présente plusieurs anomalies. L'aneuploïdie y est une constante. Le nombre de chromosomes varie de 50 à 75 avec un pic à 66. Exception faite pour les chromosomes 1, 8, 12, 15, 16, X, qui sont disomiques, tous les autres sont présents en copies multiples. Les aberrations chromosomiques sont spécifiques et constantes, ce qui est un fait remarquable. En outre elles affectent toutes les cellules.

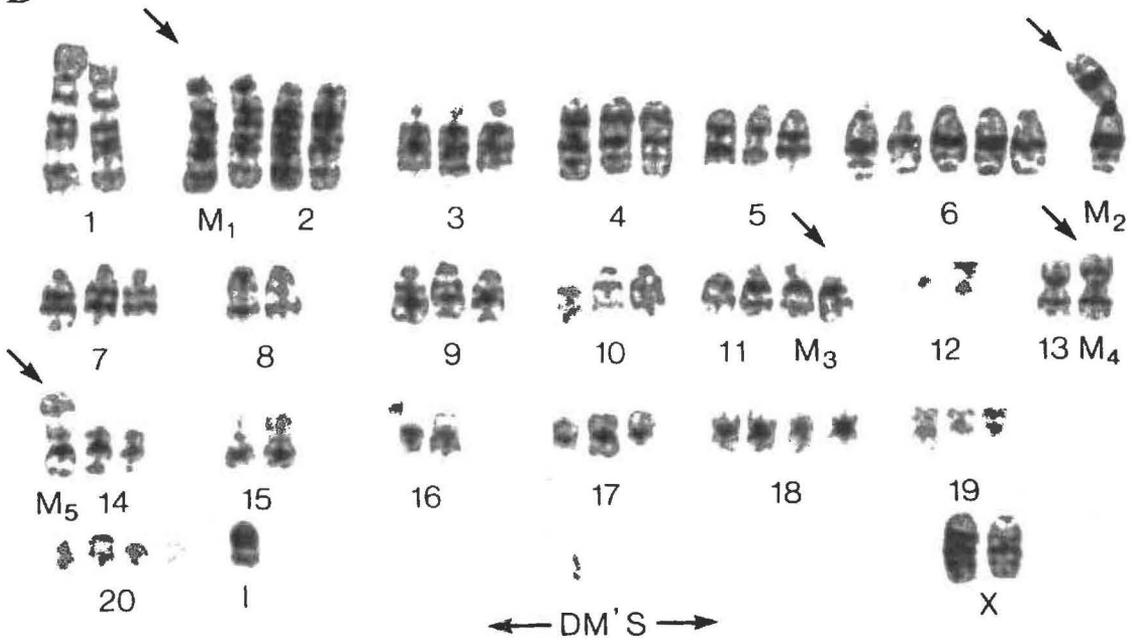
- le chromosome no. 2 est présent en duplicata dans toutes les cellules. Un court segment non identifié lui est ajouté. (2; ?)
- Dans environ 80% des cellules on trouve une copie d'un chromosome résultant d'une translocation Robertsonienne entre le long bras de deux chromosomes 6.rob (6;6)
- Le chromosome 11 au court bras duquel un petit segment est ajouté, est présent en deux copies dans toutes les cellules. t (11 p; ?)
- Un isochromosome (iso) du long bras du chromosome 13 est présent en une copie dans toutes les cellules. iso (13q)

FIGURE 19 Caryotypes et analyse des caractéristiques chromosomiques des cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B). Les chiffres 1 à 20 indiquent les numéros des chromosomes autosomiques de rat. X correspond au chromosome sexuel X et I correspond à un marqueur chromosomique non identifié correspondant probablement au chromosome sexuel Y. Les flèches indiquent le site des aberrations chromosomiques. M1 à M5 correspondent à des marqueurs chromosomiques dans les cellules L6 transfectées par le HPV16 (HPV16-L6).

A



B



- Un segment non identifié s'ajoute au bras court du chromosome 14. Ce chromosome anormal est présent à l'état de simple copie dans toutes les cellules. t (14P;?)
- 50% de la population cellulaire présente des doubles minutes (DM), ce qui est une indication très nette de transformation

6. ÉVALUATION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

6.1 Croissance des populations

Nous avons évalué la croissance des populations pour les deux modèles utilisés, cellules L6 et Balbc/MK, (section 1), dans un milieu de culture contenant 10% de SFV. L'évaluation de la prolifération a été effectuée par deux méthodes: directe par le comptage de cellules (Figures 20 et 21) et indirecte par un test métabolique qui mesure l'activité de la hydrogenase des échantillons par la réaction au bleu de tetrazolium (Figure 20B). Des résultats comparables ont été obtenus par les deux méthodes. Dans le cas des cellules transfectées par le HPV16, les lignées cellulaires établies, HPV16-L6 et HPV16-Balbc/MK ont été maintenues en culture pendant plus de 40 passages sans modification appréciable de leurs propriétés. Les lignées, HPV16-L6 et HPV16-Balb/MK ont toujours montré le même potentiel de prolifération malgré le développement de l'effet cytopathique (ECP) (section 5) important à certains passages.

Dans le cas du système cellulaire L6, la présence du génome complet de HPV16 stimule la prolifération de façon notable. Les cellules L6 témoins produisent à

FIGURE 20 Courbes de croissance cellulaire des cellules L6 normales (L6) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6). Analyse à l'aide des tests directs (A) et indirects (B).
Le test direct est basé sur la numération des cellules en utilisant l'exclusion du trypan bleu. Le test indirect métabolique est basé sur l'activité déshydrogénase cellulaire qui réduit les sels de tétrazolium en formazan bleu ainsi que décrit dans la section 4.3 (Matériel et Méthodes).

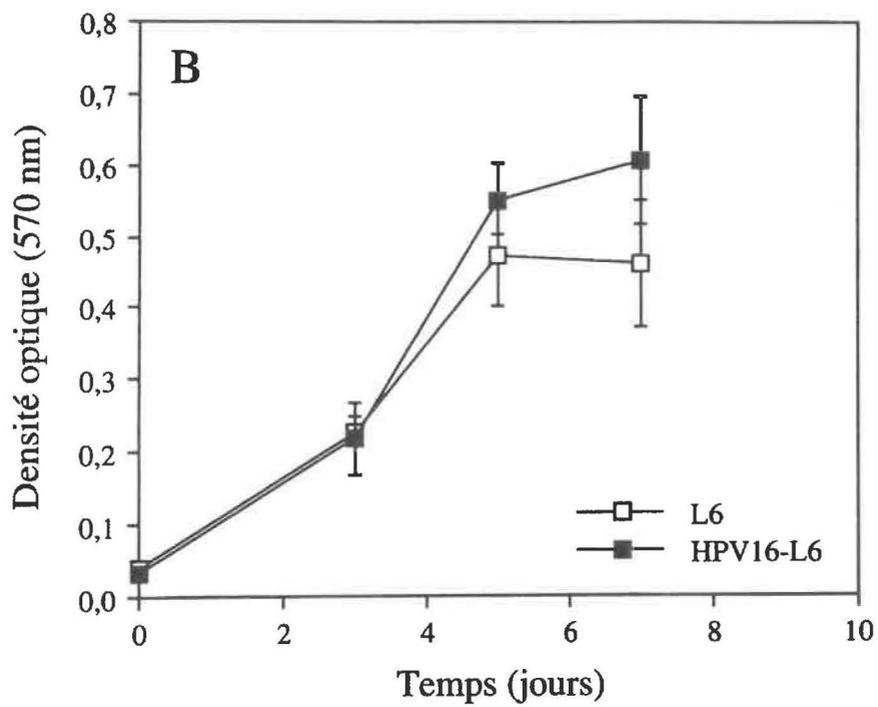
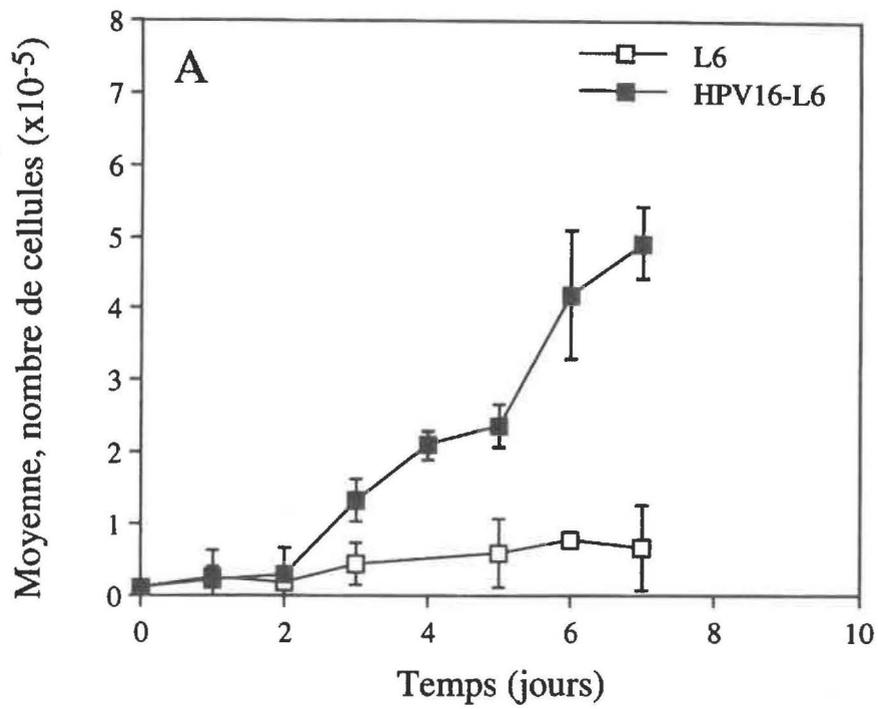


FIGURE 21 Courbes de croissance cellulaire des kératinocytes normaux (Balbc/MK) et transfectés par le virus du papillome humain type 16 (HPV16) (HPV16-Balbc/MK).

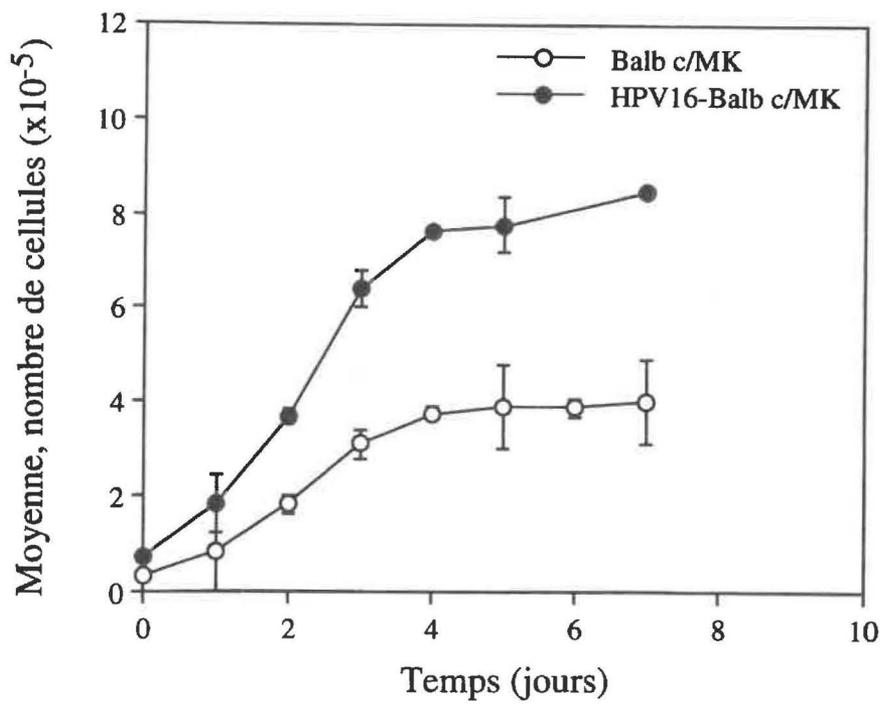


FIGURE 22 Effet des inducteurs de la différenciation cellulaire sur la prolifération des L6 normales (A,C,E) et transfectés par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B,D,F).
Effet du calcium chez les L6 (A) et HPV16-L6 (B).
Effet du DMSO chez les L6 (C) et HPV16-L6 (D).
Effet du RA chez les L6 (E) et HPV16-L6 (F).

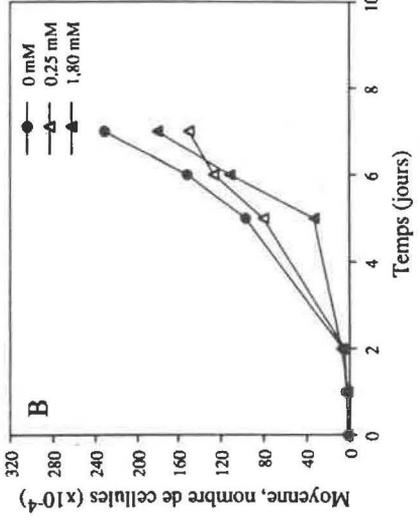
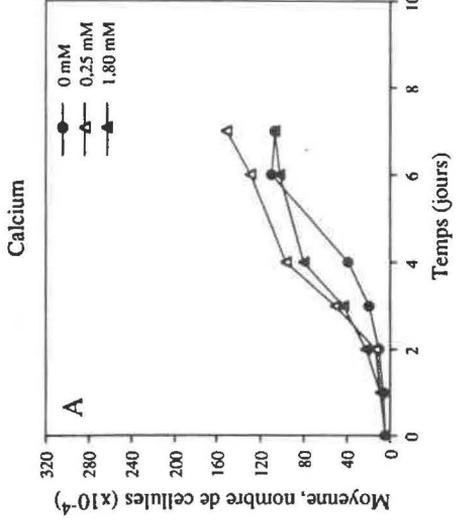
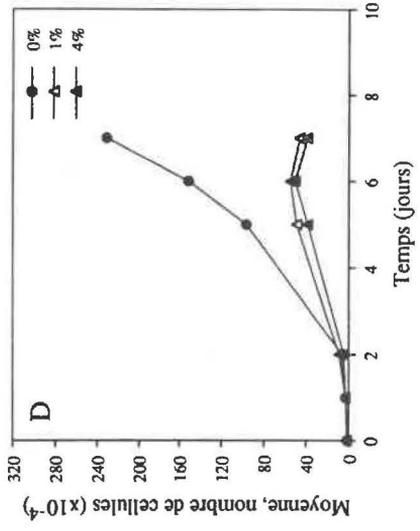
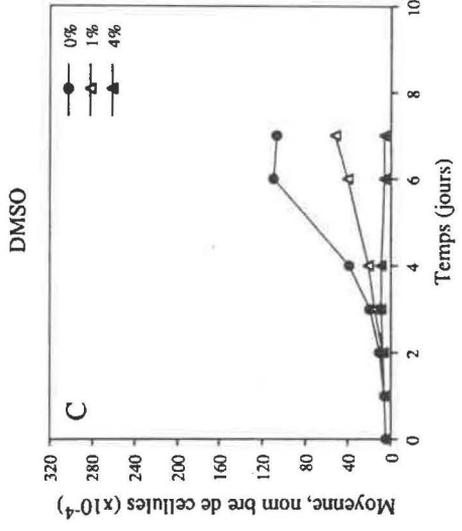
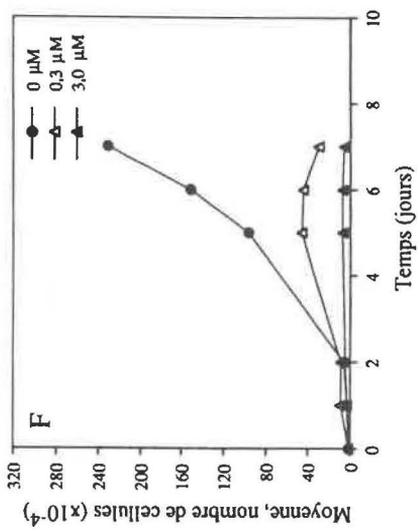
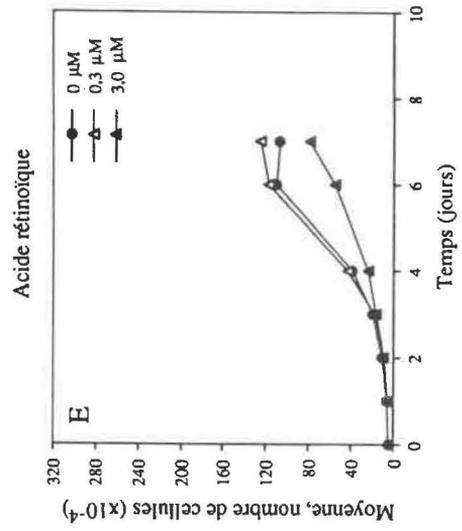
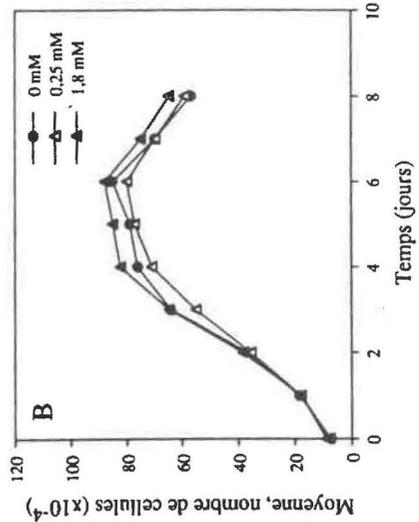
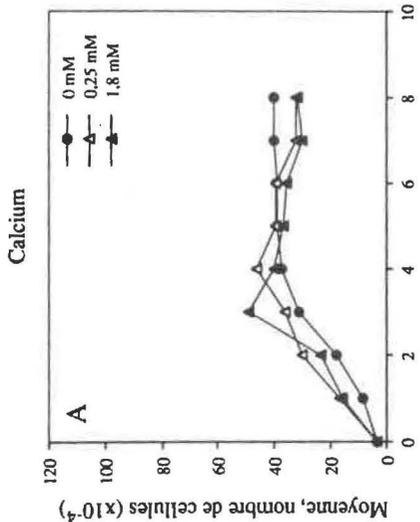
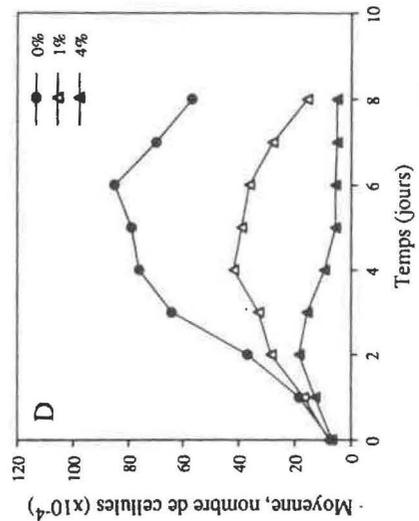
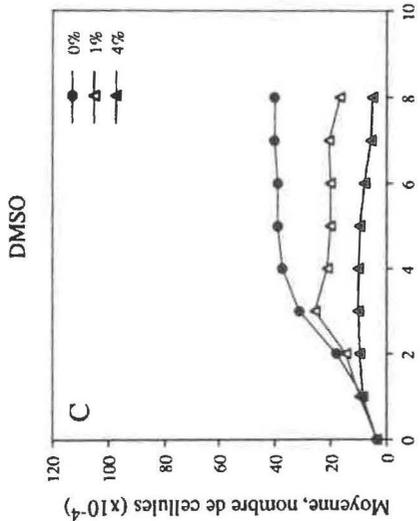
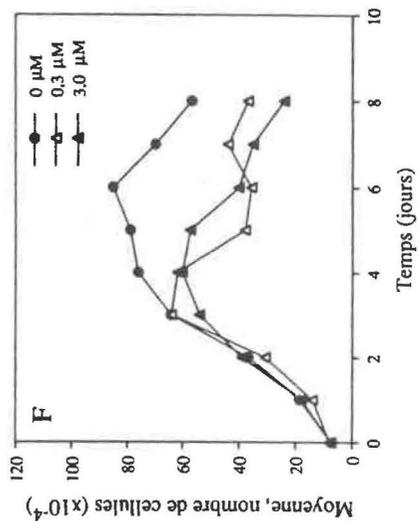
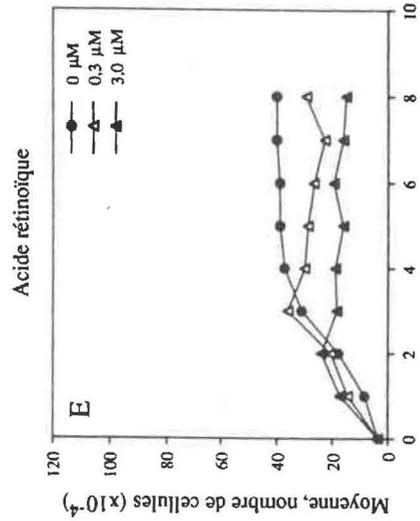


FIGURE 23 Effet des inducteurs de la différenciation cellulaire sur la prolifération des kératinocytes normaux (Balbc/MK) (A,C,E) et transfectés par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-Balbc/MK) (B,D,F). Effet du Ca^{2+} chez les Balbc/MK (A) et HPV16-Balbc/MK (B). Effet du DMSO chez les Balbc/MK (C) et HPV16-Balbc/MK (D). Effet du RA chez les Balbc/MK (E) et HPV16-Balbc/MK (F).



saturation maximum 0.5×10^5 cellules par cm^2 de surface alors que les cellules L6 transfectées par le HPV16 atteignent parfois des densités de saturation qui peuvent dépasser 0.5×10^6 cellules par cm^2 (Figure 20).

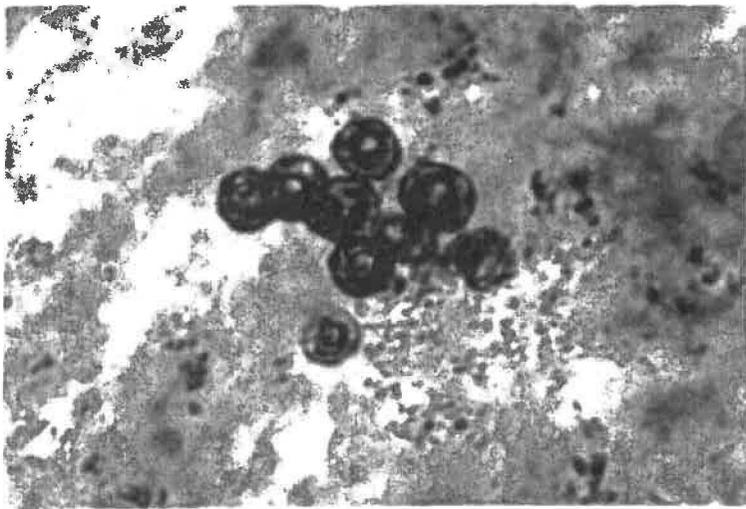
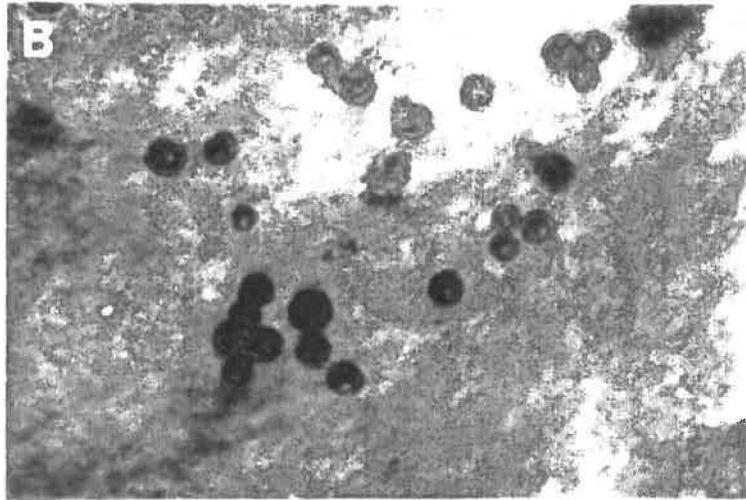
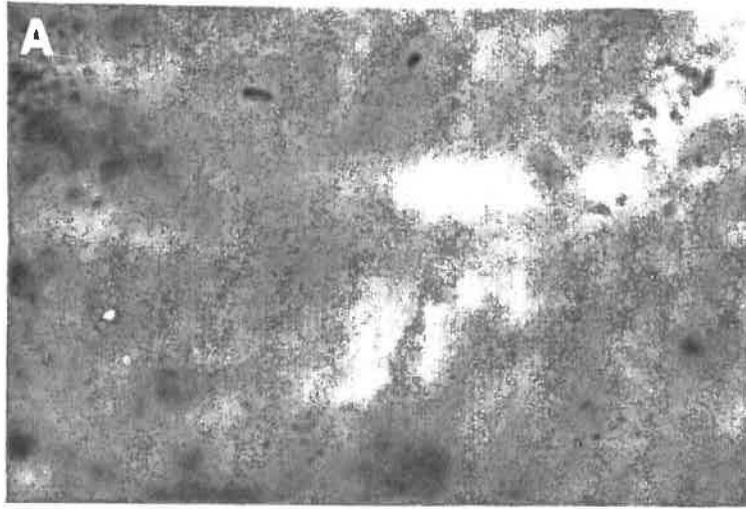
Dans le modèle cellulaire Balbc/MK on observe comme chez les L6 que la densité de saturation des cellules normales est moins élevée que celle des cellules transfectées (Figure 21). De plus, ces dernières deviennent indépendantes du facteur de croissance EGF. Les cellules HPV16-Balbc/MK semblent avoir un potentiel de prolifération illimité et ont l'apparence de cellules immortalisées.

6.2 Effet des inducteurs de différenciation sur la prolifération cellulaire

Il est bien établi que la progression dans le programme de différenciation s'accompagne d'une régression de la prolifération. Les deux processus sont corrélés négativement. La différenciation terminale est toujours associée à une stricte homéostasie. L'effet de plusieurs inducteurs classiques de la différenciation sur la prolifération de cellules normales et transformées par le HPV16 a été testé pour les deux lignées cellulaires dans le but d'établir la résistance des cellules transformées à la progression de la différenciation.

Le calcium (Ca^{2+}) stimule la prolifération des cellules L6 (Figure 22) et des kératinocytes normaux (Figure 23). Ceci résulte probablement du fait que les cellules cultivées dans le milieu EMEM pauvre en Ca^{2+} répondent positivement à l'addition du cation. Pour les L6, l'effet du Ca^{2+} est dépendant de la dose (Figure 22). Par rapport aux témoins, un effet sélectif du Ca^{2+} a été observé dans les

FIGURE 24 Croissance en milieu semi-solide des cellules L6 immortalisées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6). Faible grossissement (A). Grossissement 200X (B) et Grossissement 400X (C).



cellules transformées des deux modèles. Un effet inhibiteur a été noté dans le cas des myoblastes L6. Les cellules HPV16-Balbc/MK sont insensibles au traitement au calcium (Figure 23).

Le DMSO inhibe la prolifération des cellules normales L6 (Figure 22) et des kératinocytes (Figure 23). Un effet toxique corrélé à la dose et à la durée de l'exposition est observé. Il en est de même pour les cellules transfectées dans les deux modèles (Figures 22 et 23).

L'acide rétinoïque (RA) stimule la prolifération en début de croissance et l'inhibe dans la phase stationnaire dans le cas des cellules L6 (Figure 22) aussi bien que dans des cellules HPV16-L6 (Figure 22). Un effet similaire a été observé pour les Balbc/MK (Figure 23). Cependant, l'effet de l'acide rétinoïque est relativement dépendant de la dose dans le cas de cellules normales (Figures 22 et 23) alors qu'il est indépendant de la dose dans le cas de cellules transfectées des deux modèles (Figures 22 et 23).

Afin de vérifier si le HPV16 transforme les lignées étudiées, les cellules L6 contenant le génome complet du HPV16 ont été cultivées en suspension dans un milieu semi-solide. Les cellules témoin sont toujours demeurées dispersées dans ce milieu sans jamais former de colonies (Figure 24). Par contre, les cellules transfectées par le HPV16 ont donné naissance à plusieurs colonies d'environ 1 mm de diamètre ou plus (Figure 24). Les HPV16-Balbc/MK sont devenus également indépendantes de l'hormone de croissance EGF contrairement aux témoins.

7. ANALYSE DES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE

7.1 Observation en microscopie optique

Le programme de différenciation cellulaire des cellules L6 évolue progressivement ainsi qu'illustré dans la Figure 7. Bien que l'évolution temporelle soit progressive et que la population soit hétérogène (chaque cellule évoluant plus ou moins rapidement) nous avons pu définir des stades de différenciation correspondant à l'expression de marqueurs spécifiques ou à des critères morphologiques précis.

1^e stade: myoblastes embryonnaires

2^{ième} stade: acquisition de la bipolarité

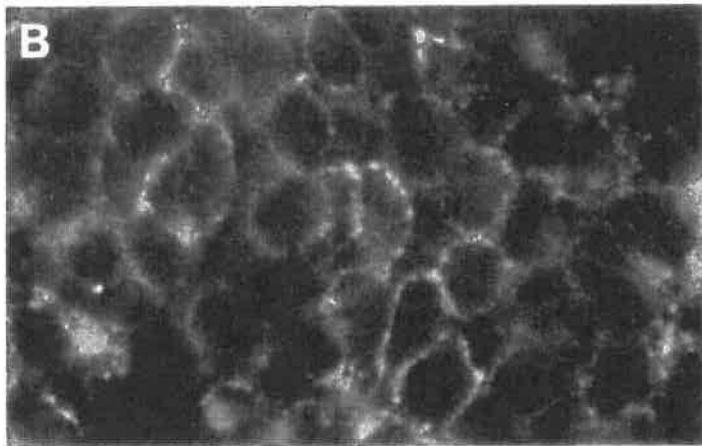
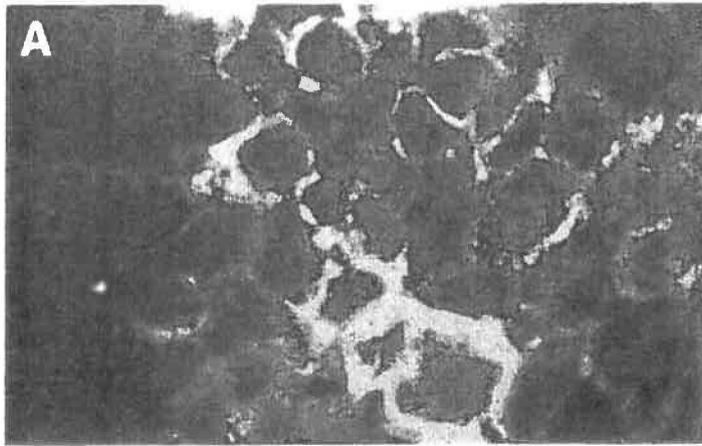
3^{ième} stade: acquisition de l'orientation

4^{ième} stade: formation de syncytium et fusion

5^{ième} stade: formation de myotubes

Dans le milieu de prolifération, les cellules normales ne dépassent jamais le 3^{ième} stade. Le 4^{ième} stade est induit par le milieu de différenciation (Figure 7). Dans le cas des cellules HPV16-L6, le programme de différenciation ne dépasse jamais les trois premiers stades même dans le milieu de différenciation (Figure 8). Il est donc important de souligner qu'un blocage de la différenciation est observé. Les kératinocytes transfectés par le HPV16 n'acquièrent pas la morphologie "en pavage" caractéristique de la différenciation des témoins, même après exposition

FIGURE 25 Mise en évidence par immunofluorescence de la distribution de la protéine N-CAM dans les cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B). (Grossissement 400X).



à de fortes doses de calcium (1.8 mM) (Figure 9). Dans ce modèle on observe donc également un blocage de la différenciation.

7.2 Cinétique de la différenciation estimée par la cytométrie de flux

La différenciation cellulaire des myoblastes peut être caractérisée par l'expression différentielle de marqueurs, universels et spécifiques, de la différenciation. L'expression de certains marqueurs de différenciation dans les cellules L6 normales et transformées par le HPV16 a été évaluée qualitativement *in situ* par immunofluorescence indirecte (Figures 25, 26 et 27). Quantitativement, environ 90% des cellules ont réagi positivement avec l'anticorps dirigé contre la N-CAM (Tableau 6) autant dans les cellules normales (Figures 25 et 28) que pour les cellules transformées (Figures 25 et 28). L'actine utilisée comme marqueur de différenciation universel (Figures 29 et 30 et Tableau 6) est aussi très bien représentée dans les deux catégories de cellules.

Les résultats qualitatifs préliminaires obtenus par microscopie photonique ont été étayés par l'analyse cinétique de l'évolution des marqueurs de différenciation par le cytométrie de flux (Tableau 6). Cette technique permet en outre l'obtention de résultats quantitatifs. Deux catégories d'information sont ainsi obtenues: l'une porte sur le pourcentage des cellules marquées (Figure 30 et Tableau 6) et l'autre sur l'intensité moyenne du marquage (Figure 29).

TABLEAU 6. Évaluation du marquage des marqueurs de différenciation (%).

Marqueurs/ Type de cellules/ Temps (Jours)	Actine		Fibronectine		N-CAM		Vimentine	
	L6	HPV16-L6	L6	HVP16-L6	L6	HPV16-L6	L6	HPV16-L6
1	74	23' 51**	91	70' 30**	92	64	65	85
3	70	90	98	97' 3**	94	83	90	30' 58**
6	84	78	90	80' 20*	90	90.5	90	85
9	6	94	12	94' 5**	85	95	14	88' 11**
12	85	16	65	63' 37**	75	90	80'	71' 19**

* faiblement marquées.

** fortement marquées.

FIGURE 26 Mise en évidence par immunofluorescence de la distribution de la fibronectine dans les cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B). (Grossissement 400X).

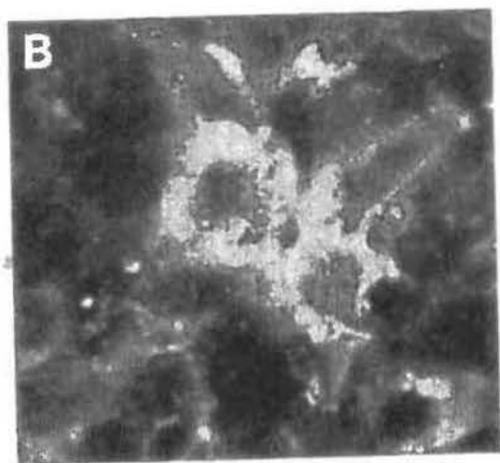
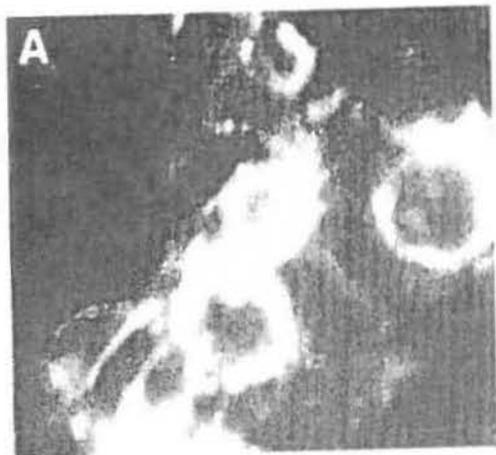


FIGURE 27 Mise en évidence par immunofluorescence de la distribution de la connexine 43 dans les cellules L6 (A) normales et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B). (Grossissement 400X).



FIGURE 28 Évaluation par cytométrie de flux de l'expression des protéines N-CAM dans les cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)(B). Jour 1 (D1), Jour 3 (D3), Jour 6 (D6), Jour 9 (D9) et Jour 12 (D12). N-CAM extra désigne le marquage de l'antigène de surface effectué sur des cellules non perméabilisées (section 44.2 de Matériel et Méthodes).

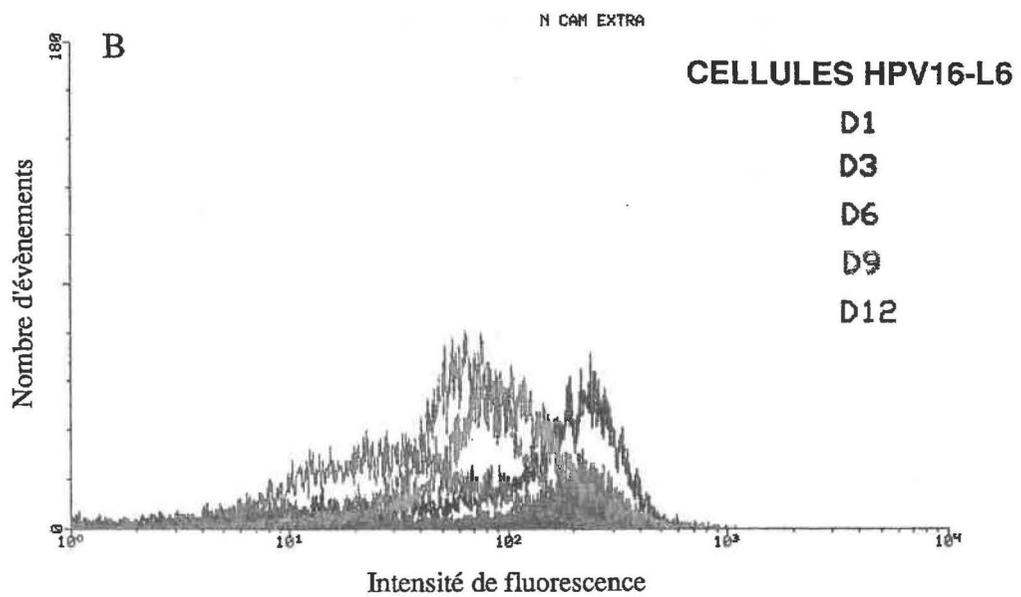
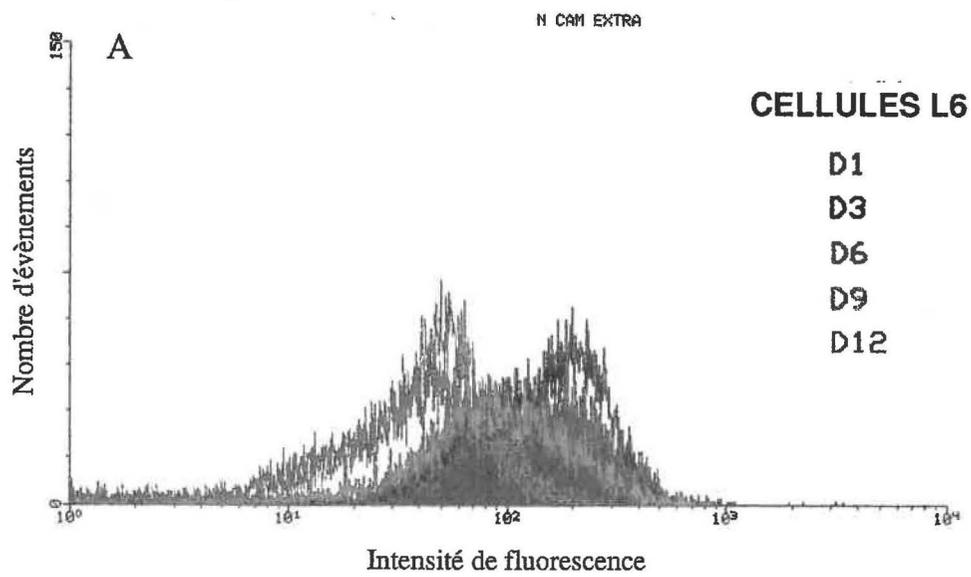
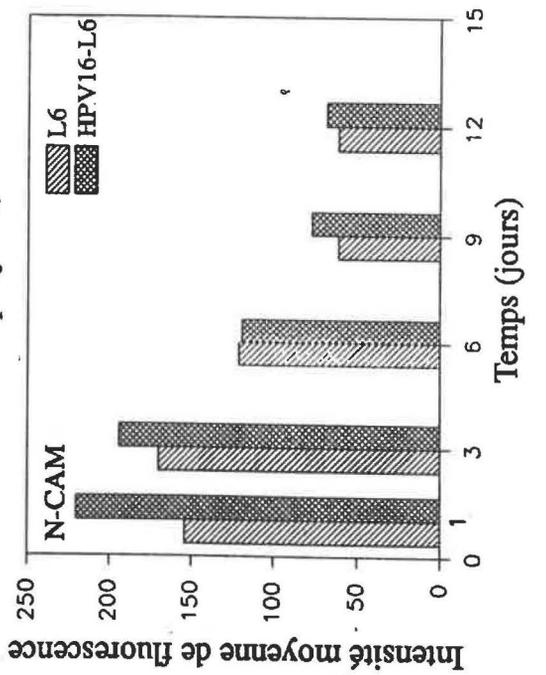
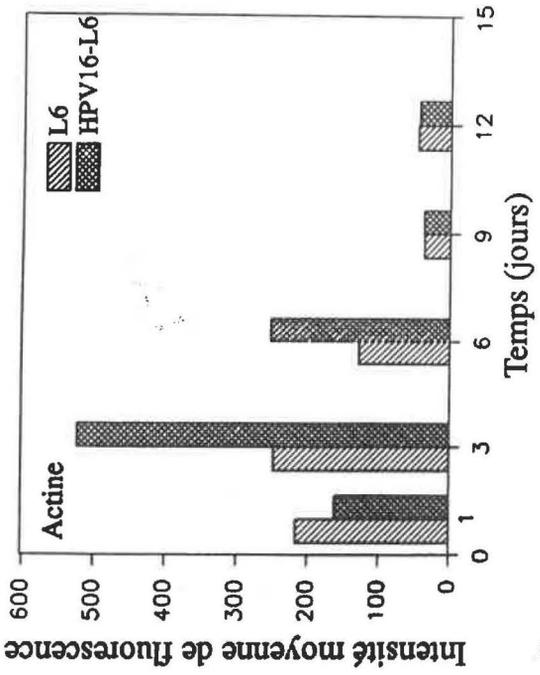
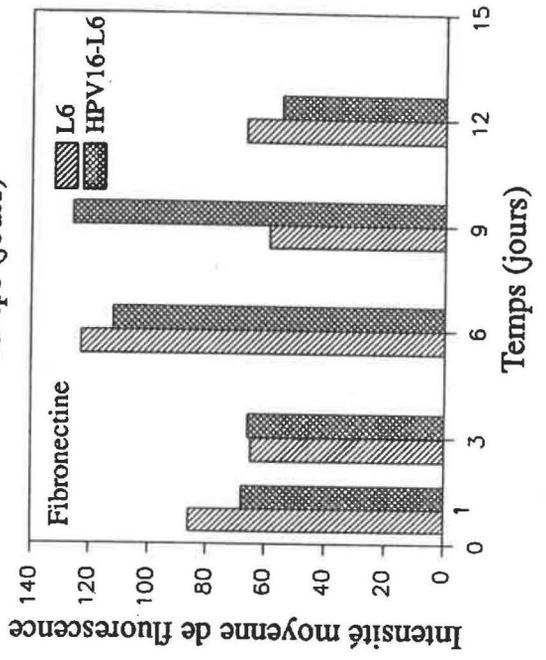
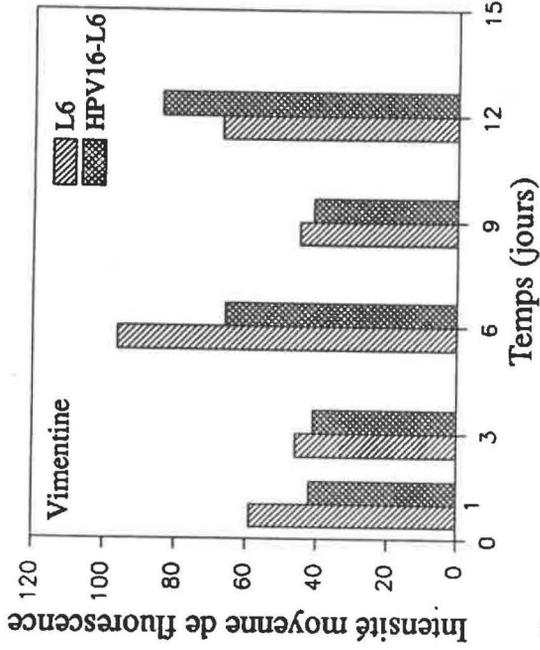
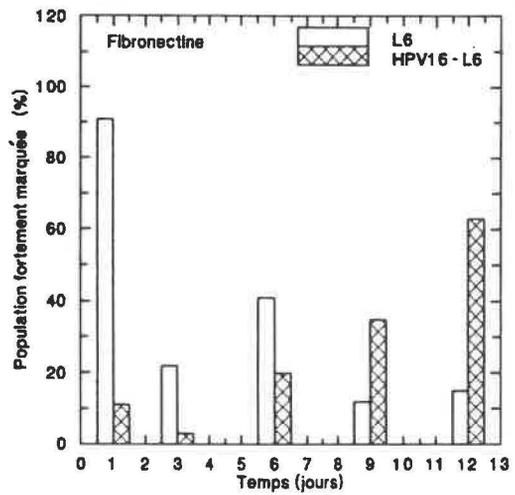
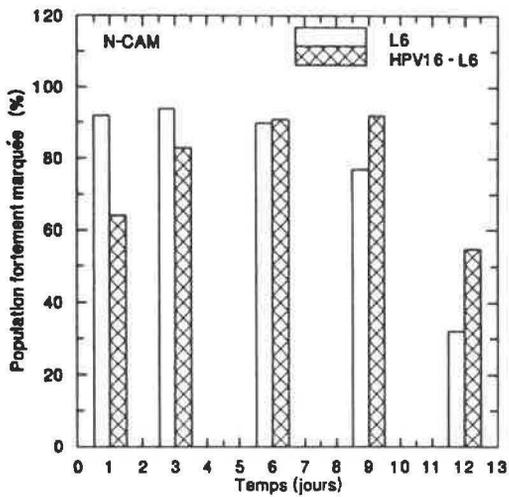
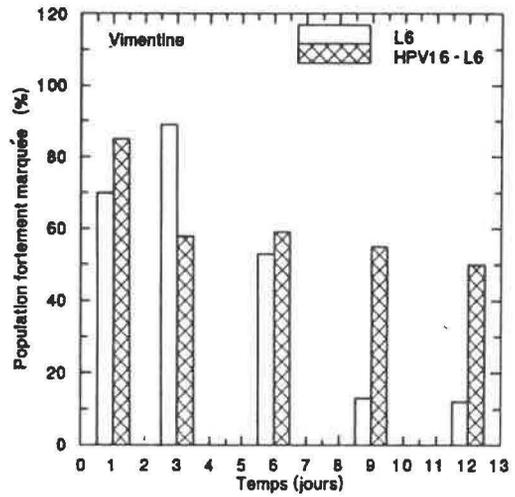
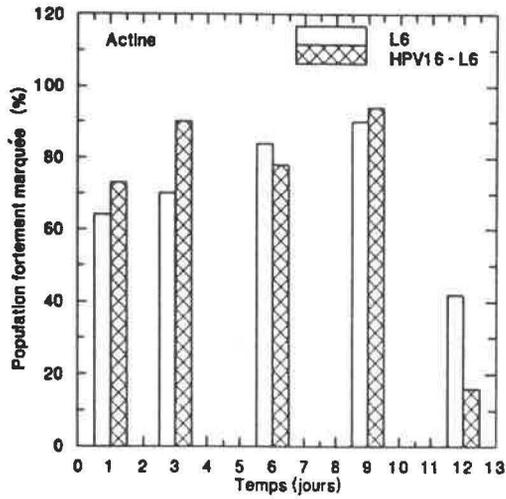


FIGURE 29 Évaluation de l'intensité de marquage des marqueurs de différenciation chez les cellules L6 normales et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) par cytométrie de flux.



FIGURÉ 30 Analyse par cytométrie de flux de divers marqueurs de différenciation chez les cellules L6 témoin (L6) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6): Évolution des populations fortement marquées.



7.2.1 Morphologie

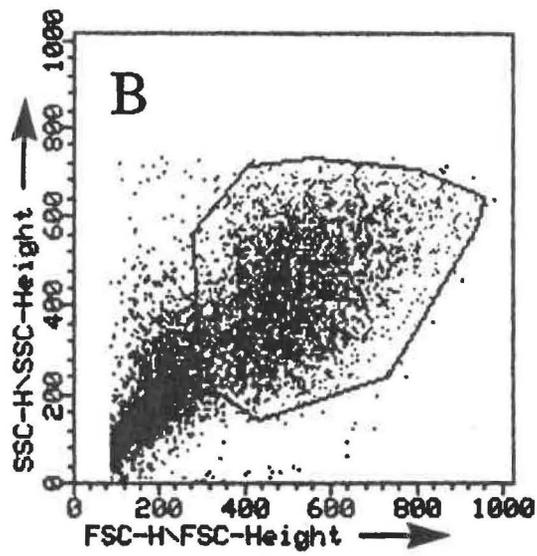
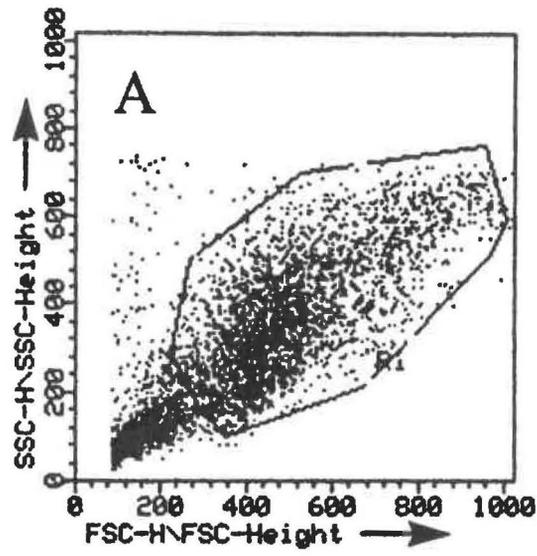
La cytométrie de flux confirme l'observation des différences morphologiques remarquables déjà notées au microscope optique (section 7.1) entre les cellules L6 normales et les cellules HPV16-L6. Dans le cas des cellules normales, on distingue deux populations de cellules (Figure 30 et Tableau 6): une population majoritaire relativement homogène d'environ 65% de la population totale, de cellules de petite taille et de faible granulosité; la population minoritaire relativement hétérogène d'environ 35% de la population totale, est de grande taille et de granulosité plus élevée (Figure 30 et Tableau 6). Dans le cas des cellules HPV16-L6 l'analyse morphologique selon les mêmes paramètres, volume et granulosité de cellules, ne distingue plus qu'une seule population de cellules plus homogènes dont la taille et la granulosité sont plus importantes que celle des cellules normales (Figure 31). La granulosité plus importante des cellules transfectées signifie que celles-ci contiennent des structures intracytoplasmiques (mitochondries, reticulum endoplasmique, vacuoles, granules de sécrétions) en plus grand nombre. Les cellules, HPV16-L6 seraient donc plus actives sur le plan métabolique que les cellules normales. Ceci confirme les résultats obtenus par le test métabolique de viabilité (section 6.1).

7.2.2 Expression des marqueurs de différenciation

Les résultats correspondant aux différents marqueurs de la différenciation doivent être examinés sous deux angles:

FIGURE 31 Évaluation par cytométrie de flux des volumes et de la granulosité des cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B).

Granulosité



Volume

- i) le nombre de cellules marquées dans la population (Figure 30)
- ii) l'intensité du marquage par cellule (Figure 29 et Tableau 6)

7.2.2.1 Actine

L'actine est un marqueur de différenciation universel. C'est un constituant majeur des microfilaments. Chez les myoblastes (cellules L6) les fibres d'actine font partie de l'architecture de la cellule. Le peptide est sous une forme polymérisé. La masse moléculaire de la sous unité d'actine est de 43 kDa. L'actine est exprimée dès les premiers stades de différenciation dans les myoblastes. Son expression est continue jusqu'à la différenciation terminale (Figure 29). Chez les cellules L6, l'intensité du marquage diminue avec le temps mais le nombre des cellules marquées augmente jusqu'au jour 9 à partir duquel, il décroît (Figure 30 et Tableau 6). Chez les cellules transfectées, au 1^{er} jour on trouve trois populations dont une seule est fortement marquée et comporte 75% des cellules. À partir du jour 3, l'intensité du marquage diminue jusqu'au jour 12 (Figure 30 et Tableau 6).

7.2.2.2 N-CAM

Les molécules membranaires d'adhésion (N-CAMs) contribuent à assurer la cohésion entre les cellules. Les molécules sont ancrées dans la membrane par une série d'acides aminés hydrophobes ou par liaison covalente à un glycolipide contenant du phosphatidylinositol. La partie glycosylée de la molécule est constituée d'unités d'acide sialique polymérisées. La masse moléculaire de ces

protéines est d'environ 125 à 190 kDa. On les trouve également dans le cytoplasme autour des myofibres en voie de développement. L'expression des N-CAM au cours du programme de différenciation est relativement similaire dans les cellules L6 et les cellules HPV16-L6 (Figures 25 et 28). Le patron de l'intensité de marquage des N-CAMs est similaire dans les deux types de cellules (Figures 28 et 29). Par contre, la population marquée évolue différemment: chez les témoins, presque toutes les cellules sont marquées dès le début et le nombre des cellules marquées diminue à partir du jour 6, ce qui coïncide avec l'apparition des premiers syncytium (Figure 29). Au contraire, le nombre de cellules marquées augmente progressivement avec le temps jusqu'au jour 9 pour les cellules transfectées (Figure 30, Tableau 6).

7.2.2.3 Fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, composée de deux sous-unités de 220 kDa chacune, reliées par deux ponts disulfures. Elle promouvoit l'adhésion des cellules au substratum en particulier, le collagène. On sait que la fibronectine est fortement exprimée dans les myoblastes embryonnaires (Figure 26). Son expression diminue lorsque N-CAM commence à s'exprimer. Elle est plus fortement marquée au jour 1 chez les témoins (Figure 29) où l'intensité du marquage diminue avec le temps (Figure 30). La population marquée chute brusquement dès le jour 3, l'augmentation observée au jour 6 correspond au stade d'orientation des myoblastes. Par contre, il faut noter l'absence de déclin chez les populations transfectées au HPV16, même au jour 12 (Figure 30). Dans ces

cellules transfectées l'intensité moyenne de marquage fluctue peu sauf aux jours 6 et 9 (Figure 30). Un fait intéressant est à signaler chez les cellules contenant le HPV16. Il semble que la population fortement marquée décroisse jusqu'au jour 3 pour se fondre au jour 9 avec la population majoritaires. Simultanément, une nouvelle population montrant un fort marquage réapparaît au jour 12 (Tableau 6). Ceci pourrait correspondre au délai observé dans l'orientation des myoblastes. De plus, contrairement aux témoins, le nombre des cellules marquées ne diminue pas, indiquant que de nouvelles cellules indifférenciées exprimant la fibronectine apparaissent.

7.2.2.4 Vimentine

La vimentine fait partie des filaments intermédiaires. Elle joue un rôle structural dans la cellule probablement en maintenant en place les différents éléments de la structure. Comme les autres filaments intermédiaires et contrairement à l'actine, la vimentine est hyperphosphorylée. Cette molécule de 55 kDa se trouve associée à des protéine kinases dans certains types cellulaires. Dans les muscles, elle est liée à un autre filament intermédiaire, la desmine.

Dans le cas des myoblastes on sait que l'expression de la vimentine diminue et disparaît avec l'apparition des récepteurs d'acétylcholine qui précède la fusion des cellules. Cette observation est confirmée par nos expériences: Chez les témoins le maximum de cellules marquées se situe au jour 3 où pratiquement la totalité de la population est marquée (Figure 29). La chute brusque du nombre des cellules marquées correspond au stade de pré-fusion. Chez les cellules transfectées on

trouvé deux populations d'intensité de marquage différent (comme pour la fibronectine) (Figure 30 et Tableau 6).

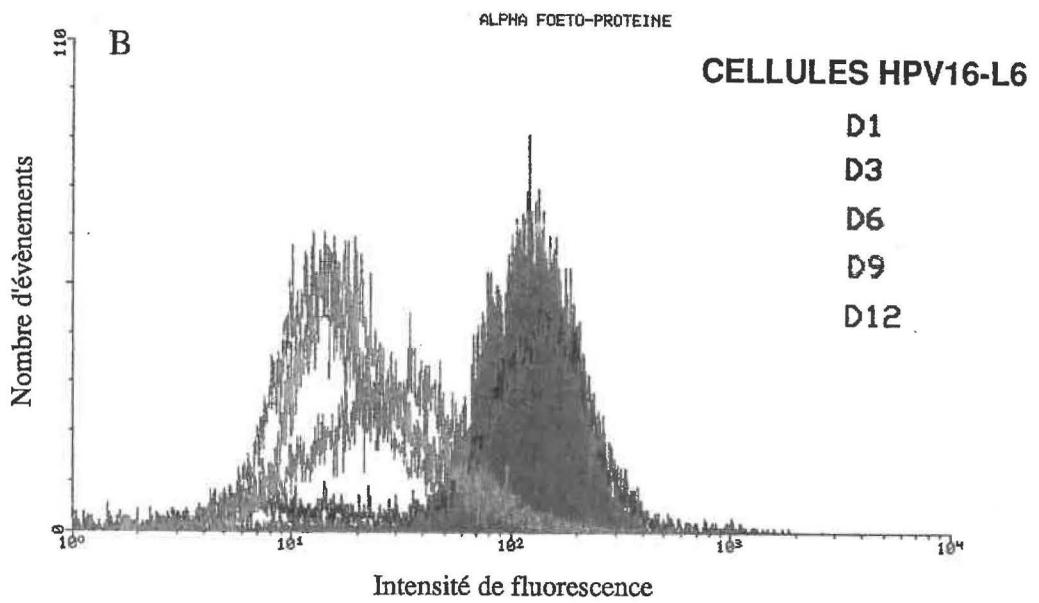
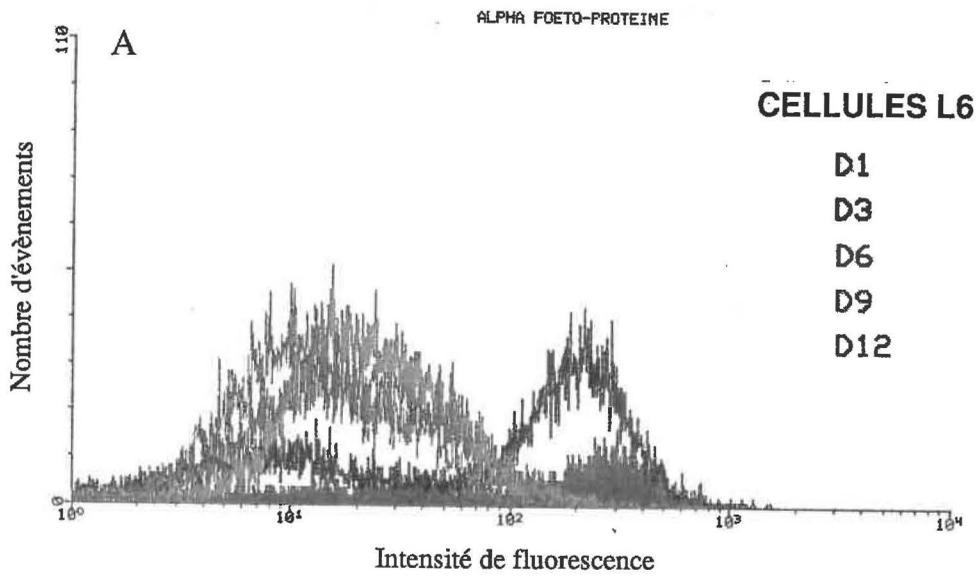
7.2.2.5 α foeto-protéine

Les cellules L6 sont des cellules embryonnaires qui expriment encore l' α -foeto-protéine. L'expression de l' α -foeto-protéine a été observée dans le cas des myoblastes normaux et transformés (Figure 32). Dans le cas de cellules normales, l' α -foeto-protéine est très fortement exprimée durant les 3 premiers jours puis diminue pour se stabiliser jusqu'au 12^e jour (Figure 32). Le degré élevé d'expression de cette protéine en début de croissance témoigne du caractère embryonnaire des cellules L6. Dans le cas des cellules HPV16-L6, l'expression de cette molécule est relativement stable depuis le début mais tend à diminuer et à se stabiliser seulement après le 9^e jour (Figure 32). Nous ne savons pas si l'anticorps était très spécifique. L'analyse mériterait d'être approfondie.

7.2.2.6 Cytokératines

L'analyse des cytokératines, marqueurs de la différenciation cellulaire des kératinocytes, ne fait pas apparaître de stades définis chez les kératinocytes Balbc/MK. L'évolution est quantitative et l'étude cinétique détaillée par la cytométrie de flux allongerait inutilement le texte. Les cytokératines (K) identifiées sont la K1, K10 et K5 de masses moléculaires respectives 67KDa, 59KDa et 58KDa. Nous signalerons que la seule différence qualitative concerne l'apparition d'une protéine de poids moléculaire 50K dès confluence du feuillet cellulaire. Cette cytokératine a été identifiée de manière préliminaire comme la K14 du catalogue

FIGURE 32 Évaluation par cytométrie de flux de l'expression de l'alpha foeto-protéine dans les cellules L6 normales (L6) (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16) (HPV16-L6)(B).
Jour 1 (D1), Jour 3 (D3), Jour 6 (D6), Jour 9 (D9) et Jour 12 (D12).



de Moll *et al.* 1982 par électrophorèse et immunobuvardage avec un anticorps monoclonal anti K14.

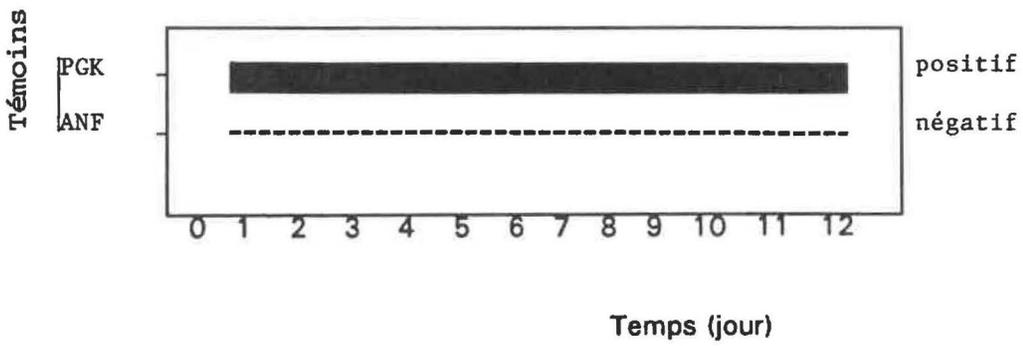
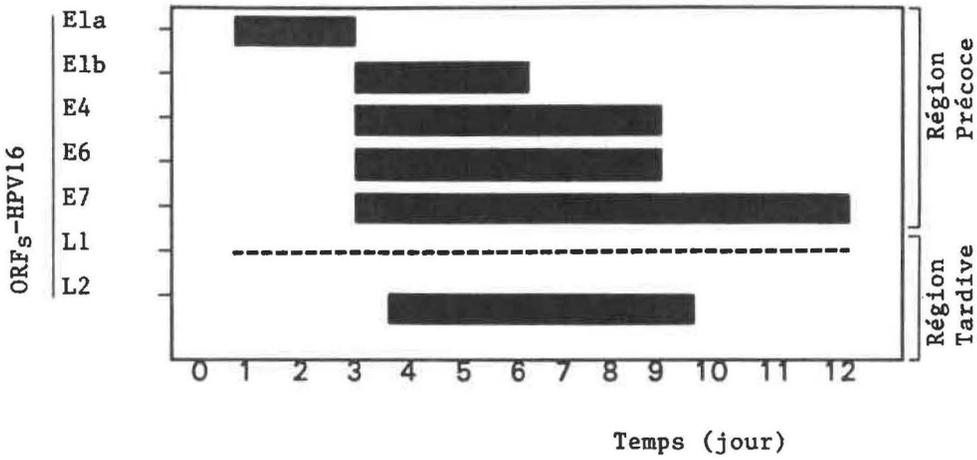
8. EXPRESSION GÉNÉTIQUE DU VIRUS DU PAPILLOME TYPE 16 (HPV16) ET DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE

8.1 Analyse de la transcription du virus du papillome humain type 16 (HPV16)

L'analyse de la transcription du HPV16 chez les L6 en fonction de la différenciation a été étudiée par la technique du RT-PCR: l'ARN total correspondant à chaque étape de différenciation a été isolé. À l'aide des amorces spécifiques aux ORF du HPV16 (Tableau 3), nous avons produit par la technique du "RT-PCR" des ADN complémentaires de l'ARN utilisé comme matrice (Figure 33). Les ORF E1a et E1b ont été produits dès le 1^{er} jour. Leur niveau d'expression diminue vers le jour 3 (Figure 34). Les transcrits E6 et E7, notamment la E7, ont été observés à partir du jour 3 et continuellement détectés jusqu'au jour 12 (Figure 34). Les transcrits E4 sont limités aux jours 3 à 6 (Figure 34). Le transcript L2 est produit dès le jour 3 et continue à être exprimé jusqu'au jour 12. Le transcript correspondant à L1 n'a été détecté qu'une seule fois. Les transcrits de la phosphoglycérate kinase "PGK" constituent un témoin positif qui est exprimé tout le long de la différenciation (Figure 34). Les transcrits du facteur atrial natriurétique "ANF" constituent un contrôle négatif: ces transcrits ne sont pas exprimés dans les cellules L6 (Figure 34).

FIGURE 33 Analyses de la transcription dans les clones cellulaires positifs au virus du papillome humain (HPV16). Amplification par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection des transcrits spécifiques du HPV16.
Marqueur de poids moléculaire ADN λ /Hind III (puits 1, 9).
E_{1a} (puits 2), E_{1b} (puits 3), E₄ (puits 4), E₆ (puits 5), E₇ (puits 6), L₁ (puits 7) et L₂ (puits 8).

FIGURE 34 Cinétique de la transcription des cadres ouverts de lecture (ORFs) du virus du papillome humain type 16 (HPV16) au cours de la différenciation cellulaire. ORF précoce (E), ORF tardif (L), phosphoglycérate kinase (PGK), facteur atrial natriurétique (ANF).



Il ressort des résultats obtenus que le maximum d'expression génétique du HPV16 est situé entre le jour 3 et le jour 6 (Figure 34). Ce résultat a été confirmé par l'analyse de l'ARN du jour 3 par "dot blot" et "Northern blot" à l'aide d'une sonde génomique totale du HPV16 (Figure 35).

8.2 Analyse de la traduction du virus du papillome type 16 (HPV16)

8.2.1 Analyse en cytométrie de flux

Nous avons tenté de mettre en évidence l'expression génétique du HPV16 chez les L6, au niveau protéique entre les jours 1 et 12. Deux types d'anticorps, polyclonal et monoclonal, dirigés contre les antigènes viraux ont été employés. L'anticorps polyclonal qui est dirigé contre le virus complet du virus du papillome Bovin type I (BPV1) réagit fortement avec les antigènes intracytoplasmiques en début de culture mais tend à diminuer par la suite. Une importante réactivité croisée a été observée dans les cellules normales. Cependant, dans le cas de cellules transformées par le HPV16, on note l'existence jusqu'au jour 3 de deux populations dont une majoritaire est plus fortement marquée. L'anticorps polyclonal reconnaît également des molécules localisées dans la membrane aussi bien dans les cellules normales que dans les cellules transformées par le HPV16 (Tableau 6).

L'anticorps monoclonal (Tableau 4) est dirigé contre l'ORF E6 du HPV16. Il réagit faiblement avec les antigènes intracytoplasmiques (Figure 36). La réactivité maximale est obtenue au jour 3 et tend à diminuer progressivement (Figure 36).

FIGURE 35 Analyse de la transcription par "Northern blot" et détection des transcripts spécifiques du virus du papillome humain type 16 (HPV16) dans les cellules L6 transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6), à l'aide d'une sonde génomique totale du HPV16.

ARNs des cellules L6 témoin (puits 1,2) et HPV16-L6 (puits 3,4).
Les ARNS ont été isolés respectivement des cellules L6 et HPV16-L6 après 3 jours de culture (puits 1,3) et après 6 jours de culture (puits 2,4).

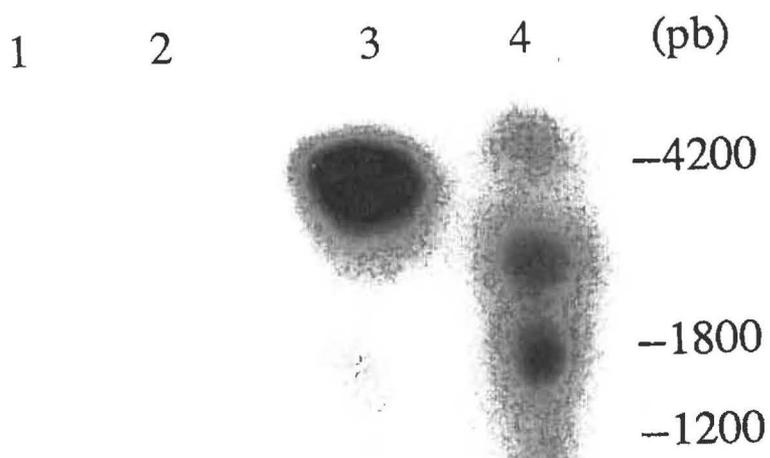
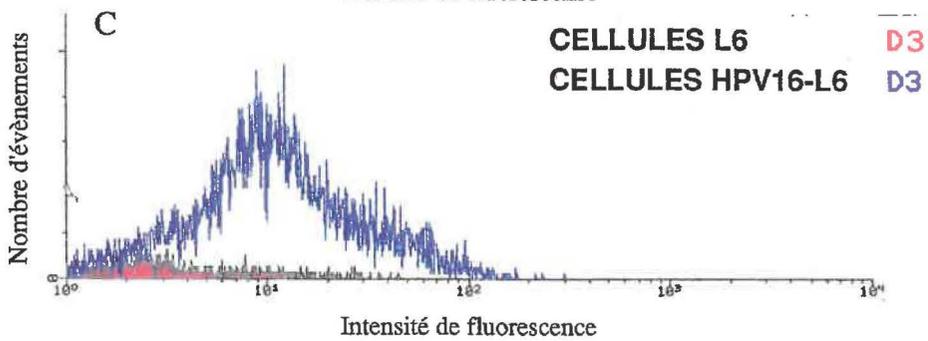
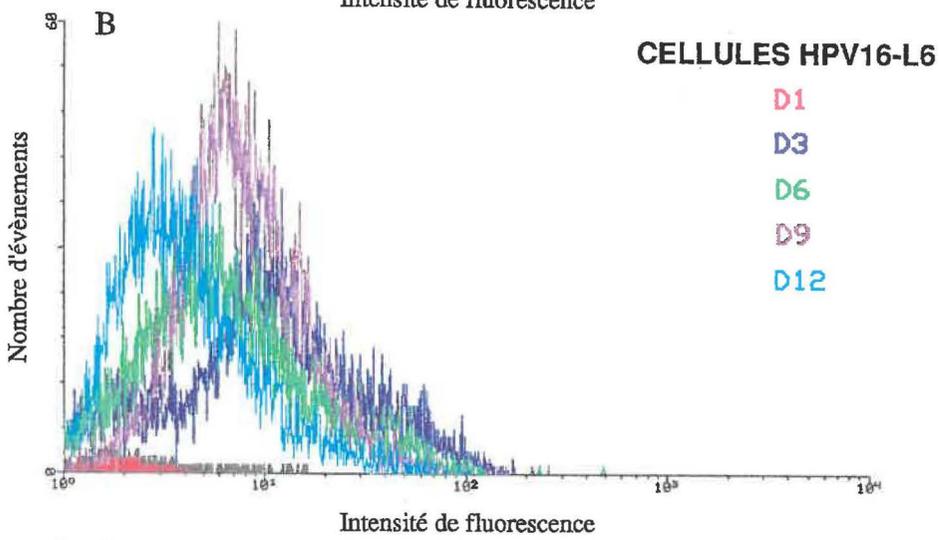
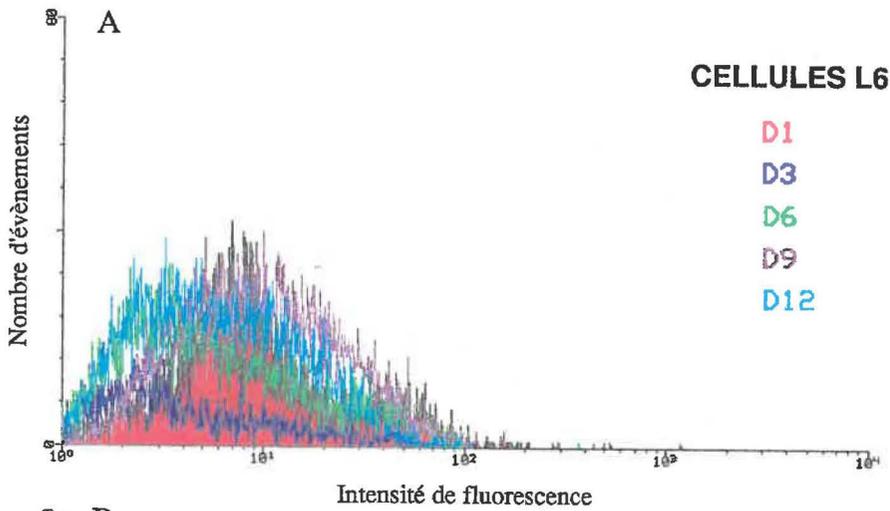


FIGURE 36 Analyse par cytométrie de flux de l'expression du virus du papillome humain type 16 (HPV16) dans les cellules L6 normales (A,C) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B,C). L'anticorps monoclonal utilisé est dirigé contre la protéine E6 du HPV16.
Jour 1 (D1), Jour 3 (D3), Jour 6 (D6), Jour 9 (D9) et Jour 12 (D12).



Aucune réaction n'a été observée au niveau des membranes de ces mêmes cellules (Figure 36). Aucun marquage des cellules normales n'est observé (Figure 36).

8.2.2 Immunobuvardage

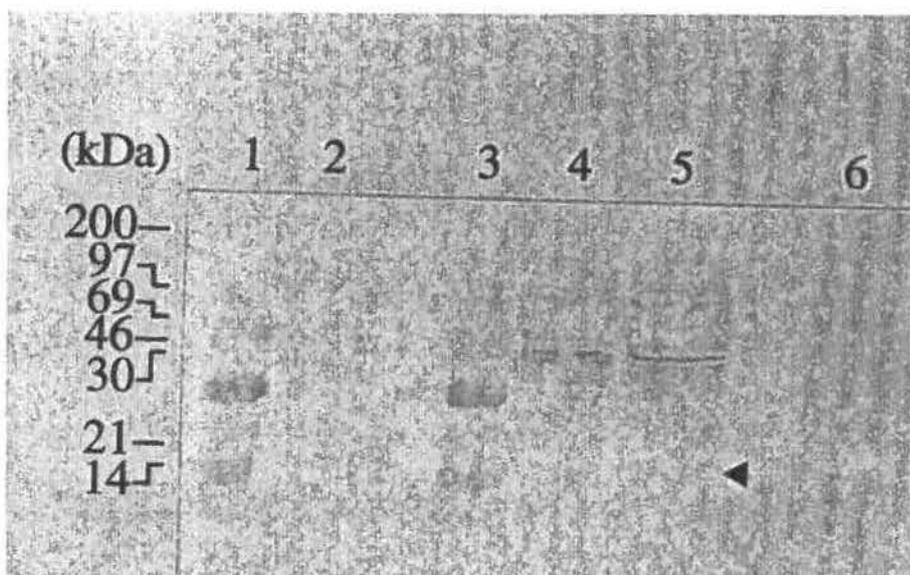
Nous avons tenté de mettre en évidence les protéines virales dans les extraits cellulaires par immunobuvardage.

Les résultats obtenus par le transfert de type "Western" ont confirmé que l'anticorps polyclonal de même que l'anticorps monoclonal réagit avec deux protéines dans les extraits des cellules normales et transfectées (Figure 37). Cependant, une bande supplémentaire de masse moléculaire d'environ 17 KDa qui correspond à la taille de la E6 a été observée dans les cellules transfectées par le HPV16 après 3 jours en culture (Figure 37). Cette bande n'a jamais été observée les jours suivants. Nous avons recherché la protéine E7 dans le noyau, suivant la technique de Greenfield *et al.* 1991. Nous avons pu mettre en évidence une bande d'environ 20 kDa. Une étude plus détaillée est en cours.

8.2.3 Traduction des gènes E6 et E7 du HPV16 dans le modèle kératinocytes

Parallèlement, l'étude de la traduction des protéines E6 et E7 par cytométrie de flux et immunobuvardage à l'aide de l'anticorps monoclonal anti HPV16 a été réalisée sur le modèle kératinocytes Balbc/MK. Les résultats obtenus sont similaires de ceux rapportés ci-dessous dans le modèle myoblastes. Le maximum d'expression se situe entre les jours 6 et 9 (résultats, non présentés). L'immunobuvardage montre aussi une réaction croisée avec deux protéines

FIGURE 37 Analyse par Immunobuvardage. Détection du produit de traduction du HPV16 à l'aide d'un anticorps polyclonal spécifique de groupe. Marqueurs de poids moléculaire (puits 1,3), cellules L6 (puits 2,4) cellules L6 transformées par le HPV16 (HPV16-L6) (puits 5), Balbc/MK (puits 6). L'anticorps montre une réaction croisée avec des protéines cytoplasmiques de masse moléculaires d'environ 46 et 92 KDa chez les cellules L6 et Balbc/MK. La flèche indique une bande d'environ 17 kDa qui pourrait être la protéine E6 du HPV16. Les protéines totales des cellules sont extraites par un tampon de lyse et linéarisées dans le tampon de dénaturation. 100 μ g de protéine sont appliqués sur le gel dans chaque puits. Après séparation des protéines par électrophorèse (Laemmli 1970) et électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, les protéines virales ou apparentées sont détectées par un anticorps monoclonal spécifique du HPV16. La méthode indirecte de détection avec un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase a été utilisée. Les marqueurs sont précolorés et apparaissent en gris dans une photographie en noir et blanc.



cytoplasmiques de même poids moléculaires que celles observées dans le modèle L6 (Figure 37).

9. ÉTUDE DES MÉCANISMES CELLULAIRES

9.1 Protéine kinase C (PKC) des myoblastes L6

Les protéines kinases C sont une famille de sérine/thréonine kinases liées aux processus de prolifération et de différenciation cellulaires. Elles font partie intégrante de la signalisation cellulaire. On les trouve dans la membrane plasmique, dans le cytoplasme et dans la membrane nucléaire. Les espèces cytoplasmiques peuvent être transportées dans la membrane plasmique sous l'effet d'effecteurs comme le TPA. En outre, les PKC liées à la membrane peuvent s'y trouver sous une forme active et inactive. Le TPA quand il est fourni aux cellules de manière exogène agit par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. Il stimule la PKC directement mais aussi en induisant la translocation d'une partie des enzymes cytoplasmiques vers la membrane comme nous l'avons dit plus haut. Lorsque le TPA est additionné directement au milieu réactionnel, il active directement la PKC liée à la suspension de membranes. Les isozymes ont des propriétés si voisines qu'en général, on ne les distingue pas sur le plan de leur activité. Les PKC sont multispécifiques, mais quelques uns de leurs substrats endogènes préférentiels ont été identifiés.

La protéine kinase C membranaire est impliquée dans une des deux voies majeures de la signalisation cellulaire. Elle utilise le calcium comme messenger secondaire. Cette voie est connue pour réguler à la fois la prolifération et la

différenciation, c'est pourquoi nous avons testé l'effet du virus sur l'activité des PKCs. Ces expériences ont été menées dans le but de tenter de localiser l'interférence du HPV16 avec les processus de signalisation.

9.1.1 Étude de l'évolution de l'activité protéine kinase C (PKC) en fonction de l'âge des cellules

Il existe trois "pools" de PKC cellulaires: un pool membranaire, un pool cytoplasmique et un pool nucléaire. Les PKCs peuvent être transportées du cytosol vers les membranes nucléaires et plasmiques.

a) Spécificité de l'activité kinase mesurée:

Les myoblastes contiennent les PKC ainsi que d'autres kinases capables de phosphoryler la sérine et la thréonine (Nishizuka 1984a; Osada *et al.* 1992). Nous avons donc tout d'abord tenté de confirmer la spécificité de la PKC pour le substrat synthétique utilisé en mesurant le taux d'inhibition de la réaction enzymatique par une série d'inhibiteurs (Tableau 4). Les résultats obtenus sont présentés au Tableau 4: à la concentration utilisée, seul le U-73, 122 inhibe totalement la PKC. Le peptide synthétique compétiteur du substrat produit aussi une inhibition non négligeable. Les autres effecteurs sont également inefficaces sauf une faible inhibition exercée par la chélérythrine. Ces résultats seront discutés dans la section 4.2.

b) Activité basale:

La membrane cellulaire présente une activité de phosphorylation qui s'exerce sur le substrat naturel endogène présent dans la membrane ainsi qu'une activité d'autophosphorylation. On l'appelle l'activité basale.

L'activité PKC membranaire endogène ou activité basale est faible . Elle évolue avec l'âge de la culture (Tableau 7). Il est clair que la régulation négative de la PKC membranaire coïncide avec la réduction de la prolifération cellulaire lorsque la phase stationnaire est atteinte. Par contre, les cellules L6 transfectées par le HPV16 dont le taux de prolifération est plus élevé (Figure 23) et dont la différenciation terminale est arrêtée, montrent une activité de phosphorylation nettement plus élevée (Figures 38, Tableaux 8 et 9). D'une part, le maximum d'activité est légèrement décalé par rapport à celui des témoins et d'autre part, l'activité demeure élevée pendant toute la durée de l'expérience (Tableau 7).

c) Activité de la protéine kinase C (PKC) membranaire:

L'évolution de l'activité de la PKC membranaire au cours du temps sur le substrat synthétique montre une évolution tout à fait parallèle celle de a l'activité basale (Tableaux 8 et 9). On notera l'augmentation d'activité liée à l'infection et la réduction d'activité associée à la suppression des facteurs de croissance lors du passage du milieu de prolifération au milieu de différenciation (Tableaux 8 et 9). Cette réduction est plus prononcée pour les cellules L6 témoins que pour leurs homologues transfectées au HPV16. Ceci renforce la conclusion que le HPV16

TABLEAU 7. Cinétique de l'activité spécifique de la protéine kinase C (PKC) membranaire* sur le substrat endogène.

Temps	n	10 min	n	30 min	n	24 hrs	n	48 hrs	n	72 hrs
Cellules L6	8	107.0 ± 35	8	99.5 ± 8	8	173.9 ± 21	8	158.7 ± 15	8	156.3 ± 17
Cellules HPV16-L6	8	104.7 ± 9	8	100.1 ± 7	8	264.9 ± 14	8	408.3 ± 26	8	256.2 ± 19

L'activité de la PKC est exprimée en p moles de substrat phosphorylé par 0.1 mg de protéines membranaires totales.

* La préparation des membranes a été décrite dans la section matériel et méthodes (section 13). Les cellules ont été cultivées dans du milieu EMEM à faible teneur en Ca^{2+} (0.05 mM).

n (nombre d'expériences)

TABLEAU 8. Activité spécifique de la protéine kinase C (PKC) membranaire* dans les cellules L6.

**	n	Témoin	n	+ DMSO 1%	n	Ca ²⁺ .25 mM	n	Ca ²⁺ 1.8 mM	n	RA .3 μM	n	TPA 1 μM
10 min	12	115.1 ± 33	10	228.0 ± 57	8	131.4 ± 19	4	186.9 ± 4	7	135.5 ± 54	10	307.3 ± 50
30 min	7	81.9 ± 9	7	134.7 ± 20	7	108.3 ± 3	4	276.4 ± 13	4	111.4 ± 28	8	251.3 ± 64
24 hrs	6	87.5 ± 12	4	92.6 ± 17	6	158.0 ± 18	4	182.5 ± 20	4	96.5 ± 17	7	250.0 ± 18
48 hrs	7	127.3 ± 13	4	103.4 ± 12	4	272.7 ± 18	4	211.4 ± 14	4	143.2 ± 8	4	297.0 ± 24
72 hrs	8	114.3 ± 14	4	90.6 ± 11	8	220.4 ± 26	4	177.8 ± 11	4	115.3 ± 25	4	150.4 ± 17
7 jours	4	26.7 ± 4	4	25.3 ± 6	4	45.4 ± 9	4	26.7 ± 3	4	49.6 ± 26	6	57.7 ± 5
+ HS ⁽¹⁾	4	6.4 ± 1	4	5.5 ± 2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

TABLEAU 9. Activité spécifique de la protéine kinase C (PKC) membranaire* dans les cellules HPV16-L6.

**	n	Témoin	n	+ DMSO 1%	n	Ca ²⁺ 0.25 mM	n	Ca ²⁺ 1.8 mM	n	RA 0.3 μM	n	RA 3 μM	n	TPA 1 μM
10 min	8	87.6 ± 14	8	143.3 ± 8	8	239.4 ± 11	8	182.8 ± 10	8	130.5 ± 7	8	131.1 ± 20	8	378.0 ± 27
30 min	4	115.2 ± 5	4	166.6 ± 17	4	107.6 ± 2	4	215.0 ± 6	4	128.7 ± 6	4	174.3 ± 16	4	311.4 ± 34
24 hrs	8	1376.7 ± 105	8	1203.2 ± 212	8	1544.0 ± 75	8	3640.6 ± 279	8	669.5 ± 128	8	1961.7 ± 685	7	3032.2 ± 213
48 hrs	8	1956.4 ± 101	8	1047.5 ± 72	8	1265.8 ± 35	8	1206.3 ± 137	8	1179.0 ± 171	8	1591.5 ± 360	8	2376.5 ± 171
72 hrs	8	1524.0 ± 112	8	853.6 ± 124	8	879.7 ± 62	8	1988.2 ± 168	8	1077.2 ± 51	8	1066.7 ± 108	8	2165.0 ± 541
7 jours	4	66.0 ± 10	4	62.6 ± 4	4	162.0 ± 3	4	125.0 ± 5	4	89.2 ± 3	4	93.0 ± 14	4	208.7 ± 17
+ HS ⁽¹⁾	4	70.6 ± 3	4	103.1 ± 7	4	70.9 ± 1	4	146.0 ± 8	4	96.6 ± 8	4	90.0 ± 12	4	206.7 ± 18

L'activité de la PKC est exprimée en p moles de substrat phosphorylé par 0.1 mg de protéines membranaires totales. Le TPA a été utilisé comme témoins positif, exogène, seulement pour 30 min, au delà, l'effet est complexe.

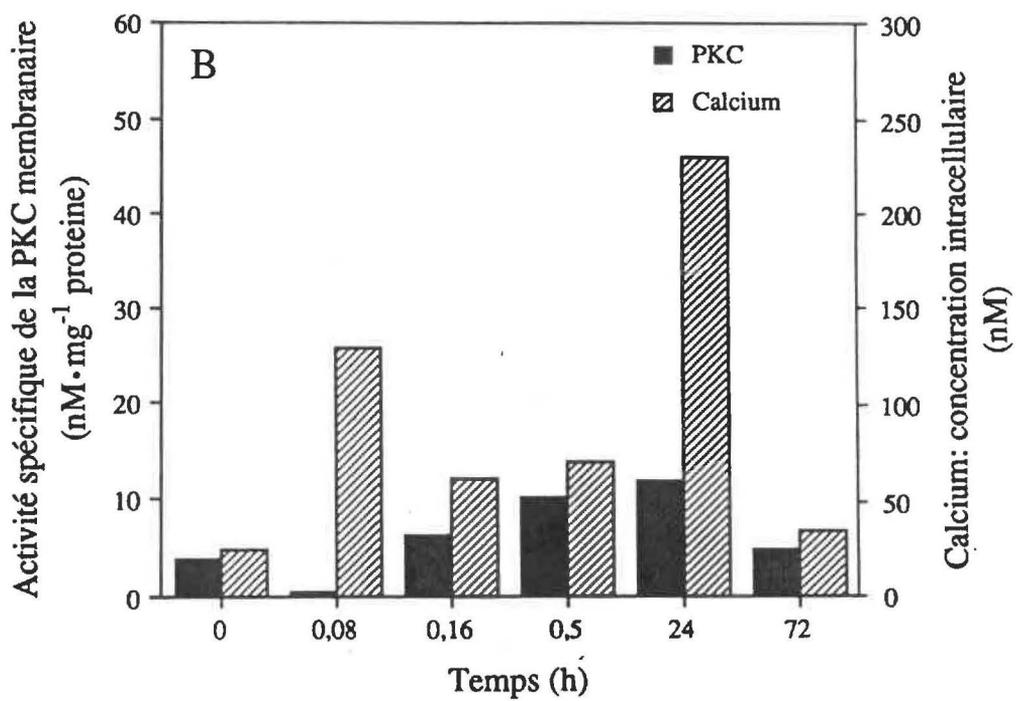
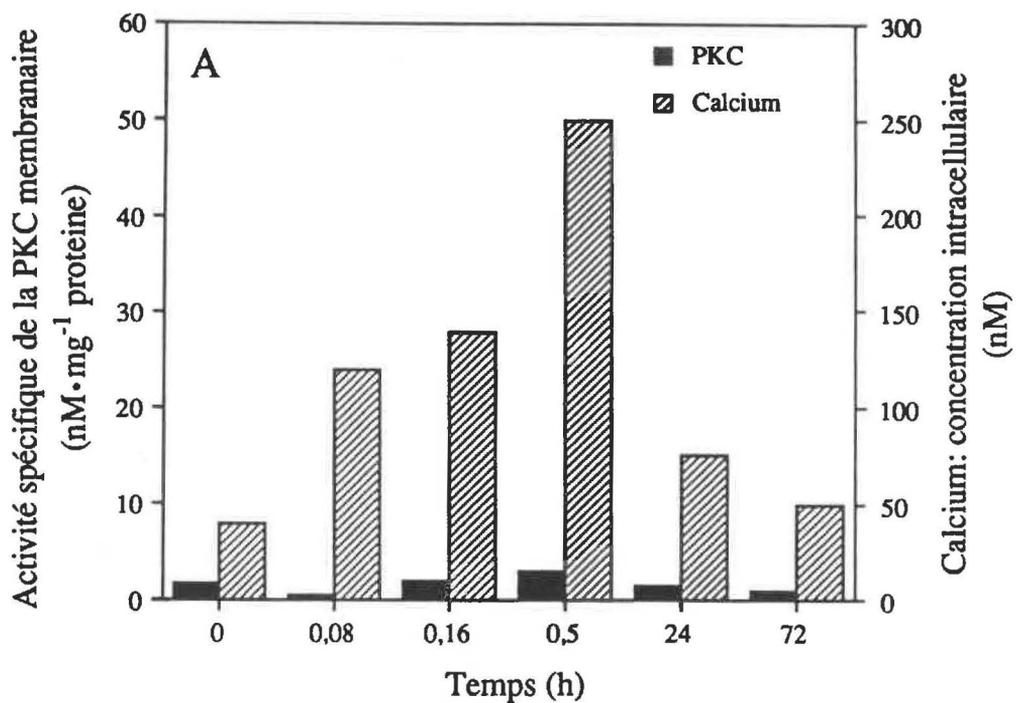
* La préparation des membranes a été décrite dans la section matériel et méthodes (section 13).

** Les cellules ont été traitées aux concentrations indiquées de DMSO, Ca²⁺, RA et TPA. La durée du traitement est également indiquée. Les cellules ont été cultivées dans du milieu EMEM à faible teneur en Ca²⁺ (0.05 mM).

(1) HS (sérum de cheval 3%)
nd (non déterminé)
n (nombre d'expériences)

FIGURE 38 Relations entre les changements du calcium intracellulaire et la protéine kinase C (PKC) dans les cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B).

Les résultats proviennent d'une expérience type faite en triplicata.



stimule l'activité de la PKC membranaire dans ce modèle cellulaire de myoblastes. Les résultats présentés dans le Tableau 9 en sont une autre preuve indirecte: La stimulation directe par le TPA de l'activité PKC est au moins aussi importante chez les cellules transfectées que chez les cellules normales malgré l'activité élevée présentée par les premières (Tableaux 8 et 9).

d) Activité de la protéine kinase C (PKC) cytoplasmique:

Afin de savoir si le virus exerçait une action spécifique sur la PKC membranaire ou s'il altérait le transport de l'enzyme cytoplasmique vers la membrane, nous avons suivi l'évolution de l'activité PKC cytosolique.

L'activation de la PKC observée dans les cellules contenant le HPV16 pouvait résulter de i) L'activation des sous populations inactives des PKC membranaires , ii) d'une translocation accrue de l'enzyme du cytoplasme vers les membranes, iii) d'une synthèse accrue de ces enzymes d'une manière générale ou de la synthèse de nouvelles isozymes par les cellules transfectées et enfin iv) d'une activation due aux effecteurs de ces enzymes.

L'activité PKC dans le cytosol des cellules normales augmente très fortement après 24 à 48 heures en culture pour décroître tout aussi fortement dès que la fin de la phase logarithmique de la culture est atteinte. Cette réduction paraît associée à l'inhibition de contact. Chez les cellules transfectées où l'inhibition de contact est supprimée la PKC reste largement stimulée (Tableaux 10 et 11). D'autre part les corrélations entre les activités cytosoliques et membranaires sont inversées chez les cellules contenant le HPV16 (Figure 41).

TABLEAU 10. Activité cytosolique* de la protéine kinase C (PKC) dans les cellules L6.

**	n	Témoïn	DMSO		n	Ca ²⁺		n	RA .3 μM	n	TPA 1 μM		
			1%			0.25 mM							
			n	4%		n	1.8 mM						
10 min	6	155.0 ± 18	244.0 ± 22	nd	nd	162.5	6	500.0 ± 30					
30 min	12	508.2 ± 32	719.0 ± 49	8	416.7 ± 18	8	897.8 ± 52	8	453.4 ± 13	12	522.7 ± 45	12	438.5 ± 38
24 hrs	4	2100.0 ± 68	1654.8 ± 212	4	1182.4 ± 66	4	700.0 ± 51	4	497.9 ± 47	4	1881.2 ± 72	4	nd
72 hrs	4	207.1 ± 35	540.4 ± 66	5	368.7 ± 9	4	148.0 ± 23	4	101.7 ± 32	4	233.3 ± 48	4	nd
7 jours	4	135.6 ± 24	196.3 ± 39	4	140.0 ± 22	4	191.4 ± 36	4	111.7 ± 53	4	126.2 ± 20	4	nd

TABLEAU 11. Activité cytosolique* de la protéine kinase C (PKC) dans les cellules HPV16-L6.

**	n	Témoïn	DMSO		n	Ca ²⁺		n	RA .3 μM	n	TPA 1 μM			
			1%			0.25 mM								
			n	4%		n	1.8 mM							
10 min	6	74.0 ± 12	6	108.0 ± 19	4	350.0 ± 22	4	242.0 ± 14	4	150.0 ± 17	6	508.0 ± 34		
30 min	12	96.0 ± 20	8	174.0 ± 19	8	118.0 ± 21	4	84.0 ± 9	4	268.0 ± 18	4	142.0 ± 23	12	404.0 ± 44
24 hrs	4	1488.0 ± 73	4	1398.0 ± 64	4	340.0 ± 25	4	1748.0 ± 101	4	4254.0 ± 218	4	736.0 ± 51	4	nd
48 hrs***	4	2904.0 ± 112	4	1482.0 ± 75	4	338.0 ± 22	4	1776.0 ± 85	4	2282.0 ± 172	4	1748.0 ± 94	4	nd
72 hrs	4	1488.0 ± 69	4	1188.0 ± 51	4	218.0 ± 31	4	978.0 ± 44	4	2012.0 ± 109	4	1188.0 ± 47	4	nd

L'activité de la PKC est exprimée en p moles de substrat phosphorylé par 0.1 mg de protéines membranaires totales. Le TPA a été utilisé comme témoin positif endogène seulement pour 30 min, au delà, l'effet est complexe.

* La préparation du cytosol a été décrite dans la section matériel et méthodes (section 13).

** Les cellules ont été traitées aux concentrations indiquées de DMSO, Ca²⁺, RA et TPA. La durée du traitement a été également indiquée. Les cellules sont cultivées dans du milieu à faible teneur en Ca²⁺ (0.05 mM).

*** L'activité à 48 hrs a été testée sur les cellules transfectées pour renforcer les résultats obtenus à 24 et 42 hrs. Le temps 7 jours n'a pas été testé.

nd (non déterminé)
n (nombre d'expériences)

FIGURE 39 Évolution des quotients d'activité de la PKC membranaire chez les cellules témoins L6 et les cellules transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6): Activité obtenue en réponse aux modulateurs par rapport à l'activité des témoins correspondants. Effets du DMSO 1% (A); Ca²⁺ 0.25 mM (B); Ca²⁺ 1.8 mM (C); RA 0.3 μM (D); RA 3 μM (E) et TPA 1 μM (F). HS représente une mesure similaire au temps 168 h mais réalisée sur des cellules cultivées dans le milieu de différenciation contenant du serum de cheval (HS). Cette figure est une représentation graphique découlant des tableaux 13 et 14.

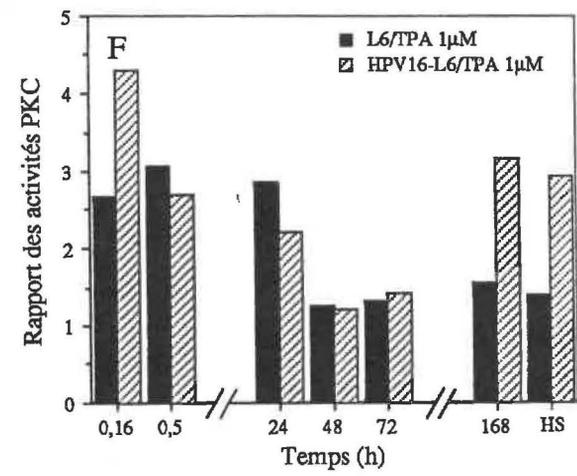
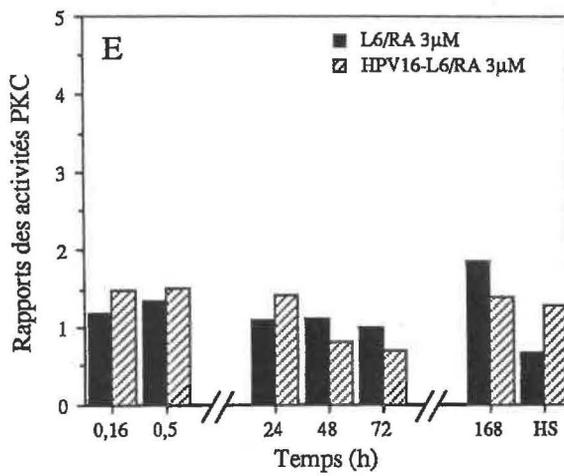
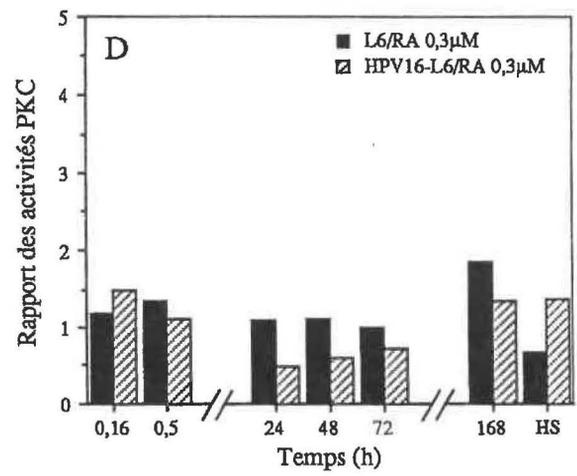
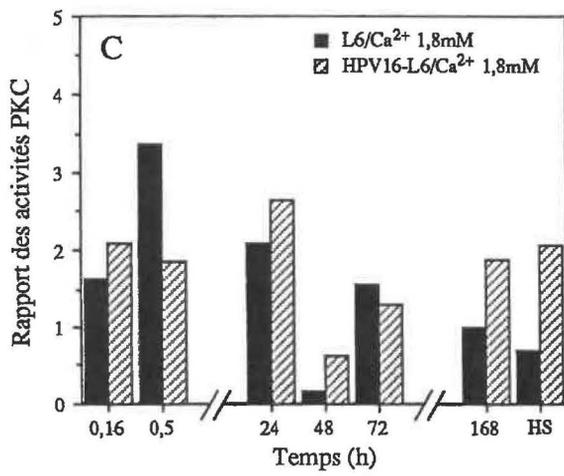
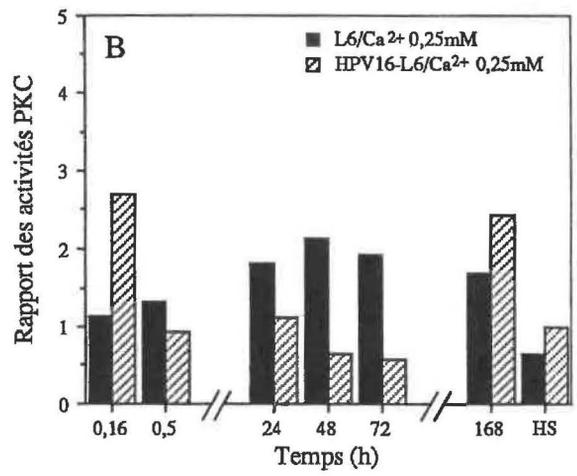
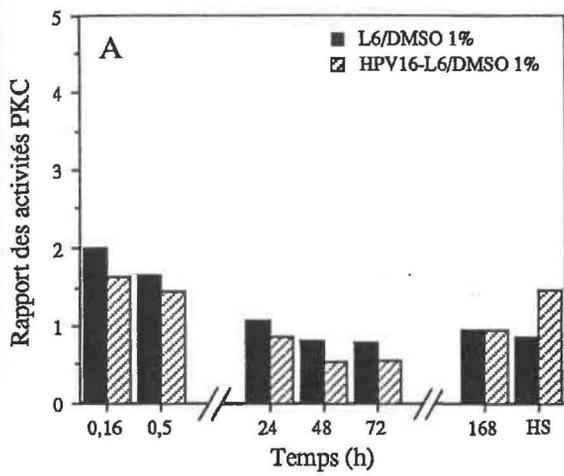


FIGURE 40 Évolution des quotients d'activité de la PKC membranaire chez les cellules témoins Balbc/MK et les cellules transfectées par le HPV16 (HPV16-Balbc/MK): Activité obtenue en réponse aux modulateurs par rapport à l'activité des témoins correspondants. Effets du DMSO 1% (A); RA 0.3 μ M (B); Ca²⁺ 1.8 mM (C) et TPA 1 μ M (D).

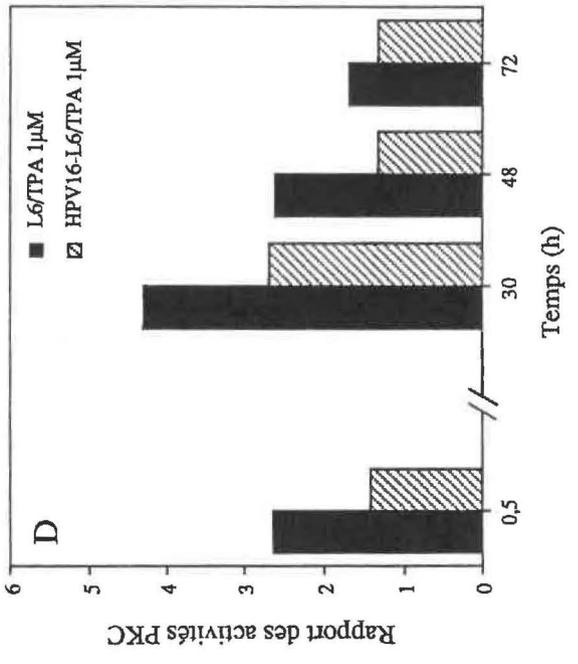
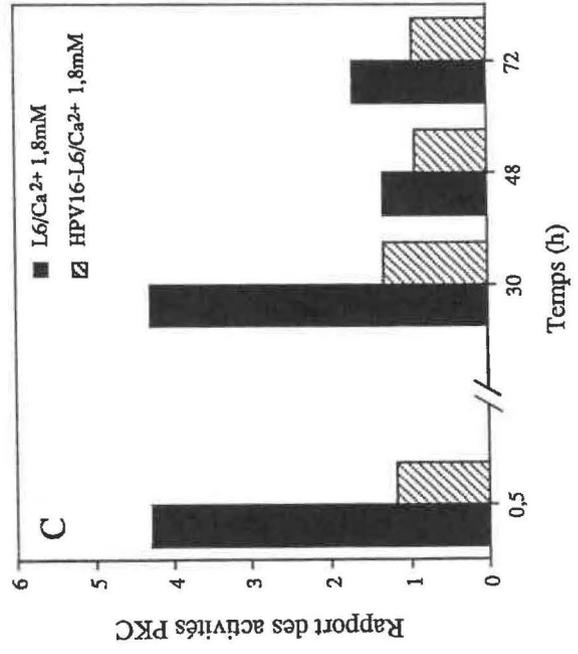
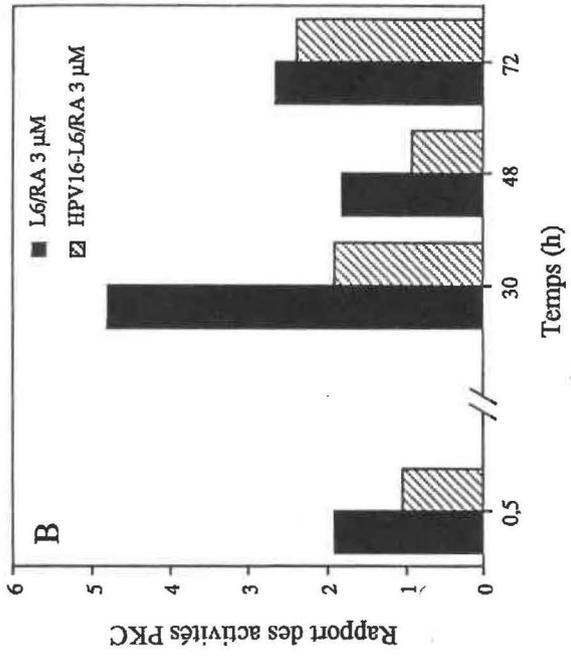
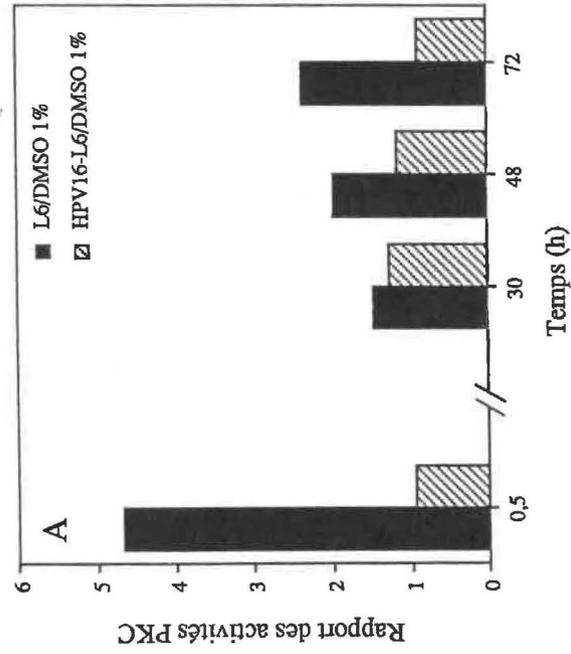
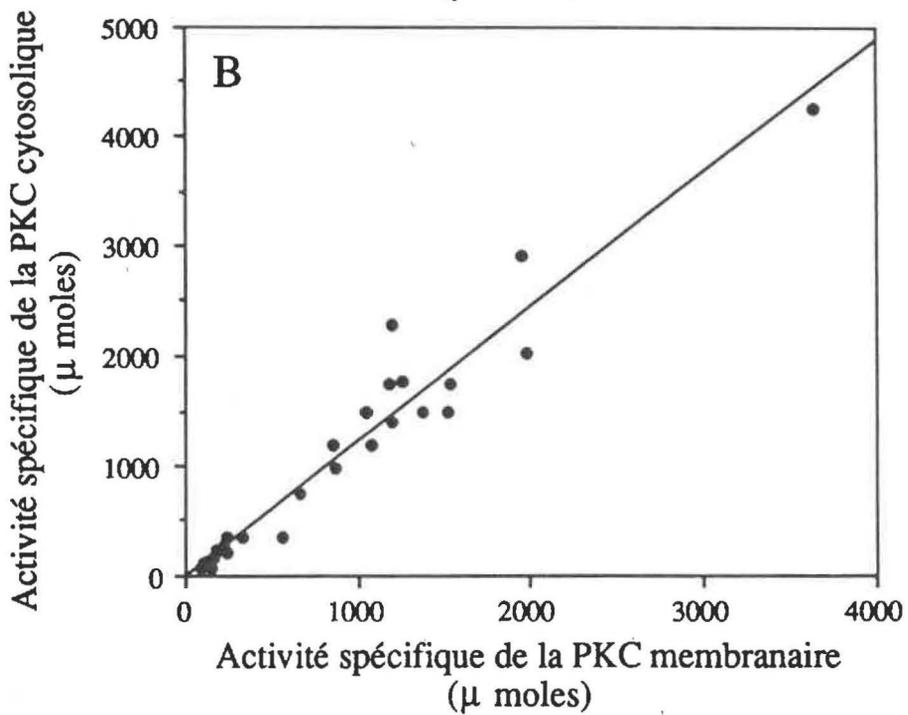
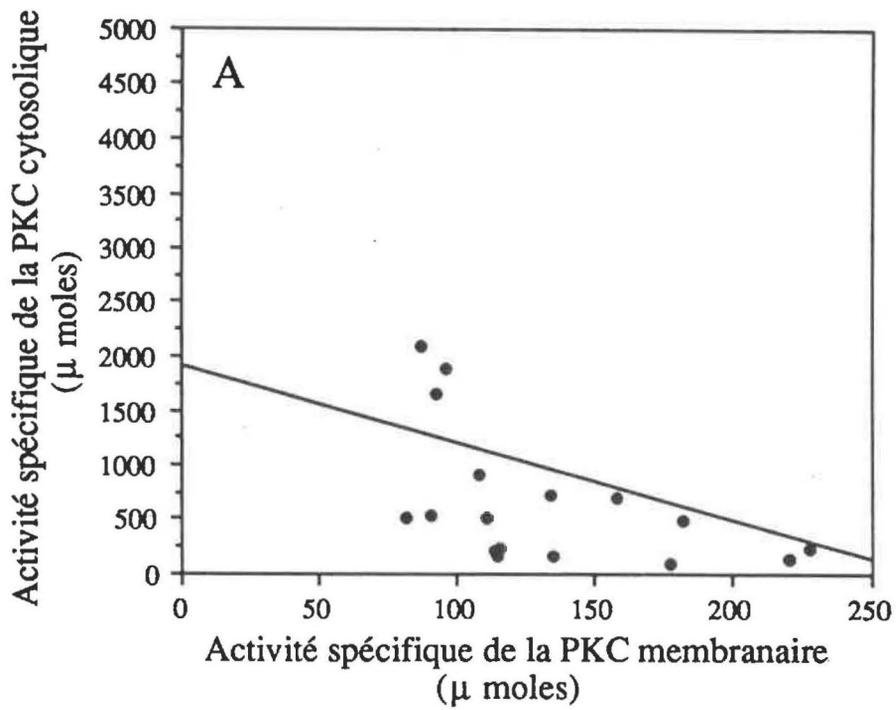


FIGURE 41 Correlations entre les activités spécifiques de la protéine kinase C (PKC) membranaire et cytosolique dans les cellules L6 normales (L6) (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B). Cellules L6 normales (A): corrélation négative (-0,70) et pente de régression (-7,29). Cellules L6 transfectées par le HPV16 (B): corrélation positive (0,97) et pente de régression (1,22)



Comme l'indique le Tableau 12, il n'y a pas de différence significative entre les cellules témoins et transfectées sur le plan du rapport entre sous populations actives et inactives du pool membranaire. Il n'est cependant pas exclu que le transport de la PKC du cytoplasme vers la membrane soit présent dans les cellules HPV16-L6.

Les résultats obtenus par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal dirigé contre les principales isozymes de la PKC (UBI, Lake Placid, NY, USA) montrent qu'il n'y a pas de nouvelle isozyme synthétisée dans les cultures infectées. Cependant, une bande électrophorétique de masse moléculaire 80 KDa est plus intense dans les cellules positives au HPV16 que dans les témoins et semble avoir une masse plus élevée (Figure 42). Ceci pourrait indiquer une phosphorylation plus intense de la molécule, lui conférant une activité plus élevée. La question de l'identité de cette bande sera abordée dans la discussion.

9.1.2 Effet des modulateurs de la différenciation cellulaire sur l'activité protéine kinase C (PKC) des myoblastes

L'analyse du patron d'expression des marqueurs spécifiques de différenciation chez les L6 semble indiquer que les cellules transfectées sont bloquées à un stade précédant la fusion. Nous avons testé l'efficacité du blocage en induisant la différenciation par des modulateurs conventionnels.

Les cellules ont été exposées pour des durées croissantes à ces agents connus pour influencer l'activité PKC, la prolifération et la différenciation cellulaires. La

TABLEAU 12 . Activité de la protéine kinase C (PKC) membranaire* : enzyme active/inactive. Comparaison entre les cellules** L6 normales et transformées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)***.

	n	L6 (1)	(2)	n	HPV16-L6 (1)	(2)
Témoin	8	140.0 ± 21		4	732.8 ± 53	
TPA 1 μ M ⁽¹⁾	8	196.0 ± 17	1.4	4	1162.0 ± 65	1.59
Ca ²⁺ 1.8 mM	8	327.8 ± 29		4	15207.0 ± 31	
Ca ²⁺ 1.8 mM + TPA 1 μ M ⁽¹⁾	11	327.7 ± 62	1.0	3	16483.0 ± 119	1.08
TPA 1 μ M ⁽³⁾	6	512.9 ± 20	3.7	4	1982.3 ± 95	2.7

(1) L'activité de la PKC est exprimée en p moles de substrat phosphorylé par 0.1 mg de protéines membranaires totales.

(2) Rapport des activités spécifiques membranaires des cellules traitées aux concentrations indiquées, de Ca²⁺ et TPA, et de leurs témoins correspondants.

(3) Le TPA a été utilisé comme témoin positif en traitement exogène. L'activité PKC mesurée reflète la translocation de l'enzyme cytosolique vers les membrane, plus l'activation de l'enzyme membranaire.

* Le TPA ajouté à la préparation des membranes active le pool enzymatique membranaire inactif.

** La préparation des membranes a été décrite dans la section matériel et méthodes (section 13).

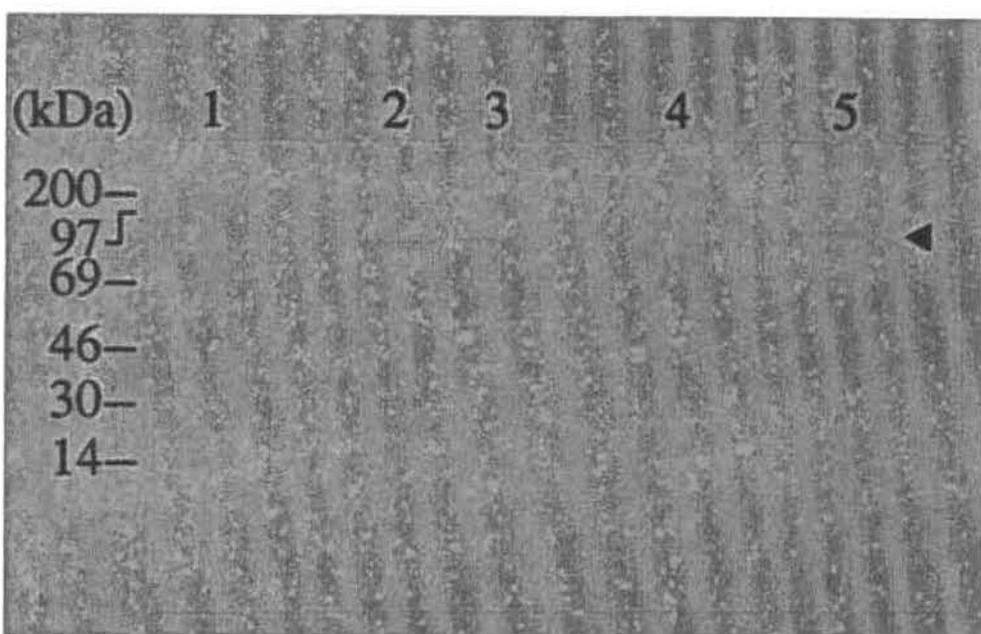
*** Les cellules ont été cultivées dans du milieu EMEM à faible teneur en Ca²⁺ (0.05 mM).

n (nombre d'expériences)

FIGURE 42 Analyse par Immunobuvardage. Détection de l'expression de la protéine kinase C (PKC) à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre les isoformes de la PKC. Marqueurs de poids moléculaires (puits 1,4), cellules L6 (puits 2,3) et cellules L6 transformées par le HPV16 (HPV16-L6) (puits 5).

La flèche indique une protéine immunoréactive de masse moléculaire d'environ 80 kDa. Cette protéine est donc une isoforme de la PKC. Deux autres bandes mineures sont à peine visibles sur le cliché.

Les protéines cytoplasmiques sont extraites. 100 µg de protéines est appliqué sur le gel dans chaque puits. Après séparation des protéines par électrophorèse (Laemmli, 1970) et électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, les protéines (PKC) sont détectées par un anticorps polyclonal spécifique des isoformes de la PKC. La méthode indirecte de détection utilise un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase.



PKC répond à ces modulateurs par une stimulation précoce et transitoire liée à l'orientation vers la différenciation. Par contre, il a été souvent observé qu'une stimulation tardive et soutenue est associée à la croissance. L'évolution cinétique de la réponse de la PKC à ces modulateurs devrait donc refléter la réaction des cellules à l'effecteur.

Le calcium, un messager secondaire dans la signalisation cellulaire, a un rôle particulier: il induit la différenciation dans un grand nombre de cellules, il est un co-facteur obligatoire des PKC conventionnelles, et peut stimuler la prolifération. Le calcium induit la différenciation dans les L6. Toutefois, la PKC n'est pas impliquée du moins directement dans la différenciation des myoblastes où ce rôle est tenu par la kinase dépendante de la calmoduline (Whitfield, 1990). Le DMSO a généralement un effet inducteur de la différenciation tandis que l'acide rétinoïque est plus spécifique. Son effet dépend des récepteurs nucléaires dans les modèles utilisés.

a) **Calcium** : Le calcium stimule la prolifération des cellules L6 normales et a peu d'effet sur les cellules L6 transfectées par le HPV16 (Figures 22). L'exposition au calcium s'accompagne chez les contrôles d'une stimulation de l'activité PKC membranaire. On notera une réponse soutenue tout au long de l'expérience (Tableau 8). Elle correspond à l'effet positif de l'ion calcium sur la croissance en particulier pour la dose 0.25 mM, ce qui est très visible dans la Figure 22. Une réduction de l'activité enzymatique s'observe au jour 7, elle correspond à la diminution de croissance résultant de l'inhibition de contact. L'effet du calcium sur

la prolifération des cellules transfectées est relativement atténuée (Figure 22) par rapport au témoin correspondant. De même, la régulation positive de l'activité PKC est très atténuée par rapport à celle des cellules transfectées non traitées mais demeure très élevée par rapport aux cellules normales (Figure 42, Tableaux 8 et 9).

La réponse précoce de l'enzyme à la dose de calcium induisant la différenciation (1.8 mM) est nette chez les témoins (Tableau 8). Elle est abolie dans les cellules transfectées (Figure 9). Dans le modèle myoblaste, l'activité PKC évolue donc parallèlement à l'activité de croissance des populations (Figure 43) sauf en ce qui concerne la réponse précoce des témoins à la dose 1.8 mM. La PKC cytosolique des cellules normales est régulée négativement après 24 heures d'exposition au calcium. Par contre, elle est stimulée au même temps dans les cellules transformées (Tableau 11) pour diminuer ensuite tout en restant très élevée par rapport aux cellules normales. Dans les deux cas l'effet observé est dépendant de la dose.

La réduction de l'activité cytosolique à 24 hrs coïncide avec le pic d'activité de l'enzyme membranaire, ce qui suggère que le calcium (comme le TPA) induit la translocation du cytosol vers la membrane. Les courbes de régression sont très claires (Figure 41). La corrélation négative des cellules témoins confirme la translocation. Par contre, dans les cellules transformées, la corrélation est inversée (Figure 41). Cela indique que les PKCs cytosoliques et membranaires sont régulées positivement (Figure 41). Il est possible que la translocation de

l'enzyme soit masquée ou que l'augmentation d'activité dans la membrane et le cytosol découlent d'une phosphorylation accrue.

b) **DMSO** : Le DMSO a un effet inhibiteur sur la prolifération des populations cellulaires L6 étudiées (Figure 22). L'effet du DMSO sur l'activité de la PKC membranaire est diamétralement opposé à celui du calcium (Tableaux 8 et 9). On relève une réponse positive précoce. L'évolution dans le temps est caractéristique de celle observée dans le cas de la différenciation cellulaire. Cette réponse est très atténuée chez les cellules transfectées (Tableau 9). Il est possible qu'une faible partie de la population réponde positivement au modulateur. L'activité de l'enzyme diminue aussi avec la réduction de la prolifération au cours du temps (Figure 43). Cette réponse est liée à la toxicité à long terme du DMSO, comme l'indique l'aspect des cultures. L'activité cytoplasmique est régulée négativement par le modulateur dans les deux types de cellules (Tableaux 8 et 9).

c) **Acide rétinoïque** : On n'observe pas d'effet significatif de ce traitement ni sur la prolifération ni sur l'activité PKC dans aucune des deux lignées (Figures 22 et 23, Tableaux 8, 9, 13 et 14).

d) **Sérum de cheval** : Le passage du milieu de prolifération au milieu de différenciation (utilisé ici comme un témoin positif) s'accompagne d'une forte réduction de l'activité PKC membranaire, encore une fois parallèle à la réduction de la prolifération et à la progression du programme de différenciation vers sa phase terminale. On notera que les cellules transformées réagissent d'une manière

similaire mais conservent cependant une activité plus élevée que celle des témoins (Tableau 9).

9.1.3 Effet des modulateurs de la différenciation cellulaire sur la protéine kinase C (PKC) des kératinocytes Balbc/MK

Au contraire des myoblastes, les PKC membranaires conventionnelles des kératinocytes sont impliquées directement dans la différenciation. Il était donc important de comparer l'effet des différents inducteurs de la différenciation sur les PKCs des kératinocytes et des myoblastes.

Dans les témoins il n'y a pas de différence significative de l'activité basale entre cellules normales ou transfectées (Tableaux 13 et 14).

La réponse aux trois inducteurs de différenciation est similaire chez les cellules normales: le calcium stimule l'activité, la réponse est à la fois précoce (avec un pic à 30 min) et soutenue (Tableau 13). Ceci est le reflet de l'induction de la différenciation par le calcium (réponse précoce) et de son effet positif sur la croissance (réponse soutenue). Par contre, l'exposition au calcium n'affecte pratiquement pas les cellules transfectées (Tableau 14). Le DMSO 1% qui est aussi un inducteur de différenciation des kératinocytes produit exactement les mêmes résultats que le calcium avec un pic précoce à 30 min. et une activité moyennement soutenue (Tableau 13). Comme pour le calcium, les cellules transfectées sont insensibles au DMSO (Tableau 14).

TABLEAU 13. Activité spécifique de la protéine kinase C (PKC) membranaire* dans les kératinocytes (Balbc/MK).

**	n	Témoïn	n	Ca ²⁺ 1.8 mM	n	DMSO 1%	n	DMSO 4%	n	RA 3 µM	n	TPA 1 µM
10 min	11	270.7 ± 17	8	411.8 ± 67	9	196.9 ± 52	8	229.4 ± 20	8	370.9 ± 65	12	785.7 ± 117
30 min	3	203.0 ± 16	8	868.0 ± 112	3	946.5 ± 138	4	290.1 ± 47	4	384.0 ± 58	4	538.9 ± 37
30 hrs	9	265.8 ± 37	7	1138.8 ± 54	7	387.2 ± 29	8	330.1 ± 45	8	1277.5 ± 229	9	4337.4 ± 320
48 hrs	8	270.0 ± 51	8	359.0 ± 38	8	535.7 ± 111	7	455.8 ± 30	8	486.9 ± 42	8	707.3 ± 50
120 hrs	14	308.6 ± 13	16	517.4 ± 131	14	733.0 ± 165	14	369.4 ± 65	13	821.8 ± 94	8	520.0 ± 47

TABLEAU 14. Activité de la protéine kinase C (PKC) membranaire* dans les kératinocytes transformés par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-Balbc/MK).

**	n	Témoïn	n	Ca ²⁺ 1.8 mM	n	DMSO 1%	n	DMSO 4%	n	RA .3 µM	n	TPA 1 µM
30 min	14	283.9 ± 62	13	332.0 ± 52	14	265.2 ± 88	nd	nd	14	294.0 ± 71	12	400.0 ± 176
30 hrs	4	148.0 ± 17	8	196.1 ± 19	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
48 hrs****	4	308.5 ± 54	8	283.3 ± 33	4	358.3 ± 43	4	76.0 ± 7	4	284.0 ± 60	4	284.0 ± 60
120 hrs	8	177.5 ± 12	8	167.6 ± 31	8	157.6 ± 4	8	156.8 ± 15	8	426.2 ± 109	8	426.2 ± 109

* L'activité de la PKC est exprimée en p moles de substrat phosphorylé par 0.1 mg de protéines membranaires totales. Le TPA a été utilisé comme témoin positif exogène seulement pour 30 min, au delà, l'effet est complexe.

** La préparation des membranes a été décrite dans la section matériel et méthodes (section 13).

*** Les cellules ont été traitées aux concentrations indiquées de DMSO, Ca²⁺, RA et TPA. La durée du traitement est également indiquée. Les cellules ont été cultivées dans du milieu EMEM à faible teneur en Ca²⁺ (0.05 mM).

**** L'activité à 10 min a été mesurée chez les témoins seulement, afin de préciser exactement le délai dans la réponse précoce. Cela n'était pas nécessaire pour les cellules transfectées.

nd (non déterminé)

nd (non déterminé)

L'acide rétinoïque qui altère la différenciation des kératinocytes montre une activation précoce faible et moyenne soutenue (Tableau 13). Les HPV16-Balbc/MK sont insensibles à l'effecteur (Tableau 14).

En résumé, les résultats indiquent clairement i) que l'évolution de la PKC est principalement associée à la prolifération cellulaire dans le modèle myoblaste; ii) que les cellules transfectées réagissent peu aux modulateurs de la différenciation. Ce dernier résultat est particulièrement net dans le modèle kératinocyte. Ces résultats sont compatibles avec l'inhibition de la différenciation terminale dans les deux modèles cellulaires et confirment les résultats obtenus par immunofluorescence.

10. ÉTUDE DU CALCIUM PAR MICROSPECTROFLUOROMÉTRIE

Puisque la PKC conventionnelle est dépendante du calcium, et que le calcium est central dans les processus cellulaires étudiés nous, l'avons analysé *in situ*. Deux techniques ont été employées, l'une basée sur la microspectrofluorométrie, l'autre sur l'imagerie. Le calcium intracellulaire peut provenir de deux sources: i) de l'extérieur de la cellule par des canaux spécifiques ou non et ii) de l'intérieur de la cellule par libération à partir des compartiments où il est séquestré. Les variations du taux de calcium sont mesurées à l'aide du fura-2 ainsi que détaillé dans la section 13.

10.1 Mesure du niveau de calcium intracellulaire

Le taux de calcium intra-cellulaire a été déterminé dans les cellules normales à 68 nM. Il s'élève chez les transfectées à 92 nM (Tableau 15). Les cellules transfectées par le HPV16 incorporent le fura-2 de manière plus efficace que les cellules normales. Il n'y a donc pas d'artefact dû au virus. Cette observation est valable aussi bien pour les mesures de la concentration intracellulaire de calcium dans les cellules individuelles que dans les champs de cellules (Tableau 15). Le rapport des concentrations en calcium des cellules transformées par rapport aux cellules normales est de l'ordre de 1.35.

10.2 Origine du calcium intracellulaire

L'ionomycine est un ionophore qui ouvre des pores dans les membranes. Cette réponse est utilisée comme un témoin positif. La figure 46 indique que le taux de calcium augmente dans les deux types de cellules après traitement à l'ionomycine par influx de calcium exogène. Le calcium est ensuite chélaté spécifiquement par l'EGTA et décroît en conséquence. Ceci indique que les cellules utilisées répondent correctement au fura-2.

La première expérience vise à élucider la provenance des ions calcium lorsque ceux-ci augmentent dans les cellules. Pour cela on utilise la thapsigargine. La thapsigargine bloque les pompes calciques et décharge artificiellement les compartiments où le calcium est sequestré. La réponse du L6 et HPV16-L6 est

TABLEAU 15. Détermination de la concentration de calcium intracellulaire (Ca^{2+}): par microspectrofluorométrie.***

	Cellules L6 (nM \pm DS**)	n*	HPV16-L6 (nM \pm DS**)	n*
Cellules individuelles	68 \pm 8	10	92 \pm 14	9
Champ de cellules	44 \pm 10	7	49 \pm 22	8

* Nombre d'expériences effectuées.

** DS: déviation standard.

*** Détermination de la concentration du calcium intracellulaire par utilisation du fura-2 tel que décrit dans Matériel et Méthode (section 13).

différentielle. Seules les cellules L6 transfectées au HPV16 (HPV16-L6) répondent à la thapsigargine par une libération du calcium intracellulaire (Figure 46).

La caféine qui libère le calcium des sequestres sensibles à la ryanodine (typique des myocytes du squelette) n'a pratiquement pas d'effet ici, indiquant que les compartiments intracellulaires sont vides (Figure 51). Ce n'est pas surprenant puisque les cellules sont cultivées dans un milieu pauvre en calcium. La Figure 51 montre également que le U-73, 122 (une amide stéroïde bloquant la libération du calcium séquestré) ne bloque pas la réponse au Ca^{2+} des cellules exposées ce qui confirme que les séquestres ne sont pas impliqués dans les variations du calcium endogène dans nos conditions expérimentales.

Le DMSO est connu pour altérer la perméabilité membranaire de manière non spécifique et temporaire. L'exposition des L6 et HPV16-L6 au DMSO augmente la concentration endogène en calcium (Figure 44). Par ailleurs, les deux types de cellules répondent à un apport exogène élevé de calcium par un influx de calcium de l'espace extracellulaire vers le cytoplasme.

Nous avons utilisé le D600, un bloquant des canaux L, afin de vérifier si les agonistes empruntaient cette voie d'entrée du calcium. L'utilisation du D600 avant et après l'entrée du calcium provoque respectivement une annulation de l'influx et une chute de la concentration de calcium endogène. On n'observe pas d'effet de ce bloquant sur la régulation du calcium par le DMSO (Figure 44). Par contre, on observe un effet léger d'inhibition en présence de calcium exogène (Figure 45A).

FIGURE 43 Activité spécifique de la PKC membranaire en fonction du temps chez les cellules L6 normales et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (A) et relation entre l'activité spécifique protéine kinase C (PKC) et la croissance des cellules L6 HPV16-L6 (B).

La courbe ajustée de croissance obtenue par ordinateur n'est représentée ici que pour aider le lecteur à visualiser la relation entre l'activité spécifique de la PKC membranaire et la croissance moyenne des populations testées.

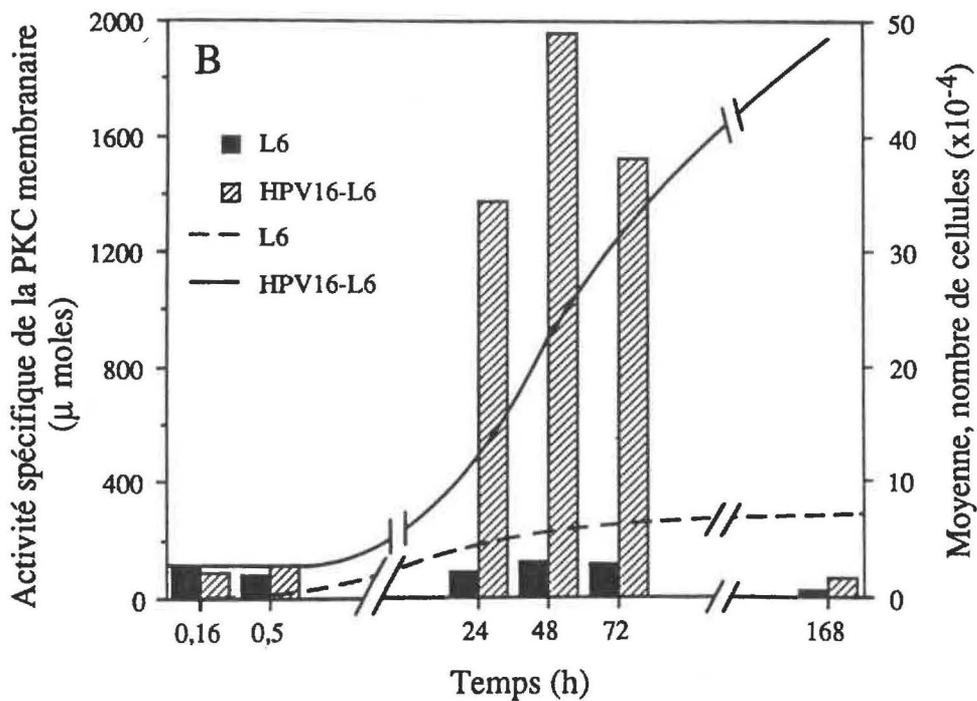
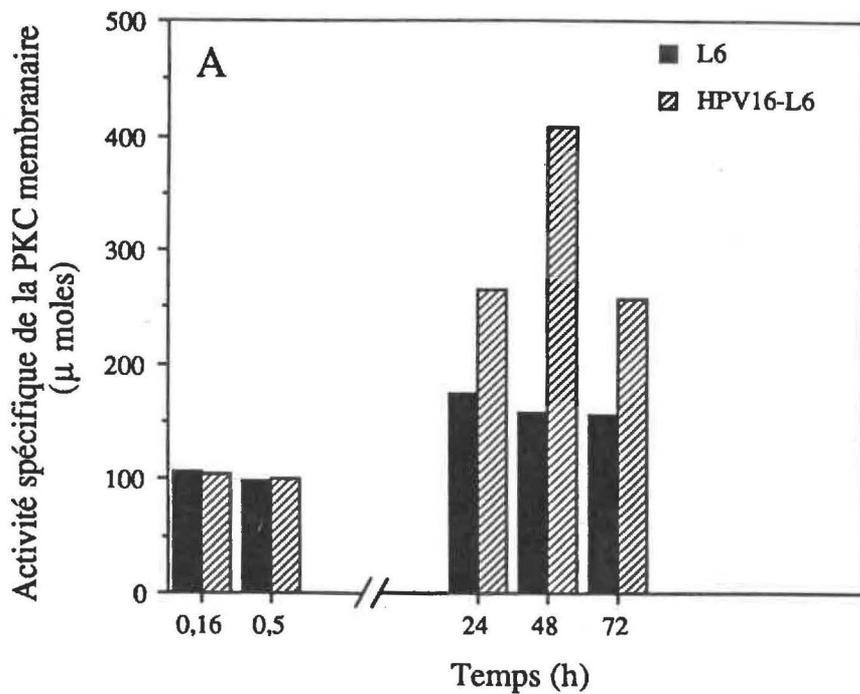


FIGURE 44 Analyse en microspectrofluorométrie de l'effet du DMSO et du bloquant D600 sur la réponse calcique intracellulaire dans les cellules L6 normales (L6) (A,B) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (C,D).

Le bloquant spécifique des canaux calciques (D600) est utilisé après la stimulation par l'agoniste DMSO 1% dans les cellules L6 (A) et HPV16-L6 (C). Le D600 est également utilisé avant la stimulation par l'agoniste DMSO 1% dans les cellules L6 (B) et HPV16-L6 (D) pour confirmer la nature des canaux impliqués dans la réponse à l'agoniste.

Les flèches représentent le temps auquel l'agoniste est ajouté.

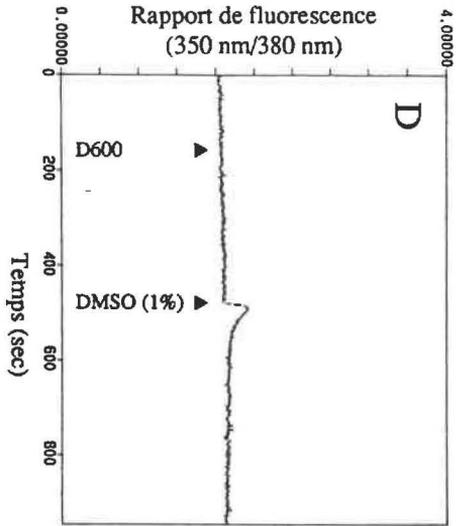
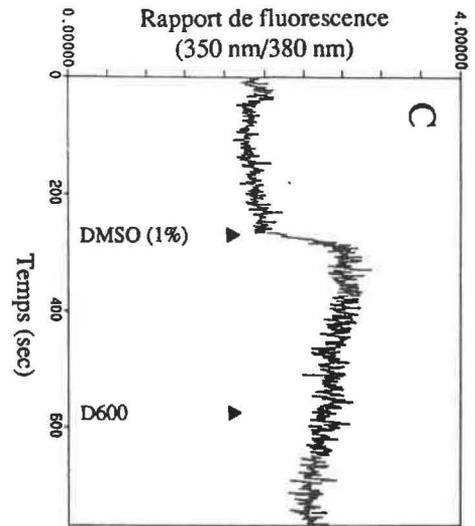
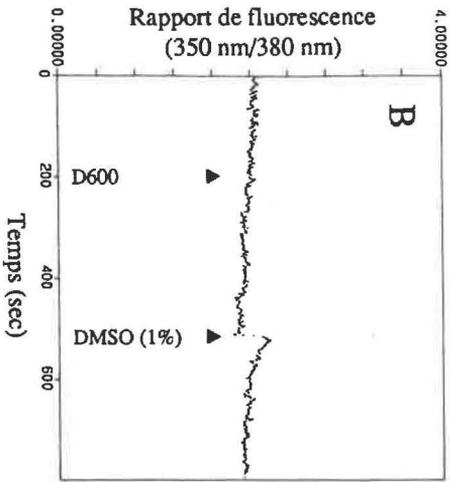
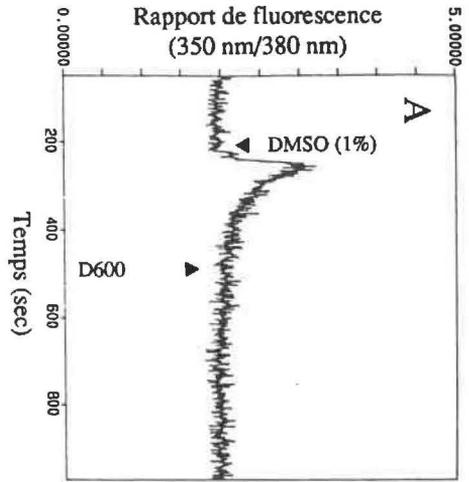


FIGURE 45 Analyse en microspectrofluorométrie de l'effet du calcium extracellulaire Ca^{2+} 1.8 mM et du bloquant D600 sur la réponse calcique intracellulaire dans les cellules L6 normales (A,B) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (C,D).

Le bloquant spécifique des canaux calcique (D600) est utilisé après la stimulation par l'agoniste Ca^{2+} 1.8 mM dans les cellules L6 (A) et HPV16-L6 (C). Le D600 est également utilisé avant la stimulation par l'agoniste Ca^{2+} 1.8 mM dans les cellules L6 (B) et HPV16-L6 (D) pour confirmer la nature des canaux calciques impliqués dans la réponse à l'agoniste.

Les flèches représentent le temps auquel l'agoniste est ajouté.

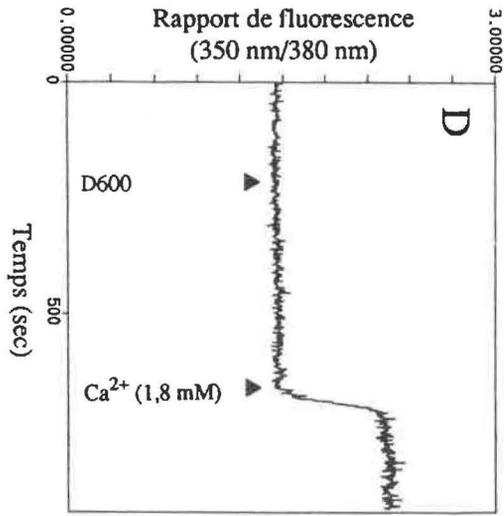
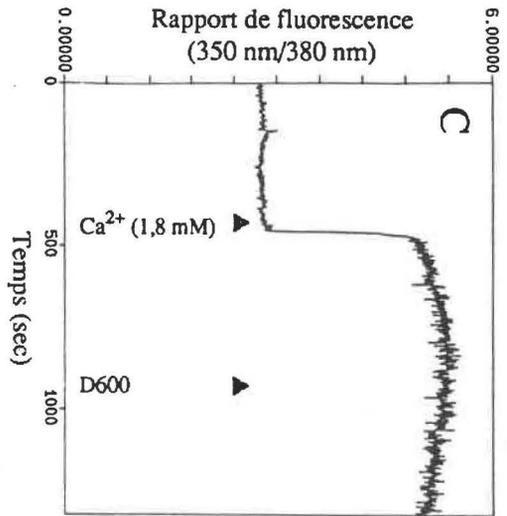
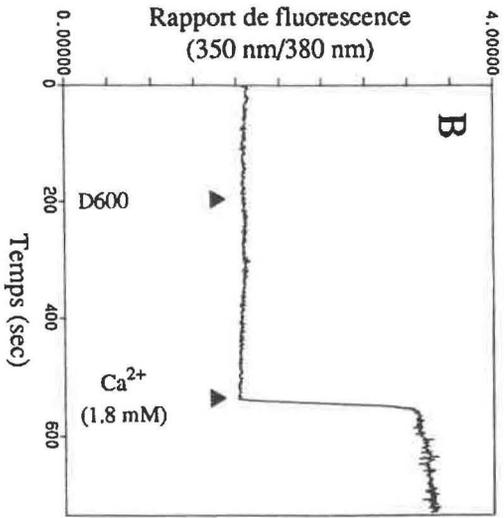
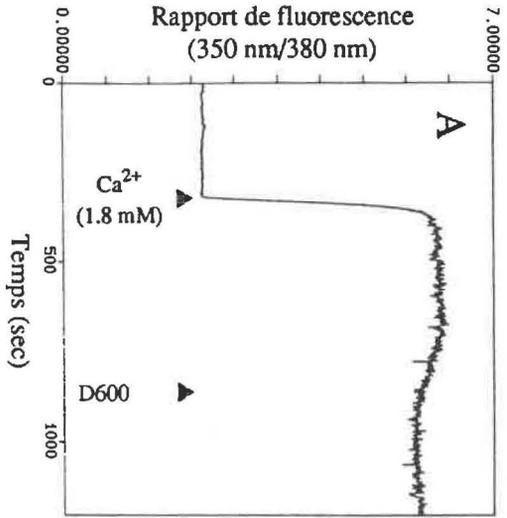
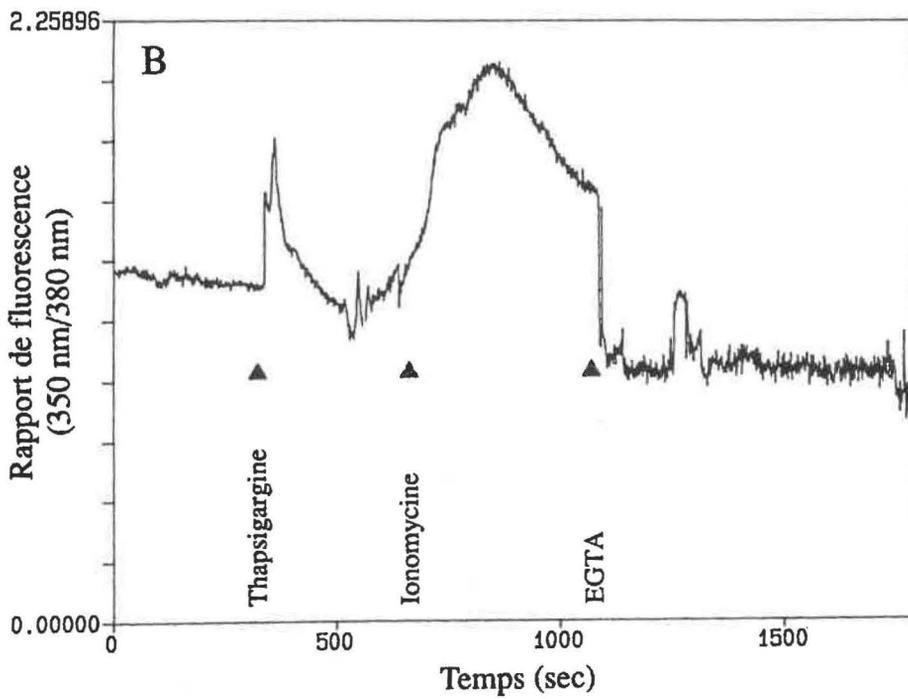
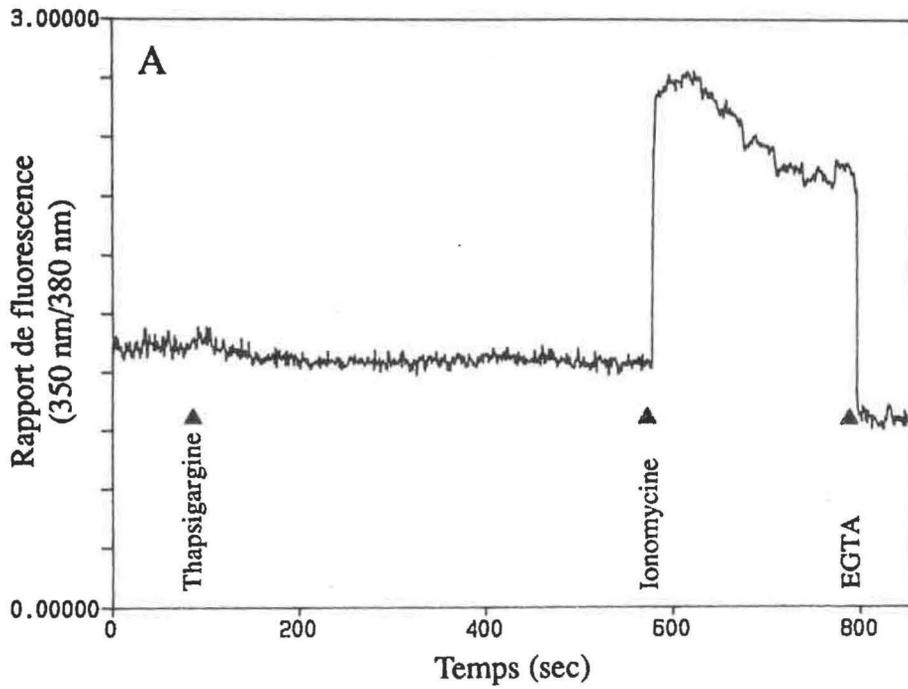


FIGURE 46 Analyse en microspectrofluorométrie des effets de la thapsigargine, de l'ionomycine et de l'EGTA sur la réponse calcique intracellulaire dans les cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B). Les flèches représente le temps auquel l'agoniste est ajouté.



Le TMB8: 8-N-N-diethylaminoethyl-3,4,5-trimethoxybenzoate a un effet inhibiteur sur l'influx de calcium, et sur sa libération des compartiments où il est séquestré. Dans nos travaux le TMB8 diminue partiellement l'influx de calcium ce qui est confirmé par son effet inhibiteur quand les cellules sont exposés au TMB8 avant l'exposition au calcium (Figure 47).

Le Cobalt (Co^{2+}) est reconnu comme un bloquant des canaux cationiques non spécifiques et inhibe complètement l'entrée de calcium. La Figure 48 montre que les cellules L6 et les cellules HPV16-L6 sont également sensibles à cette inhibition. L'apport de calcium est donc exogène dans nos conditions d'expérience.

10.3 Effet des modulateurs de la différenciation cellulaire sur la réponse calcique

La dépolarisation de la membrane par l'apport d'une dose exogène élevée de potassium permet l'entrée de l'ion calcium. Ce résultat est observé chez les L6 et les HPV16-L6 (Figure 49). Le D600 n'a que peu d'effet sur cette réponse, par contre, l'exposition à une dose élevée de calcium stimule fortement l'entrée du cation (Figure 49). Cet influx est complètement bloqué par le cobalt. La Figure 49 démontre donc que dans les deux types de cellules, il existe des canaux cationiques non spécifiques sensibles au voltage. La faible réponse au D600 indique la présence de quelques canaux de type L.

Les canaux spécifiques du calcium n'apparaissent qu'au moment précédant la fusion des myocytes. Ces canaux sont liés au récepteur de l'acétylcholine. Nous

FIGURE 47 Analyse en microspectrofluorométrie de l'inhibition de la réponse calcique intracellulaire à l'aide du bloquant du flux de calcium et de la libération du calcium intracellulaire: le TMB-8.

cellules L6 normales (A,B).
cellules L6 transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (C,D).

Le TMB-8 est utilisé après la stimulation par l'agoniste Ca^{2+} 1.8 mM dans les cellules L6 (A) et HPV16-L6 (C). Le TMB-8 est également utilisé avant la stimulation par l'agoniste Ca^{2+} 1.8 mM dans les cellules L6 (B) et HPV16-L6 (D).

Les flèches représentent le temps auquel l'agoniste est ajouté.

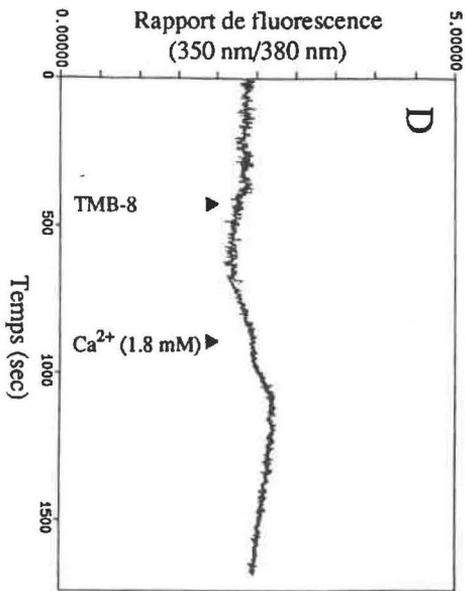
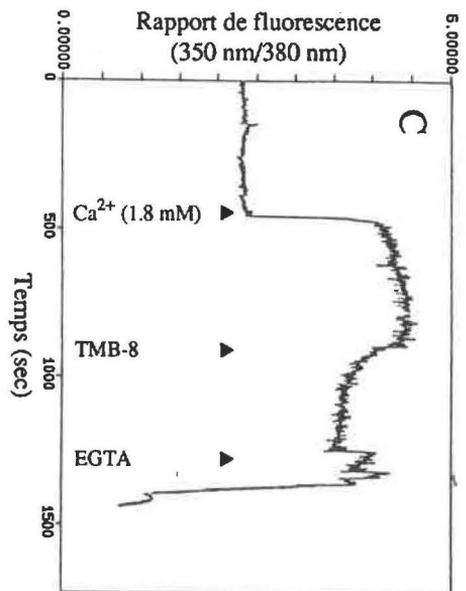
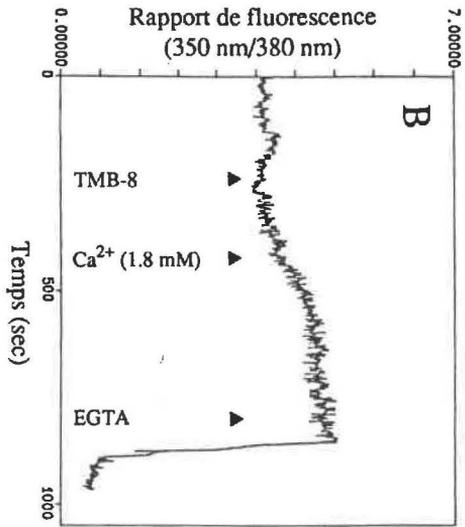
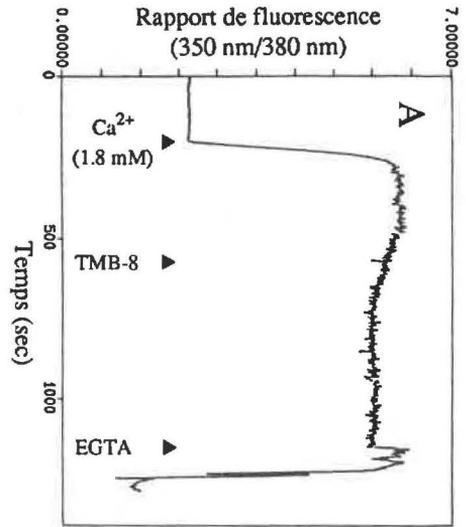


FIGURE 48 Analyse en microspectrofluorométrie de l'inhibition de la réponse calcique intracellulaire à l'aide du bloquant du flux du calcium: le cobalt (Co^{2+}).

cellules L6 normales (A,B).
cellules L6 transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (C,D).

Le Co^{2+} est utilisé avant la stimulation par l'agoniste Ca^{2+} 1.8 mM dans les cellules L6 (A) et HPV16-L6 (C). Le Co^{2+} est également utilisé après la stimulation par l'agoniste Ca^{2+} 1.8 mM dans les cellules L6 (B) et HPV16-L6 (D) pour confirmer la nature des canaux calciques impliqués dans la réponse à l'agoniste.

Les flèches représentent le temps auquel l'agoniste est ajouté.

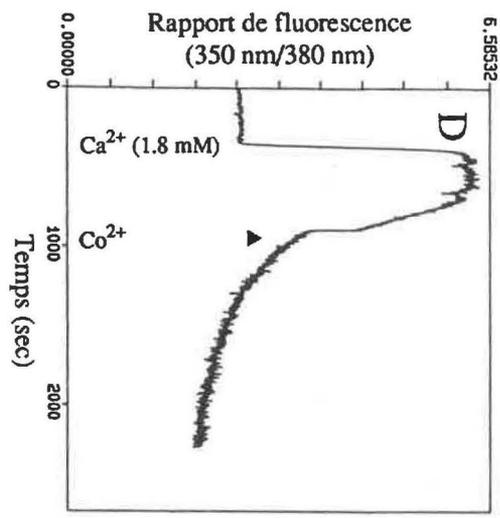
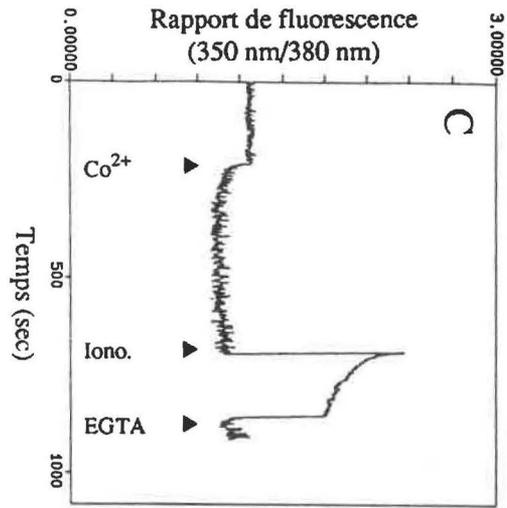
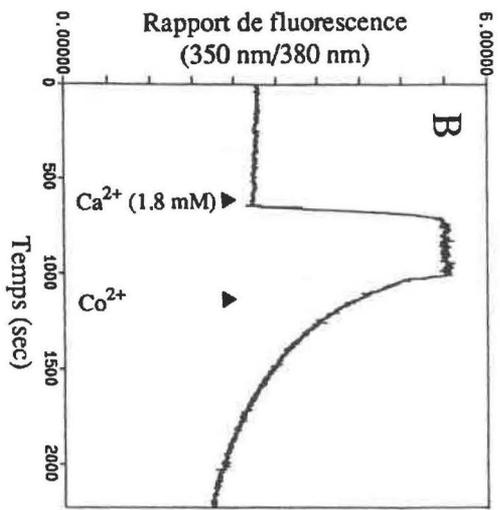
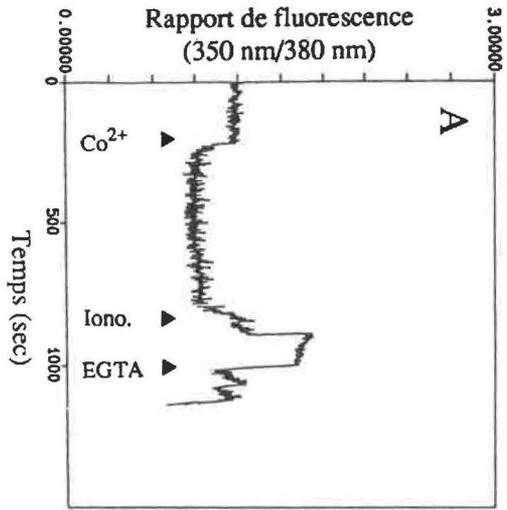
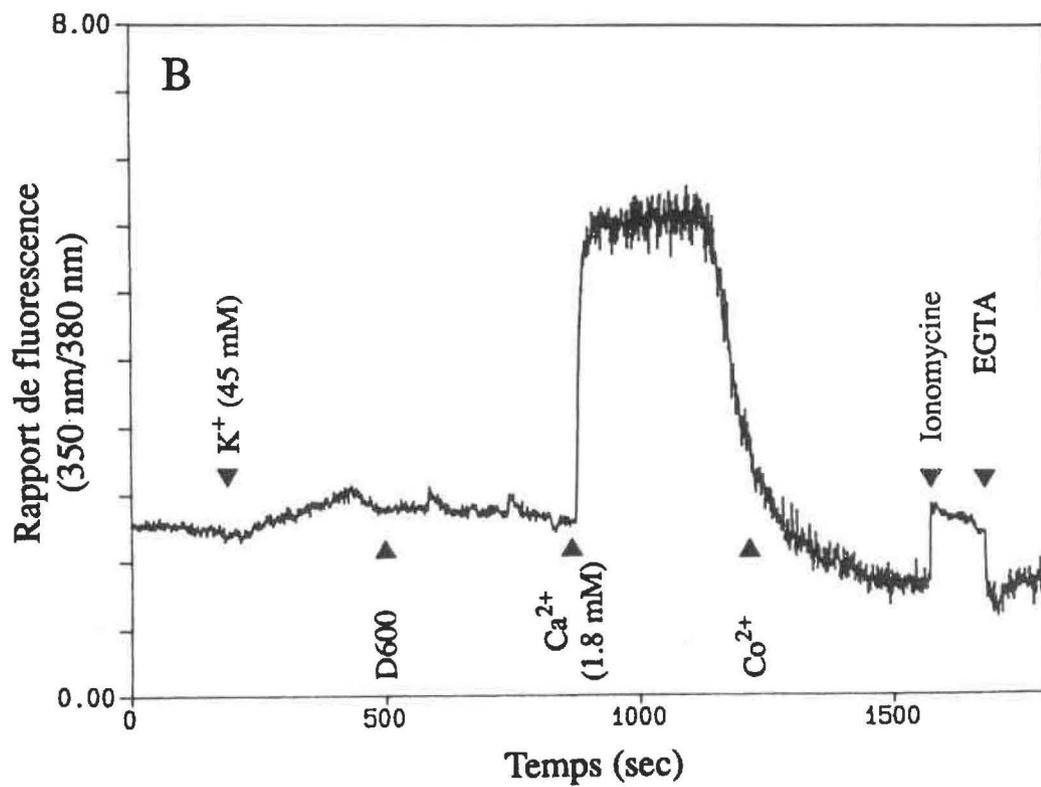
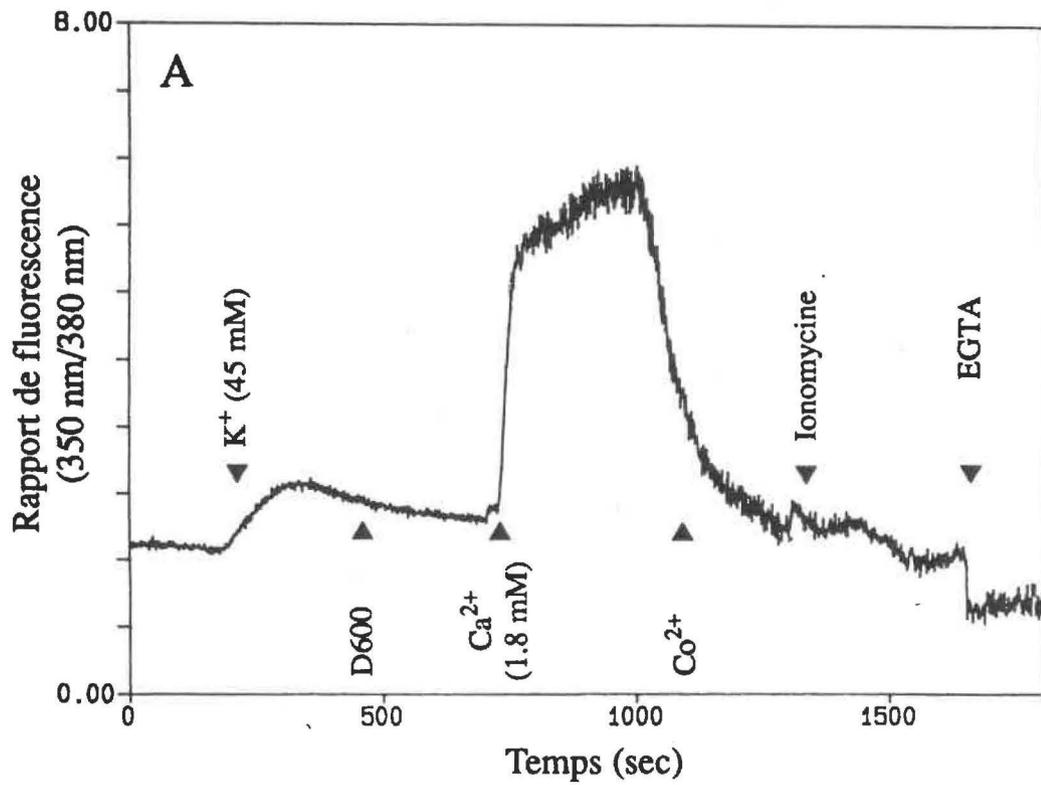


FIGURE 49 Analyse en microspectrofluorométrie de la dépolarisation par le KCl des cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B).
Le D600 et le Co^{2+} sont des bloquants des canaux calciques.
Les flèches représentent le temps auquel l'agoniste est ajouté.



avons vérifié (résultats non illustrés) que ces canaux ne sont pas présents dans les jeunes cellules. Par contre, l'entrée du calcium en réponse à l'exposition à l'acétylcholine est très nette chez les cellules L6 âgées de 7 à 9 jours (Figure 50). Les récepteurs d'acétylcholine sont connus pour être exprimés seulement au stade de pré-fusion des myoblastes. La réponse est bloquée par le cobalt. Leurs homologues transfectés ne répondent pas à l'agoniste bien qu'ils montrent une réponse positive au calcium. Ceci confirme bien que les cellules transfectées sont bloquées au stade pré-fusion par le virus HPV16 (Figure 50).

On observe aussi un influx de calcium en réponse à l'exposition au DMSO. La réponse est faible pour les deux types de cellules en comparaison de la réponse au calcium. De plus la réponse au calcium est en général soutenue chez les cellules transfectées et plus transitoire chez les cellules normales. C'est l'inverse pour la réponse au DMSO (Figure 44).

11. ANALYSE EN IMAGERIE

11.1 Mesure du niveau de calcium intracellulaire

Le niveau de calcium intracellulaire dans les cellules transformées par le HPV16 semble être relativement plus élevé que dans les cellules normales (Figure 52). Le niveau de calcium diminue également avec l'âge de la culture cellulaire (Figure 52), ce qui confirme les résultats acquis avec la technique précédente.

FIGURE 50 Mise en évidence des récepteurs muscariniques par microspectrofluorométrie: expression différentielle des récepteurs d'acétylcholine dans les cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B). Ach (acétylcholine), cobalt (Co^{2+}), calcium (Ca^{2+}). Cch (corbachol). Les flèches représentent le temps auquel l'agoniste est ajouté.

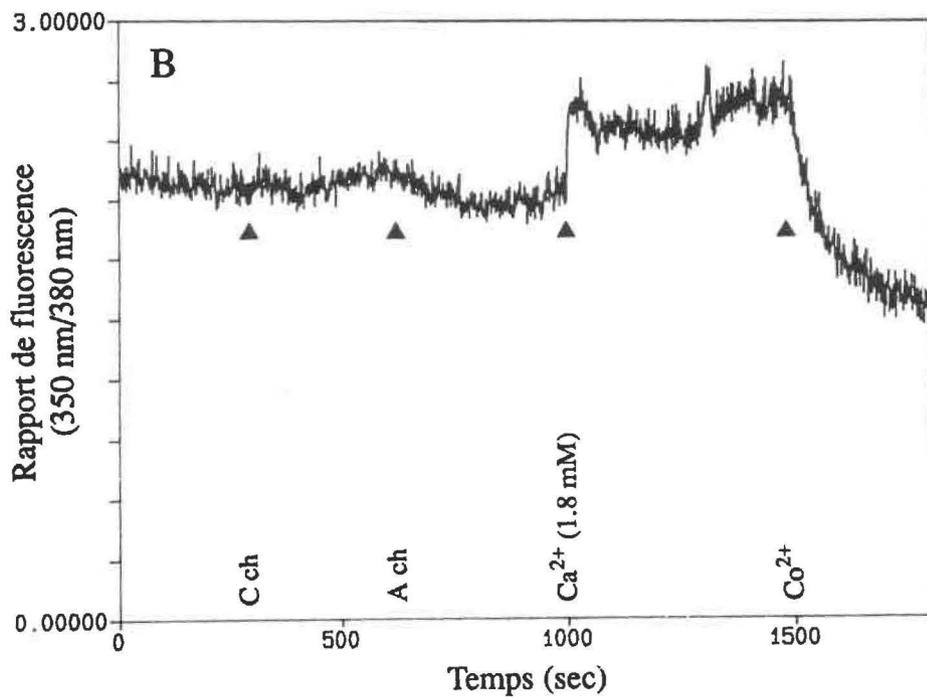
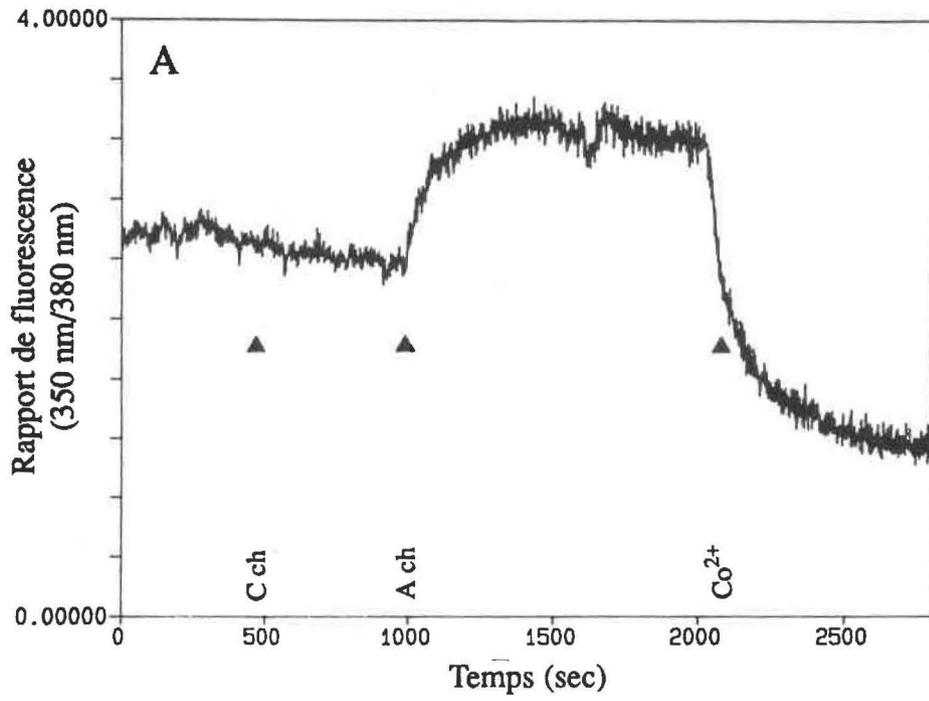


FIGURE 51 Analyse en microspectrofluorométrie des effets de la caféine et de son bloquant l'U-73, 122 sur la réponse du calcium intracellulaire cellules L6 normales (A,C). cellules L6 transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B,D). Effet de la caféine sur la libération du calcium des compartiments intracellulaires après stimulation par l'agoniste DMSO 1% chez les cellules L6 (A) et HPV16-L6 (B). Action du bloquant U73, 122 sur la caféine dans les cellules L6 (C) et HPV16-L6 (D). Les flèches représentent le temps auquel l'agoniste est ajouté.

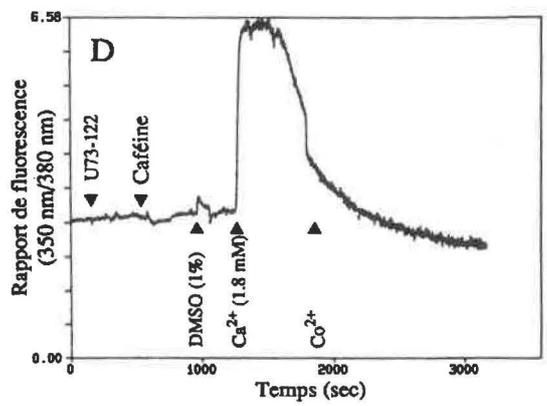
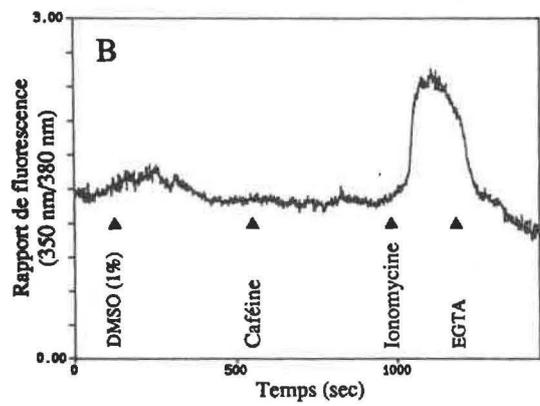
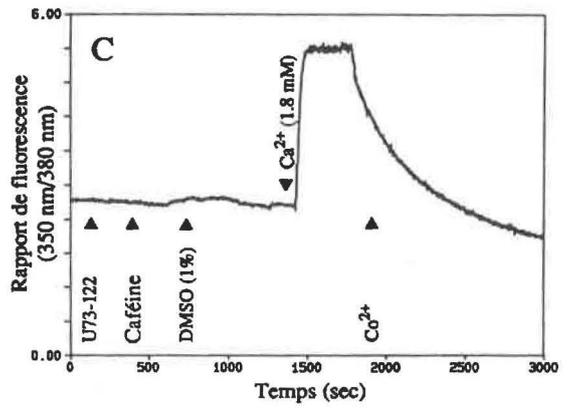
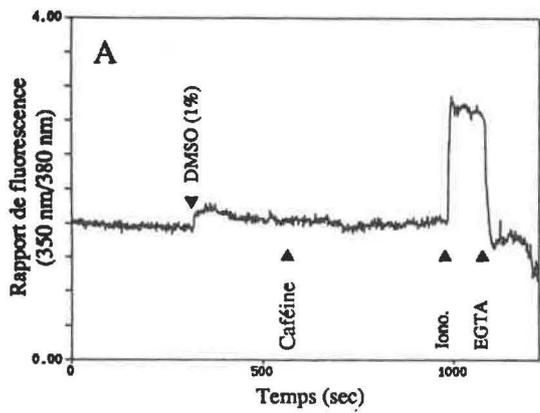
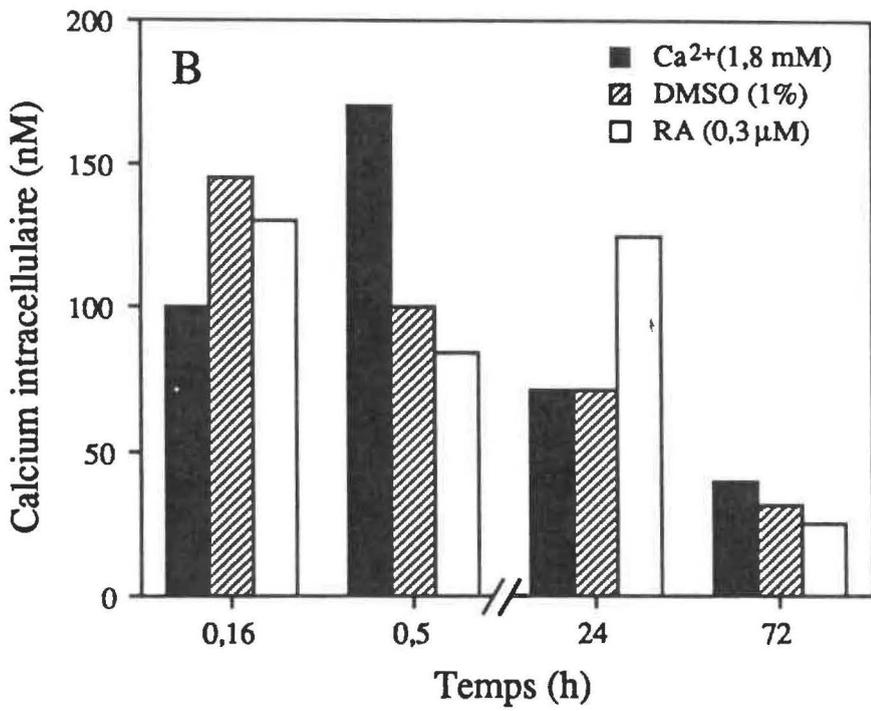
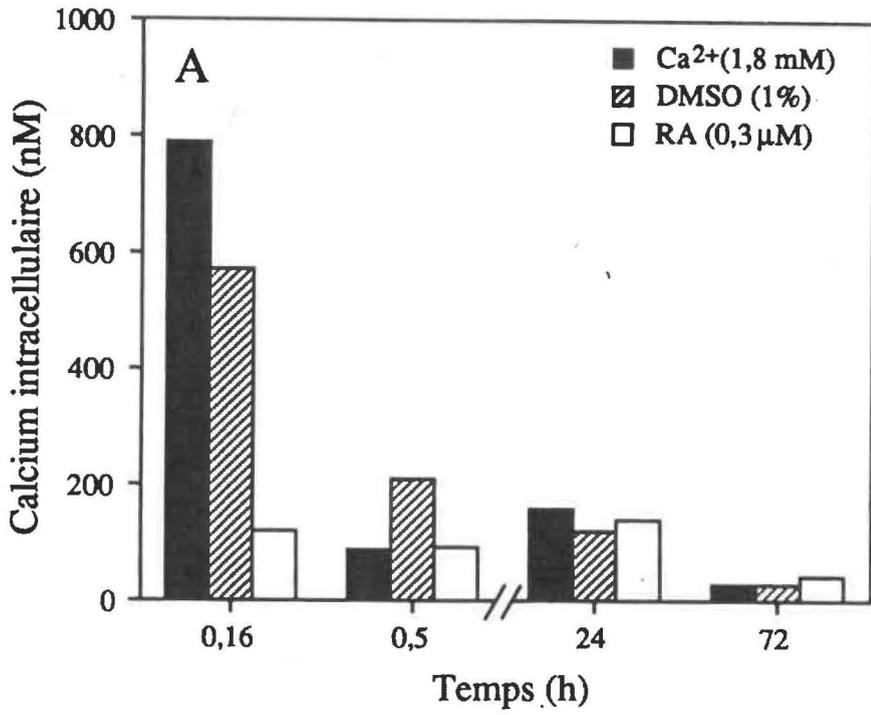


FIGURE 52 Evaluation en imagerie et effets des modulateurs de la différenciation cellulaire sur la concentration du Ca^{2+} intracellulaire en fonction du temps dans les cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B). Calcium (Ca^{2+}), diméthylsulfoxyde (DMSO), acide rétinoïque (RA).



11.2 Origine du calcium intracellulaire

Un flux de calcium de l'extérieur vers le milieu intracellulaire est observé en réponse aux différents effecteurs (Figure 52) dans les deux modèles cellulaires (Figure 52). La thapsigargine qui stimule la libération du calcium des compartiments intracellulaires ne semble avoir d'effet ni dans les cellules L6 normales ni dans les cellules transformées par HPV16 (Figure 53). Dans les cellules kératinocytes, par contre, la thapsigargine a provoqué la libération du calcium des compartiments intra-cellulaires (Figure 53B). L'ensemble de ces résultats constitue une bonne indication que dans les myoblastes le calcium cellulaire provient du milieu extracellulaire dans nos conditions d'expérience. Le milieu EMEM pauvre en calcium ne permet pas la séquestration du calcium.

11.3 Effet des modulateurs de la différenciation cellulaire sur la réponse calcique

La réponse calcique après exposition à un effecteur de différenciation a montré une double dépendance. La nature de la réponse dépend du modulateur et des cellules normales ou transformées par le HPV16.

a) **Calcium**: Environ 75% des cellules répondent (Figure 54). Une réponse de type transitoire a été observée avec les cellules L6 (Figure 55) alors qu'elle est soutenue dans le cas des cellules transformées par le HPV16 (Figure 55) où 100% des cellules répondent à la stimulation. Cette réponse décroît avec le temps. On observe un minimum après 40 min. dans les cellules L6, mais le taux de calcium

FIGURE 53 Analyse en imagerie de l'effet modulateur de la thapsigargine sur la réponse calcique des cellules L6 normales (A) et kératinocytes normaux (Balbc/MK) (B).
L'effet de la thapsigargine est très net en B où la cellule décharge le calcium des compartiments où il est sequestré. Cet effet n'est pas observé en A.

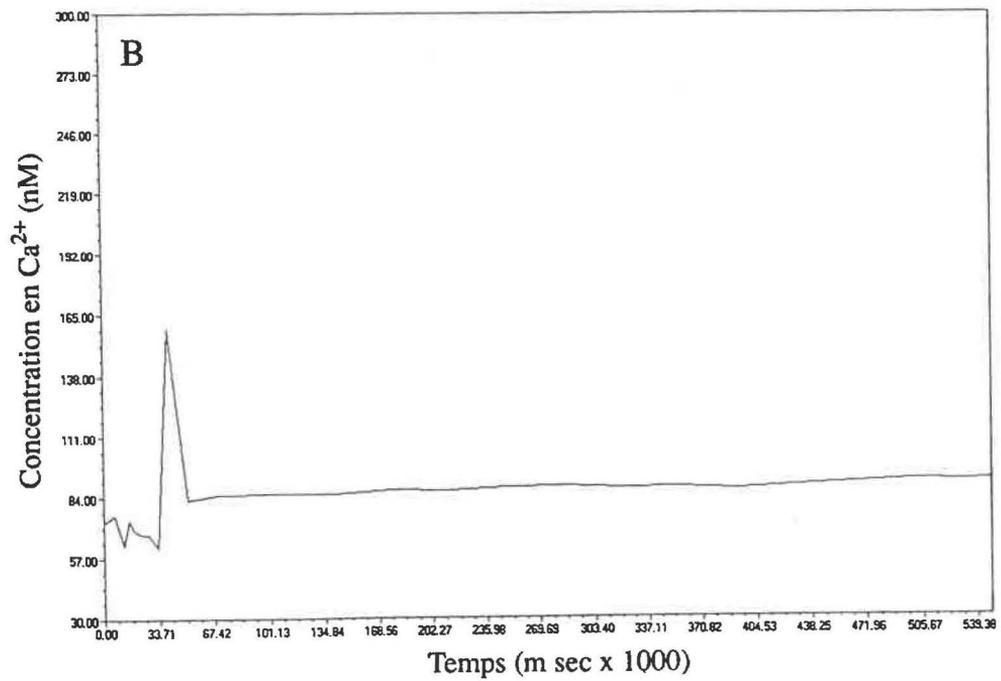
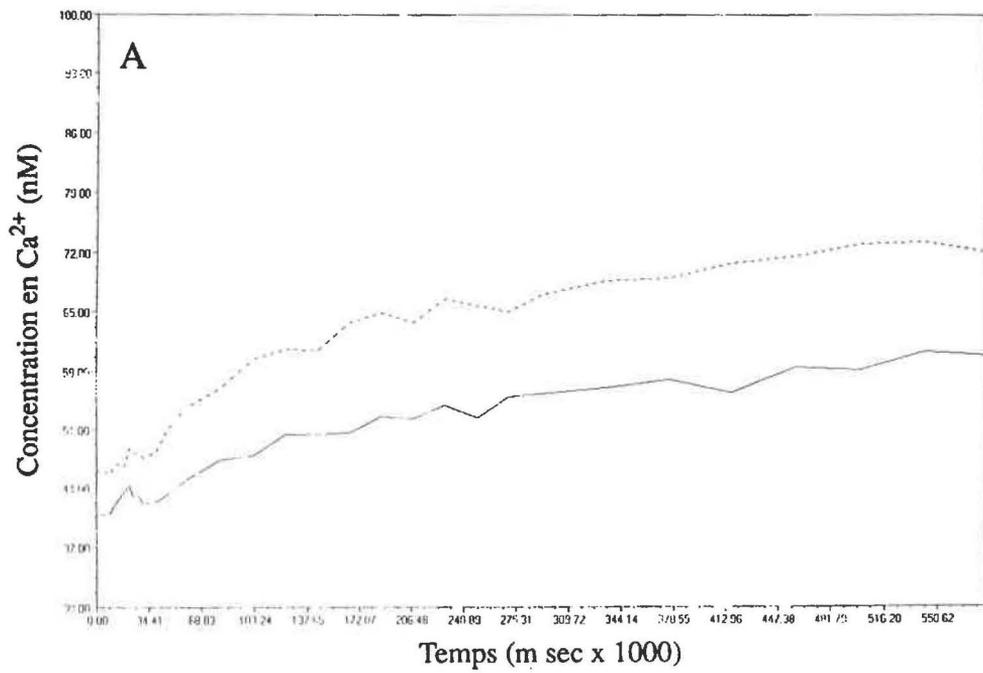


FIGURE 54 Images séquentielles en imageries des rapports de concentration du calcium intracellulaire des cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B), stimulées par le calcium extracellulaire 1.8 mM.

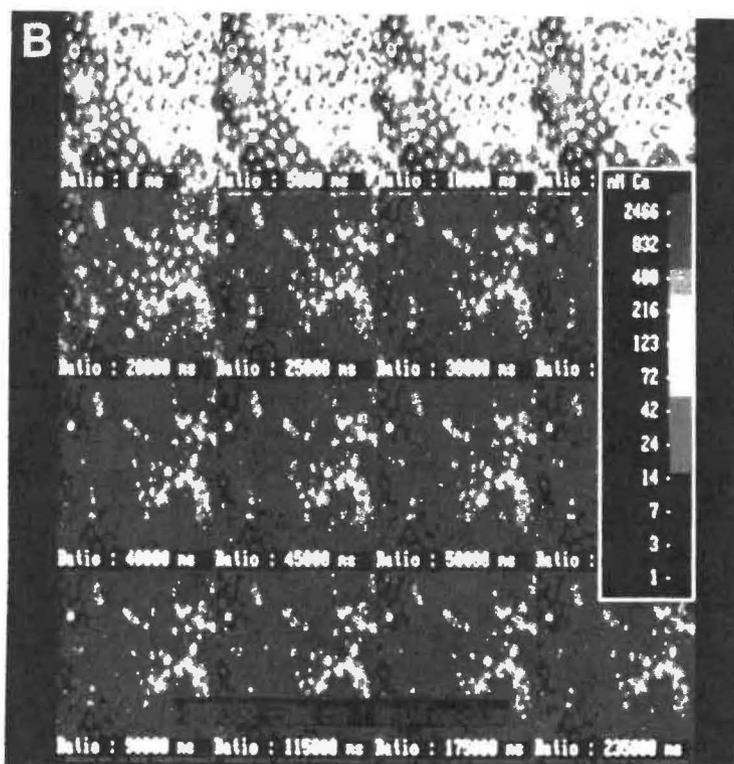
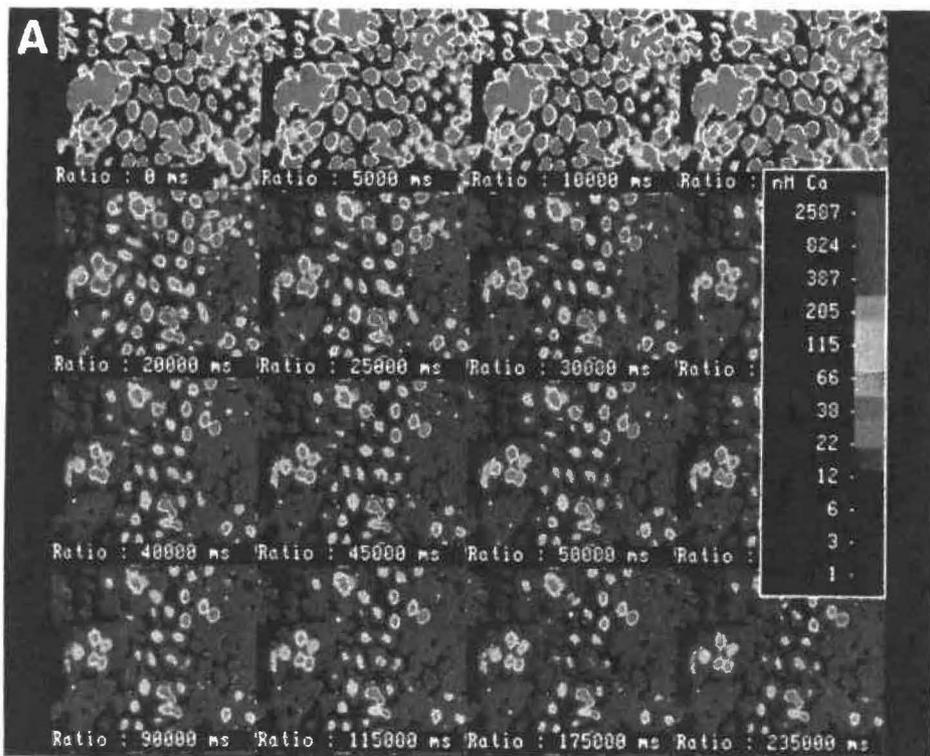
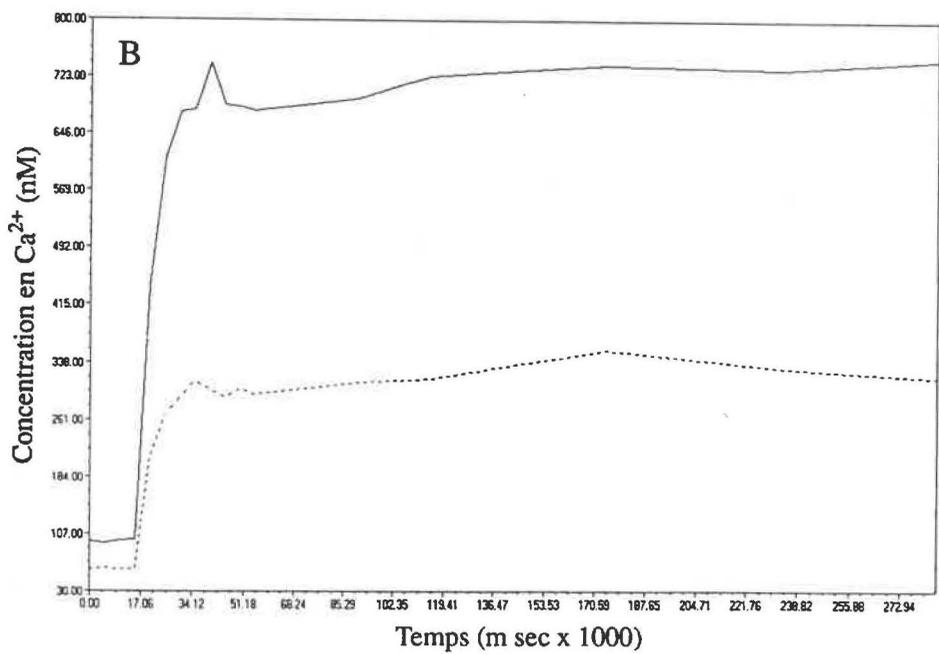
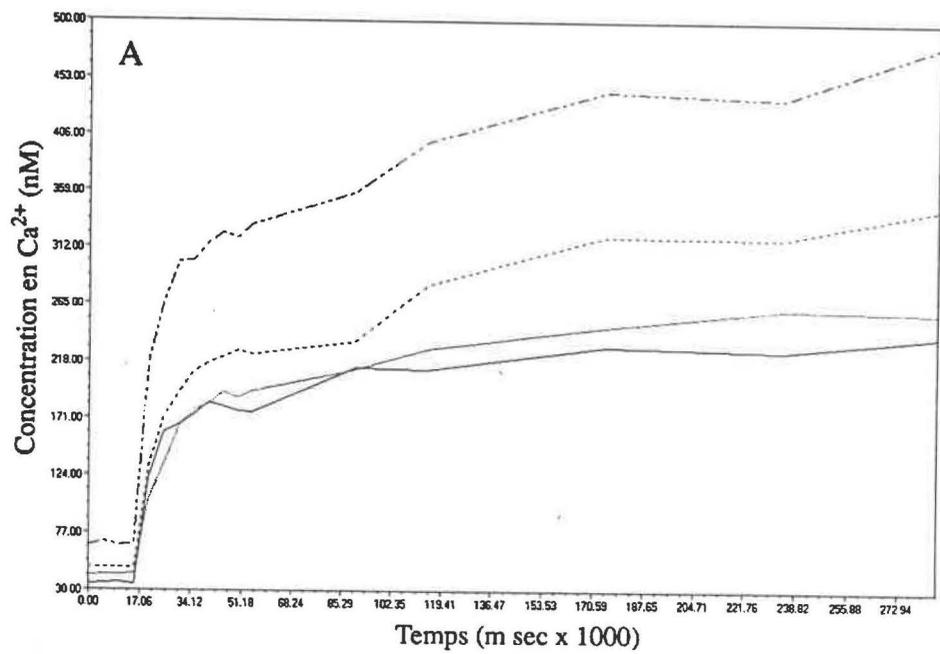


FIGURE 55 Analyse en imagerie de l'effet modulateur du calcium extracellulaire sur la réponse calcique intracellulaire des cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B).
Chaque courbe représente la réponse d'une cellule individuelle à l'augmentation de concentration en Ca^{2+} exogène. On notera l'augmentation du taux de calcium intracellulaire résultant d'un influx de calcium exogène. La réponse est de type soutenu.



intracellulaire libre remonte jusqu'à 24 h d'exposition pour diminuer ensuite. Par contre, on n'observe pas ce minimum chez les cellules transformées (Figure 52). L'influx de calcium dans les cellules exposées est très élevé. La réponse montre une évolution similaire dans les groupes de cellules testées. On note de faibles variations synchrones au cours du temps chez les contrôles. Ces mêmes variations sont désynchronisées jusqu'à 24 h chez les cellules abritant le virus.

b) **DMSO 1%**: L'amplitude de la réponse au DMSO n'est pas comparable à celle provoquée par le calcium, mais les cellules répondent à 100% (Figure 56). Une réponse synchronisée est observée pour les cellules L6 (Figure 58) alors qu'une réponse désynchronisée des cellules est obtenue pour les cellules transformée par le HPV16 (Figure 57). L'asynchronisation dans la réponse au stimulus des cellules transformées est très importante. On ne peut l'observer qu'avec la technique d'imagerie car la méthode microspectrométrique analyse la moyenne de la réponse. A l'inverse des cellules normales, l'effet du DMSO est transitoire et produit des vagues successives dans les cellules infectées. Le délai de réponse peut aller de 15 à 240 sec (Figure 58). L'augmentation du calcium est progressive chez les cellules normales pendant 30 à 40 min. et diminue ensuite rapidement. Dans les cellules transfectées on note un pic de calcium intracellulaire après 30 min d'exposition (Figure 52B). Ce pic pourrait correspondre à une ouverture maximale des canaux calciques non spécifiques. Le D600 (bloquant des canaux calciques de type L) ne semble pas avoir d'effet important sur le taux de calcium avant (Figure 45) ou après (Figure 45) la stimulation au calcium. L'effet du D600 a été également étudié avant (Figure 44) ou après (Figure 44) traitement par le 1%

FIGURE 56 Images séquentielles en imageries des rapports de concentration du calcium intracellulaire des cellules L6 normales (L6) (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B), stimulées par le DMSO 1%.

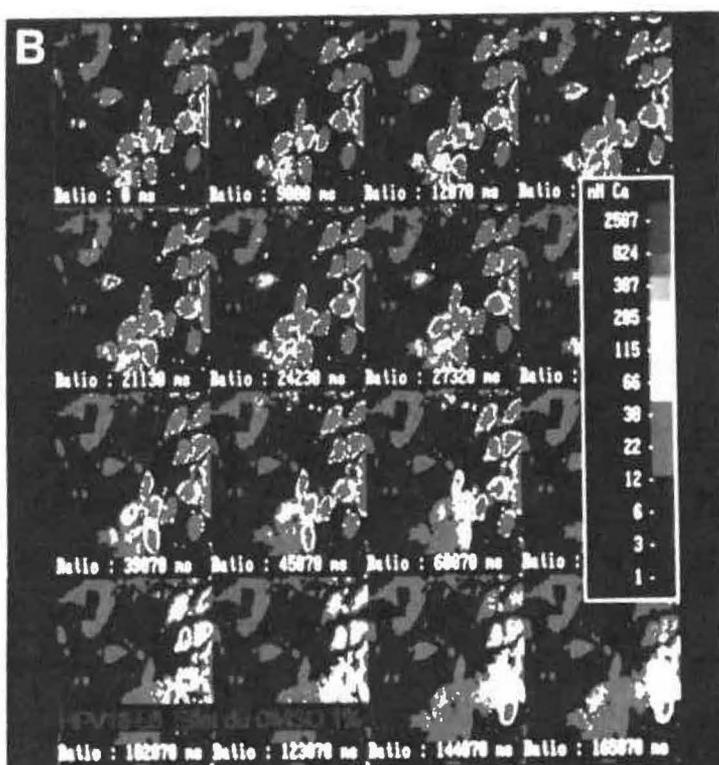
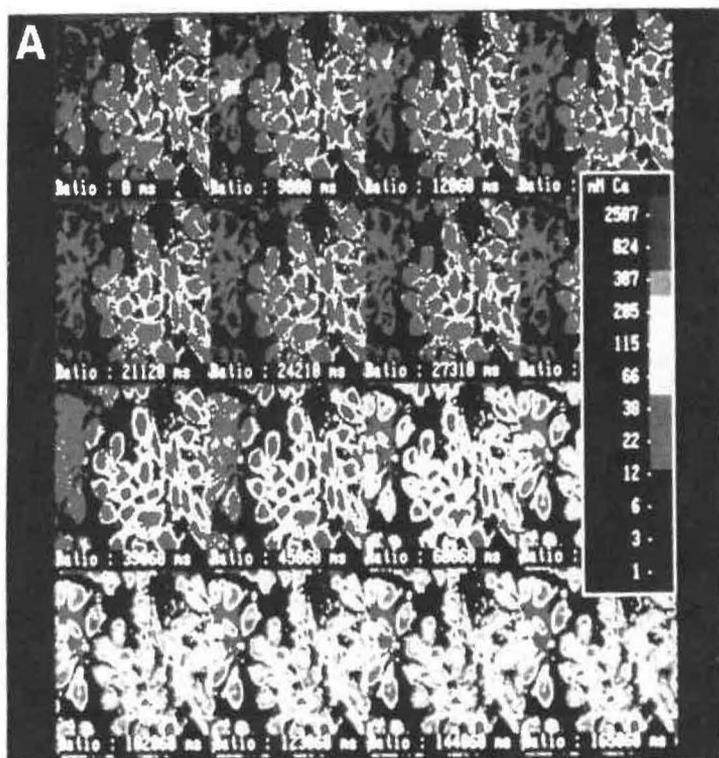


FIGURE 57 Analyse en imagerie de l'effet modulateur du DMSO extracellulaire sur la réponse calcique intracellulaire des cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B).

Chaque courbe représente la réponse d'une cellule individuelle à l'exposition au DMSO. On notera que la réponse calcique (influx de calcium dans la cellule) est de type soutenu et synchrone pour les cellules L6 normales (A) et de type transitoire et asynchrone pour les cellules transfectées HPV16-L6 (B).

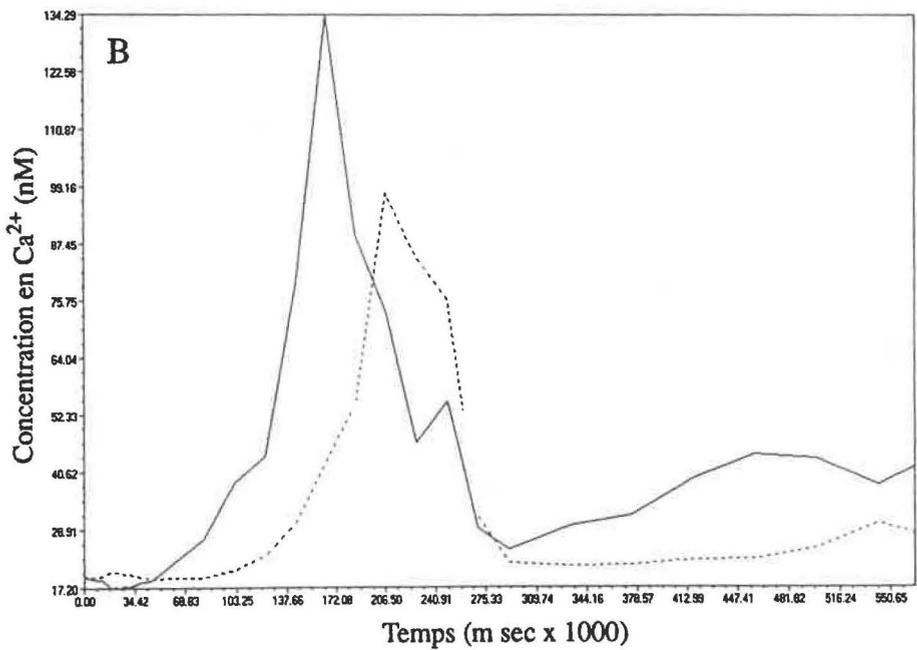
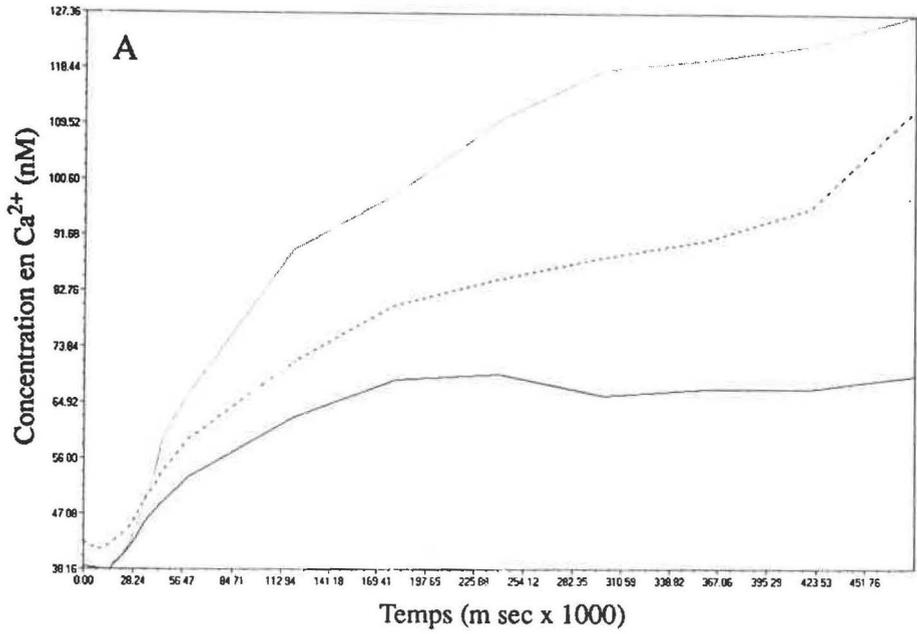


FIGURE 58 Analyse en imagerie de l'altération des communications intercellulaires dans les cellules L6 normales (L6) (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B). Chacune des lignes représente une cellule individuelle suivie et analysée en fonction du temps et de l'agoniste utilisé. Ici c'est le DMSO 1% qui a été utilisé comme agoniste. On note une synchronisation de la réponse à l'agoniste dans le cas des cellules L6 (A) alors qu'une absence de synchronisation de la réponse à l'agoniste est observée dans les HPV16-L6 (B).

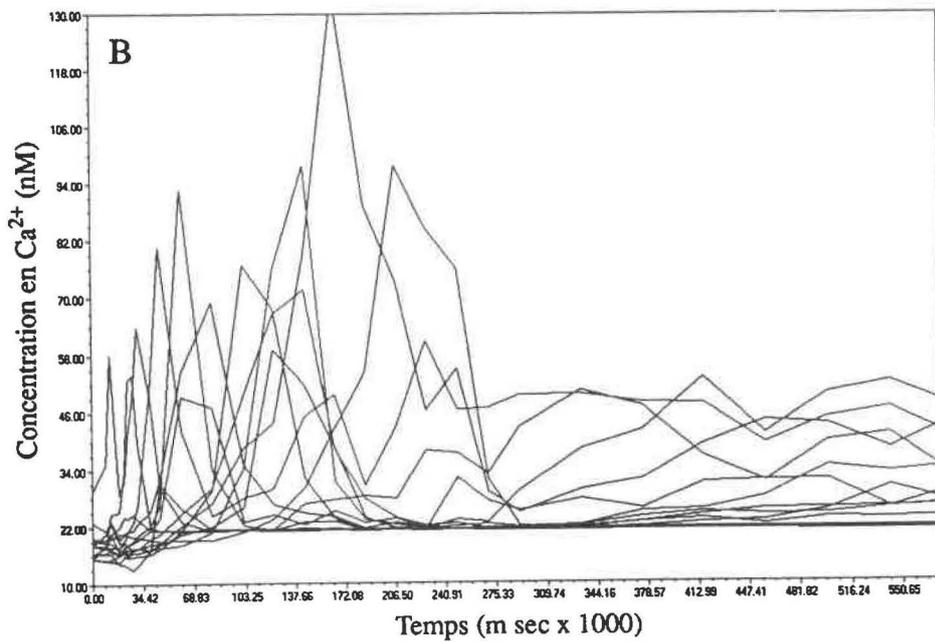
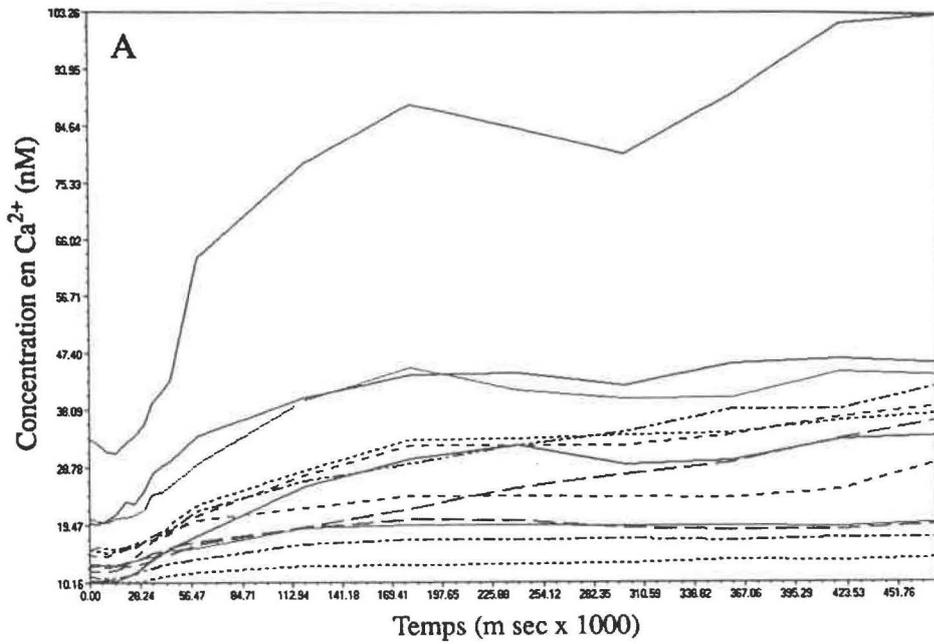


FIGURE 59 Analyse en imagerie de l'effet modulateur de l'acide rétinoïque extracellulaire sur la réponse calcique intracellulaire des cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B).
Les cellules normales ne répondent pas par un influx de calcium à l'exposition à l'acide rétinoïque (A). Par contre on obtient, après un temps de latence, une réponse transitoire progressive chez les cellules transfectées HPV16-L6 (B).

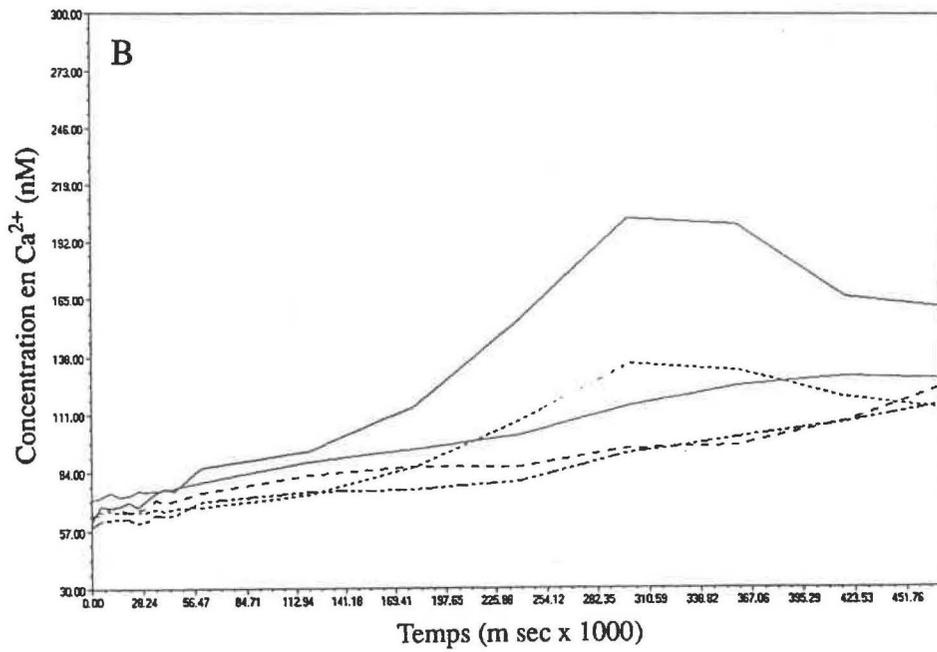
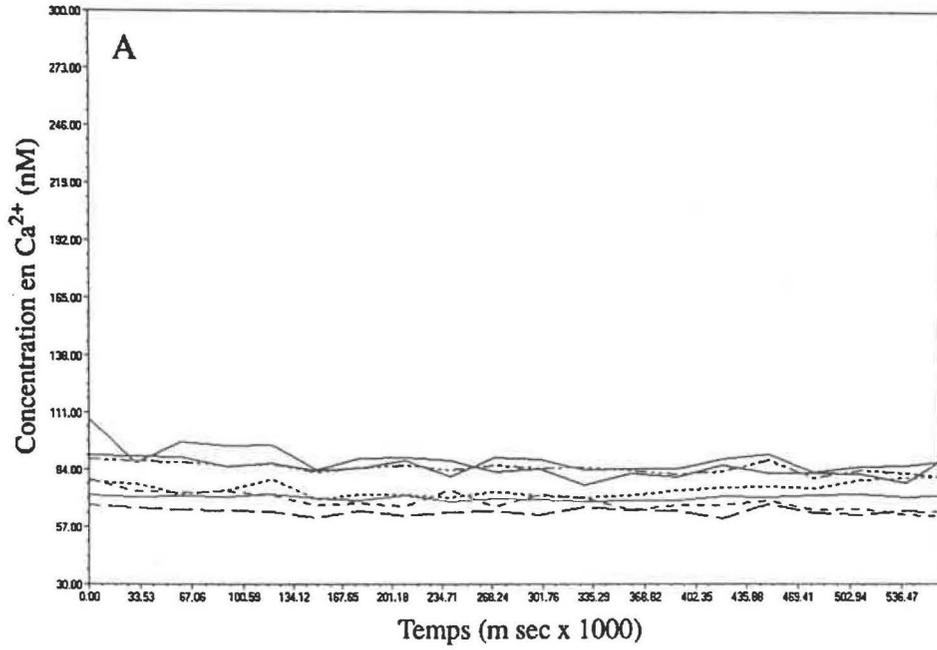
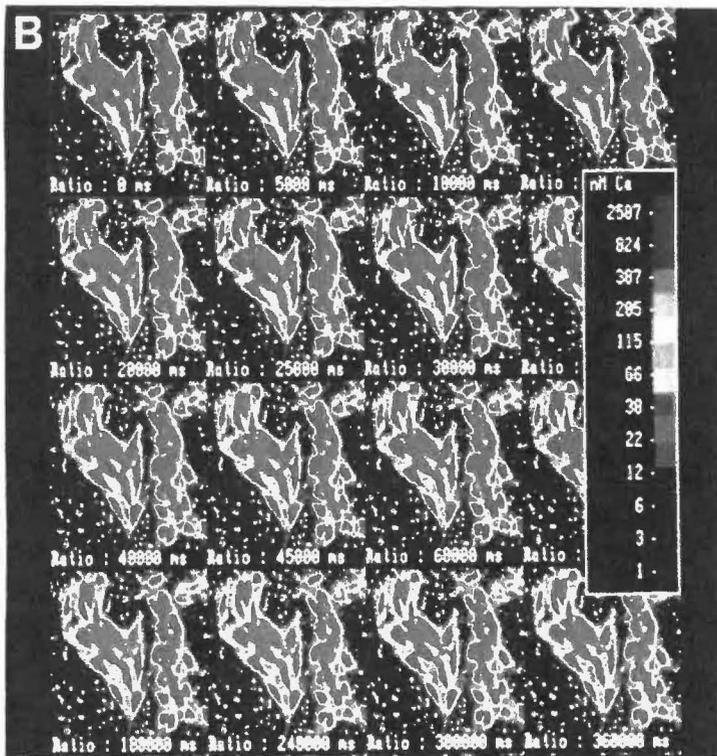
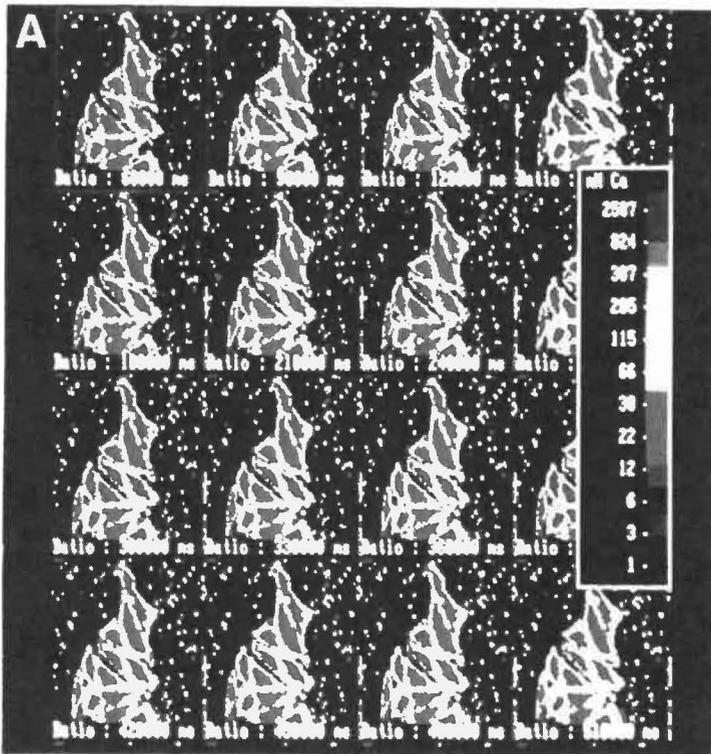


FIGURE 60 Images séquentielles en imagerie des rapports de concentration du calcium intracellulaire des cellules, L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6) (B), stimulées par l'acide rétinoïque 3 μ M.



DMSO. Il suscite une faible réponse soutenue dans les deux types de cellules, la réponse décroît avec le temps. On notera encore une fois l'absence de synchronie dans la réaction des cellules transformées (Figure 58). C'est particulièrement net après 40 min.

Il ressort de nos résultats que l'exposition aux différents modulateurs provoque un influx de calcium dans les cellules. Cet influx se poursuit suivant des patrons différents jusqu'à 24 hrs. Après 24 hrs, l'effet diminue puis s'annule. Dans un milieu riche en calcium comme le DMEM, les cellules sont saturées et nous n'avons obtenu aucune variation de l'influx de calcium exogène en présence des effecteurs.

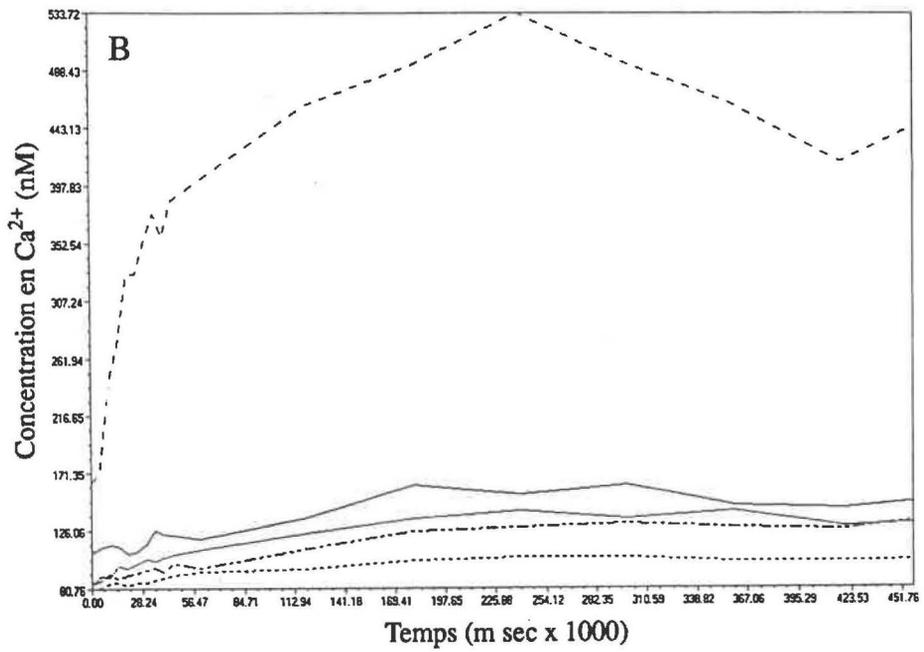
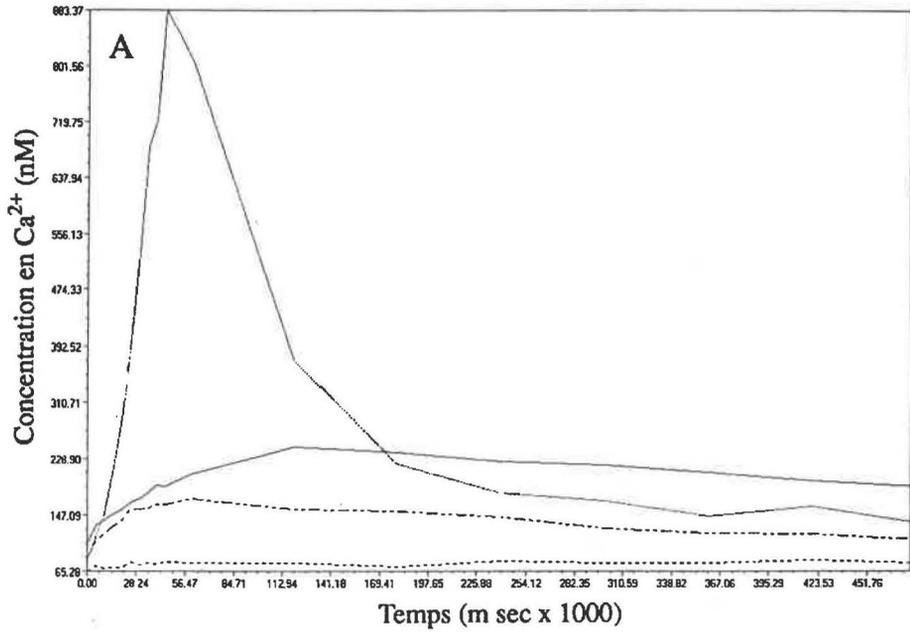
Le D600 (un bloqueur des canaux calciques de type L) cause une réduction de la réponse calcique d'environ 40 à 50% mais pas de suppression. Ces résultats confirment ceux obtenus par microspectrophotométrie.

c) Acide rétinoïque: L'amplitude de la réponse est faible dans les cellules normales et transfectées. Les cellules L6 ne montrent pas de réponse significative au RA. On notera cependant l'oscillation du Ca^{2+} intracellulaire dans les cellules traitées. Dans les cellules transfectées par le HPV16 la réponse est faible, transitoire et retardée par rapport à celle du témoin (Figure 59). La faible amplitude de la réponse des témoins ainsi que la réponse légèrement plus intense des cellules transfectées sont confirmées par l'imagerie (Figure 60).

11.4 Réponse des kératinocytes aux modulateurs de différenciation

Par comparaison avec les L6 nous avons étudié les réponses calciques aux agonistes dans le modèle Balbc/MK. Nous avons limité les tests aux effets précoces qui sont seuls significatifs dans ce modèle. La réponse au calcium est immédiate et transitoire chez les témoins. Par contre, la réponse des cellules transformées est soutenue pendant les dix minutes de mesure (Figure 61). Son amplitude est du même ordre que celle obtenue avec les myoblastes. L'effet du DMSO est moindre. Aucune différence majeure entre cellules saines et transfectées n'a été notée.

FIGURE 61 Analyse séquentielle en imagerie des rapports de concentration du calcium intracellulaire des kératinocytes normaux (Balbc/MK) (A) et transfectés par le virus du papillome humain type 16 (HPV16) (HPV16-Balbc/MK) (B) stimulés par le calcium extracellulaire. La réponse à l'exposition au calcium exogène est de type transitoire pour les cellules Balbc/MK normales (A) et de type soutenu pour les cellules transfectées HPV16-Balbc/MK (B).



PARTIE C: Communications intercellulaires

12. COMMUNICATIONS INTERCELLULAIRES

Nous avons étudié ces communications car elles jouent un rôle important dans la diffusion des petites molécules et particulièrement des messagers secondaires.

Les canaux responsables de la communication cytoplasme à cytoplasme sont appelés jonctions lacunaires.

12.1 Étude des communications intercellulaires *in situ*

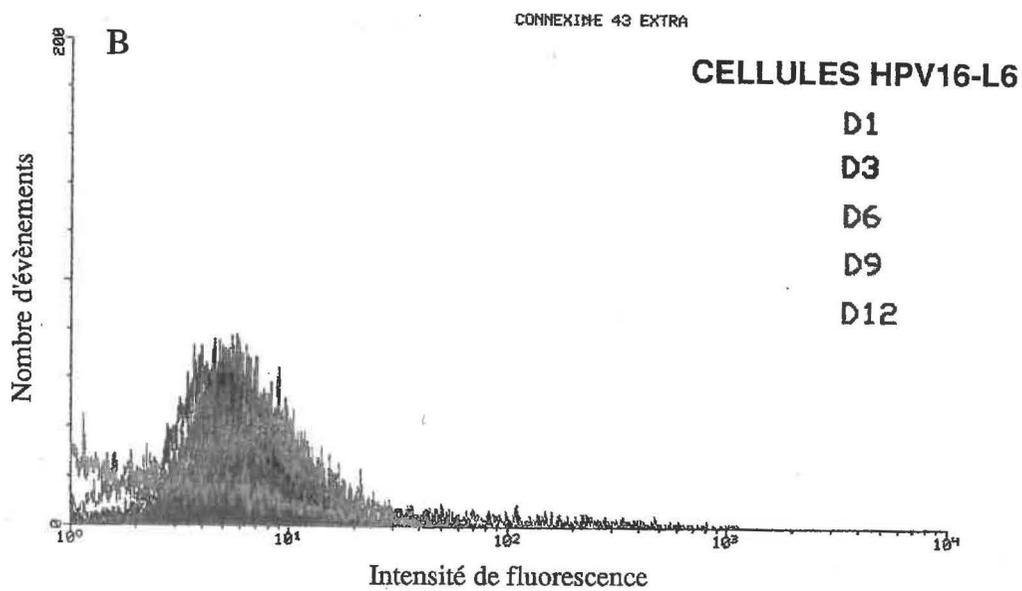
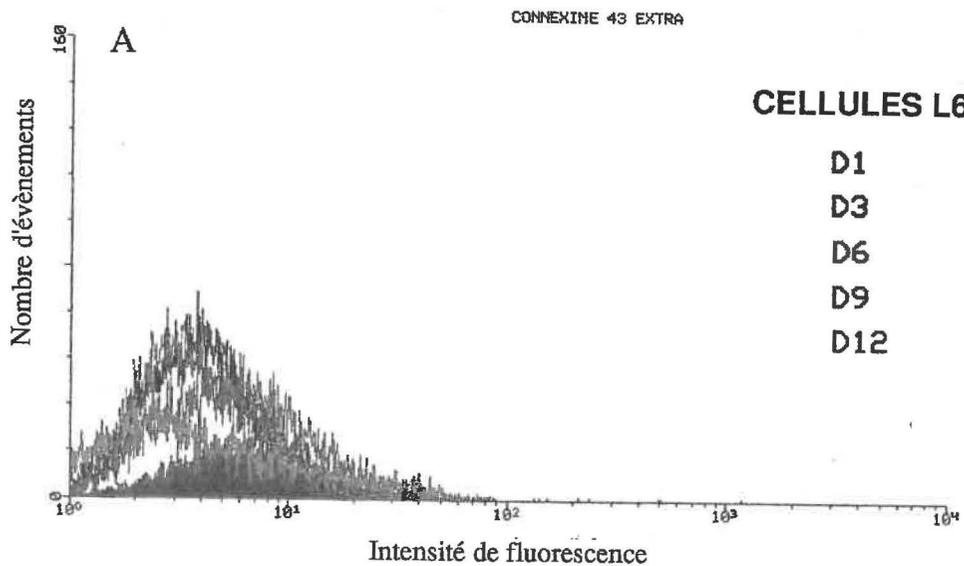
L'effet du HPV16 sur les jonctions lacunaires entre myoblastes a été étudié par microscopie électronique à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la connexine 43 : une protéine hexamère qui compose les jonctions lacunaires (Figure 27). La présence de ces structures est nettement diminuée dans les cellules HPV16-L6 par rapport aux cellules normales (Figure 17).

12.2 Cytométrie de flux

L'analyse en cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la connexine 43 indique que cette protéine est moins exprimée dans les cellules transformées par le HPV16 que dans les cellules témoins (Figure 62).

À titre d'exemple, au jour 6 un faible pourcentage de cellules L6 normales (5%) expriment faiblement la connexine 43, tandis que les cellules HPV16-L6 n'expriment plus cette protéine.

FIGURE 62 Évaluation par cytométrie de flux de l'expression de la connexine 43 dans les cellules L6 normales (A) et transfectées par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-L6)(B).
Jour 1 (D1), Jour 3 (D3), Jour 6 (D6), Jour 9 (D9) et Jour 12 (D12).



12.2.1 Technique du chargement par grattage: "scrape loading"

Les cellules ne sont pas perméables au colorant "jaune Lucifer". Le principe est de léser les cellules par un ou deux traits au scalpel et de recouvrir les cellules de colorant pendant un temps très court. Seules les cellules lésées vont se charger en colorant. La circulation du colorant vers les cellules avoisinant la cellule lésée ne peut se faire que par les jonctions lacunaires. Le chargement du colorant "jaune Lucifer", par incision de cellules normales et transformées par le HPV16, a montré un effet différentiel. La redistribution du colorant se fait de manière plus efficace dans les cellules témoins que dans celles transformées par le HPV16 (Figure 18). Les résultats obtenus en imagerie en particulier l'asynchronie observée dans les cellules transfectées (Figure 58) suggèraient une altération de la voie de signalisation intercellulaire permettant la circulation des messagers secondaires, chez les cellules exprimant le HPV16. Ceci est confirmé par les résultat ci-dessus.

DISCUSSION

PARTIE A: Établissement de lignées cellulaires contenant le génome complet du HPV16.

Des lignées cellulaires contenant le génome complet du HPV16 ont été établies après électroporation. Cette méthode s'est avérée une méthode de choix pour les cellules réfractaires à la méthode de transfection par le chlorure de calcium (Graham et Van der Eb, 1973; Shivarova *et al.* 1983). Nous avons trouvé une corrélation linéaire entre la concentration d'ADN exogène et le nombre de clones obtenus (Ennaji *et al.* 1992c). Une autre relation a été mise en évidence entre la mortalité cellulaire, le nombre de clones obtenus et le voltage utilisé. Un voltage faible est associé à une baisse de l'efficacité de la transfection. L'efficacité de transfection optimale associée à une viabilité cellulaire de 75% est obtenue sous 200 volts (Ennaji *et al.* 1992c). Ce voltage est relativement faible par rapport à celui mentionné dans la littérature pour les cellules B (Potter *et al.* 1984), les cellules de lymphome (Potter *et al.* 1984) et les précurseurs de granulocytes humains (Toneguzzo et Keating, 1986).

Le traitement électrique des cellules ne semble affecter ni la prolifération ni la différenciation cellulaire (Figure 10). Aucune altération du programme de différenciation sur la base des critères morphologiques et de l'expression de l'actine n'a été observée (Figure 10).

Les clones contenant le génome complet du HPV16 ont été isolés d'abord par hybridation des clones "dot blot" et confirmés par hybridation de type "Southern" (Figures 12 et 13) à l'aide d'une sonde génomique totale du HPV16 (Dürst *et al.*

1983). L'état physique du génome du HPV16 dans les lignées cellulaires (Figure 12) a été caractérisé à l'aide d'une sonde génomique totale (Dürst *et al.* 1983; Wilezynski *et al.* 1988). Les clones contenant le génome du HPV16 intégré ont été caractérisés à l'aide de sondes génomiques partielles contenant des séquences individuelles des cadres ouverts de lecture (ORFs) du HPV16 (Tableau 3). Ces sondes spécifiques ont été amplifiées à l'aide du PCR (Saiki *et al.* 1988) et les séquences amplifiées ont été clonées dans le plasmide pUC18 (Ennaji *et al.* 1992b). Des séquences du PV ont été clonées et confirmées aussi par d'autres méthodes (Browne *et al.* 1988, Mallon *et al.* 1986, Pilacinski *et al.* 1984, Tomita *et al.* 1987). La détection du HPV16 à l'aide du PCR est bien connue (Shibata *et al.* 1988; Dallas *et al.* 1989; Melchers *et al.* 1989; Young *et al.* 1989; Chow *et al.* 1990; Bavin *et al.* 1993; Margall *et al.* 1993). Cette technique a été également utilisée pour la détection d'ADN viral autre que celui du HPV16 (Chin-Yih *et al.* 1988; Delmmer *et al.* 1988; Anceschi *et al.* 1990). Le PCR permet également l'identification de groupe du HPV à l'aide des amorces universelles (Gregoire *et al.* 1989; Manos *et al.* 1989). L'identification des ORFs de HPV de type se fait à l'aide des amorces spécifiques tel qu'indiqué dans le Tableau 6.

Les sondes générées par PCR et clonées dans le pUC18 (Ennaji *et al.* 1992b) ont été utilisées pour la caractérisation de l'intégration des séquences du HPV16 dans les clones isolés (Figure 11) et aussi pour l'étude de la transcription du HPV16. Ces sondes peuvent être également utilisées pour la détection dans des échantillons cliniques (Van den Brule *et al.* 1989). Ces outils de diagnostic

peuvent permettre un dépistage des infections à HPV16 très tôt dans les lésions génitales d'apparence bénigne mais contenant le génome du HPV16 (Macnab *et al.* 1986). Ceci permettrait d'agir très tôt et d'éviter l'évolution vers un cancer génital. Enfin les fragments d'ADN du HPV16 amplifiés et clonés dans le pUC18, peuvent être utilisés comme sonde partielle dans l'établissement d'une relation entre les isolats et peuvent contribuer à la résolution du problème de l'hétérogénéité et de la variabilité dans les populations du HPV. Les sondes moléculaires totales (Figure 2) et partielles du HPV16 ont permis d'isoler les lignées cellulaires contenant le génome complet du HPV16, nécessaires à ce travail.

PARTIE B: Expression génétique du HPV16 et prolifération et différenciation cellulaire

1. EXPRESSION DU HPV16

1.1 Analyse de la transcription

L'étude de l'expression du HPV16 dans les myoblastes de rat *in vitro* constitue une contribution originale. En effet, ni le type de cellules ni le modèle cellulaire utilisés ne proviennent de l'hôte naturel du HPV16. Le modèle cellulaire présente l'avantage d'être inductible ce qui permet de contrôler les étapes de la prolifération ou de la différenciation. L'étude relativement exhaustive de la transcription du HPV16 au cours de la différenciation cellulaire *in vitro* a été réalisée à l'aide du RT-PCR (Figure 34). L'utilisation du PCR pour la caractérisation de la transcription est

bien connue (Hart *et al.* 1990). Elle a été nécessaire dans cette étude où les résultats obtenus par hybridation de type "Northern" se sont montrés insuffisants.

Une première analyse par hybridation de type "Northern" a permis de détecter des ARNs de différentes tailles variant de 1.2 à 5.1 kpb (Figure 35). La distribution de ces ARNs n'est pas toujours uniforme. Ils peuvent résulter d'un épissage différentiel. L'hybridation moléculaire avec des sondes moléculaires totales du génome complet du HPV16, et partielles, ORF de HPV16, a confirmé la présence des ARN dans les cellules transformées par le HPV16.

Les transcripts précoces et tardifs ont été détectés. Parmi les gènes précoces, l'ORF E4 montre le plus fort signal à l'hybridation, tandis que les signaux de E6 et E7 ont été relativement faibles. Parmi les gènes tardifs à l'étude L1 n'a pas été détecté alors que L2 est présent à un faible niveau de transcription. L'analyse du niveau d'expression par hybridation de type "northern" particulièrement de E6 et E7, aurait été difficile sans l'utilisation de RT-PCR du fait du chevauchement de leurs ARNm (Figure 2). L'utilisation des amorces spécifiques pour E6 et E7 (Tableau 6) alliée à la technique du PCR ont permis de tester individuellement le niveau d'expression de chacun de ces gènes. Comme nous l'avons mentionné, la méthodologie PCR utilisée, est couramment employée par l'analyse du HPV16 et notamment de sa transcription (Rotemberg *et al.* 1989; Young *et al.* 1989; Johnson *et al.* 1990).

L'expression du HPV16 au cours de la différenciation cellulaire a été analysée sur deux semaines au niveau de la transcription et de la traduction. L'analyse des

produits de la transcription a montré un patron évolutif et différentiel des gènes du HPV16 (Figure 34). L'optimum de la transcription a été obtenue au jour 3 après la mise en culture pour l'ensemble des gènes (Figure 34). Plus en détail, les gènes E1a et E1b sont exprimés successivement à partir du jour 1 et cessent d'être exprimés par la suite. Les gènes E1a et E1b sont portés par l'ORF E1 qui code pour au moins deux produits de gènes (Seedorf *et al.* 1985; Baker et Howley, 1987). Le produit du gène E1 semble jouer un rôle dans le maintien du génome viral à l'état épisomal (Lusky et Botchan 1984). L'ORF E1 est hautement conservé et la partie C-terminale présente une certaine homologie de séquence et une fonction commune avec l'antigène T du SV40 et du polyomavirus (Clertant et Seif, 1984).

Dans les lésions malignes, le génome viral semble le plus souvent s'intégrer dans le génome cellulaire au niveau des ORFs E1 et E2 (Baker et Howley, 1987; Durst *et al.* 1987; Shirasawa, 1987). Le rôle et l'importance de l'intégration dans l'immortalisation et l'évolution maligne de la transformation n'est pas clair (Matlashewski, 1989). Nous montrons ici que l'expression du gène E1 précède dans le temps celle de tous les autres gènes. Il se pourrait donc que l'expression de E1 conditionne celle du reste du génome. L'ORF L2 est exprimé entre les jours 3 et 9 seulement (Figure 34). L'ORF L1 a été détecté une fois sur cinq le jour 3 seulement. Les ORFs L1 et L2 codent pour des polypeptides structuraux des virions. Une transcription différentielle de ces gènes a été observée dans des lésions différant dans leur sévérité.

Dans les lésions pré-cancéreuses les transcrits correspondant aux ORF L1 et L2 sont détectés en abondance (Crum *et al.* 1985). Cependant, dans les lésions malignes les ORF L1 et L2 sont rarement détectés (Smotkin et Wettstein, 1986; Baker et Howley, 1987; Shirasawa *et al.* 1988). Ces faits peuvent renforcer nos conclusions indiquant que les lignées L6 transfectées par le HPV16 que nous avons utilisées étaient transformées.

Le produit des gènes E6 et E7 est exprimé tout au long du programme de différenciation (Figure 34). Ces gènes semblent être impliqués dans l'amplification initiale du génome viral après l'infection (Berg *et al.* 1986; Matlashewski, 1989). Dans les lignées cellulaires qui dérivent des carcinomes génitaux humains, les gènes E6 et E7 sont aussi toujours exprimés (Smotkin et Wettstein, 1986; Baker *et al.* 1987; Matlashewski, 1989). Le rôle possible de leur produit dans la transformation a été étudié plus en détail pour le HPV16. *In vitro*, il a été démontré que le produit du gène E7 se lie avec l'oncoprotéine Rb. Le complexe E7-Rb supprime l'effet du produit de gène Rb sur l'inhibition de la prolifération cellulaire (Dyson *et al.* 1989). La transformation cellulaire *in vitro* par E7 a été étudiée par Kanda *et al.* 1988. L'expression de E7 semble être requise pour le maintien de la transformation ainsi qu'il a été démontré à l'aide d'un système d'expression inductible, contenant le gène E7, dont le promoteur peut être activé par la dexamétasone. L'arrêt de l'expression de E7 s'accompagne de la cessation de la croissance cellulaire (Smotkin et Wettstein, 1986; Matlashewski, 1989). Le rôle de transactivation de E7 dans la transcription des gènes impliqués dans la division cellulaire est suggéré (Matlashewski, 1989).

L'activation de la transcription par la E6 est également rapportée (Crook *et al.* 1991; Desaintes *et al.* 1992). *In vitro* il a été également démontré que l'oncoprotéine E6 se lie avec le p53, suppresseur de tumeur cellulaire par inhibition de la mitose. Le complexe E6-p53 stimule la dégradation de la p53 (Crook *et al.* 1991) ce qui pourrait lever l'inhibition et déréguler le cycle cellulaire. L'ensemble de ces données peut expliquer la stimulation de la prolifération et le blocage de la différenciation cellulaire dans les cellules transformées par le HPV16 tout au moins chez l'hôte naturel.

Les transcripts du gène E4 sont exprimés aussi longtemps que ceux du gène E6 et L2. Nous avons observé que le signal d'hybridation de ces transcripts est très élevé. Des études plus approfondies de ce gène seraient souhaitables mais dépasseraient le cadre de ce travail.

En résumé, nos résultats confirment des observations faites *in vivo* aussi bien qu'*in vitro* sur les HPV et certains virus tumorigènes à ADN. Il semblerait que dans le modèle cellulaire L6, la transcription de E1a soit très précoce et transitoire. Elle précède celle de E1b et de tous les autres gènes. L'expression des transcripts transitoires dans d'autres modèles cellulaires a été également rapportée dans la littérature pour d'autres virus notamment pour le SV40 (Imbert *et al.* 1983; Lehman et Jacobberger, 1990). E1b n'est exprimé que jusqu'à un stade de différenciation peu poussé. E4, E6 et L2 ne sont plus détectables, vers le jour 9 où une partie de la population est alignée. Par contre, l'expression de E7 se poursuit jusqu'à la fin de la culture. Il est possible que le degré de différenciation

des cellules contrôle l'expression en cascade des gènes viraux mise en évidence dans notre travail. L'expression constante de la E7 pourrait être associée à la levée de l'inhibition de croissance par contact. Ceci suggère une implication de la E7 dans l'immortalisation de la lignée.

1.2 Analyse de la traduction

L'analyse de l'expression du HPV16 dans les myoblastes *in vitro* a été partiellement testée au niveau de la traduction. La réponse d'immunofluorescence des protéines totales du HPV16 a été quantifiée, au cours de la différenciation des myoblastes, par la cytométrie de flux en utilisant des anticorps dirigés contre les produits des gènes des virus de papillomes. Plus spécifiquement, un des anticorps utilisés est dirigé contre les antigènes de groupes et de types. Cet anticorps polyclonal a été préparé à partir de la particule virale entière du virus de papillome bovin type 1 (BVP1). Il reconnaît donc les déterminants antigéniques de groupe. L'anticorps monoclonal a été préparé à partir de la protéine E6 du HPV16 (Ab-1). Il est donc spécifique de type. Le marquage à l'aide de l'anticorps polyclonal, révèle une concentration élevée de protéines antigéniques durant les premiers jours de culture. L'expression tend à diminuer par la suite (Figure 36). L'expression membranaire est faible (Figure 36) mais stable tout au long de la culture. Dans le cas de cellules normales, un marquage positif est obtenu (Figure 36). On ne peut donc tirer aucune conclusion de ces résultats, sauf que les sites antigéniques viraux de groupe et de type ont des homologues parmi les protéines cellulaires de L6. Le marquage à l'aide de l'anticorps monoclonal est plus spécifique. Dans les

cellules transformées par le HPV16, aucun marquage au niveau de la membrane n'a été détecté. Par contre, on observe de façon constante un marquage intracellulaire seulement. Les résultats suggèrent que le produit du gène E6 n'est pas une protéine membranaire. Elle s'exprime au niveau du cytoplasme, ce qui est bien le cas pour la E6 ainsi que rapporté dans la littérature (Pfister et Fuchs, 1987). L'anticorps est plus spécifique du virus du fait qu'aucun marquage des cellules normales n'a été observé en cytométrie de flux. De plus, l'analyse par immunobuvardage a permis de détecter dans les cellules transformées par le HPV16 une protéine de 17 KDa qui correspondrait à E6 (Figure 37). L'équivalent de cette bande n'a pas été observé dans les cellules normales correspondantes (Figure 37). Des résultats préliminaires semblent confirmer la présence du produit du gène E7 dans le noyau des cellules L6 transfectées par le HPV16.

2. PROLIFÉRATION CELLULAIRE

Les cellules HPV16-L6 ne se différencient pas de façon terminale (Figure 8) comme c'est le cas des cellules L6 normales qui elles, atteignent la phase de fusion, de formation de syncytium et de myotubes (Figure 7). Donc le HPV16 qui arrête l'évolution du programme de différenciation ce qui permet à la prolifération de continuer. En effet, on note une nette différence dans les courbes de croissance des populations L6 (Figure 20) et HPV16-L6 (Figure 20). La prolifération se poursuit dans le cas des cellules HPV16-L6 (Figure 20) où l'on n'observe pas de phase stationnaire. Il y a perte d'inhibition de contact. Ceci a été observé par l'essai direct de prolifération (Figure 20A) et confirmé par un essai

indirect, métabolique (Figure 20B). L'expression du HPV16 est tributaire donc du programme de différenciation des myoblastes dans lequel la cellule progresse. En même temps, le HPV16 inhibe la phase terminale de différenciation de telle façon que la cellule transformée continue à proliférer. Le mécanisme possible de l'immortalisation peut s'expliquer par l'inhibition de la différenciation.

3. DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE

3.1 Les marqueurs de différenciation

Les parasites intracellulaires, notamment les virus sont souvent associés à une altération des propriétés cellulaires. Les virus, en général, utilisent la machinerie de l'hôte et modifient son métabolisme. Par exemple, il est possible d'observer la stimulation ou la suppression de la synthèse de certaines macromolécules cellulaires. Ces événements produisent de nombreux changements des fonctions cellulaires en particulier de ceux impliqués dans les programmes de différenciation. La stimulation de la synthèse des macromolécules est rapportée pour certains papovavirus, du même groupe viral que le HPV, notamment le SV40 (Lehman et Jacobberger, 1990). Les modifications structurales et fonctionnelles qui sont les conséquences d'une interaction du HPV16 avec le programme de différenciation des myoblastes ont été analysées ici, par le biais des marqueurs de différenciation à l'aide de la méthode de cytométrie de flux. Cette technique a été utilisée avec d'autres virus, entre autres le SV40 (Stenman *et al.* 1975; Robinson and Lehman, 1978; Christensen and Brockman, 1982; Robinson and Lehman, 1982) l'adénovirus (Murray *et al.* 1981), le cytomegalovirus (Elmendorf *et al.* 1988), le

virus herpes simplex 2 (Leary *et al.* 1976), le virus influenza (Kimora *et al.* 1985), le rétrovirus (Notter *et al.* 1982; Sinangil *et al.* 1985; Jacobs *et al.* 1986) et d'autres virus (Kohn et Fuchs, 1969; Reeve et Post, 1971; Gram *et al.* 1978). Dans le cas du HPV16, aucune étude préalable mettant en parallèle la différenciation des cellules L6 et l'expression du HPV16 n'a été effectuée. Les résultats obtenus ici constituent donc une contribution originale. Les marqueurs ont été utilisés à deux fins: d'une part l'identification des étapes de différenciation des cellules normales dans nos conditions d'expériences, d'autre part la recherche d'un effet de la transfection sur la différenciation. Les résultats obtenus pour chacun des marqueurs de différenciation seront d'abord discutés individuellement avant d'en dresser un tableau synthétique.

a) L'actine est un marqueur de différenciation cellulaire universel à double rôle, structural et fonctionnel. Le processus de différenciation des myoblastes semble être caractérisé par la dérégulation des produits de gènes tels que l'actine β et γ (Endo et Nadal, 1987) et de façon parallèle par l'induction de gènes spécifiques aux cellules musculaires comme l'actine α , les récepteurs d'acétylcholine et la créatine kinase (Sorlowski et Lingrel, 1988). Ici nous avons utilisé l'actine α . Outre son rôle structural très important dans les cellules musculaires l'un des rôles fonctionnels de l'actine α a été d'intervenir dans la transcription. La stimulation de la transcription par l'actine est étudiée par Bacher *et al.* 1991. Une augmentation d'expression de l'actine dans les cellules transfectées par le HPV16 a été observée dans notre travail (Figure 29). Ceci peut suggérer un effet stimulateur de l'actine cellulaire dans les processus de la transcription du HPV16 *in vitro*. Ceci est à

rapprocher de la démonstration de l'arrêt de la transcription des gènes E6, E4 et L2 qui coïncide avec la diminution brusque de l'actine au jour 9. La stimulation par l'actine de la transcription du virus du parainfluenza humain type 3 (HPIV3) a été démontrée (De *et al.* 1991). La stimulation de la transcription *in vitro* par l'actine cellulaire a été également observée dans les cellules HeLa, cellules qui sont transformées par le HPV18 (De *et al.* 1991).

b) **Fibronectine**: Par contraste, dans les cellules musculaires, la fibronectine est un marqueur de différenciation spécifique. Au jour 1, 90% de la population normale embryonnaire est fortement marquée. Au jour 3, 22% de la population seulement est marquée. La population marquée tend à diminuer jusqu'au jour 6 de même que l'intensité du marquage malgré une certaine hétérogénéité des populations. Par contre, la population des cellules transfectées qui est aussi nettement marquée au jour 1, reste plus marquée dans l'ensemble que la population normale, exceptée au jour 6. Ceci correspond d'une part à la poursuite de la prolifération des cellules transfectées après le jour 6 et d'autre part à l'orientation des cellule qui se fait progressivement et de manière sporadique. L'expression de la fibronectine est en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature. La fibronectine excrétée contrôle l'orientation des myoblastes chez les L6. La réduction de la prolifération après addition du sérum SFV à la confluence s'accompagne d'une diminution d'expression de la fibronectine chez 1/3 de la population cellulaire (Kubo, 1991c), ce que nous confirmons.

L'expression de la fibronectine a été également étudiée dans les fibroblastes

(Hynes et Destree 1978). L'addition de fibronectine aux cellules transformées s'accompagne de changements morphologiques (Ali *et al.* 1977; Hynes *et al.* 1978). Nicholson, 1976a, b a étudié l'interaction entre les protéines de surface et les protéines du cytosquelette. Dans le cas de cellules transformées, une corrélation entre la fibronectine et l'actine a été rapportée en fin de culture (Hynes et Bye, 1974). Ces résultats acquis sur des fibroblastes sont opposés aux nôtres. On observe une corrélation négative entre les populations marquées par l' α -actine et celles marquées par la fibronectine, sauf en fin de culture où les deux populations évoluent en parallèle. Ceci est commun aux L6 et aux L6 transformées et semble être lié à l'orientation des cellules.

La fibronectine joue un rôle important dans la myogénèse et dans l'adhésion à la matrice extracellulaire (Pierschbacher *et al.* 1982; Ginsberg *et al.* 1985; Haverstick *et al.* 1985). Elle joue également un rôle dans la morphologie fibroblastique et la stabilité du cytosquelette. Elle stimule la prolifération des précurseurs des cellules myogéniques et supprime l'expression de la desmine (Menko et Boettiger, 1987; Oclan *et al.* 1988; Knuden, 1990). Ceci peut alors expliquer la différence de morphologie et l'absence de fusion dans les cellules transformées par le HPV16. La fibronectine semble être également impliquée dans la stimulation de la différenciation cellulaire terminale des cellules musculaires (Knuden, 1990). L'expression de la fibronectine est drastiquement réduite après la différenciation terminale (Kubo, 1991c), ce que nous observons aussi.

c) **Vimentine:** L'expression de la vimentine est transitoire. Cette expression est intimement liée à une étape de la différenciation cellulaire, étape de la pré-fusion cellulaire qui normalement s'accompagne de la disparition de la vimentine et de l'apparition des récepteurs cellulaires d'acétylcholine (Figure 50). Nos résultats désignent clairement le Jour 6 comme le début du stade de préfusion. Dans le cas de cellules transformées par le HPV16, les cellules ne fusionnent pas (Figures 8 et 14) et les récepteurs d'acétylcholine n'apparaissent pas ainsi que nous le verrons plus loin. D'autre part, la vimentine continue à être exprimée ce qui montre clairement le stade auquel les cellules transfectées sont bloquées par le virus.

d) **N-CAM:** Le N-CAM est une molécule d'adhésion cellulaire (CAM) originellement identifiée dans les cellules neurales (N) d'où leur nom N-CAM (Edelman, 1986; Rutishauser, 1986). Cette molécule a été retrouvée par la suite dans plusieurs types de cellules incluant les cellules musculaires (Knudsen, 1990). La molécule N-CAM est une glycoprotéine intramembranaire comprenant une chaîne polysialique dont la polymérisation augmente avec l'âge et la différenciation cellulaire. Au cours de la myogénèse, et juste avant l'étape de fusion cellulaire des myocytes, la N-CAM passe d'une forme de masse moléculaire de 125 KDa à un autre forme de 145 KDa. Le degré de polymérisation de la chaîne sialique reflète le degré de différenciation (Moore et Walsh, 1985; Dickson *et al.* 1990). Notre anticorps ne permet pas de faire cette distinction.

Les N-CAMs sont pour la plupart localisées au niveau de la surface membranaire, mais il existe également des isoformes à localisation cytoplasmique autour des myofibres en voie de développement dans les cellules musculaires (Knudsen, 1990). La N-CAM contribue à la différenciation des myoblastes (Grosin *et al.* 1985). En fait, elle est essentielle à la myogénèse des muscles du squelette (Knudsen, 1990). Elle est également essentielle à la fusion des myoblasts où elle semble jouer un rôle de premier plan dans la régulation des gènes durant la différenciation des cellules myoblastiques probablement par son action régulatrice sur les jonctions lacunaires (Knudsen, 1990). L'expression de N-CAM dans les cellules L6 normales (Figure 14) est légèrement moins élevée que dans les cellules transformées par le HPV16 (Figure 14). Au jour 6 qui est le stade de préfusion pour les cellules normales, il y a une diminution du marquage de N-CAM. Ensuite deux populations se différencient. Nous avons interprété ce résultat comme l'apparition de sous-population de cellules fusionnées où le N-CAM ne se trouve plus que dans le cytoplasme (jours 9-12, Figure 29). Par contre, on ne trouve généralement qu'une population fortement marquée dans les cellules transfectées. Vers le jour 12, la baisse du marquage pourrait correspondre à l'absence de formation de fibres musculaires. Des études plus détaillées seraient nécessaires pour comprendre l'évolution de N-CAM dans les deux types de cellules.

Des tentatives de mise en évidence par voie immunochimique de N-CAM dans ces mêmes cellules, L6, par Kubo, 1991c ont échoué tandis que nous avons obtenu une réponse positive. La différence de résultat peut s'expliquer par la différence de qualité de l'anticorps utilisé. Kubo (1991c) a utilisé un anticorps anti

N-CAM de souris tandis que nous avons utilisé l'anticorps anti N-CAM de rat. L'évolution de l'expression de N-CAM est en gros antiparallèle de celle de la fibronectine, ce qui est logique d'après leur fonction au cours de la différenciation.

Ainsi: Sur le plan de la morphologie nous avons pu distinguer 5 stades de différenciation jusqu'à la formation des myotubes. Le patron d'expression des marqueurs nous permet de les spécifier: jusqu'au jour 3 les cellules se multiplient et possèdent un taux élevé d'actine et de fibronectine. La molécule d'adhésion N-CAM est fortement synthétisée. Au jour 6 les cellules acquièrent la bipolarité et s'orientent d'où un taux plus élevé de fibronectine et de vimentine pendant que l'actine et surtout la N-CAM décroissent - c'est le début du stade de préfusion. Entre le jour 6 et 9 c'est le stade de préfusion et de formation des syncytium: la vimentine chute brusquement de même que la fibronectine et N-CAM. La chute de N-CAM correspond au début de la fusion. Les membranes fusionnent et N-CAM qui forme le ciment intercellulaire, est catabolisé. Entre le jour 9 et 12 les myotubes apparaissent. Le patron est voisin de celui du jour 9 sauf pour la fibronectine qui remonte. Ceci pourrait être relié à l'orientation de nouvelles cellules en voie de fusion.

Clairement, le stade d'arrêt de la différenciation, se situe à la préfusion à partir du jour 6 de culture pour des cellules transfectées.

e) **Les cytokératines:** Les marqueurs de différenciation des Balbc/MK sont constitués par une famille de filaments intermédiaires de masse moléculaire 40 à 69 KDa: les cytokératines (Moll *et al.* 1982). Normalement, dans l'épiderme, les

cytokératines qui reconnaissent les couches basales sont caractéristiques de stades peu différenciés. Les couches suprabasales et les couches kératinisées expriment des cytokératines caractéristiques de stades de plus en plus différenciés. Ceci est également vrai quand on va des épithelia simples aux épithelia stratifiés. Généralement, les cytokératines de poids moléculaire faible sont caractéristiques d'états peu différenciés. La progression de la différenciation s'accompagne de l'expression de cytokératines de poids moléculaire plus élevé. Mais - fait important - le patron de différenciation est vertical dans les couches successives. Dans notre modèle, les cellules proviennent initialement de la couche supérieure d'épiderme murin embryonnaire. Nous avons observé *in vitro* que dès le stade de confluence tous les marqueurs de tissus différenciés sont exprimés notamment la molécule K1 de masse moléculaire 68 KDa, comme l'ont montré les anticorps monoclonaux utilisés en immunocytofluorescence et confirmé par western blot. Les seuls changements observés sont d'ordre quantitatif. On n'a pas pu mettre en évidence de marqueur sélectif. On ne peut pas établir de patron car ces changements sont graduels. Ceci peut se comprendre du fait de l'origine des cellules qui proviennent d'une couche d'un horizon déterminé déjà engagé dans son programme de différenciation, alors que la différenciation des épidermes et épithelia est "verticale". Nous avons en outre observé que le HPV16 ne modifie pas qualitativement l'expression des cytokératines. Nous confirmons ainsi des résultats obtenues par Roop *et al.* 1988.

3.2 Immortalisation et transformation

On note que la morphologie, la courbe de croissance et la différenciation des cellules HPV16-L6 sont altérées en culture *in vitro*. L'altération morphologique est l'une des caractéristiques de la transformation phénotypique de plusieurs types de cellules transformées en culture (Hanafusa, 1977; Pastan and Willingham, 1978). Les cellules HPV16-L6 sont relativement rondes et très vacuolisées. Par contraste, les cellules normales sont bipolaires et peu vacuolisées. De plus, les cellules HPV16-L6 montrent un temps de doublement relativement court par rapport à celui des témoins (Figure 20). Chez ces mêmes cellules la courbe de croissance demeure exponentielle alors que la phase stationnaire est en général atteinte après 6 jours dans le cas des cellules L6. Les cellules témoins évoluent vers l'état de différenciation terminale caractérisé par la formation de myotubes alors que les cellules transfectées n'ont jamais atteint cet état de différenciation, pas plus que l'état antérieur de fusion cellulaire.

Le blocage de la différenciation qui laisse aux cellules leur potentiel de prolifération pourrait rendre compte de l'immortalisation observée dans les deux modèles cellulaires.

Nous pensons qu'il y a également transformation:

i) Il y a formation de colonies en milieu semi-solide ensemencé par une suspension de cellules HPV16-L6 (Figure 24).

ii) Les réarrangements génomiques et la fréquence des doubles minutes renforcent l'hypothèse de la transformation (Figure 19) et peuvent en être en partie responsables.

iii) Chez les kératinocytes, les cultures deviennent indépendantes de l'hormone de croissance EGF.

iv) Les lignées de HPV16-Balbc/MK et les HPV16-L6 transfectées ont une tendance à pousser en suspension.

Il est possible que la transformation résulte de l'activation de proto-oncogènes via certains produits du génome viral (Nishizuka, 1986) par exemple par suite des réarrangements chromosomiques. A ce point de notre travail, nous n'avons pas de résultats concrets à présenter.

4. ASPECT MECANISTIQUE

L'étude des marqueurs de différenciation des kératinocytes: les cytokératines ne nous a révélé que des différences quantitatives. Ceci rendait difficile l'établissement d'une relation entre les étapes de la différenciation et l'expression du virus. C'est pourquoi nous n'avons rapporté ici que les résultats mécanistiques sur les kératinocytes, aux fins de comparaison avec le modèle L6.

4.1 Protéine kinase C (PKC)

Les PKC sont une famille de sérine/thréonine kinases qui jouent un rôle majeur dans une des voies de la signalisation cellulaire. Ces enzymes sont impliquées

dans plusieurs processus biologiques notamment la prolifération, la sécrétion et la différenciation (Nishizuka, 1984a,b). L'implication de la PKC à la fois dans la prolifération et la différenciation justifie le choix de son étude dans le cadre de ce travail.

L'hypothèse d'une interférence des HPVs avec les processus de signalisation a été d'abord proposée par Matlashewski *et al.* 1988. Ceci nous a amené à voir si une relation peut être établie entre la PKC et la différenciation/prolifération cellulaire en utilisant des modèles cellulaires dont les cellules ont le potentiel de se différencier sous l'action de différents modulateurs. Les protéines kinases C (PKC) sont des enzymes multispécifiques (Nishizuka, 1984a,b). Différentes isoformes de la PKC ont été décrits (Coussens *et al.* 1986; Knopf *et al.* 1986; Ono *et al.* 1988). Ces isoformes sont localisés dans la membrane plasmique, le cytoplasme et la membrane nucléaire. Elles ne semblent pas différer dans leur activité. Les espèces cytoplasmiques peuvent être transportées dans la membrane plasmique sous l'effet d'effecteurs comme le TPA et dans la membrane nucléaire. En outre, les PKC liées à la membrane peuvent s'y trouver sous une forme active et inactive. Le TPA qui active les PKC membranaires directement quand il est ajouté au milieu réactionnel, a un effet activateur chez les témoins et les clones transfectés. La dualité dans le contrôle de la PKC sur la prolifération cellulaire a été décrite en détail par Kikova *et al.* 1989.

La transfection de fibroblastes par des vecteurs contenant des gènes sur-exprimés de PKC (Pearson *et al.* 1988; Housey *et al.* 1988) affecte le contrôle de

la croissance qui est largement augmentée dans ces cellules. Ceci renforce l'hypothèse de l'implication de la PKC dans la prolifération. L'activité PKC est très augmentée dans les cellules HPV16-L6 (Tableau 41). Ceci est vrai pour l'activité membranaire de base (qui mesure à la fois l'autophosphorylation de l'enzyme et probablement l'activité sur un substrat endogène), pour l'activité membranaire sur le substrat synthétique et l'activité cytosolique (Tableaux 10 et 11). L'augmentation d'activité semble associée à la prolifération accrue des cellules transformées et peut être à une transcription plus élevée. Ceci est à rapprocher de l'observation que la transfection de myoblastes par la phospholipase C (PLC) altère et prévient la fusion en myotubes (Knuden *et al.* 1989): La phospholipase C clive le phosphatidylinositol pour donner le diacylglycerol (DAG) et l'inositol 1,4,5 triphosphate. DAG est l'effecteur obligatoire de la PKC. Notre interprétation des résultats serait que le virus altère la phospholipase C qui libère le diacylglycerol affectant l'activité, PKC. L'augmentation de l'activité PKC accélérerait la croissance et en même temps bloquerait la différenciation au stade pré-fusion. L'augmentation de l'activité PKC par le virus rendrait compte à la fois de l'augmentation de la transcription, (en association avec l' α -actine) de l'immortalisation et du blocage de la différenciation au niveau pré-fusion. Un contrôle indirect négatif de la PKC pourrait s'exercer sur les jonctions lacunaires, ainsi que nous l'avons observés, renforçant l'effet positif sur la prolifération.

4.2 Identité de l'enzyme

Il a été proposé que l'isoforme majeure de la PKC dans les muscles du squelette de la souris soit un nouveau membre de cette famille: nPKC Θ (Osada *et al.* 1992). Nos résultats semblent le confirmer: D'une part nous avons identifié une protéine par immunobuvardage de même poids moléculaire (Figure 42) que celle décrite par Osada *et al.* 1992. D'autre part, le patron d'inhibition de nos enzymes ne correspond pas à celui de la PKC conventionnelle: Nous avons obtenu une inhibition de 100% par un inhibiteur de la PKC (qui inhibe aussi la PKC classique). Cependant, le peptide inhibiteur spécifique n'est actif qu'à environ 30% contre 80 à 90% chez la PKC usuelle. En outre, la chélérythine qui est en compétition avec le substrat pour le site actif inhibe spécifiquement à 100% la PKC conventionnelle et n'inhibe notre enzyme qu'à 15%. Ces deux derniers résultats montrent que la PKC conventionnelle a plus d'affinité pour le substrat synthétique utilisé que celle des cellules de muscles du squelette et indique donc une différence probable d'isoformes. La PKC conventionnelle coexiste avec le nPKC et l'activité mesurée est celle des isoformes en mélange.

4.3 Effet des modulateurs de différenciation

Plusieurs raisons nous ont incités à mesurer l'effet de modulateurs connus de la différenciation cellulaire. La PKC peut répondre à ces modulateurs de deux manières i) par une stimulation précoce et transitoire liée à l'amorce de la différenciation, ii) par une stimulation tardive soutenue qui semble associée à la

croissance. L'évolution cinétique de la réponse de la PKC reflètera donc la réaction des cellules à l'effecteur.

Le calcium est un inducteur de différenciation dans les deux modèles cellulaires étudiés. Toutefois, si la PKC est impliquée dans la différenciation des kératinocytes, elle ne l'est pas, tout au moins directement, dans la différenciation des cellules L6 où ce rôle est tenu par la PKC dépendante de la calmoduline. Le DMSO a généralement un effet inducteur de la différenciation tandis que l'acide rétinoïque (RA) est plus spécifique. Nos résultats montrent que:

- 1) Les agents inducteurs de la différenciation qui sont associés à l'inhibition de la prolifération induisent une réponse précoce (10-30 min.) de la PKC qui est suivie par une diminution de l'activité. C'est le cas pour le DMSO 1% dans les cellules L6 (Figure 39A) ou de la réponse au calcium et au DMSO dans les Balbc/MK (Figures 40A, C). Cette observation est en accord avec la littérature qui indique une augmentation rapide de la PKC après exposition des cellules à un agent de différenciation (Gainer *et al.* 1985; Lichti et Yuspa, 1988).

Le progrès dans la différenciation est inversement corrélé à la prolifération cellulaire donc, il est possible qu'une activation précoce de la PKC par des agents inducteurs de la différenciation, joue un rôle dans une régulation négative de la prolifération dans les cellules en voie de différenciation comme on l'observe avec le traitement au DMSO 1% et au calcium 1.8 mM dans les cellules L6, et les kératinocytes.

2) Par opposition à l'augmentation transitoire précoce de la PKC en réponse aux inducteurs de différenciation, il semble qu'une activité modérée mais soutenue de la PKC, soit associée à la régulation normale de la croissance dans les systèmes qui sont en voie de prolifération ce qui est le cas dans les modèles cellulaires utilisés dans le cadre de ce travail comme l'illustre bien nos résultats (Figures 39B,C et Figures 40B,C). Comme nous l'avons détaillé dans la section résultats, nous avons observé: i) une corrélation positive entre l'activité PKC et la croissance chez les cellules HPV16-L6 et chez les L6 dans le cas où le modulateur avait un effet positif sur la croissance (Figure 43).

L'activation de la PKC est maintenue durant la prolifération des populations de cellules et diminue avec le temps en raison de la confluence de la culture ou de la différenciation terminale (Figures 39C et 40C). Un résultat très intéressant est à signaler: le calcium n'est pas un effecteur de la nPKC Θ contrairement à l'enzyme conventionnelle. Dans les cellules L6 exposées à la dose élevée de calcium, on note cependant une activation de l'activité dans la membrane (Tableau 8). A l'opposé, l'activité dans le cytosol diminue notablement (Tableau 10) en réponse au calcium (il y a un effet dose très net). Ce résultat peut-être interprété de deux manières: soit que chez les myoblastes la PKC classique soit localisée sur la membrane, soit que le calcium (comme le TPA pour l'enzyme conventionnelle) provoque la translocation de l'enzyme nPKC cytosolique dans la membrane. Ce résultat n'apparaît pas dans les cellules transfectées, soit que l'augmentation d'activité n'affecte que la nPKC soit que la cellule devienne insensible au calcium.

L'effet du calcium deviendrait alors décelable seulement par son action sur la PKC conventionnelle.

Chez les Balbc/MK c'est la PKC classique qui est l'isoforme principale. La régulation dans le temps inclue la phosphorylation des récepteurs de l'EGF, qui induit une perte rapide de l'affinité. Ceci conduit à la réduction de la prolifération cellulaire (Schessinger, 1986). Deux résultats majeurs sont mis en évidence: i) l'enzyme n'est pas ou peu activée par la présence du virus contrairement à la réponse observée chez les myoblastes (Tableaux 8, 9, 13 et 14). ii) l'augmentation d'activité en réponse au calcium et au DMSO caractéristique de l'induction de la différenciation par ces modulateurs est complètement inhibée par la présence du virus (Figures 39A,B,C,D et Figures 40A,B,C).

Ainsi, dans les deux systèmes cellulaires la réponse de la PKC aux inducteurs de différenciation est inhibée. Par contre, l'augmentation d'activité de l'enzyme est spécifique de la cellule hôte. Elle est liée dans les cellules L6 aussi bien à l'arrêt de la différenciation et à la prévention de la fusion qu'à l'augmentation de la prolifération. Chez les Balbc/MK elle est surtout associée à l'arrêt de la différenciation.

4.4 Calcium intracellulaire

Dans les deux modèles cellulaires étudiés, L6 et Balbc/MK, le calcium induit la différenciation terminale en myocytes et kératinocytes. Le calcium joue également un rôle essentiel dans la prolifération de ces cellules. Il est aussi un effecteur

obligatoire des protéines kinase C conventionnelles qui par ailleurs règlent l'influx de calcium en agissant sur l'ATPase de la pompe calcium.

Le calcium intracellulaire est strictement régulé. Il peut provenir soit de sources extérieure à la cellule, soit des sites intracellulaires où il est séquestré notamment dans le réticulum endoplasmique et peut être les mitochondries.

Les mécanismes de contrôle de la concentration en Ca^{2+} dans le cytoplasme de myoblastes ne diffèrent pas fondamentalement de ceux intervenant dans d'autres cellules excitables. Dans les cellules au repos, la perméabilité de la membrane plasmique pour le Ca^{2+} est faible mais pas nulle, et une petite entrée de Ca^{2+} résulte du gradient électrochimique. Cette entrée est contrebalancée par deux systèmes d'extrusion dont l'importance relative est encore mal précisée: une Ca^{2+} -ATPase (pompe à calcium) contrôlée entre autre par la PKC et un échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ qui participent également à la régulation de la concentration basale de Ca^{2+} ; Le réticulum endoplasmique, peut séquestrer l'ion grâce à une Ca^{2+} -ATPase à haute affinité et les mitochondries, possèdent un système de séquestration à haute capacité mais basse affinité, qui n'intervient que lors d'une augmentation de concentration du Ca^{2+} cytoplasmique. D'autres organites, granules et le cytosquelette sont riches en Ca^{2+} , mais ne paraissent pas impliqués dans le métabolisme à court terme du Ca^{2+} cytoplasmique et leur rôle n'est pas bien établi.

Le calcium est impliqué dans plusieurs processus physiologiques tel que la sécrétion, (Penner et Neher, 1988) la division cellulaire, (Poenie *et al.* 1985, 1986) l'excitabilité neuronale (Miller, 1988) la contraction musculaire via la signalisation

cellulaire où il joue le rôle de second messenger. Le rôle activateur du Ca^{2+} sur la PKC conventionnelle est bien documenté (Takai *et al.* 1979; Kishimoto *et al.* 1980; Nishizuka, 1988; Whitfield, 1990). L'activation de la PKC par le Ca^{2+} nécessite de faibles variations de concentration endogène du cation (Takai *et al.* 1979; Kishimoto *et al.* 1980). Le Ca^{2+} peut provenir du milieu extracellulaire ou du milieu intracellulaire à partir des compartiments intracellulaires dont il est libéré en réponse à certains agonistes (Berridge, 1987). Les variations physiologiques du calcium (Ca^{2+}) cytosolique contrôlent le fonctionnement de la PKC *in vivo*.

De nouvelles techniques en électrophysiologie combinées à la chimie, par exemple l'utilisation des indicateurs de fluorescence sensibles au calcium qui peuvent être chargés facilement dans la cellule (Tsien *et al.* 1982; Grynkiewicz *et al.* 1985) (Grapengiesser *et al.* 1989; Morley *et al.* 1992) et l'imagerie (Poenie *et al.* 1986) ont été développées. De telles techniques ont permis de suivre des changements intracellulaires de calcium dans des temps de l'ordre de la milliseconde dans une cellule vivante mais aussi de suivre l'organisation spatiale du calcium dans le même temps.

La dynamique de processus rapides tels les changements de polarité membranaire liés aux variations de concentration d'ions intracellulaires, peut être ainsi étudiée à partir d'images en déterminant les rapports de fluorescence (Masson, 1991). Par exemple, la concentration en ion Ca^{2+} peut être suivie à l'aide d'un fluorophore, le fura 2, qui montre deux pics d'absorption (340 et 380 nm). Le spectre change avec la liaison de l'ion Ca^{2+} libre au fura-2. Alors que le

premier pic croît, le second décroît avec la quantité de Ca^{2+} lié. Le pic d'émission se situe à 510 nm. L'enregistrement des images obtenues permet d'étudier ces phénomènes rapides dans le temps et dans l'espace. Les images du calcium étant enregistrées par paires à 340 et 380 nm, les différentes images, rapportées à un standard, permettent de déterminer directement la concentration en ion calcium (Masson, 1991) par le rapport d'intensité aux deux longueurs d'onde.

Nous avons établi que le calcium pénètre bien dans la cellule en utilisant un ionophore: l'ionomycine (Figure 46). Cette entrée de calcium est inhibée par un chélateur du Ca^{2+} exogène: l'EGTA (Figure 46). La réponse négative des cellules L6 à la thapsigargine (Figure 46) (Thastrap *et al.* 1990) et à la caféine deux agonistes de la libération du Ca^{2+} des compartiments intracellulaires (Figure 51) (Erne et Hermseyer, 1988; Callewart *et al.* 1989) indique que dans le milieu de prolifération pauvre en calcium, les cellules ne séquestrent pas de calcium dans les compartiments intracellulaires. Ceci est confirmé par la réponse négative ou très faible à l'U-73, 122 (Bleasdale *et al.* 1989) et au TMB8 (Ishihara et Karaki, 1991; Morley *et al.* 1992).

L'augmentation du calcium libre intracellulaire après exposition au calcium exogène et au DMSO provient donc d'un influx de calcium exogène. Dans le modèle L6 l'identification des canaux est difficile. Le fait que l'entrée du calcium n'est bloquée que par le cobalt (Figure 48) montre qu'on est en présence de canaux cationiques non spécifiques. Les bloquants tels que le D600 (Herscheler *et al.* 1982; Lee et Tsien, 1983) sont peu actifs. Ceci démontre qu'il y a peu ou

pas de canaux contrôlés par le voltage à ce stade physiologique des L6. Ceci est confirmé par le peu d'efficacité de la dépolarisation par les fortes concentrations en KCl (Figure 49).

Les canaux des cellules transfectées ont les mêmes propriétés électrophysiologiques, cependant elles emmagasinent un peu de calcium comme l'indique la libération du cation par la thapsigargine (Figure 49). Cette faible séquestration du calcium s'expliquerait par le fait que la concentration en calcium intracellulaire libre est plus élevée dans les cellules transfectées. Nos résultats sont caractéristiques de l'état prolifératif.

Au stade de la préfusion apparaissent les types de canaux sensibles au voltage (Kubo, 1990b) et les canaux dépendant des récepteurs muscariniques (acétylcholine) et des récepteurs adrénergiques (PGE1). Les myoblastes embryonnaires ne possèdent pas de récepteurs d'acétylcholine (Cossu *et al.* 1987). Ces récepteurs apparaissent juste avant la fusion des myoblastes (Entwistle *et al.* 1988). On n'a pas observé de réponse à l'acétylcholine (Figure 50) pour les cellules transformées alors que les cellules normales ont répondu positivement (Figure 50). Ceci confirme bien que la fusion et la différenciation cellulaire terminale (Figure 50) sont inhibées par le HPV16 et cela "date" avec précision le blocage de la différenciation au stade de la préfusion.

L'effet du calcium exogène et du DMSO sur les cellules L6 normales et transfectées montre des différences. En réponse au calcium, le flux de calcium est transitoire (1000 à 1300 sec) dans les cellules L6 et soutenu dans les cellules

transfectées. La réponse est transitoire pour le DMSO mais si elle est coordonnée dans les cellules L6, elle est totalement cahotique dans les cellules transfectées comme c'est illustré par la technique d'imagerie (Figures 57 et 58). Ce résultat est discuté plus loin.

L'amplitude de la réponse aux modulateurs est intéressante. Elle est très élevée dans les dix premières minutes d'exposition au calcium et la régulation intracellulaire se fait très rapidement. Celle au DMSO est plus faible. L'imagerie et la spectrophotométrie ont donné des résultats similaires (Figure 44 et 57).

L'acide rétinoïque favorise aussi l'influx du cation, l'amplitude de la réponse est du même ordre que celle au DMSO dans les cellules transfectées mais pas dans les cellules normales (Figures 27 et 49). D'après nos résultats (Figures 45, 54 et 55), il semblerait que les cellules transfectées aient un pouvoir de régulation du calcium supérieur à celui des cellules normales soit par activation des pompes éliminant le cation soit par séquestration (Tableau 15). Les résultats sur les kératocytes sont trop préliminaires pour mériter une discussion à ce point du travail.

PARTIE C: Communications intercellulaires

Les interactions cellules-cellules sont généralement reconnues comme un facteur important dans le contrôle du cycle cellulaire, de la prolifération et de la différenciation. La progression du programme de différenciation cellulaire et le maintien soit de l'état de prolifération soit de l'état de différenciation, dépend en grande partie des interactions cellules-cellules (Phipps *et al.* 1990).

L'altération des communications cellulaires dans les cellules L6 transformées par le HPV16 a été démontrée par la technique du "scrape loading" (chargement par grattage du colorant "jaune lucifer") (Figure 18). La technique du chargement par grattage du colorant "jaune lucifer" permet une approche d'analyse directe et rapide des communications intercellulaires des cultures cellulaires *in vivo*. Cette technique permet une double évaluation de l'efficacité des communications intercellulaires: d'une part une évaluation qualitative des communications entre cellules et d'autre part une évaluation quantitative par le comptage, dans un champ cellulaire déterminé, des cellules récipiendaires de second ordre du colorant. L'analyse par le programme d'ordinateur, analyse Frap, permet une quantification à plus large échelle. Les résultats obtenus montrent une réduction des échanges cellulaires dans les cellules transformées par le HPV16 (Figure 18). Ces résultats sont consistants avec les données rapportées dans la littérature pour d'autres modèles cellulaires (El Fouly *et al.* 1987; Yamaski, 1991).

L'expression des protéines qui composent les jonctions lacunaires, connexine 43 (Beyer *et al.* 1991 entre autres) a été mesurée par cytométrie de flux (Figure 62). La présence de la connexine 43 chez le rat, puis plus précisément dans les cellules L6 a déjà été démontrée (Beyer *et al.* 1987; Beyer *et al.* 1989; Baloch *et al.* 1991). L'expression de la connexine 43 dans les cellules normales (Figure 62) et dans les cellules HPV16-L6 (Figure 62) a été évaluée. L'expression de la connexine 43 dans les cellules HPV16-L6 est plus faible que dans les cellules L6. Le HPV16 semble altérer les jonctions lacunaires. C'est un phénomène général dans les cellules infectées par des virus comme SV40 et de nombreux autres virus

(Castegioni *et al.* 1991). Les cellules transformées montrent aussi une nette réduction des communications intercellulaires (Yamaski, 1991).

On sait que la régulation négative des jonctions lacunaires sous l'effet de l'ester du phorbol (TPA) se produit via la PKC (Yin oh *et al.* 1991). Ainsi, l'élévation de l'activité PKC dans les cellules HPV16-L6 pourrait expliquer la réduction des communications cellulaires observées dans ces cellules ainsi que la réponse cahotique de ces cellules au calcium et au DMSO. En effet le Ca^{2+} libre intracellulaire se propage de manière synchrone dans la population des cellules normales analysées (Figure 58). Ceci se traduit par une réaction uniforme des cellules normales exposées au DMSO. Par contre la réponse cahotique et asynchrone des cellules transformées peut s'expliquer par l'hétérogénéité engendrée par la pauvreté des communications intercellulaires. Dans le premier cas, les cellules répondent comme un champ cellulaire homogène (Figure 58), dans le deuxième cas la réponse est de type individuel asynchronisé (Figure 58). Le contrôle du patron des oscillations du Ca^{2+} par les jonctions lacunaires a été rapporté par Muallen *et al.* 1993. La réponse au calcium est atténuée par rapport à celle du DMSO parce que le calcium exogène est connu pour ouvrir les jonctions lacunaires.

Basée sur nos conclusions, la relation entre les différents processus qui semblent concourir à l'immortalisation et la transformation des L6 transfectées est schématisée dans la Figure 63. Ces schémas seront expliqués dans la conclusion de cette thèse.

CONCLUSIONS

Les résultats obtenus dans le cadre de ces recherches confirment les hypothèses de travail que nous avons émises au début. Nos conclusions découlent d'une étude détaillée d'un modèle cellulaire inductible de différenciation (myoblastes murins) transfecté par le génome complet du HPV16 et de la comparaison avec un second modèle embryonnaire: kératinocytes murins.

1. Une relation a été établie entre l'expression de marqueurs spécifiques et la différenciation spontanée et induite des myoblastes de rat. Elle a permis l'établissement de relations entre les étapes du programme de différenciation et l'évolution de processus cellulaires liés à l'une des voies majeures de la signalisation. Elle a également permis de déterminer avec précision le stade de différenciation bloqué par le HPV16.

2. L'étude de la transcription du virus montre une expression différentielle et transitoire des différents cadres ouverts de lecture (ORFs). Une relation entre l'expression des divers gènes viraux et l'état de différenciation des cellules est démontrée. La transcription du gène E1 est limitée aux stades peu différenciés. Le maximum d'expression des autres ARNs se situe entre les jours 3 et 6. Cette observation a été confirmée par immunodétection en cytométrie de flux. Après le jour 9, seul le gène E7 continue d'être exprimé.

3. Le HPV16 bloque la différenciation. Nous avons pu déterminer avec précision le stade de blocage au moment où les cellules ont acquis la bipolarité et où une partie de la population est alignée. Ce stade est antérieur à la préfusion. Cette conclusion est établie grâce au fait que le marqueur vimentine qui cesse d'être

exprimé au stade préfusion, continue d'être présent jusqu'à la fin des expériences dans les cellules transfectées par le HPV16. De même, le canal calcium activé par l'acétylcholine très spécifique du stade de préfusion n'est exprimé que chez les contrôles. Le blocage de la différenciation peut être responsable de la dérégulation de la croissance des cellules.

4. Les cellules transfectées sont immortalisées et transformées comme plusieurs de nos résultats semblent l'indiquer: les cellules perdent leur dépendance vis à vis des hormones de croissance, elles peuvent croître en suspension et forment des colonies sur les milieux semi-solides. Enfin, on peut trouver des réarrangements chromosomiques spécifiques dans toutes les cellules et des doubles minutes dans 50% des karyotypes des cellules L6 examinés. Nous n'avons pas fait d'expérience *in vivo* pour tester la tumorigénicité.

5. Il semble que la signalisation cellulaire soit responsable⁴ directement ou indirectement du blocage de la différenciation, de l'immortalisation et peut être de la transformation en coopération avec des oncogènes cellulaires.

L'enzyme nPKC Θ est l'enzyme suractivée dans les cellules HPV16-L6. Elle semble directement associée à l'augmentation de la prolifération mais pourrait agir par son action négative sur les communications intercellulaires qui sont largement altérées. En effet, une réduction des échanges par les jonctions lacunaires est toujours liée à une augmentation de la prolifération cellulaire. En outre, bien que non impliquée dans la différenciation cellulaire des myocytes (c'est la calmoduline - kinase C qui en est l'élément majeur) l'activation de la nPKC Θ pourrait être

responsable de l'inhibition de la fusion des myocytes. L'inhibition de la fusion par une PKC suractivée a été démontrée par d'autres auteurs dans un autre modèle cellulaire. L'hyperactivité de l'enzyme pourrait donc être l'agent causal de l'arrêt de la différenciation au stade préfusion. Enfin l'enzyme pourrait contribuer à un dérèglement de la transcription par son activité au niveau nucléaire. Le patron d'inhibition de l'enzyme nous conduit à penser que sa dérégulation se produit en amont par une activation de la phospholipase C.

6. Le blocage de la différenciation par le virus a été confirmé dans un autre modèle cellulaire (les kératinocytes murins) que nous avons transfecté. Les inducteurs de la différenciation sont sans effet sur ces cellules. La PKC conventionnelle propre à ces cellules ne répond plus aux inducteurs, mais elle n'est pas hyperrégulée en présence du virus.

7. Enfin, les perturbations montrées par le métabolisme du calcium indiquent que ce messager secondaire crucial pour la différenciation des L6 ne remplit plus, ou mal, son rôle dans les HPV16-L6.

On peut donc dire que le virus bloque la différenciation dans deux modèles cellulaires, mais que la réponse de la PKC est spécifique de l'hôte. Sur la base de nos résultats, nous proposons un schéma résumant le mode d'action possible du virus (Figure 63).

Dans les myoblastes (Schéma 63A)

1. Milieu prolifératif: Le calcium n'est que peu ou pas accumulé dans les compartiments. Si la PLC est activée sous l'influence du HPV16, la nPKC θ qui dépend de DAG et plus faiblement les PKC conventionnelles seront activées. Ce qui est le cas. L'élévation du taux de calcium n'est pas nécessaire puisque la nPKC θ ne dépend pas de ce cation. Par contre, l'élévation du calcium par libération du calcium des compartiments est un prérequis pour la fusion. Ni les contrôles, ni les cellules transfectées ne pourront fusionner dans ces conditions, donc la prolifération associée à l'augmentation d'activité de la nPKC θ persistera.

2. Milieu de différenciation: Le calcium s'accumule dans les compartiments, mais l'activité de la nPKC θ décroît suggérant une diminution de l'activité PLC. Dans les cellules transfectées 3 alternatives fonctionnant individuellement ou en combinaison sont possibles pour expliquer le blocage de la fusion.
 - i) l'activité de la PLC ne génère plus assez de IP3 pour libérer le calcium des compartiments ,

 - ii) les récepteurs muscariniques (acétylcholine) ne sont pas exprimés ou ne sont pas fonctionnels,

 - iii) les pompes libérant le calcium du réticulum endosarcoplasmique sont altérées.

Dans les kératinocytes (Schéma 63B)

Ces cellules ne possèdent que la PKC conventionnelle, dépendant du calcium. D'après nos résultats l'activité de la PKC n'est pas activée par le virus, même en présence de calcium exogène, alors que l'enzyme des témoins Balbc/MK répond au calcium. Dans les cellules HPV16-Balbc/MK, une activation de la PLC ne produirait d'effet sur la PKC que si le calcium peut être libéré des compartiments or aucune activation n'est observée. De plus, la réponse au calcium exogène qui devrait libérer le calcium des compartiments et augmenter l'activité PKC ne se produit pas. Ces observations suggèrent encore un blocage du calcium libéré du réticulum endoplasmique. Il semblerait donc que bien que l'on obtienne une réponse spécifique de l'hôte, le blocage de la différenciation dans les deux systèmes étudiés relève du même processus, une altération de la régulation du calcium intracellulaire.

FIGURE 63 Schéma hypothétique illustrant les processus impliqués dans la stimulation de la prolifération et le blocage de la différenciation par le virus du papillome humain type 16 (HPV16) dans les cellules L6 (A) et les kératinocytes (Balbc/MK)(B). Récepteur (R), acétylcholine (Ach), complexe protéine G (G), phosphate inositol 4,5-biphosphate (PIP2), diacétylglycérol (DAG), inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), phospholipase C (PLC), réticulum sarcoplasmique (RS), protéine kinase C (PKC), jonction lacunaire (GJ).

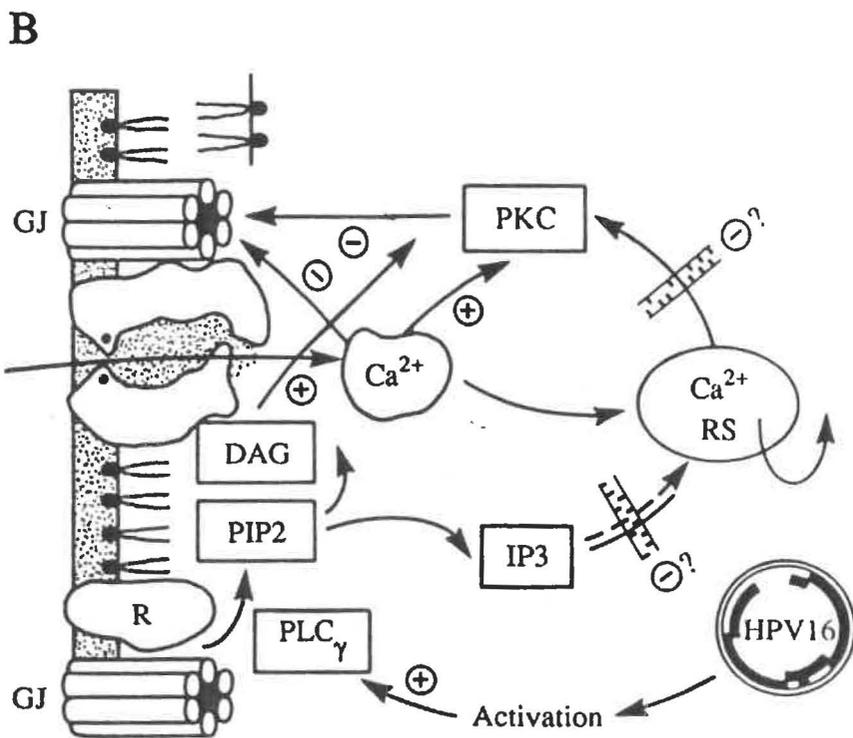
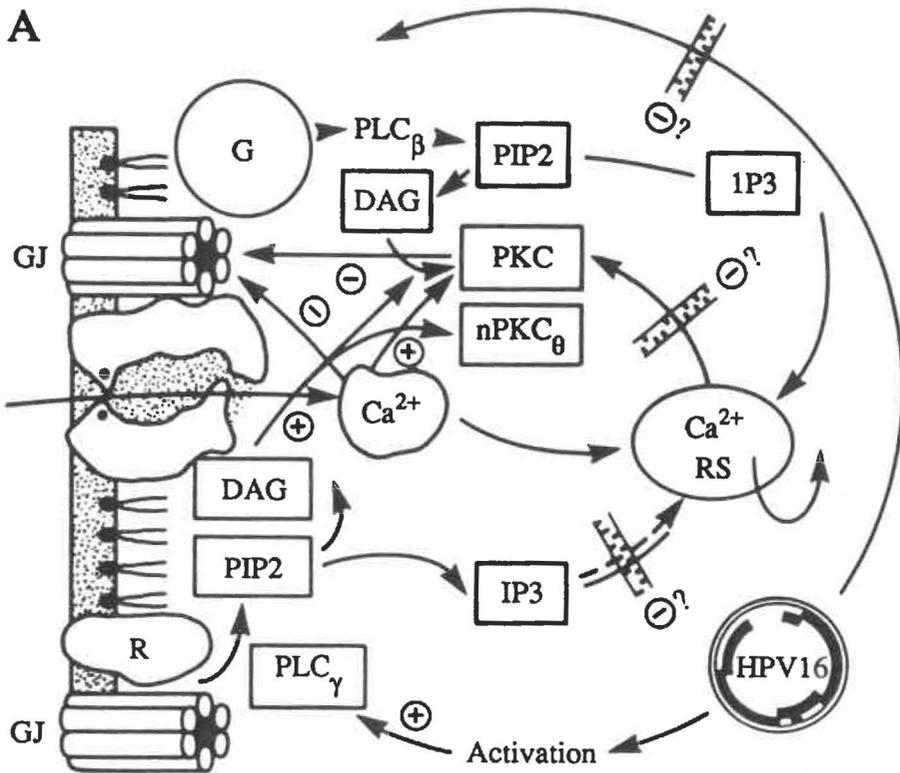
Cellules L6 (A):

Dans le cas où le virus activerait la phospholipase γ (PLC) qui dégrade le PIP2 en IP3 et DAG: si la PKC impliquée dans la prolifération des myoblastes est bien une isoforme indépendante du calcium (nPKC Θ), elle sera largement activée par l'augmentation du taux de DAG (diacylglycérol). La PKC conventionnelle par contre, ne sera pas activée si la libération du calcium de ses compartiments est inhibée ou si le virus inhibe la voie menant à la phospholipase β via la protéine G. Cette voie, n'est pas utilisée en effet, puis qu'elle dépend du récepteur de l'acétylcholine qui n'est pas exprimé chez HPV16-16.

Cellules Balbc/MK (B):

Dans ces cellules seule la PKC conventionnelle dépendant du DAG et du Ca²⁺ est présente. Si le virus active la phospholipase γ , il faut invoquer un blocage de la libération du calcium de ses compartiments internes pour expliquer l'absence d'activation de la PKC conventionnelle.

Selon ce schéma, dans le cas de A, la PKC conventionnelle ne sera pas non plus activée, mais une large augmentation de l'activité nPKC Θ sera observée.



REMERCIEMENTS

Je veux adresser mes remerciements les plus sincères aux directeurs de l'Institut Armand Frappier (IAF), le Centre de Lutte contre la Maladie (LCDC) et le Conseil National de Recherches du Canada (CNRC) pour m'avoir fait bénéficier des facilités nécessaires à la réalisation de ce travail, ainsi qu'au directeur du Centre de recherche en virologie pour avoir accepté ma candidature au doctorat en virologie dans le cadre des études graduées en virologie.

Je tiens à remercier, en premier lieu, les Drs. Jenny Phipps et Maximilien Arella pour avoir dirigé mes travaux de façon enrichissante. De plus, ils ont su me prodiguer un enseignement, des conseils et un sens du travail acharné qui ont grandement influencé le développement et l'aboutissement de ce projet. Je voudrais leur témoigner ma très vive gratitude et ma reconnaissance pour l'aide et l'encouragement qu'ils m'ont apporté et pour le dynamisme qu'ils ont manifesté au cours de ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier le docteur Christian Poirel, ancien directeur de mes travaux de recherches, pour ses inestimables conseils et sa confiance.

Mes remerciements s'adressent également à Ginette Larose, André Levac et Tom Devecseri pour l'aide qu'ils ont apportée dans l'illustration de cette thèse.

Je veux exprimer ma reconnaissance à l'endroit de Mme Kathy Hamelin qui a réalisé la dactylographie de cette thèse et des manuscrits qui s'y rattachent.

Je tiens à remercier le Dr. Simon Garzon et Monsieur Robert Alain pour les expériences de microscopie électronique.

Je remercie Monsieur Bob Toews de la section conception électronique et le Dr. Michael Zuker de la section structure et modélisation du service d'informatique du CNRC pour leur aide précieuse dans l'analyse informatisée des séquences et traitements de données sur ordinateurs.

Il me faut mentionner également l'apport important de tout le personnel des bibliothèques de l'IAF et du CNRC et notamment à Marlyne Thibeault, qui m'ont permis de consulter une littérature abondante et parfois difficile d'accès.

Mes remerciements vont également à tout le personnel scientifique et technique de l'Institut Armand Frappier (IAF) et du Conseil National de Recherches du Canada (CNRC) et plus particulièrement aux membres du centre de recherche en virologie de l'IAF et du groupe de signalisation cellulaire du CNRC, pour leur collaboration des plus enrichissantes et leur disponibilité en toute occasion.

À tous ceux et celles qui ont été mêlés de près ou de loin à la réalisation de ce travail, je veux exprimer toute ma reconnaissance.

J'adresse mes remerciements à la commission des bourses de l'Institut Armand-Frappier ainsi qu'à la Société Canadienne de la Croix Rouge (CRCS) pour le support financier qu'ils m'ont octroyé tout au long de mes études.

Je désire accorder ici une pensée toute particulière au défunt docteur Armand-Frappier, fondateur de l'Institut qui porte fièrement son nom, pour son grand humanisme, son rayonnement mondial, et le dynamisme scientifique dont il a fait preuve tout au long de sa vie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES

- ABBEIT, J.M., K. MÜNGER, P.M., HOWLEY et D. HANANHAN. 1993. Neuroepithelial carcinomas in mice transgenic with human papillomavirus type 16 E₆/E₇ ORFs. *Am. J. Pathol.* 142: 1187-1197.
- ABERCROMBIE, M., J.E.M. HEAYSMAN et S. PEGRUM. 1971. The locomotion of fibroblasts. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp. Cell Res.* 67: 359-367.
- ADACHI, A., H. YASUE, M. OHASHI et M. ISHIBASHI. 1986. A novel type of human papilloma virus DNA from the lesion of epidermodysplasia verruciformis. *Jpn. J. Cancer Res.* 77: 978-982.
- ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS et J.D. WATSON. 1986. *Biologie moléculaire de la cellule*. Flammarions Ed., Paris. France. pp. 1-1146.
- ALI, I.U. et R.O. HYNES. 1977. Effects of cytochalasin B and colchicine on attachment of a major surface protein of fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 471: 16-24.
- ALI, I.U., V. MAUTNER, R. LANZA et R.O. HYNES. 1977. Restoration of normal morphology: adhesion and cytoskeleton in transformed cells by addition of a transformation-sensitive surface protein. *Cell* 11: 115-126.
- AMTMANN, E. et G. SAUER. 1982. Bovine papillomavirus transcription: polyadenylated RNA species and assessment of the direction of transcription. *J. Virol.* 43: 59-64.
- ANCESCHI, M.M., C. FALCINELLI, M. PIERETTI et E.M. COSMI. 1990. Multiple primer pairs polymerase chain reaction for detection of human papillomavirus types. *J. Virol. Meth.* 28: 59-66.
- ANDROPHY, E.J., D.R. LOWRY et J.T. SCHILLER. 1987. Bovine papillomavirus E2 trans-acting gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature (London)* 325: 70-72.
- ANDROPHY, E.J., J.T. SCHILLER et D.R. LOWRY. 1985. Identification of the protein encoded by the E6 transforming gene of bovine papillomavirus. *Science* 230: 442-445.

- ARGENTIN, S., M. NEMER, J. DROUIN, G.K. SCOTT, B.P. KENEDY et P.L. DAVIES. 1985. The gene for rat atrial natriuretic factor. *J. Biol. Chem.* 260(8): 4568-4571.
- AUBORN, K.J. et B.M. STEINBERG. 1990. Therapy of papillomavirus - induced lesions. In: *Papillomaviruses and Human Cancer*. Pfister, H. Ed., Boca Raton. CRC Press. USA. pp: 203-220.
- AUERSPERG, N. et C. ROSKELLEY. 1991. Retroviral oncogene: Interrelationships between neoplastic transformation and cell differentiation. *Crit. Rev. Oncog.* 2(2): 125-160.
- BACHER, N., Y. ZISMAN, E. BERENT et E. LIVNEH. 1991. Isolation and characterization of PKC-L, a new member of the protein kinase C-related gene family specifically expressed in lung, skin, and heart. *Mol. Cell. Biol.* 11: 126-133.
- BAKER, C.C. 1987. Papillomaviruses sequences. In *The papovaviridae. Volume 2: The papillomavirus*. Salzman, N.P. et Howley, P.M. (Eds.) Plenum Press. New York. USA. pp. 1-392.
- BAKER, C.C. et P.J. HOWLEY. 1987. Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. *EMBO J.* 6: 1027-1032.
- BALOCH, S., C.C.G. NAUS, J. BECHBERGER et P.A. MERRIFIELD. 1991. Expression of gap junction mRNA and protein in rat skeletal muscle and cultured rat L₆ myoblasts. *Anat. Rec.* 229(4): 8A.
- BAND, V., J.A. DE CAPAIO, L. DELMOLINO, V. KULESA et R. SAGER. 1991. Loss of P53 protein in human papillomavirus type 16 E6 - immortalized human mammary epithelial cells. *J. Virol.* 65(12): 6671-6676.
- BANKS, B.L., G. MATLASHEVSKI, D. PIM, M. CHURCHER, C. ROBERTS et L. CRAWFORD. 1987a. Expression of human papillomavirus type 6 and type 16 capsid protein in bacteria and their antigenic characterization. *J. Gen. Virol.* 68: 3081-3089.
- BANKS, L., P. SPENCE, E. ANDROPHY, N. HUBBERT, G. MATLASHEVSKI, A. MURRAY et L. CRAWFORD. 1987b. Identification of human papillomavirus type 18E6 polypeptide in cells derived from human cervical carcinomas. *J. Gen. Virol.* 68: 1351-1359.
- BANKS, L., F. MOREAU, K. VOUSDEN, D. PIM et G. MATLASHEVSKI. 1991. Expression of human papillomavirus E7 oncogene during cell transformation is sufficient to induce susceptibility to lysis by activated macrophages. *J. Immunology* 146(6): 2037-2042.

- BAVIN, P.J., J.A. GILES, A. DEERY, J. CROW, P.D. GRIFFITHS, V.C. EMERY et P.G. WALKER. 1993. Use of semi-quantitative PCR for human papillomavirus DNA type 16 to identify women with high grade cervical disease in a population presenting with a mildly dyskaryotic smear project. *Br. J. Cancer* 67(3): 602-605.
- BEAM, K.G. et C.M. KNUDSON. 1988. Effect of postnatal development on calcium currents and slow charge movement in mammalian skeletal muscle. *Journal of General Physiology* 91: 799-815.
- BEAUDENON, S., D. KREMSDORF, O. CROISSANT, S. JABLONSKA, S. WAIN-HOBSON, et G. ORTH. 1986. A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature (London)* 321: 246-249.
- BEAUDENON, S., F. PRAETORIUS, D. KREMSDORF, M. LUTZNER, N. WORSAAE, G. PEHAU-ARNAUDET et G. ORTH. 1987a. A new type of human papillomavirus associated with oral focal epithelial hyperplasia. *J. Invest. Dermatol.* 88: 130-134.
- BEAUDENON, S., D. KREMSDORF, S. OBALEK, S. JABLONSKA, G. PEHAU-ARNAUDET, O. CROISSANT et G. ORTH. 1987b. Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology*. 161: 374-379.
- BECKER-ANDRÉ, M. et K. HAHLBROCK. 1989. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (Patty). *Nucleic Acids Res.* 17: 9437-9446.
- BERRIDGE, M.J. 1987. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 159-193.
- BERRIDGE, M.J. 1988. Inositol triphosphate induce membrane potential oscillation in xynopus oocytes. *J. Physiol.* 403: 589-599.
- BERRIDGE, M.J. 1993. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361: 315-324.
- BERG, J.W. et J.G. LAMPE. 1981. High-risk factors in gynecologic cancer. *Cancer* 48: 429-441.
- BERG, L., M. LUSKY, A. STENLUND et M.R. BOTCHMAN. 1986. Repression of bovine papillomavirus replication is mediated by a virally encoded trans-acting factor. *Cell* 46: 753-758.
- BEYER, E.C., D.L. PAUL et D.A. GOODENOUGH. 1987. Connexin 43: A protein from rat heart homologous to Gap Junction protein from liver. *J. Cell. Biol.* 105(6): 2621-2629.

- BEYER, E.C., J. KISTLER, D.L. PAUL et D.A. GOODENOUGH. 1989. Antisera directed against connexin 43. Peptides react with a 43-KD protein localized to Gap Junction in myocardium and other tissues. *J. Cell. Biol.* 108: 595.
- BEYER, E.C. et T.H. STEINBERG. 1991. Evidence that the Gap Junction protein connexin-43 is the ATP-induced probe of mouse macrophages. *J. Biol. Chem.* 266(13): 7971-7974.
- BIRNBOIM, H.C. et J. DOLY. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513.
- BISHOP, J.M. 1981. Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes. *Cell* 23: 5-6.
- BLEASDALE, J.E, G.L. BUNDY, S. BUNTING, F.A. FITZPATRICK, R.M. HUFF, F.F. SUN et J.E. PIKE. 1989. Inhibition of phospholipase C dependent process by U-73, 122. *In* Advances in prostaglandin, thromboxane and leukotriene research. Volume 19. Samuelsson, B., Wong, P.Y.-K. et Sun, F.F. Eds, New York. Raven Press. pp. 590-594.
- BLOHME, I. et H. BRYUGER. 1985. Malignant disease in renal transplant patients. *Transplantation* 39: 23-25.
- BOER, P.H., C.N. ADRA, Y.F. LAU et M.W. MCBURNEY. 1987. The testis-specific phosphoglycerate kinase gene, pgk-2, is a recruited retroposon. *Mol. Cell. Biol.* 7: 3107-3112.
- BOER, P.H., H. POTTEN, C.N. ADRA, K. JARDINE, G. MULLHOFER, et M.W. MCBURNEY. 1990. Polymorphisms in the coding and noncoding regions of murine pgk-1. *Alleles Bioch. Gen.* 28(5/6): 299-308.
- BOSHART, M., L. GISSMANN, H. IKENBERG, A. KLEINHEINZ, W. SCHEUERLEN, et H. ZUR HAUSEN. 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3: 1151-1157.
- BOULIS, N.M. et M. DAVIS. 1990. Blockade of the spinal excitatory effect of cyclic AMP on the startle reflex by interathecal administration of the isoquinoline sulfamide H-8 comparison to the protein kinase C inhibitor H-7. *Brain Res.* 525(2): 198-204.
- BOYLE, W.F., J.L. RIGGS, J.S. OSHIRO et E.H. LENNETTE. 1973. Electron microscopic identification of papovirus in laryngeal papilloma. *Laryngoscope* 83: 1102-1106.

- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 218-254.
- BREEDIS, C., L. BERWICK et T.F. ANDERSON. 1962. Fractionation of Shope papilloma virus in cesium chloride density gradients. *Virology* 17: 84-94.
- BREITBURD, F.V. 1987. Cell culture systems for the study of papillomaviruses. In: *Papillomaviruses and Human Diseases*. Syrjänen, K., L. Gissmann et L.G. Koss Eds., New York. Springer-Verlag. USA. pp. 372-389.
- BROKER, T.R. et M. BOTCHAN. 1986. Papilloma viruses: retrospectives and prospectives. *Cancer Cells*. 4: 17-22.
- BROWNE, H.M., J.M. CHURCHER, M.A. STANLEY et A.C. MINSOR. 1988. Analysis of the L₁ gene product of human papillomavirus type 16 by expression in vaccinia virus recombinant. *J. Gen. Virol.* 69: 1263-1273.
- BUTEL, J.S. 1972. Studies with human papillomavirus modeled after known papovavirus systems. *J. Natl. Cancer Inst.* 48: 285-289.
- CAFFREY, J.M., A.M. BROWN et M.D. SCHNEIDER. 1989. Ca²⁺ and Na⁺ currents in developing skeletal myoblasts are expressed in a sequential program: reversible suppression by transforming growth factor beta-1, an inhibitor of the myogenic pathway. *J. Neurosci.* 9: 3443-3453.
- CALLEWARET, G., L. CLEEMANN et M. MORAD. 1989. Caffeine-induced Ca²⁺ release activates Ca²⁺ extrusion via Na⁺-Ca²⁺ exchanger in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 257: C147-C152.
- CAMPOS, M.S., M.H. MOAR, W.F.H. JARRET et H.M. LAIRD. 1980. A new papillomavirus associated with alimentary cancer in cattle. *Nature (London)* 286: 180-182.
- CADRIN, M., S.W. FRENCH et P.T.T. WONG. 1991. Alteration in molecular structure of cytoskeleton proteins in griseofulvin-treated mouse liver: a pressure tuning in spectroscopy study. *Exp. Mol. Pathol.* 55(2): 170-179.
- CASTEGLIONI, E.T., R. BARHOUMI, C.S. ARMSTEAD, K.A. CLARY, E.W. COLLISON et R.C. BURGHARDT. 1991. Cache Valley Virus - Induced alterations in cell-cell communication and calcium homeostatis in L₆ muscle cells. *J. Cell. Biol.* 115(3 part 2): 192A.
- CHAKRAVARTHY, B.R., A. BUSSEY, J.F. WHITFIELD, M. SIKORSKA, R.E. WILLIAMS et J.P. DURKIN. 1991. The direct measurement of protein kinase C (PKC) activity in isolated membranes using a selective peptide substrate. *Anal. Biochem.* 194: 1-7.

- CHAN, S-Y., L. HO, C-K. ONG, V. CHOW, B. DRESCHER, M. DÜRST, J. MEULEN, L. VILLA, J. LUANDE, H.N. MGAYA. 1992. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with human kind. *J. Virol.* 66: 2057-2066.
- CHANDRA, S., D. CROSS, Y-C. LING et G.H. MORRISON. 1989. Quantitative imaging of free and total intracellular calcium in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1870-1874.
- CHEN, E.Y., P.M. HOWLEY, A.D. LEVINSON, et P.H. SEEBURG. 1982. The primary structure and genetic organization of bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature (London)* 299: 529-534.
- CHENG, H. et C.P. LEBLANC. 1974. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. *Am. J. Anat.* 141: 537-562.
- CHEUNG, W.Y. 1970. Cyclic 3'5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38: 533-538.
- CHIN-YIH, O.U., S. KWOR, S.W. MITCHELL, D.H. MACK, J.J. SNINSKY, J.W. KREHS, P. FEORINO, D. WARFIELD et G. SKHOCHETMAN. 1988. DNA amplification for direct detection of HIV in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science.* 239: 295-297.
- CHOO-K.-B., K.Y. CHONG, L.-N. LIEW, H.-C. HSU et W.T.K. CHENG. 1992. Uregulated and basal transcriptional activities of the regulatory sequence of the type 18 human papillomavirus genome in transgenic mice. *Virology* 188: 378-383.
- CHOW, V.T.K., K.M. THAM et H.U. BERNARD. 1990. *Thermus aquaticus* DNA polymerase catalysed chain reaction for the detection of human papillomavirus. *J. Virol. Methodol.* 27: 101-112.
- CHRISTENSEN, J.B. et W.W. BROCKMAN. 1982. Effect of large and small T antigens on DNA synthesis and cell division in similar virus 40-transformed Balbc 3T3 cells. *J. Virol.* 44: 574-585.
- CHU, G., H. HAYAKAWA et BERG. 1987. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucl. Ac. Res.* 15: 1311-1326.
- CIUFFO, G. 1907. Innesto positivo con filtrato di verra vulgare. *G. Ital. Mal. Venereol.* 48: 12-17.
- CLERTANT, P. et I. SEIF. 1984. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins. *Nature (London)* 311: 276-279.

- COGGIN, J.R. et H. ZUR HAUSEN. 1979. Workshop on papillomaviruses and cancer. *Cancer Res.* 39: 545-546.
- COGNARD, C., M. LAZDUNSKI, et G. ROMEY. 1986. Different types of Ca²⁺ channels in mammalian skeletal muscle cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 517-521.
- CORNELISSEN, M.T., H.L. SMITS, M.A. BRIZET, J.G. VAN DEN TWEEL, A.P. STARUYK, J. VAN DER NOODAA et J. TER SCHEGGET. 1990. Uniformity of the slicing pattern of the E6/E7 transcripts in human cervical premalignant lesions and carcinoma. *J. Gen. Virol.* 71: 1243-1246.
- COSSU, G., F. EUSEBI, F. GRASSI et E. WANKE. 1987. Acetylcholine receptor channels are present in undifferentiated satellite cells but not in embryonic myoblasts in culture. *Devel. Biol.* 123: 43-50.
- COUSSENS, L., P.J. PARKER, L. RHEE, T.L. YANG-FENG, E. CHEN, M.D. WATERFIELD, U. FRANKE et A. ULLRICH. 1986. Multiple distinct formula of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* 233: 859-866.
- COVAULT, J., J.P. MERLIE, C. GORIDIE, et J.R. SANES. 1986. Molecular forms of neuronal cell adhesion molecular and its RNA in developing and derivatived skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 102(3): 731-739.
- CRAWFORD, L.V. et E.M. CRAWFORD. 1963. A comparative study of polyoma and papilloma viruses. *Virology* 21: 258-263.
- CRAWFORD, L.V. 1965. A study of papilloma virus DNA. *J. Mol. Biol.* 13: 362-372.
- CRIEP, A.E., R. HERBER, S. JEON, J.K. LOHSE, R.R. DUBIELZIG et P.F. LAMBERT. 1993. Tumorigenicity by human papillomavirus type 16 E6 and E7 in transgenic mice correlates with alterations in epithelial cell growth and differentiation. *J. Virol.* 67(3): 1373-1384.
- CROISSANT, O., F. BREITBURD, et G. ORTH. 1985. Specificity of cytopathic effect of cutaneous human pailomaviruses. *In: Clinics in Dermatology*. S. Jablonska and G. Orth Eds., Philadelphia. Vol. 3, pp. 43-55.
- CROOK, T., J.A. TIDY et K.H. VOUSDEN. 1991. Degradation of 53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell* 67(3): 547-556.

- CRUM, C.P., M. MITAO, R.J. LEVINE et S. SILVERSTEIN. 1985. Cervical papillomaviruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions. *J. Virol.* 54: 675-701.
- DABROWSKA, R., J.M.F. SHERRY, D.K. AROMATORIO, et D.J. HARTSHORNE. 1978. Modulator protein as a component of the myosin light chain kinase from chicken gizzard. *Biochemistry* 17: 253-8.
- DAGNINO, L., J. DROUIN et M. NEMER. 1991. ANF and iso ANF gene expression in tissues. *Mol. End.* 5(9): 1292-1300.
- DALLAS, P.B., J.L. FLANAGAN, B.N. NIGHTINGALE et B.J. MORIS. 1989. Polymerase chain reaction for fast, non radioactive detection of high and low-risk papillomavirus type in routine cervical specimens and biopsies. *J. Med. Virol.* 27: 105-111.
- DANOS, O., M. KATINKA, et M. YANIV. 1982. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.* 1: 231-236.
- DARNELL, J., H. LODISH et D. BALTIMORE. 1988. *La cellule: Biologie moléculaire*. Decaire Ed., Quebec. pp. 1-1189.
- DARTMANN, K., E. SCHWARZ, L. GISSMANN et H. ZUR HAUSEN. 1986. The nucleotide sequence and genome organization of human papillomavirus type 11. *Virology* 151: 124-130.
- DAVID, J.D., C.R. FRASER et G.P. PERROT. 1990. Role of protein kinase C in chick embryo skeletal myoblast fusion. *Dev. Biol.* 139: 89-99.
- DAVIS, L.G., M.D. DIBNER, et J.F. BATTEY. 1986. *Basic methods in molecular biology*. Elsevier, N.Y. USA. pp. 1-388.
- DE, B.P., A. LESOON et A.K. BANERJEE. 1991. Human parainfluenza virus type 3 transcription *in vitro*: role of cellular action in mRNA synthesis. *J. Virology* 65(6): 3268-3275.
- DELFINO, V.P., F. POTANTE, E. VACEA, T. LETTINI, P. RAGONE et R. RICCO. 1990. Shape evaluation in medical image analysis. *Eur. Microsc. Anal.* 7: 21-24.
- DELLA TORRE, G., S. PILOTTI, G. DE PALO, et F. RILKE. 1978. Viral particles in cervical condylomatous lesions. *Tumori* 64: 459-463.
- DELMMLER, G.J., J. GREGORY, C.M. SCHIMBOR ET R.A. MAY. 1988. Detection of cytomegalovirus in urine from newborn by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J. Inf. Diseases* 158(6): 1177-1184.

- DENIS, M., K. CHADEE et G. MATLASHEVSKI. 1989. Macrophage killing of human papillomavirus type 16 transformed cells. *Virology*. 170: 342-345.
- DESAINTES, C., S. HALLEZ, P. VAN ALPHEN et A. BURNY. 1992. Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 66(1): 325-333.
- DE VILLIERS, E.M., L. GISSMANN et H. ZUR HAUSEN. 1981. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J. Virol.* 40: 932-935.
- DE VILLIERS, E.M., D. WAGNER, A. SCHNEIDER, H. WESCH, H. MIKLAW, J. WAHRENDORF, U. PAPENDICK et H. ZUR HAUSEN. 1987. Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet* 2: 703-706.
- DE VILLIERS, E.M., A. HIRSCH-BEHNAM, Ch. V. KNEBEL-DOEBERITZ, Ch. NEUMANN et H. ZUR HAUSEN. 1989. Two nearly identified human papillomavirus types (HPV40 and 57) isolated from mucosal lesions. *Virology* 171: 248-252.
- DEWREY, M.M. et L. BARR. 1962. Intercellular connection between smooth muscle cells. *The Nexus. Science.* 137: 670-674.
- DICKSON, G., D. PECK, S.E. MOORE, C.H. BARTON et F.S. WALSH. 1990. Enhanced myogenesis in NCAM-transfected mouse myoblasts. *Nature* 344: 348-351.
- DOHERTY, P.J., M. HUESCA-CONTRERAS, H.M. DOSCH et S. PAN. 1989. Rapid amplification of complementary DNA from small amounts of unfractionated RNA. *Analyt. Biochem.* 177: 7-10.
- DOORBAR, J. et P.H. GALLIMORE. 1987. Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J. Virol.* 61: 2793-2798.
- DOORBAR, J., D. CAMPBELL, R.J.A. GRAND et P.H. GALLIMORE. 1986. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J* 5: 355-362.
- DUNN, A.E.G. et M.M. OGILVIE. 1968. Intranuclear virus particles in human genital wart tissue: observations on the ultrastructure of the epidermal layer. *J. Ultrastr. Res.* 22: 282-284.
- DÜRST, M., R.T. DZARLIEVA-PETRUSEVSKA, P. BOUKAMP, N.E. FUSENIK et L. GISSMANN. 1987. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* 1: 251-256.

- DÜRST, M., L. GISSMANN, H. IKENBERG, et H. ZUR HAUSEN. 1983. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3812-3815.
- DYSON, N., P.M. HOWLEY, K. MÜNGER, et E. HARLOW. 1989. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-937.
- EBASHI, S. et A. KODAMA. 1965. A new protein function promoting aggregation in tropomyosin. *J. Biochem.* 58: 107-8.
- EDELMAN, G.M. 1986. Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 2: 81-116.
- EL FOULY, M.H., J.E. TROSKO and C.C. CHANG. 1987. Scrape loading and dye transfer: a rapid and simple technique to study gap junctional intracellular communication. *Exp. Cell. Res.* 168: 422-430.
- ELMENDORF, S., J. MCSHARRY, J. LAFFIN, D. FOGLEMAN et J.M. LEHMAN. 1988. Detection of an early cytomegalovirus antigen with two color quantitative flow cytometry. *Cytometry* 9: 254-260.
- ENDO, T. et B. NADEL-GINARD. 1987. Three types of muscle-specific gene expression in fusion-blocked rat skeletal muscle cells: translational control in EGTA-treated cells. *Cell* 49: 515-526.
- ENGEL, L.W., C.A. HEILMAN et P.M. HOWLEY. 1983. Transcriptional organization of bovine papillomavirus type 1. *J. Virol.* 47: 516-528.
- ENNAJI, M.M., J. PHIPPS, R. McRAE, A. MERZOUKI, J. CAMPIONE et M. ARELLA. 1992a. High efficient strategy for amplification, cloning and expression of different HPV16 open reading frames (ORFs) using polymerase chain reaction (PCR). *Recent Adv. Cell. Mol. Biol.* 2: 53-65.
- ENNAJI, M.M., M. ARELLA, B. CHAKRAVARTHY, R. McRAE, S. SCOTT, J. WHITFIELD, J. DURKIN and J. PHIPPS. 1992b. A putative role for PKC in proliferation and differentiation. *Recent Adv. Cell. Mol. Biol.* 6: 237-243.
- ENNAJI, M.M., M. ARELLA, J. PHIPPS, R. McRAE, A. MERZOUKI, et J. CAMPIONE. 1992c. The relationship between cell differentiation and human papillomavirus type 16 (HPV16) gene expression. *Recent Advan. Cell. Mol. Biol.* 2: 193-201.
- ENTWISTLE, A., R.J. ZALIN, S. BEVAN et A.E. WARNER. 1988. The control of chick myoblast fusion by ion channels operated by prostaglandine and acetylcholine. *J. Cell. Biol.* 106: 1693-1702.

- EPLANTTENIER, J.L., U. BINSWANGER, F. OTT, et F. LARGIA DER. 1980. Dermatological complications in immunosuppressed patients after kidney transplantation. *Schweiz Med. Wochenschr.* 110: 1307-1313.
- ERNE, P. et K. HERMSEYER. 1988. Intracellular Ca^{2+} release in vascular muscle cells by caffeine, ryanodine, norepinephrine and neuropeptides. *J. Cardiovas. Pharmacol.* 12: 585-591.
- EXATION, J.H. 1990. Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem.* 265: 1-4.
- FABIATO, A. 1988. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. in: Fleischer, S. Fleischer B (eds). *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc. 157: 378-417.
- FABIATO, A. 1985. Time and calcium dependance of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac. *Purkinje Cell. J. Gen. Physiol.* 85: 247-289.
- FARZANEH, F., A. ENTWISTLE et R. ZALIN. 1989. Protein kinase C mediates the hormonally regulated plasma membrane fusion of avian embryonic skeletal muscle. *Exp. Cell. Res.* 181: 298-304.
- FAVRE, M., F. BREITBURD, O. CROISSANT, et G. ORTH. 1975. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papilloma viruses. *J. Virol.* 15: 1239-1247.
- FINCH, J.I. et A. KLUG. 1965. The structure of viruses of the papillomavirus type. III. Structure of rabbit papilloma virus. *J. Mol. Biol.* 13: 1-12.
- FLORINE-CASTEEL, K. 1990. Phospholipid order in gel and fluid phase cell-size liposomes measured by digitized video fluorescence polarization microscopy. *Biophys. J.* 57: 1199-1215.
- FRANCO, A. et B. JEFFREY. 1989. A voltage-regulated calcium-permeable cation channel in myoblasts and myotubes from the mouse C2 cell line. *Biophys. J.* 55: 491a.
- FRANKE, W.W., E. SCHMID, S. WINTER, M. OSBORN, et K. WEBER. 1979. Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentine-type in culture cells from diverse vertebrates. *Exp. Cell. Res.* 123: 25-46.
- FRANKE, W.W., E. SCHMID, M. OSBORN et K. WEBER. 1978. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 5034-5038.

- FRELIN, C., H.P.M. VIJVERBERG, G. ROMÉY, P. VIGNE et M. LAZDUNSKI. 1984. Different functional states of tetrodotoxin sensitive and tetrodotoxin resistant Na⁺ channels occur during the *in vitro* development of rat skeletal muscle. *Pfügers Archiv*. 402: 121-128.
- FRENZY, A., M. MITAD, N. NAYAI, S.J. SYLVERSTEIN et C.P. CRUM. 1985. Latent papillomavirus and recurring genital warts. *N. Engl. J. Med.* 313: 784-787.
- FUCHS, E. et H. GREEN. 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocytes. *Cell* 19: 1033-1042.
- FUCHS, P.G., T. IFTNER, J. WENINGER et H. PFISTER. 1986. Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8: genomic sequence and comparative analysis. *J. Virol.* 58: 626-634.
- FUCHS, P.G., F. GIRARDI et H. PFSITER. 1988. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int. J. Cancer.* 41: 41-45.
- FURCHPAN, E.J. et D.D. POTTER. 1959. Transmission of the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol.* 145: 289-325.
- GAINER, C. et E. MURRAY. 1985. Diacylglycerol inhibits gap junction communication in cultured epidermal cells evidenced for role of protein kinase C. *Biochem. Res. Comm.* 126(3): 1109-1113.
- GARZON, S., H. STRYKOWSKI et G. CHARPENTIER. 1990. Identification of mitochondria in the replication of nodamura virus in larvae of the lepidoptera, *Galleria mellonella* (L.) and in suckling mice. *Arch. Virol.* 113: 165-176.
- GARZON, S. et M. BENDAYAN. 1993. Colloidal Gold Probe: An overview of its application in viral cytochemistry. In: *Immuno-Gold Electron Microscopy in virus diagnosis and research*. Hyatt, A.D. et Eaton, B.T. Eds., Ann Arbor. CRC Press. USA. pp. 138-169.
- GINSBERG, M., M.D. PIERSCHBACHER, E. RUOSCHAHTI, G. MARGUERIE et E. PLOW. 1985. Inhibition of fibronectin inhibition binding to platelets by proteolytic fragments and synthetic peptides which support fibroblast adhesion. *J. Biol. Chem.* 260: 3931-3936.
- GIRI, I., O. DANOS, et M. YANIV. 1985. Genomic structure of the cottontail rabbit (Shope) papillomavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1580-1584.

GISSMANN, L. et H. ZUR HAUSEN. 1976. Human papillomavirus physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1310-1313.

GISSMANN, L., H. PFISTER et H. ZUR HAUSEN. 1977. Human papillomaviruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* 76: 569-580.

GISSMANN, L. et H. ZUR HAUSEN. 1980. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int. J. Cancer* 25: 605-609.

GISSMANN, L., V. DIEHL, H. SCHULZ-COULON et H. ZUR HAUSEN. 1982. Molecular cloning and characterization of human papillomavirus DNA from a laryngeal papilloma. *J. Virol.* 44: 393-400.

GISSMANN, L., L. WOLNIK, H. IKENBERG, U. KOLDOVSKY, H.G. SCHNURCH, et H. ZUR HAUSEN. 1983. Human papillomavirus type 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomavirus and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 560-563.

GISSMANN, L. 1988. Human papillomaviruses as an essential factor for the development of cervical cancer. *In* *New Frontiers in Cytology. Modern Aspects of Research and Practice*. Goerttler, K., Feichter, G.E., and Witte, S., Eds., Heidelberg. Springer-Verlag. pp. 55-61.

GISSMANN, L. et M. DÜRST. 1990. Cell transformation by human papillomaviruses. *In*: *Papillomaviruses and Human Cancer*. Pfister, H. Ed., Florida. USA. CRC Press. pp. 145-152.

GLOSS, B., H.U. BERNARD, K. SEEDORF et G. KLOCK. 1987. The upstream regulatory region of the human papillomavirus - 16 contains an E₂ protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J.* 6: 3735-3743.

GOLDMAN, R.D. et D.M. KNIPE. 1972. Functions of cytoplasmic fibers in nonmuscle cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37: 523-534.

GOLDSTEIN, D.J., M.E. FINBOW, T. ANDERSON, P. MCLEAN, K. SMITH, V. BUBB et R. SCHLEGEL. 1991. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16 K component of vacuolar H⁺-ATPases. *Nature (London)* 352: 347-349.

GONOI, T. et S. HASEGAWA. 1988. Post-natal disappearance of transient calcium channels in mouse skeletal muscle: effects of denervation and culture. *J. Physiol.* 401: 617-637.

- GRAFF, J.M., D.J. STUMPO et P.J. BLACKSHEAR. 1989. Characterization of the phosphorylation sites in the chicken and bovine myristoylated alanine-rich C-kinase substrate protein, a prominent cellular substrate for protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 264: 1912-1919.
- GRAHAM, F.L., A.J. VAN DER EB. 1973. New technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-467.
- GRAPENGIESSER, E., E. GYLFE et B. HELLEMAN. 1989. Three types of cytoplasmic Ca^{2+} oscillations in stimulated pancreatic β cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 268: 404-407.
- GRAM, L.S., J.C. FORSLUND et J.C. JETT. 1978. Quantification of cell fusion by twenty-one strains of new castle disease virus using flow cytofluorometry. *J. Gen. Virol.* 41: 27-36.
- GREEN, M. 1986. Transformation and oncogenesis: DNA viruses. In Field B.N., Knipe, Eds., Raven Press, N.Y. USA. pp. 183-234.
- GREENFIELD, I., J. NICKERSON, S. PENMAN, et M. STANLEY. 1991. Human papillomavirus type 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.* 88: 11217-11221.
- GREGOIRE, L., M. ARELLA, J.P. CAMPIONE et W.D. LANCASTER. 1989. Amplification of human papillomavirus DNA sequences by using conceived primers. *J. Clin. Microb.* 27(12): 2660-2665.
- GRIFFIN, B.,E. 1980. Structure and genomic organization of SV40 and polyoma virus. In: DNA tumor viruses. Tooze, J., Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 61-123.
- GRIMMEL, M., E.-M. DE VILLIERS, Ch. NEUMANN, M. PAWLITA et H. ZUR HAUSEN. 1988. Characterization of a new human papillomavirus (HPV41) from disseminated warts and detection of its DNA in some skin carcinomas. *Int. J. Cancer* 41: 5-11.
- GROSS, G., H. IKENBERG, E.M. DE VILLIERS, A. SCHNEIDER, D. WAGNER, et L. GISSMANN. 1986. Bowenoid papulosis: a venereally transmissible disease as reservoir for HPV 16. In: Origins of female genital cancer: Virological and epidemiological aspects. Zur Hausen, H., Peto, R. Eds., New York. Banbury Report, Cold Spring Harbor. pp. 149-165.
- GROSS, G. 1987. Lesions of the male and female external genitalia associated with human papillomaviruses. In: Papillomaviruses and human diseases. Syrjänen, K., Gissmann, L., Koss, L.G. Eds., New York. Springer-Verlag. pp. 197-234.

- GROSS, G., K. ELLINGER, A. ROUSSAKI, P.G. FUCHS, H.H. PETER et H. PFISTER. 1988. Epidermodysplasia verruciformis in a patient with Hodgkin's disease: characterization of a new papillomavirus type and interferon treatment. *J. Invest. Dermatol.* 91: 43-47.
- GROSS, G., S. JABLONSKA, H. PFISTER, et H.E. STEGNER. 1989. Genital papillomavirus infectious: modern diagnosis and treatment. Springer-Verlag. New York. USA. pp. 1-449.
- GROSIN, K.L., C.M. CHUONG et G.M. EDELMAN. 1985. Expression sequences of cell adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 82: 6942-6946.
- GRUBENDORF-CONEN, E., I. 1987. Papillomavirus induced tumors of skin: Cutaneous warts and epidermodysplasia verruciformis. In: *Papillomavirus and Human Disease*. Syrjänen, K., L. Gissmann et L.G. Koss, Eds., New York. Springer Verlag. USA. pp. 159-179.
- GRUNSTEIN, M. et D.S. HOGNESS. 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 3961-3965.
- GRYNIKIEWICZ, G., P. MARTIN et R.Y. TSIEN. 1985. A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260(6): 3440-3450.
- GUO, H., P. ACEVEDO, F.D. PARSA et J.S. BERTRAM. 1992. Gap-junctional protein connexin 43 is expressed in dermis and epidermis of human skin: Differential modulation by retinoids. *J. Inv. Dermatol.* 4: 460-467.
- HALBERT, C., E.W. DEMERS et D.A. GALLOWAY. 1992. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J. Virol.* 66(4): 2125-2134.
- HAMA, K. 1960. The fine structure of the desmosomes in frog mesothelium. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.* 7: 575-582.
- HAMA, K. 1961. Some observations on the fine structure of crayfishes (*Cambarus virilis* and *Cambarus clarkii*) with special reference to the organization of the synapses. *Anat. Res.* 141: 275-293.
- HANAFUSA, H. 1977. Cell transformation by RNA tumor viruses. *Compr. Virol.* 10: 401-483.
- HAND, R.E. Jr., R.W. TENNANT, W. YANG et G.C. LAVELLE. 1978. Immunofluorescent analysis of murine leukemia virus-infected cells by microfluorometry. *J. Immunol. Methods* 23: 175-186.

- HARBARTH, P. et H.P. VOSBERG. 1988. Enzymatic amplification of myosin heavy chain mRNA sequences *in vitro*. *DNA* 7: 297-306.
- HART, C., T. SPIRA, J. MOORE, J. SNINSKY, G. SCHOCHETMAN, A. LIFESON, J. GALPHIN et O.U. CHIN-YIH. 1990. Direct detection of HIV RNA sequence expression in seropositive subject. *The Lancet* 2(8611): 596-599.
- HAUGEN, T.H., T.P. CRIPE, G.D. GINDER, A. DARCIN, et L.P. TUREK. 1987. Trans-activation of an upstream early gene promoter of bovine papillomavirus 1 by a product of the viral E2 gene. *EMBO J.* 6: 145-151.
- HAVERSTICK, D.M., J.F. COWAN, K.M. YAMADA et S.A. SANTORO. 1985. Inhibition of plated and adhesion to fibronectin fibronogen and Von Williebrand factor substrate by synthetic tetrapeptide derived from cell-binding domain of fibronectin. *Blood* 66: 946-952.
- HAY, E.D. 1981. Extracellular matrix. *J. Cell. Biol.* 91: 205s-223s.
- HERBERT, J.M., J.M. ANGERS, J. GLEYS et J.P. MAFFRAND. 1990. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 172(3): 993-999.
- HEILBRUNN, L.V. 1940. The action of calcium on muscle protoplasm. *Physiol. Zool.* 13: 88-94.
- HEILBRUNN, L.V. et F.J. WIERCINSKI. 1947. The action of various cations on muscle protoplasm. *J. Cell. Comp. Physiol.* 29: 15-32.
- HEILMAN, C.A., L. ENGEL, D.R. LOWY, et P.M. HOWLEY. 1982. Virus-specific transcription in bovine papillomavirus-transformed mouse cells. *Virology* 119: 22-28.
- HENNINGS, H., S.H. YUSPA, I. MICHAEL, et U. LICHTI. 1978. Modification of epidermal cell response to 12-O-tetradecaylphorbol 13-acetate by serum level, culture temperature and pH. In mechanisms in tumor promotion and carcinogenesis. Raven Press, N.Y. USA. pp. 233-243.
- HENNINGS, H., D. MICHAEL, C. CHENG, P. STEINERT, K. HOLBROOK et S.H. YUSPA. 1980. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19: 245-254.
- HERSCHELER, J., D. PELZER, G. TRUBE ET W. TRAUTWEIN. 1982. Does the organic calcium channel blocker D600 act from inside or outside on the cardiac cell membrane? *Eur. J. Physiol.* 393: 287-291.

- HIDAKA, H., M. INAGAKI, S. KAWAMOTO, et Y. SASAKI. 1984. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 23: 5036-5041.
- HIROKAWA, N. et J.E. HEUSER. 1982. Internal and external differentiation of the post synaptic membrane at the neuro muscular jonction. *J. Neurocytol.* 11(3): 487-510.
- HOFFMAN, S., B.C. SORKIN, P.C. WHITE, R. BRACKENBURY et R. MAILHAMMER. 1982. Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membrane. *J. Biol. Chem.* 257: 7720-29.
- HORAN, M., P.K. HORAN et C.A. WILLIAMS. 1975. Quantitative measurement of SV40 T-antigen production. *Exp. Cell Res.* 91: 247-252.
- HOUSEY, G.M., M.D. JOHNSON et W.L.W. O'BRIAN. 1988. Cell overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblast. *Cell.* 52: 343-354.
- HSU, C.C.S. 1974. Peripheral blood lymphocyte responses to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen during pregnancy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 146: 771-775.
- HUMMEL, M., J.B. HUDSON et L.A. LAJMINS. 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J. Virol.* 66(10): 6070-6080.
- HUNE, R.I. et S.A. THOMAS. 1989. A calcium and voltage-dependent chloride current in developing chick skeletal muscle. *J. Physiol.* 417: 241-261.
- HUXLEY, H.E. 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164: 1356-1366.
- HYNES, R.O. 1982. Fibronectin and its relation to cellular structure and behavior. In: *Cell Biology of Extracellular Matrix*. E.D. Hay Ed., New York. Plenum. pp. 295-334.
- HYNES, R.O. et A.T. DESTREE. 1978. Relationships between fibronectin (lets protein) and actin. *Cell.* 15: 875-886.
- HYNES, R.O. 1973. Alteration of cell-surface proteins by viral transformation and by proteolysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70: 3170-3174.
- HYNES, R.O. et J.M. BYE. 1974. Density and cell cycle dependence of cell surface proteins in hamster fibroblasts. *Cell* 3: 113-120.

HYNES, R.O., I.U. ALI, A.T. DESTREE, V. MAUTNER, M.E. PERKINS, D.R. SINGER, D.D. WAGNER et K.K. SMITH. 1978. A large glycoprotein lost from the surface of the transformed cells. *Am. N.Y. Acad. Sc.* 312: 317-342.

IKENBERG, H. 1989. Human papillomavirus DNA in invasive genital carcinomas. In: *Genital Papillomavirus Infection*. Gross, G., S. Jablonska, H. Pfister et H.E. Stegner Eds., New York, USA. Springer-Verlag. pp. 88-112.

IMBERT, J., L.J. JACQUES et F. BERG. 1983. Simian virus 40 antigen is detected only in cells in the E₂ phase of the cell cycle in one group of rat transformants. *Virology*. 126: 711-716.

INOUE, H., G. KONDOH, T.M. SUDIRO et A. HAKURA. 1992. Stability of P53 the rat cells transformed by various viral transforming genes. *Virology* 187(1): 343-347.

ISHIHARA, H. et H. KARAKI. 1991. Inhibitory effect of 8-(N,N-diethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate (TMB8) in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 197: 181-186.

IZZARD, C.S. et L.R. LOCHNER. 1976. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J. Cell. Sci.* 21: 129-159.

JABLONSKA, S., J. DABROWSKI et K. JAKUBOWICZ. 1972. Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer Res.* 32: 583-589.

JABLONSKA, S., G. ORTH, M. JARZABEK-CHORZELSKA, G. RZESA, S. OBALEK, W. GLINSKI, M. FAVRE et O. CROISSANT. 1979. Epidermodysplasia verruciformis versus disseminated verrucae. *J. Invest. Dermatol.* 72: 114-119.

JABLONSKA, S. et G. ORTH. 1983. Human papillomaviruses. In: *Recent advances in dermatology*. Rook, A. et Maibach, H. (eds.). Churchill Livingstone. London, Volume 6. pp. 1-36.

JABLONSKA, S. et G. ORTH. 1985. Epidermodysplasia verruciformis. *Clin. Dermatol.* 3(4): 83-91.

JACOBS, R.M., J.T. BOYCE et G.J. KOCIBA. 1986. Flow cytometric and radioisotopic determination of platelet survival time in normal cats and feline leukemia virus infected cats. *Cytometry* 7: 64-69.

JARRETT, W.F.H., M.S. CAMPOS, B.W. O'NEIL, H.M. LAIRD et L.W. COGGINS. 1984. A novel bovine papillomavirus (BPV-6) causing true epithelial papillomas of the mammary gland skin: a member of a proposed new BPV subgroup. *Virology* 136: 255-264.

- JARRETT, W.F.H. 1985. The natural history of bovine papillomavirus infections. *In*: *Advances in Viral Oncology*. G. Klein, Ed., New York. Academic Press. Vol. 5, pp. 83-101.
- JENSON, A.B., J.R. ROSENTHAL, C. OLSON, F. PASS, W.D. LANCASTER et K. SHAH. 1980. Immunological relatedness of papillomaviruses from different species. *J. Natl. Cancer Inst.* 64: 495-500.
- JENSON, A.B. et W.D. LANCASTER. 1990. Association of human papillomavirus with benign, premalignant and malignant. *In*: *Papillomavirus and human cancer*. Pfsiter, H. Ed., Boca Raton, USA. CRC Press. pp. 11-39.
- JOHNSON, M.A., P.I. BLOMFIELD, I.S. BEVAN, C.B. WOODMAN, L.S. Young. 1990. Analysis of human papillomavirus type 16 E6-E7 transcription in cervical carcinomas and normal cervical epithelium using the polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 71: 1473-1479.
- KANDA, T., S. WATANABE et K. YOSHIKE. 1987. Human papillomavirus type 16 transformation of rat 3Y1 cells. *Japan J. Cancer Res.* 78: 103-108.
- KANDA, T., A. FURUNO, et K. YOSHIKE. 1988a. Human papillomavirus type 16 open reading fram encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. *J. Virol.* 62: 610-617.
- KANDA, T., S. WATANABE, et K. YOSHIKE. 1988b. Immortalization of primary rat cells by human papillomavirus type 16 subgenomic DNA fragments controlled by the SV40 promoter. *Virology* 165: 321-325.
- KANDA, T., S. WATANABE, S. ZANMA, H. SATO, A. FURUNO et K. YOSHIKE. 1991. Human papillomavirus type 16 E6 proteins with glycine substitution for cysteine in the metal-binding motif. *Virology* 185: 536-543.
- KANO, M., K. WAKUTA et R. SATOH. 1987. Calcium channel components of action potential in chick skeletal muscle cells developing in culture. *Develop. Brain Res.* 32: 233-240.
- KANO, M., K. WAKUTA et R. SATOH. 1989. Two components of calcium channel current in embryonic chick skeletal muscle cells developing in culture. *Develop. Brain Res.* 47: 101-112.
- KATAYAMA, N., M. NISHIKAWA, N. SHIMIZU, F. KOMADA, T. SEKINE, N. MINAMI et S. SHIRAKAWA. 1992. A role of protein kinase C in the growth of human erythroide progenitor cells. *Leukemia Res.* 16(2): 145-151.

- KAUR, P. AND J.K. McDOUGALL. 1988. Characterization of primary human keratinocytes transformed by human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 62: 1917-1922.
- KAWASHIMA, M., M. FAVRE, S. JABLONSKA, S. OBALEK et G. ORTH. 1986. Characterization of a new type of human papillomavirus (HPV) related to HPV5 from a case of actinic keratosis. *Virology.* 154: 389-394.
- KIDOKORO, Y. 1975. Sodium and calcium components of the action potential in a developing skeletal muscle cell line. *J. Physiol.* 244: 145-159.
- KIKOVA, U., A. KISHIMOTO et Y. NISHIZUKA. 1989. The protein kinase family: heterogeneity and its implication. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 31-44.
- KIMORA, T., E. TANIMURA, N. YAMAMOTO, T. OTO, et A. OHYAMA. 1985. The quantitative kinetic study of degree viral antigen by flow cytometry. An *in vitro* study. *Virus Res.* 2: 375-390.
- KIMORA, Y., T. YOKOCHI, T. MIYADAI, K. YOSHIDA, J. YOKOO et K. MATSUMOTO. 1985. Characterization of a porcine kidney cell line resistant to influenza virus infection. *J. Virol.* 53: 980-983.
- KISHIMOTO, A., Y. TAKAI, T. MORI, U. KIKKAWA et Y. NISHIZUKA. 1980. Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* 255: 2273-2276.
- KLEINSASSER, O. et G. OLIVEIRA E CRUZ. 1973. "Juvenile" und "adulte" Kehlkopfapillome. *HNO.* 21: 97-101.
- KLEINER, E., W. DIETRICH et H. PFISTER. 1986. Differential regulation of papilloma virus early gene expression in transformed fibroblasts and carcinoma cell lines. *EMBO J.* 5: 1945-1950.
- KLUG, A. et J.T. FINCH. 1965. Structure of virus of the papillomavirus type I. Human wart virus. *J. Mol. Biol.* 11: 403-423.
- KNOPF, J.L., M.-H. LEE, L.A. SULTZMAN, R.W. KRIZ, C.R. LOOMIS, R.M. HEWICK et R.M. BELL. 1986. Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* 46: 491-502.
- KNUDEN, K.A. 1990. Cell adhesion molecules in myogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2: 902-906.
- KNUDEN, K., L. SMITH, et S. MCELWEE. 1989. Involvement of cell surface phosphatidylinositol-anchored glycoproteins in cell-cell adhesion of chick embryo myoblasts. *J. Cell. Biol.* 109: 1779-1786.

- KNUDON, M.A.J., K.P. CAMPBELL, et R. CORONADO. 1988. The purified ryanodine receptor of muscle sarcoplasmic reticulum similarities to Gap Junction channels. *J. Gen. Physiol.* 92(6): 45A.
- KOIDE, H., K. OGITA, U. KIKKAWA, et Y. NISHIZUKA. 1992. Isolation and characterization of the ϵ subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1149-1153.
- KOHN, A. et P. FUCHS. 1969. Cell fusion by various strains of new castle disease and their virulence. *J. Virol.* 3: 539-540.
- KOMLY, C.A., F. BREITBURD, O. CROISSANT et R.D. STREECK. 1986. The L2 open reading frame of human papillomavirus type 1a encodes a minor structural protein carrying type specific antigens. *J. Virol.* 60: 813-817.
- KONDOH, G., Y. MURATA, K. AOZASA, M. YUTSUDO et A. HAKURA. 1991. Very high incidence of germ cell tumorigenesis seminomagenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J. Virol.* 65: 3335-3339.
- KREIDER, J.W. et G.L. BARTLETT. 1985a. Shope rabbit papilloma carcinoma complex: a model system of human papillomavirus infections. *Clin. Dermatol.* 3(4): 20-24.
- KREIDER, J.W., M.K. HOWLETT, S.A. WOLFE, G.L. BARTLETT, R.J. ZAINO, T.V. SEDLACEK et R. MORTEL. 1985b. Morphological transformation *in vivo* of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata. *Nature (London)*. 317: 639-644.
- KREMSDORF, D., M. FAVRE, S. JABLONSKA, S. OBALEK, L.A. RUEDA, M.A. LUTZNER, C. BLANCHET-BARDON, P.C. VAN VOORST VADER et G. ORTH. 1984. Molecular cloning and characterization of the genomes of nine newly recognized human papillomavirus types associated with epidermodysplasia verruciformis. *J. Virol.* 52: 1013-1018.
- KUBO, Y. 1991a. Properties of ionic currents induced by external ATP in a mouse mesodermal stem cell line. *J. Physiol.* 442: 691-710.
- KUBO, Y. 1991b. Electrophysiological and immunohistochemical analysis of muscle differentiation in a mouse mesodermal stem cell line. *J. Physiol.* 442: 711-741.
- KUBO, Y. 1991c. Comparison of initial stages of muscles differentiation in rat and mouse myoblastic and mouse mesodermal stem cell lines. *J. Phys.* 442: 743-759.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 660-685.

- LAFEMIA, R. et G.S. HAYWARD. 1986. Constitutive and retinoic acid - inducible expression of cytomegalo-virus immediate-early genes in human teratocarcinoma cells. *J. Virology*. 58(2): 434-440.
- LANCASTER, W.D. et W. MEINKE. 1975. Persistence of viral DNA in human cell cultures infected with human papillomavirus. *Nature (London)* 256: 434-439.
- LANCASTER, W.D. et C. OLSEN. 1978. Demonstration of two distinct classes of bovine papilloma virus. *Virology* 89: 372-379.
- LAND, H., L. PARADA et R. WEINBERG. 1983. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature (London)* 304: 596-602.
- LARSEN, P.M., L. STORGAARD, et S.J. FEY. 1987. Proteins present in bovine papillomavirus particles. *J. Virol.* 61: 3596-3601.
- LAVERTY, C.R., N. BOOTH, E. HILLS, Y. COSSART, et E.J. WILLS. 1978. Noncondylomatous wart virus infection of the postmenopausal cervix. *Pathology* 10: 373-378.
- LAW, M.F., W.D. LANCASTER et R.M. HOWLEY. 1978. Conserved polynucleotide sequences among the genome of papillomaviruses. *J. Virol.* 32: 199-211.
- LAW, M.-F., W.D. LANCASTER et P.M. HOWLEY. 1979. Conserved sequences among the genome of papillomaviruses. *J. Virol.* 32: 199-207.
- LEARY, J.F., M.F.D. NOTTER, et P. TODD. 1976. Laser flow cytophotometric immunoperoxidase detection of herpes simplex virus type 2 antigens in infected cultured human cells. *J. Histochem. Cytochem.* 24: 1249-1257.
- LEE, K.S. et R.W. TSIEN. 1983. Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature (London)* 302: 790-794.
- LEECHANACHAI, P., L. BANKS, F. MOREAU et G. MATLASHEWSKI. 1992. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene J.* 7: 19-25.
- LEHMAN, J.M. et J.W. JACOBBERGER. 1990. Virus-cell interaction analysis with flow cytometry. In *flow cytometry and sorting, second edition*. Wiley-Liss Inc., N.Y. USA. pp. 623-631.
- LEHN, H., T.M. ERNST, et G. SAUER. 1984. Transcription of episomal papillomavirus DNA in human condylomata acuminata and Buschke-Lowenstein tumors. *J. Gen. Virol.* 65: 2003-2010.

- LEIBERSPERGER, H., M. GSCHWENDT, M. GERNOLD et F. MARKS. 1991. Immunological demonstration of a calcium-unresponsive protein kinase C of the δ -type in different species and murine tissues. *J. Biol. Chem.* 266: 14778-14784.
- LICHTI, U. et S.H. YUSPA. 1988. Modulation of tissue and epidermal transglutaminases in mouse epidermal cells after treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-O-acetate and/or retinoic acid *in vivo* and in culture. *Cancer Res.* 48(1): 74-81.
- LIFESON, J. GALPHIN et O.U. CHIN-YIH. 1988. Direct detection of HIV RNA sequence expression in seropositive subject. *Lancet* 2(8611): 596-599.
- LOEWENSTEIN, W.R. 1966. Permeability of membrane junctions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 137: 441-472.
- LOHMANN, F., U. DREWS, F. DONIE et G. REISER. 1991. Chick embryo muscarinic and purinergic receptors activate cytosolic Ca^{2+} via phosphatidyl-inositol. *Metabolism Exp. Cell. Res.* 197: 326-329.
- LORINCZ, A.T., W.D. LANCASTER, et G.F. TEMPLE. 1986. Cloning and characterization of the DNA of a human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J. Virol.* 58: 225-229.
- LORINCZ, A.T., A.P. QUINN, W.D. LANCASTER, et G.F. TREMPLE. 1987. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 159: 187-194.
- LUSKY, M. et M.R. BOTCHAN. 1984. Characterization of the bovine papilloma virus plasmid maintenance sequences. *Cell* 36: 391-401.
- LUSKY, M. et M.R. BOTCHAN. 1985. Genetic analysis of bovine papillomavirus type 1 trans-acting replication factors. *J. Virol.* 53: 955-961.
- LUTZNER, M., O. CROISSANT, M.F. DUCASSE, H. KREIS, J. CROSNIER, et G. ORTH. 1980. A potentially oncogenic human papillomavirus (HPV-5) found in two renal allograft recipients. *J. Invest. Dermalol.* 75: 353-356.
- MACNAB, J.C.M., S.A. WALKINSHAW, J.W. CORDINER et J.B. CLEMENTS. 1986. Human papillomavirus in clinically and histologically normal tissue of patients with genital cancer. *New Engl. J. Med.* 315(17): 1053-1058.
- MAKOWSKY, L., D.L.D. CASPAR, W.C. PHILLIPS et D.A. GOODENOUGH. 1977. Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J. Cell Biol.* 74: 629-645.

MAKOWSKI, L. 1985. Structural domains in Gap Junctions implications for the control of intercellular communication. *In* Gap Junctions. Bennett, M.Y.L. et D.C. Spray. Eds., New York, USA. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. pp. 5-12.

MALLON, R.G., W. SISKI et V. DEFENDI. 1986. Expression of the E2 open reading frame of papillomavirus PBV1 and HPV6B in *E. coli*. *Gen.* 43: 241-251.

MANOS, M.M., Y. TING, D.K. WRIGHT, A.J. LEWIS, T.R. BROKER et S.M. WOLLINSKY. 1989. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital papillomavirus. *Cancer Cells* 7: 209-214.

MARGALL, N., X. MATIAS-GUIU, M. CHILLON, P. COLL, M. ALYO, V. NUNES, M. QUILEZ, N. RABELLA, G. PRATS et J. PRAT. 1993. Detection of human papillomavirus 16 and 18 DNA in epithelial lesions of the lower genital tract by *in situ* hybridization and polymerase chain reaction: cervical scrapes are not substitutes for biopsies. *Clin. Microbiol.* 31(4): 924-930.

MASSON, W.T. 1991. Fluorescence ratio imaging in real time of optical probes of biological activity in living cells. *Eur. Microsc. Anal.* 12: 13-15.

MATLASHEWSKI, G., K. OSBORN, L. BANKS, M. STANLEY et L. CRAWFORD. 1987a. Transformation of mouse fibroblasts with human papillomavirus type 16 DNA using heterologous promoter. *In*: *Cancer Cells*. Volume 5. Steinberg, B.M., Brandsman, J.L. et Taichman, L.B. Eds. New York. Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 195-199.

MATLASHEWSKI, G., J. SCHNEIDER, L. BANKS, N. JONES, A. MURRAY et L. CRAWFORD. 1987b. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated Ras in transforming primary cells. *EMBO J.* 6(6): 1741-1746.

MATLASHEWSKI, G., K. OSBORN, L. BANKS, M. STANLEY et L. CRAWFORD. 1988. Transformation of primary human fibroblast cells with human papillomavirus type 16 DNA and EJ-RAS. *Int. J. Cancer* 42: 232-238.

MATLASHEWSKI, G. 1989. The cell biology of human papillomavirus transformed cells. *Anticancer Res.* 9: 1447-1556.

MATTEWS, Ref. 1982. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology.* 17: 1-199.

MAUTNER, V. et R.O. HYNES. 1977. Surface distribution of LETS protein in relation to the cytoskeleton of normal and transformed cells. *J. Cell Biol.* 75: 743-758.

- McBRIDE, A. et P.M. HOWLEY. 1991. Bovine papillomavirus with a mutation in the E2 serine 301 phosphorylation site replicates at a high copy number. *J. Virol.* 65(12): 6528-6534.
- McCANCE, D.J. 1986. Human papillomaviruses and cancer. *Biochem. Biophys. Acta.* 823: 195-205.
- McCANCE, D.J., R. KOPAN, E. FUCHS et L.A. LAIMINS. 1988. Human papillomavirus type 16 alters epithelial cell differentiation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7169-7173.
- McNUTT, N.S., L.A. CULP, et P.H. BLACK. 1971. Contact-inhibited revertant cell lines isolated from SV40-transformed cells. II. Ultrastructural study. *J. Cell Biol.* 50: 691-708.
- McNUTT, N.S., L.A. CULP et P.H. BLACK. 1973. Contact-inhibited revertant cell lines isolated from SV40-transformed cells. IV. Microfilament distribution and cell shape. *J. Cell Biol.* 56: 413-428.
- MEINKE, W. et G.C. MEINKE. 1981. Isolation and characterization of the major capsid protein of bovine papilloma virus type 1. *J. Gen. Virol.* 52: 15-24.
- MEISELS, A., et R. FORTIN. 1976. Condylomatous lesions of the cervix and vagina: I. Cytologic patterns. *Acta. Cytol.* 20: 505-510.
- MEISELS, A., R. FORTIN, et M. ROY. 1977. Condylomatous lesions of cervix: II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol. (Baltimore)* 21: 379-390.
- MEISELS, A., M. ROY., M. FORTIER, C. MORIN, K.V. CASAS-CORDEROSHAH et H. TURGEON. 1981. Human papillomavirus infection of the cervix. The atypical condyloma. *Acta Cytol.* 25: 7-16.
- MEISELS, A., C. MORIN et M. CASAS-CORDERO. 1984. Lesions of the uterine cervix associated with papillomavirus and their clinical consequences. In: *Advances in clinical cytology*. Vol. 2. Koss, L.G. et Coleman, D.V. (Eds). Masson, New York. pp. 1-32.
- MELAMED, M., L. TORE, M. SOHN, et L. MORTIMER. 1979. *Flow cytometry and sorting*. Wiley-Liss Ed., New York, USA. Second edition. pp. 824.
- MELCHERS, W., A. VAN DER BRULE, J. WALBOOMERS, M. DEBRUIN, M. BURGER, P. HERBRINK, C. MEIJER, L. LINDEMAN et W. QUINT. 1989. Increased detection rate of human papillomavirus in cervical scraper by the polymerase chain reaction as compared to modified fish and southern blot analysis. *J. Med. Virol.* 27: 329-335.

- MENKO, S.A. et D. BOETTIGER. 1987. Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation. *Cell*. 51: 51-57.
- MERLIE, J.P., M.E. BUCKINGHAM et R.G. WHALEN. 1977. Molecular aspects of myogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 11: 61-114.
- MEYERS, C., M.G. FRATTINI, J.B. HUDSON et L.A. LAIMINS. 1992. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science* 257(5072): 971-973.
- MILLER, R. 1988. Calcium signalling in neurons. *Trends Neurosci.* 11: 415-419.
- MOLL, R., W.W. Franke et D.L. SCHILLER. 1982. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expressions in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 17-24.
- MOORE, S.E. et F.S. WALSH. 1985. Specific regulation of N-CAM/D₂-CAM cell adhesion molecule during skeletal muscle development. *EMBO J.* 4(3): 623-630.
- MOORE, S.E., J. THOMPSON, V. KIRKNESS, J.G. DICKSON et F.S. WALSH. 1987. Skeletal muscle neural cell adhesion molecule N-CAM changes in protein and messenger RNA species during myogenesis of muscle cell lines. *J. Cell. Biol.* 105(3): 1377-1386.
- MORLEY, P., B.K. TSANG, J.F. WHITFIELD and J.L. SCHWARTZ. 1992. The effect of muscarinic cholinergic agonists on intracellular calcium and progesterone production by chicken granulosa cells. *Endocrinology.* 130(2): 663-669.
- MUALLEM, S., H. ZHAO, K. LUBY-PHELPS, R. MOOS et P. LOESSBERG-STAUFFER. 1993. Signal transduction through Gap Junction control ([Ca²⁺] oscillations. *FASEB J.* 7(4): A643-.
- MÜLLER, H. et L. GISSMANN. 1978. Mastomys natalensis papilloma virus (MnPV), the causative agent of epithelial proliferations: characterization of the virus particle. *J. Gen. Virol.* 41: 315-323.
- MULLIS, K.B. et F.A. FALOONA. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology.* 155: 335-350.
- MURAKAWA, G.J., J.A. ZAIA, P.A. SPALLONE, D.A. STEPHENS, B.E. KAPLAN, R.B. WALLACE et J.J. ROSSI. 1988. Direct detection of HIV-1 RNA from AIDS and ARC patient samples. *DNA.* 7: 287-295.
- MURRAY, J.D., M.L. BERGET et I.W. TAYLOR. 1981. Flow cytometric analysis of DNA content of mouse liver cells following *in vitro* infection by human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 57: 221-226.

NAHERI, A. et D.F. MOSHER. 1978. High molecular weight, cell surface-associated glycoprotein (fibronectin) lost in malignant transformation. *Biochim. Biophys. Acta.*

NAGHASHFAR, Z.S., N.B. ROSENSHEIN, A.T. LORINCZ, J. BUSCEMA et K.V. SHAH. 1987. Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J. Gen. Virol.* 68: 3073-3078.

NASSERI, M., R. HIROCHIKA, T.R. BROKER et L.T. CHOW. 1987. A human papillomavirus type II transcript encoding an E1/E4 protein. *Virology* 159: 433-489.

NISHIZUKA, Y. 1984a. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* 225: 1365-1370.

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

NISHIZUKA, Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science.* 233: 305-312.

NISHIZUKA, Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase and its implication for cellular regulation. *Nature (London)* 334: 661-664.

NISHIZUKA, Y. 1989. The family of protein kinase C for signal transduction. *JAMA* 262: 1826-1833.

NODA, T., H. YAJIMA et Y. ITO. 1988. Progression of the phenotype of transformed cells after growth stimulation of cells by a human papillomavirus type 16 gene function. *J. Virol.* 62: 313-317.

NOTTER, N.F., J.F. LEARY et P.C. BALDUZZI. 1982. Adsorption of Rous sarcoma virus to genetically susceptible and resistant chicken cell studies by laser flow cytometry. *J. Virol.* 41: 958-964.

NUOVO, G.J., C.P. CRUM, E.-M. DE VILLIERS, R.U. LEVINE et S.J. SILVERSTEINE. 1988. Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J. Virol.* 62: 1452-1456.

OBALEK, S., W. GLINSKI, M. HAFTEK, G. ORTH et S. JABLONSKA. 1980. Comparative studies on cell-mediated immunity in patients with different warts. *Dermatologica* 161: 73-83.

OCLAN, K. 1988. Antagonistic effects of lamin and fibronectin on the expression of the myogenic phenotype. *Dev. Biol.* 125: 158-167.

OHNO, S., H. KAWASAKI, Y. KONNO, M. INAGAKI, H. HIDAKA et K. SUZUKI. 1988. A fourth type of rabbit protein kinase C. *Biochemistry* 27: 2083-2087.

OLIVIER, A.R. et P.J. PARKER. 1991. Expression and characterization of protein kinase C- δ . *Eur. J. Biochem.* 200: 805-810.

ONO, Y., V. A. KIKKAWA, K. OGITA, T. KUROKAWA, T. OSAOKA, Y. SEKIGUCHI, K. ASE, K. IGARASHI et Y. NISHIZUKA. 1987. Expression and properties of two types of protein kinase C. Alternative splicing from single gene. *Science* 236: 1116-1120.

ONO, Y., T. FUJII, K. OGITA, U. KIKKAWA, K. IGARASHI AND Y. NISHIZUKA. 1988. The structure, expression and properties of additional members of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* 263: 6927-6932.

ORIEL, J.D. 1987. Genital and anal papillomavirus infections in human males. In: *Papillomaviruses and human diseases*. Syrjänen, K., Gissmann, K., Koss, L.G. Eds, New York. Springer-Verlag. pp. 182-196.

ORMEROD, M.G. 1990. *Flow cytometry: a practical approach*. Rickwood and Hames, ed. IRL Press, N.Y. USA. pp. 279.

ORTH, G., M. FAVRE et O. CROISSANT. 1977a. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J. Virol.* 24: 108-120.

ORTH, G., F. BREITBURD, M. FAVRE, et O. CROISSANT. 1977b. Papillomaviruses: Possible role in human cancer. In: *Origins of Human Cancer*. H.H. Hiatt, J.D. Watson, and J.A. Winston Eds., New York. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, pp. 1043-1068.

ORTH, G., S. JABLONSKA, M. FAVRE, O. CROISSANT, M. JARZABEK-CHORZELSKA et G. RZESA. 1978. Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1537-1541.

ORTH, G. et M. FAVRE. 1985. Human papillomaviruses: Biochemical and biological properties. *Clin. Dermatol.* 3(4): 27-42.

OSADA, S.I., K. MIZUNO, T.C. SAIDO, K. SUZUKI, T. KOROKI et S. OHNO. 1992. A new member of the protein kinase C family, nPKC Θ predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* 12: 3930-3938.

OSKARSSON, M., W.L. MCCLEMENTS, D.G. BLAIR, J.V. MAIZEL et G.F. VAN DE WOUDE. 1980. Properties of a normal mouse cell DNA sequence (SARC) homologous to the SRG sequence of Moloney sarcoma virus *science*. 207: 1222-1224.

PARKIN, D.M., E. LÄRA, et C.S. MUIR. 1988. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int. J. Cancer.* 41: 184-189.

- PASTAN, I. et M. WILLINGHAM. 1978. Cellular transformation and the morphologic phenotype of transformed cells. *Nature (London)* 274: 645-650.
- PATER, A., N.S. BELAGULI, H.A.R. GARDNER, A. MITHAL et M.M. PATER. 1992. Glucocorticoid-dependent transformation by human papillomavirus type 16 E7 coding and 3' noncoding sequences. *Virology* 188: 369-372.
- PATER, M.M., G.A. HUGHES, D.E. HYSLOP, H. NAKSHATRI, et A. PATER. 1988. Glucocorticoid-dependent oncogenic transformation by type 16 but not type II human papillomavirus DNA. *Nature (London)* 355: 832-835.
- PAUL, D.L. 1986. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell. Biol.* 103: 123-134.
- PAYMENT, P. et M. TRUDEL. 1989. Manuel de techniques virologiques. Presses de l'Université du Québec. Québec, Canada. pp. 1-350.
- PEARSON, D., A. WILKINSON, W.Q. BELL et B.M. FINN. 1988. Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity of NIH 3T3 fibroblast transfected protein kinase C cDNA. *Cell.* 52: 447-458.
- PELMONT, J. 1989. Enzymes. Presses de l'Université de Grenoble. Grenoble. France. pp. 1-605.
- PENG, X., R.O. OLSON, C.B. CHRISTIAN, C.M. LANG et J.W. KREIDER. 1993. Papillomavirus and carcinomas in transgenic rabbits carrying EJ-Ras DNA and cottontail rabbit papillomavirus DNA. *J. Virol.* 67(3): 1698-1701.
- PENN, I. 1986. Cancers of the anogenital region in renal transplant recipients. Analysis of 65 cases. *Cancer* 58: 611-616.
- PENNER, R. et E. NEHER. 1988. The role of calcium in stimulus-secretion coupling in excitable and non excitable cells. *J. Exp. Biol.* 139: 329-345.
- PFISTER, H., L. GISSMANN, et H. ZUR HAUSEN. 1977. Partial characterization of proteins of human papilloma viruses (HPV) 1-3. *Virology* 83: 131-137.
- PFISTER, H., U. LINZ, L. GISSMANN, B. HUCHTHAUSEN, D. HOFFMANN et H. ZUR HAUSEN. 1979. Partial characterization of a new type of bovine papillomaviruses. *Virology* 96: 1-8.
- PFISTER, H. et J. MESZAROS. 1980. Partial characterization of a canine oral papillomavirus. *Virology* 104: 243-246.
- PFISTER, H. 1984. Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 99: 111-181.

PFISTER, H. 1987a. Human papillomaviruses and genital cancer. *Adv. Cancer Res.* 48: 113-118.

PFISTER, H. et P.G. FUCHS. 1987b. Papillomavirus: Particles, genome organisation and proteins. *In: Papillomavirus and human disease.* Syrjänen, K., L. Gismann, L.G. Koss (eds). Springer-Verlag. New York. USA. pp. 1-518.

PFISTER, H. 1990. General introduction to papillomaviruses. *In: Papillomavirus, papillomaviruses and human cancer.* Pfister, Ed. CRC Press. Boca Raton, U.S.A. pp. 1-9.

HELPS, W.C., K. MÜNGER, C.L. YEE, J.A. BARNES et P.M. HOWLEY. 1992. Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J. Virol.* 66(4): 2418-2427.

PHIPPS, M., J. PHIPPS, J.F. WHITFIELD, A. ALLY, R. SOMORJAI et S.A. NARANG. 1990. Carcinogenic implications of the neighborhood coherence principle (NCP). *Med. Hypoth.* 31: 289-301.

PIERSCHBACHER, M.D., E. RUDSLAHTI, J. SUNDELIN, P. LIND et P.A. Peterson. 1982. The cell attachment domain of fibronectin. Determination of the primary structure. *J. Biol. Chem.* 257: 9593-9597.

PILACINSKI, W.P., D.L. GLASSMAN, R.A. KRZYZEK, P.L. SADOWSKI, et A.K. ROBBINS. 1984. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the bovine papillomavirus L1 and L2 open reading frames. *Biotechnology* 1: 356-360.

PIM, D., M. COLLINS et L. BANKS. 1992. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulate the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *J. Oncogene* 7(1): 27-32.

PIRISI, K., S. YASUMOTO, M. FELLER, J. DONINGER et J.A. DIPAOLO. 1987. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.* 61: 1061-1067.

POENIE, M., J. ALDERTON, R.A. STEINHARDT et R.Y. TSIEN. 1986. Calcium rises abruptly and briefly throughout the cell at the onset of anaphase. *Science* 223: 886-889.

POENIE, M., J. ALDERTON, R.Y. TSIEN et R.A. STEINHARDT. 1985. Changes of free Ca^{2+} levels with stages of the cell division cycle. *Nature (London)* 315: 147-149.

POTTER, H., L. WEIR et P. LEDER. 1984. Enhancer-dependent expression of human K immunoglobulin genes introduced into mouse pre- β -lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 716-720.

- RAPPOLEE, D.A., A. WANG, D. MARK et Z. WERB. 1989. Phenotypes in single novel method for studying mRNA or small numbers of cells. *J. Cell. Biochem.* 39: 1-11.
- RAVIOLA, E., D.A. GOODENOUGH et G. RAVIOLA. 1980. Structure of rapidly frozen gap junctions. *J. Cell Biol.* 87: 273-279.
- REEVE, P. et G. POST. 1971. Studies on the cytopathogenic new castle disease virus: relation between virulence polykaryocytosis and plaque size. *J. Gen. Virol.* 11: 17-24.
- REISS, M., M.M. JASTREBOF, J.R. BERTINO et R. NARAYAN. 1986. DNA-mediated gene transfer into epidermal cells using electroporation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137: 244-249.
- REISS, M., D. DIMAIO, et T.A. ZIBELLO. 1989. Bovine papillomavirus type 1 induces resistance to Ca^{2+} -induced terminal differentiation in murine keratinocytes. *Cancer Commun.* 1(2): 75-82.
- REUTER, S., H. DELIUS, T. KAHAN, B. HOFMANN, H. ZUR HAUSEN et F. SCHWARTZ. 1991. Characterization of a novel human papillomavirus DNA in the cervical carcinoma cell line ME 180. *J. Virol.* 65(10): 5564-5568.
- RINGER, S. 1883. A further contribution regarding the influence of the different constituent of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol. (London)* 4: 29-42.
- ROBERTSON, J.D. 1960. The molecular structure and contact relationships of cell membranes. *Prog. Biophysics and Biophys. Chem.* 10: 343-351.
- ROBERTSON, J.D. 1963. The occurrence of a subunit pattern in the unit membranes of club endings in Mauthner cell synapses in goldfish brains. *J. Cell. Biol.* 19: 201-221.
- ROBINSON, C.C. et J.M. LEHMAN. 1978. Similar virus 40: a gene function. DNA content analysis of chinese hamster cells transformed by an early temperature-sensitive virus mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 4389-4393.
- ROBINSON, C.C. et J.M. LEHMAN. 1982. Simian virus 40 A gene function. Further characterization and growth of ts transformed chinese hamster cells. *J. Cell. Physiol.* 111: 225-231.
- ROCHFORD, R., M.V. HOBBS, J.L. GARNIER, N.R. COOPER, et M.J. CANNON. 1993. Plasmacytoid differentiation of Epstein-Burr virus - transformed B cells *in vitro* is associated with reduced expression of viral latent genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(1): 352-356.

- ROMANCZUK, H., L.L. VILLA, R. SCHLEGEL et P.M. HOWLEY. 1991. The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus type 16 and 18. *J. Virol.* 65(5): 2739-2744.
- ROOP, D.R., T.M. KRIEG, T. MEHREL, C.K. CHENG et S.H. YUSPA. 1988. Transcriptional control of high molecular weight keratin gene expression in multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Research* 48: 3245-3252.
- ROTEMBERG, M.O., L.T. CHOW et T.R. BROKER. 1989. Characterization of rare human papillomavirus type 11 in mRNAs coding for regulatory and structural proteins, using the polymerase chain reaction. *Virology* 172(2): 489-497.
- ROUS, P. et J.W. BEARD. 1935. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papilloma (Shope). *J. Exp. Med.* 62: 523-548.
- ROUS, P. et J.G. KIDD. 1936. The carcinogenic effect of a papillomavirus on the tarred skin of rabbits. I. Description of the phenomenon. *J. Exp. Med.* 67: 399-422.
- ROUS, P. et W.F. FRIEDEWALD. 1944. The effect of chemical carcinogens on virus-induced rabbit carcinomas. *J. Exp. Med.* 79: 511-537.
- ROWSON, K.E.K. et B.W.J. MAHY. 1967. Human papova (wart) virus. *Bacteriol. Rev.* 31: 110-131.
- RÜDLINGER, R., I.W. SMITH, M.H. BUNNEY, et J.A.A. HUNTER. 1986. Human papillomavirus infections in group of renal transplant recipients. *Br. J. Dermatol.* 115: 681-692.
- RÜDLINGER, R., R. GROB, P. BUCHMANN, D. CHRISTEN, et R. STERNER. 1988. Anogenital warts of the condyloma accuminatum type in HIV positive patients. *Dermatologica* 176: 277-281.
- RULEY, H. 1983. Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature (London)* 304: 602-606.
- RUOGLAHTI, E., E. ENGVALL et E.G. HAYMAN. 1981. Fibronectin: current concepts of its structure and functions. *Coll. Res.* 1: 95-128.
- RUTISHAUSEN, U. 1986. Differential cell adhesion through spatial and temporal variations of NCAM. *Trends Neurosci.* 9: 374-378.
- SAIDO, T.C., K. MIZUNO, Y. KONNO, S. OSADA, S. OHNO et K. SUZUKI. 1992. Purification and characterization of protein kinase C ϵ from rabbit brain. *Biochemistry* 31: 482-490.

SAIKI, R.K., S. SCHARF, F. FALOONA, K.B. MULLIS, G.T. HORN, H.A. ERLICH et N. ARNHEIM. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.

SAIKI, R.K., D.H. GELFLAND, S. STTOFEL, S.J. HIGUCHI, R. HORM, G.T. MULLIS et R.K. ERLICH. 1988. Primer - directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

SALZMAN, N.P. et P.M. HOWLEY. 1987. The papoviridae. Volume 2. The papillomaviruses. Plenum Press. New York. USA. pp. 1-392.

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS (eds). 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.

SATO, H., A. FURUNO et K. YOSHIKE. 1989. Expression of human papillomavirus type 16 E7 gene induces DNA synthesis of rat 3Y1 cells. *Virology* 168(1): 195-199.

SCHESSINGER, J.J. 1986. Allosteric regulation of epidermal growth factor receptor kinase. *Cell Biol.* 103: 2067-2072.

SCHILLER, J.T., W.C. VASS et D.R. LOWRY. 1984. Identification of a second transforming region in bovine papillomavirus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7880-7884.

SCHILLER, J.T., W.C. VASS, K.H. VOUSDEN et D.R. LOWRY. 1986. E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. *J. Virol.* 57: 1-6.

SCHLEGEL, R., M. WADE-GLASS, M. RABSON et Y.C. YANG. 1986. The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide. *Science* 233: 464-469.

SCHNEIDER-GRÄNDICKE, A. et E. SCHWARTZ. 1986. Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J.* 5(9): 2285-2292.

SCHWARTZ, E., M. DÜRST, C. DEMANKOWSKI, O. LATTERMANN, R. ZECH, E. WOLFSPERGER, S. SUHAI et H. ZUR HAUSEN. 1983. DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO J.* 2: 2341-2348.

SCHWARTZ, E., U.K. FREESE, L. GISSMANN, W. MAYER, B. ROGGENBUCK, A. STEMLAW et H. ZUR HAUSEN. 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cell lines. *Nature (London)* 314: 111-114.

- SCHWARTZ, E. 1987a. Transcription of human papillomavirus genomes. In: Papillomaviruses and Human Diseases. Syrjänen, K., L. Gissmann et L.G. Koss Eds., Yew York, USA. Springer-Verlag. pp. 467-491.
- SCHWARTZ, E., A. SCHNEIDER-GADICKE, et H. ZUR HAUSEN. 1987b. Human papillomavirus type 18 transcription in cervical carcinoma cell lines and in human cell hybrids. In: Cancer cells papillomaviruses. Volume 5. Steinberg, B.M., Brandsma, J.L. et Taichman, L.B., Eds., Yew York. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. pp. 47-51.
- SEEBERGER, R., T.H. HAUGEN, L. TUREK et H. PFISTER. 1987. An enhancer of human papillomavirus 8 is trans-activated by the bovine papillomavirus 1 E2 function. In: Cancer Cells vol. 5. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- SEEDORF, K., G. KRÄMMER, M. DÜRST, S. SUHAI et W.G. RÖWEKAMP. 1985. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. Virology **145**: 181-185.
- SEEDORF, K., G. KRAMMER, M. DURST, S. SUHAI et W. ROWENKAMP. 1987. Identification of early proteins of the human papillomavirus type 16 (HPV16) and type 18 (HPV18) in cervical carcinoma cells. EMBO J. **6**: 139-145.
- SENISTERA, G. et R.M. EPAND. 1992. Dual modulation of protein kinase C activity by sphingosine. Biochem. Biophys. Res. Comm. **187**(2): 635-640.
- SESKI, J.C., E.R. REINHALTER et J. SILVA. 1978. Abnormalities of lymphocyte transformations in women with condylomata acuminata. Obstet. Gynecol. **51**: 188-192.
- SHAH, K.V., H.L. OZER, H.N. GHAZEY, et T.J. KELLY. 1977. Common structural antigen of papovaviruses of the simian virus 40 - polyoma subgroup. J. Virol. **21**: 179-186.
- SHAPIRO, S., et M. HAWARO. 1988. Practical flow cytometry. Alan R. Liss ed. N.Y. USA. p. 353.
- SHAY, J.W., W.E. WRIGHT, D. BRADISKYTE et B.A. VAN DER HAEGEN. 1993. E6 of human papillomavirus type 16 can overcome the M1 stage of immortalisation in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. Oncogene **8**(6): 1407-1413.
- SHIBATA, D., Y.S. FU, J.W. GUPTA, K.V. SHAH, N. ARNEHEIM ET W.J. MARTIN. 1988. Detection of human papillomavirus in normal and dysplasia tissue by the polymerase chain reaction. Lab. Invest. **59**: 555-559.

SHIMODA, K., A.T. LORINCZ, G.F. TEMPLE et W.D. LANCASTER. 1988. Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J. Gen. Virol.* 69: 2925-2930.

SHIRASAWA, H., Y. TOMITA, S. SEKIYA, H. TAKAMIZAWA et B. SIMIZU. 1987. Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cell lines derived from cervical carcinomas. *J. Gen. Virol.* 68: 583-591.

SHIRASAWA, H., Y. TOMITA, K. KUBOTA, T. KASAI, S. SEKIYA, H. TAKAMIZAWA et B. Shimizu. 1988. Transcriptional differences of the human papillomavirus type 16 genome between precancerous lesions and invasive carcinomas. *J. Virol.* 62: 1022-1025.

SHIRASAWA, H., Y. TOMITA, A. FUSE, T. YAMAMOTO, H. TANZAWA, S. SEKIYA, H. TAKAMIZAWA et B. SIMIZU. 1989. Structure and expression of an integrate human papillomavirus type 16 genome amplified in a cervical carcinoma cell line. *J. Gen. Virol.* 70: 1913-1919.

SHIRASAWA, H., H. TANZAWA, T. MATSUNAGA et B. SIMIZU. 1991. Quantitative detection of spliced E6-E7 transcripts of human papillomavirus type 16 in cervical premalignant lesions. *Virology* 194: 795-798.

SHIVAROVA, N., W. FORSTER, H.E. JACOB et R. GRIGOROVA. 1983. Microbiological implication of electric field effect stimulation of plasmid transformation of *Bacillus cereus* protoplasts by electric fields pulses. *Z. Allg. Microbiol.* 23(9): 595-599.

SHOPE, R.E. et E.W. HÜRST. 1933. Infectious papillomatosis of rabbits, with a note on the histopathology. *J. Exp. Med.* 58: 607-624.

SILLMAN, F.H., A. STANEK, A. SEDLIS, J. ROSENTHAL, K.W. LANKS, D. BUCHHAGEN, A. NICASTRI et J. BOYCE. 1984. The relationship between human papillomavirus and lower genital intra epithelial neoplasia in immunosuppressed women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 150: 300-308.

SINANGIL, F., S. HARADA, D.T. PURTILO, et D.J. VOLSKY. 1985. Host cell range of adult T-cell leukemia virus I. Viral infectivity and binding to various cells as detected by flow cytometry. *Int. J. Cancer* 36: 191-198.

SINGER-SAM, J., H.O. ROBINSON, A.R. BELLVE, M.I. SIMON et D. RIGGS. 1990. Measurement by quantitative PCR of changes in HPRT, PGK-1, PGK-2, APRT, MTase and Zfy gene transcripts during mouse spermatogenesis. *Nucl. Acids Res.* 18(5): 1255-1259.

- SMITH, R.J., L.M. SAM, J.M. JUSTEN, G.L. BUNDY, G.A. BALA et J.E. BLEASDALE. 1990. Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of novel inhibitor of phospholipase C - dependent processes on cell responsiveness. *J. Pharm. Exp. Therap.* 253(2): 688-697.
- SMITH, A.E., R. SMITH et E. PAUCHA. 1979. Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40. *Cell* 18: 335-346.
- SMOTKIN, D., et F.O. WETTSTEIN. 1986. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4680-4685.
- SMOTKIN, D. et F.O. WETTSTEIN. 1987. The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J. Virol.* 61: 1686-1691.
- SNIJDERS, P.J., A.J. VAN DEN BRULE, H.F. SCHRIJENMAKERS, G. SNOW, C.J. MEIJER et J.M. WIALBOOMERS. 1990. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J. Gen. Virol.* 71: 173-183.
- SOUTHERN, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-509.
- SPALHOLZ, B.A., Y.-C. YANG et P.M. HOWLEY. 1985. Transactivation of a bovine papillomavirus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell* 42: 183-191.
- STENMAN, S., J. ZENTHEN, et N.R. RINGERTZ. 1975. Expression of SV40 T antigen during the cell cycle of SV40 transformed cells. *Int. J. Cancer* 15: 547-554.
- STERLING, J., M. STANLEY, G. GATWARD et T. MINSON. 1990. Production of human papillomavirus type 16 virions in a keratinocyte cell line. *J. Virol.* 64: 6305-6307.
- STRAUSS, M.J., H. BUNTING et J.L. MELNICK. 1950. Virus-like particles and inclusion bodies in skin papillomas. *J. Invest. Dermatol.* 15: 433-435.
- SYRJÄNEN, K.J. 1984a. Current concepts of human papillomavirus infections in the genital tract and their relationship to intra epithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Obst. Gyn. Survey* 39: 253-265.
- SYRJÄNEN, K.J., M. VAYRYNEN, O. CASTREN, M. YISKOSKI, R. MANTYJARRI, S. PYRHONEN, et S. SAARIKOSKI. 1984b. Sexual behaviour of females with human papillomavirus lesions in the uterine cervix. *Br. J. Vener Dis.* 60: 243-248.

SYRJÄNEN, K., M. VÄYRYNEN, M. HIPPELAINEN, O. Castren, S. Saarikoski, et R. Mantyjarvi. 1985. Electron microscopic assessment of cervical punch biopsies in women followed-up for human papillomavirus (HPV) lesions. *Arch. Geschwulstforsch.* 55: 131-138.

SYRJÄNEN, S., K. SYRJÄNEN, K. et M.A. LAMBERG. 1986. Detection of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions using in situ DNA hybridation applied on paraffin sections. *Oral Surg.* 62: 660-667.

SYRJÄNEN, K.J. 1987. Papillomavirus infections and cancer. In: *Papillomavirus and human disease.* Syrjänen, K., Gissmann, L. et Koss, L.G., Eds., New York, USA. Springer-Verlag. pp. 468-491.

SYRJÄNEN, S.M. et J. KELLOKOSKI. 1990. Oral manifestations of HPV infections. In: *Genital Papillomavirus Infections.* Gross, G., Jablonska, S., H. Pfister et M.E. Stegner, Eds., New York, USA. Springer-Verlag. pp. 209-223.

SZENTGYÖRGY, A.G., E.M. SZENTKIRALYI, et J. KENDRICK-JONES. 1973. The light chains of scallop myosin as regulatory subunits. *J. Mol. Biol.* 74: 179-203.

TAICHMAN, L.B., F. BREITBURD, O. CROISSANT, et G. ORTH. 1984. The search for a culture system for papillomavirus. *J. Invest. Dermatol.* 83: 2-6.

TAICHMAN, L.B. et R.F. LAPORTA. 1987. The expression of papillomaviruses in epithelial cells. In: *The papovaviridae: The papillomaviruses.* Volume 2. Salzman, N.P. et Howley, P.M. (Eds.) Plenum Press, New York. pp. 1-392.

TAKAI, Y., A. KISHIMOTO, Y. IWASA, Y. KAWAHARA, T. MORI et Y. NISHIZUKA. 1979a. Calcium dependent activation of a multiple functional protein kinase by membrane phospholipides. *J. Biol. Chem.* 254: 3692-3695.

TAKAI, Y., A. KISHIMOTO, U. KIKKAWA, T. MORI et Y. NISHIZUKA. 1979b. Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 1218-1224.

TAKAI, Y., K. KAIBUCHI, T. TSUDA et H. HOSHIJIMA. 1985. Role of protein kinase C in transmembrane signalling. *J. Cell. Biochem.* 29: 143-155.

TANINUCHI, A. et S. YASUMOTO. 1990. A major transcript of human papillomavirus type 16 in transformed NIH 3T3 cells contains polycistronic mRNA encoding E7, E5 and E1-E4 fusion gene. *Virus Genes* 3(3): 221-233.

- THASTRUP, O., P.J. CULLEN, B.K. DROBAK, M.R. HANLEY et A.P. DAWSON. 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 2466-2470.
- THOMAS, K.H., T.M. WILKIE, P. TOMASHEFSKY, A.R. BELLVE et M.I. SIMON. 1989. Differential gene expression during mouse spermatogenesis. *Biology of Reproduction.* 41: 729-739.
- TIMOTHY, R.C. 1989. Spatial aspects of calcium signaling. *J. Cell Science* 93: 221-226.
- TIMOTHY, R.C. 1992. Calcium signaling and the triggering of secretion in adrenal chromaffin cells. *Pharmacol. Ther.* 52: 173-189.
- TOMITA, Y., H. SHIRAWAWA, H. SEIKINE et B. SHIMIZU. 1987. Expression of the human papillomavirus type 6B L₂ open reading frames in *E. coli*: L₂ β galactosidase fusion protein and their antigenic properties. *Virology* 158: 8-14.
- TONEGUZZO, F. et A. KEATING. 1986. Stable expression of selectable genes introduced into human hematopoietic stem cells by electric field mediated DNA transfer. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.* 83: 346-351.
- TRAUTMANN, A., C. DELAPORTE, et A. MARTY. 1986. Voltage-dependent channels of human muscle cultures. *Lflügers Archiv.* 406: 163-172.
- TSIEN, R.Y. 1981. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature (London)* 290: 527-8.
- TSIEN, R.Y., T. POZZAN et T.J. RINK. 1982. *J. Cell. Biol.* 94: 325-334.
- TSUNOKAWA, Y., TAKEBE, N., KASAMATSU, M., TERADA, M. et T. SUGIMURA. 1986. Transforming activity of human papillomavirus type 16 DNA sequence in a cervical cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2200-2205.
- VAN DER BRULE, A.J.C., C.J. CLAAS, M. DUMAINE, J.G.W. MELCHERS, T. HELMENHORST, G.V. QUINT, J. LINDEMAN, C.J.L.M. MEIFER et J.M.M. WALBOOMERS. 1989. Use of anti-contamination primers in the polymerase chain reaction for the detection of human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and biopsies. *J. Med. Virol.* 29: 20-27.
- VESSEY, M., M. LAWLESS, K. MCPHERSON et D. YEATES. 1983. Neoplasia of the cervix uteri and contraception: a possible adverse effect of the pill. *Lancet* 2: 930-935.

- VESSEY, M.P. 1986. Epidemiology of cervical cancer: role of hormonal factors, cigarette smoking and occupation. *Banbury Rep.* 21: 29-43.
- VIELKIND, U. et R. SWIERENGA. 1989. A simple fixation procedure for immunofluorescent detection of different cytoskeletal components within the same cell. *Histochemistry.* Springer-Verlag. pp. 1-8.
- VILLA, L.L. et A. LOPES. 1986. Human papillomavirus. DNA sequences in penile carcinomas in Brazil. *Int. J. Cancer* 37: 853-855.
- VONKA, V., J. KANKA et Z. Roth. 1987. Herpes simplex type 2 virus and cervical neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 48: 149-190.
- VON KNEBEL DOEBERITZ, M., T. BAUKNECHT, D. BARTSCH et H. ZUR HAUSEN. 1991. Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulating papillomavirus gene E6 and E7 in cervical carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(4): 1411-1415.
- VOOSDEN, K.H. 1989. Human papillomaviruses and cervical carcinoma. *Cancer Cells* 1(2): 43-48.
- WALDECK, W., F. RÖSL, et H. ZENTGRAF. 1984. Origin of replication in episomal bovine papilloma virus type 1 DNA isolated from transformed cells. *EMBO J.* 3: 2173-2178.
- WATANABE, A. et H. GRUNDFEST. 1961. Impulse propagation at the septal and commissural junctions of crayfish lateral axons. *J. Gen. Physiol.* 45: 267-308.
- WATERFIELD, U. FRANCKE et A. ULLRICH. 1986. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* 233: 859-866.
- WATTS, S.L., W.C. PHELBS, R.S. OSTROW, K.R. ZACHOW et A.J. FARAS. 1984. Cellular transformation by human papillomavirus DNA *in vitro*. *Science.* 225: 634-638.
- WEISS, R. et R. HORN. 1986. Functional differences between two classes of sodium channels in developing rat skeletal muscle. *Science* 233: 361-364.
- WETTSTEIN, F.O. 1990. State of viral DNA and gene expression in benign vs. malignant tumors. In: *Papillomavirus and human cancer.* Pfister (Ed.) CRC Press. Florida. USA. pp. 155-174.
- WHITFIELD, J.F. 1990. Calcium, cell cycles and cancer. CRC Press Inc. Boca Raton. Florida. U.S.A. 263 p.

WICKENDEN, C. A. STEELE, A.D. MALCOLM et D.V. COLEMAN. 1985. Screening for wart virus infection in normal and abnormal cervixes by DNA hybridation of cervical scrapes. *Lancet* 1: 65-67.

WILEZYNSKI, S.P., L. PEARMAN et J. WALKER. 1988. Identification of HPV16 early genes retained in cervical carcinomas. *Virology*. 166: 624-627.

WILSON, G.S. et A. MILES. 1975. The mechanisms of bacterial infection. In: *Principles of Bacteriology, Virology and Immunology*. Edward Arnold (Publishers) London. U.K. pp. 1273-1302.

WONG, P.T.T., M. CADRIN et S.W. FRENCH. 1991a. Distinctive infrared spectral features in liver tumor tissue of mice evidence of structural modifications at the molecular level. *Exp. Mol. Pathol.* 55(3): 269-284.

WONG, P.T.T., R.K. WONG, T.A. CAPUTO, T.A. GODWIN et B. RIGAS. 1991b. Infrared spectroscopy of exfoliated human cervical cells evidence of extensive structural changes during carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10988-10992.

YAEGASHI, N., S.A. JENISON, M. BATRA et D.A. GALLOWAY. 1992. Human antibodies recognize multiple distinct type-specific and gross-react region of the minor capsid proteins of human papillomavirus type 6 and 11. *J. Virol.* 66: 2008-2019.

YAFFE, D. 1968. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc. Natn. Acad. Sci.* 61: 477-483.

YAFFE, D. 1969. Cellular aspects of muscle differentiation *in vitro*. *Curr. Top. Dev. Biol.* 4: 37-77.

YAMADA, K.M. et K. OLDEN. 1978. Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature (London)* 275: 179-184.

YAMASKI, H. 1991. Abberant expression and function of gap junctions during carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives.* 93: 191-197.

YANG, Y.-C, B.A. SPALHOLZ, M.S. RABSON, et P.M. HOWLEY. 1985. Dissociation of transforming and transactivation functions for bovine papillomavirus type 1. *Nature (London)* 318: 575-577.

YASUMOTO, S., A.L. BURKHARDT, J. DONINGER, et J.A. DiPAOLO. 1986. Human papillomaviru type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J. Virol.* 57: 572.

- YEE, C., I. KRISHNAN-HEWLETT, C.C. BAKER, R. SCHLEGEL et P. HOWLEY. 1985. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.* 119: 361-366.
- YIN OH, S., C.G. GRUPEN et A.W. MURRAY. 1991. Phorbol ester induces phosphorylation and down regulation of connexin 43 in WB cells. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1094: 243-245.
- YOUNG, L.S., I.S. BEVAN, M.A. JOHNSON, P.I. BLOOMFIELD, T. BROMIDGE, N.J. MAITLAND et C.B.J. WOODMAN. 1989. The polymerase chain reaction. New epidemiological tool for investigating cervical human papillomavirus infection. *British Med. J.* 298(6665): 14-18.
- YUSPA, S.H. et C.C. HARIS. 1974. Altered differentiation of mouse epidermal cells treated with retinyl acetate *in vitro*. *Exp. Cell. Cell. REs.* 85: 95-105.
- ZAMPIGHI, G., J.M. CORLESS et J.D. ROBERTSON. 1980. On gap junction structure. *J. Cell Biol.* 86: 190-198.
- ZAMPIGHI, G., M. KREMAN, F. RAMON, A.L. MORENO et S.A. SIMON. 1988. Structural characteristics of Gap Junctions I. Channel Number in coupled and uncoupled conditions. *J. Cell. Biol.* 106: 1667-1678.
- ZUR HAUSEN, H., W. MEINHOF, W. SCHWEIBER, et G.W. BORNKAMM. 1974. Attempts to detect virus specific DNA sequences in human tumors. I. Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer.* 13: 650-656.
- ZUR HAUSEN, H. 1977. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 78: 1-30.
- ZUR HAUSEN, H. 1982. Human genital cancer: synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events? *Lancet* 2: 1370-1372.
- ZUR HAUSEN, H. 1986a. Intracellular surveillance of persisting viral infections: human genital cancer resulting from a failing cellular control of papillomavirus gene expression. *Lancet* 2: 489-491.
- ZUR HAUSEN, H. et A. SCHNEIDER. 1986b. The role of papillomavirus in human anogenital cancer. In: *The papillomaviruses*. Howley, P.M. et Salzman, N. (Eds). Plenum, New York.

ANNEXES

ANNEXE I

Exemple de calcul de l'activité spécifique de la protéine kinase C (PKC)

Tel que développé par B. Chakravarthy *et al.* 1991, l'essai de l'activité PKC n'est utilisable que pour la comparaison d'un traitement donné au contrôle correspondant. En d'autres termes, l'activité absolue des suspensions de membrane varie de manière considérable d'un jour à l'autre. Ce qui est fixe, c'est le rapport entre les valeurs mesurées pour le traitement par rapport à cells du témoin. Exemple: activité du témoin après 3 jours de culture: 100 unités; activité après 30 min. d'exposition au Ca^{2+} : 500 unités; rapport: 5X. Même expérience répétée sur des cellules de même âge une semaine plus tard: activité du témoin 650 unités; activité après exposition au Ca^{2+} , 3250 unités; rapport: 5X.

De telles variations ne permettaient d'utiliser le test ni pour la comparaison des activités des cellules transformées par rapport au témoin correspondant, ni pour une étude cinétique.

Les facteurs possible de variation sont les suivants:

- 1) Nombre de cellulesensemencées par boîte de petri.
- 2) Nombre de cellules utilisées pour la préparation des membranes pour un volume final fixe.
- 3) Activité de la PKC membranaire sur son substrat endogène qui produit un artefact sur les valeurs du blanc.

- 4) Impuretés chemiluminescentes dans l'ATP frais qui cause une augmentation artificielle des lecteurs.
- 5) Teneur en protéines totales de la suspension membranaire.

Les modifications suivants apportées au test ont permis la répétition des expériences de manière fiable:

- 1) Le nombre de cellulesensemencées a été soigneusement contrôlé. L'ensemencement a été fait en triplicata.
- 2) Les cellules ont été énumérées sur des échantillonsensemencés séparément. Le blanc doit représenter l'absorption non spécifique de l'ATP.
- 3) Il a été mesuré comme suit: 10 échantillons de suspensions membranaires ont été préparés chaque jour après l'ensemencement. Ils ont été portés à ébullition au bain marine pour 10 min. en évitant l'évaporation. 20 μ ls ont été ajoutés au milieu réactionnel et mesurés tel que décrit. La moyenne des valeurs pour un temps donné a été comme blanc.
- 4) l'ATP est soit utilisé une semaine environ après réception soit utilisé frais, mais avec un blanc correspondant.
- 5) Les membranes sont congelées à -70° avant utilisation. Les suspensions sont plus homogènes et permettent un meilleur accès de l'enzyme au substrat.
- 6) Les protéines membranaires sont estimées par la méthode de Bradford. Dans les calculs, la teneur en protéine est utilisée à la place du volume de suspension membranaire.

Exemple de calcul:

mesure en cpm de la moyenne pour trois échantillons (le compteur à scintillation tient compte de la demi-vie depuis la date de préparation de l'ATP. Il produit 3 lectures pour chaque échantillon et donne la moyenne et la déviation standard correspondante).

cpm : 15 867 échantillons 1

20 708 échantillons 2

18 362 échantillons 3

moyenne: 18 979

Le blanc est égal à 2000 (AT récent).

La mesure est donc: $18\ 979 - 2000 = 16979$

Sachant que pour chaque picomole de substrat phosphorylé on a 220 cpm:

nombre de picomoles de substrat phosphorylé: $16\ 979 \div 220 = 77.18$

pmoles.

Mesure des protéines: Teneur moyenne (en D.O.) en protéines membranaires

des échantillons analysés: 0.085 correspondant à 20 μ l de suspension.

Teneur en protéine déduits de la courbe standard (essai de Bradford): 2 μ g.

Volume de suspension utilisé pour les réactions: 60 μ l

μ g de protéine dans les essais: $\frac{2 \times 60}{20} = 6 \mu\text{g}$

pmoles de substrat phosphorylées per .1 mg de protéines

$$\frac{77.1 \times 100}{6} = 1286.3$$

Ce nombre est parmi ceux qui ont servi à calculer l'activité spécifique du témoin HPV16-L6 au temp 24 hrs (Tableau 9).

ANNEXE II

Analyses statistiques: test de student (t)

Si l'on considère que les populations d'échantillons à comparer sont normales, une distribution de t peut être utilisée pour vérifier les hypothèses sur les différences de moyennes (\bar{X}) d'échantillons indépendants. La variable quantitative est l'activité spécifique de la protéine kinase C (PKC). Les échantillons étant indépendants et d'effectifs inégaux ($n_a \neq n_b$) et $k = 2$, la comparaison des échantillons se fait deux par deux. Les effectifs étant inférieurs à 30 ($n < 30$) le test de comparaison se fait sur les variances bilatérales.

Si les variances sont égales ($\sigma_a^2 = \sigma_b^2$) \rightarrow on effectuera un test t

Si les variances sont inégales ($\sigma_a^2 \neq \sigma_b^2$) \rightarrow on effectuera un test t modifié.

- Hypothèse nulle (H_0) : $\sigma_a^2 = \sigma_b^2$

- Hypothèse à tester (H_1) : $\sigma_a^2 \neq \sigma_b^2$

$$F \text{ calculé} = \frac{s^2 x_a}{s^2 x_b} \quad \text{ou } \sigma^2 = \text{variance}$$

$$s = \text{écart type}$$

Si $F \text{ calculé} \geq F_{\alpha/2}$, $F_{\alpha/2}$ peut être déduit d'une table après choix du seuil α : 5%, 1% ou 0.1%.

D'après les calculs effectués, le test F montre qu'il existe une différence dans la variabilité de \bar{X} entre les deux groupes (a et b). Donc on doit utiliser un test de t modifié bilatéral.

Hypothèse à tester : Est-ce qu'il existe une différence entre les moyennes (\bar{X})

des groupes a et b?

- Hypothèse principale (nulle, H_0) : $\mu_a = \mu_b$

- Hypothèse à tester (H_1) : $\mu_a \neq \mu_b$

L'hypothèse principale H_0 est rejeté si $| t_{\text{calculé}} | > t_{\alpha/2}$

$$\text{Avec } t_{\text{calculé}} = \frac{\bar{x}_a - \bar{x}_b}{\left[\frac{S^2 x_a}{n_a} + \frac{S^2 x_b}{n_b} \right]^{1/2}}$$

$t_{\alpha/2}$ peut être déduit de table à partir du degré de liberté calculé (dL) et du seuil: $\alpha = 5\%, 10\%, 0.1\%$

$$v^* = \text{dL} = \frac{\left[\frac{s^2 x_a}{n_a} + \frac{s^2 x_b}{n_b} \right]}{\left[\frac{s^2 x / n_a}{n_a - 1} \right] + \left[\frac{s^2 x / n_b}{n_b - 1} \right]}$$

Exemple de calcul: on veut comparer les activités spécifiques de la PKC membranaire dans les cellules L6 entre le témoin et le traitement au DMSO 1% pour le temps 10 min (Tableau 8).

Données:	$n_{\text{témoin}} = 12,$	$n_{\text{DMSO 1\%}} = 10$	$n = \text{effectif}$
	$\bar{X} = \text{témoin} = 115.1$	$\bar{X}_{\text{DMSO 1\%}} = 228.0$	$\left\{ \begin{array}{l} \bar{X} = \text{moyenne} \end{array} \right.$
	$s_{X \text{ témoin}} = 33$	$s_{X \text{ DMSO 1\%}} = 57$	$s = \text{ecart type}$

$$t_{\text{calculé}} = \frac{115.1 - 228}{\left[\frac{(33)^2}{12} + \frac{(57)^2}{10} \right]^{1/2}} = -5.537$$

$$v^* = dL = \frac{\left[\frac{(33)^2}{12} + \frac{(57)^2}{10} \right]}{\left[\frac{(33)^2}{12} + \frac{(57)^2}{10} \right]} = \frac{12-1}{10-1}$$

On a partir de la table à $\{ \alpha = 0.1\% \rightarrow t_{\alpha} = 3.787, dL = 14$

$| t_{\text{cal}} | \geq t_{\alpha/2}$ donc $| -5.5371 | > 3.787 \Rightarrow$ Donc, rejet de l'hypothèse nulle H_0 .

Il y a donc une différence très hautement significative (99%) entre les groupes du témoin et du traitement au DMSO 1%.

Des calculs similaires pour chacune des données des tableaux (8, 9, 10, 11, 13 et 14) ont été effectués sur ordinateur. Les tableaux suivant présentent les résultats de cette analyse statistique.

TABLEAU 8. Activité spécifique de la protéine kinase C (PKC) membranaire* dans les cellules L6: comparaison des traitements par rapport aux témoins correspondants.

**	Témoïn	+ DMSO 1%	Ca ²⁺ .25 mM	Ca ²⁺ 1.8 mM	RA .3 µM	TPA 1 µM
10 min	s ⁽²⁾	ths	ns	s	ns	ths
30 min	s ⁽²⁾	hs	s	ths	ns	ths
24 hrs	ths ⁽²⁾	ns	hs	hs	ns	ths
48 hrs	ths ⁽²⁾	ns	ths	s	ns	ths
72 hrs	ths ⁽²⁾	hs	ths	ths	ns	s
7 jours	ths ⁽²⁾	ns	s	ns	s	ths
+ HS ⁽¹⁾	ths ⁽²⁾	ns				

TABLEAU 9. Activité spécifique de la protéine kinase C (PKC) membranaire* dans les cellules HPV16-L6: comparaison des traitements par rapport aux témoins correspondants.

**	Témoïn	+ DMSO 1%	Ca ²⁺ 0.25 mM	Ca ²⁺ 1.8 mM	RA 0.3 µM	RA 3 µM	TPA 1 µM
10 min	s ⁽²⁾	ths	ths	ths	ths	ths	ths
30 min	s ⁽²⁾	s	ns	ths	s	hs	ths
24 hrs	ths ⁽²⁾	ns	hs	ths	ths	hs	ths
48 hrs	ths ⁽²⁾	ths	ths	ths	ths	ths	ths
72 hrs	ths ⁽²⁾	ths	ths	ths	ths	ths	ths
7 jours	ths ⁽²⁾	ns	ths	ths	s	s	ths
+ HS ⁽¹⁾	ths ⁽²⁾	ths	ns	ths	ths	hs	ths

L'activité de la PKC est exprimée en p moles de substrat phosphorylé par 0.1 mg de protéines membranaires totales. Le TPA a été utilisé comme témoins positif, exogène seulement pour 30 min, au delà, l'effet est complexe.

* La préparation des membranes a été décrite dans la section matériel et méthodes (section 13).
 ** Les cellules ont été traitées aux concentrations indiquées de DMSO, Ca²⁺, RA et TPA. La durée du traitement est également indiquée. Les cellules ont été cultivées dans du milieu EMEM à faible teneur en Ca²⁺ (0.05 mM).

(1) HS (sérum de cheval 3%)
 nd (non déterminé)
 s (significatif à 90%)
 hs (hautement significatif à 99%)
 ths (très hautement significatif à 99.9%)
 ns (non significatif à plus de 95%)

(2) comparaison des témoins des cellules L6 et HPV16-L6

TABLEAU 10. Activité cytosolique^a de la protéine kinase C (PKC) dans les cellules I6: comparaison des traitements par rapport aux témoins correspondants.

**	Témoin	DMSO	4%	Ca ²⁺	0.25 mM	1.8 mM	RA	TPA
		1%					.3 μM	1 μM
10 min	hs(2)	hs					ns	ths
30 min	ths(2)	ths	s	ths	s		ns	s
24 hrs	ths(2)	ns	ths	ths	ths		ns	
72 hrs	ths(2)	ths	ths	s	hs		ns	
7 jours	s	s	ns	s	ns		ns	

TABLEAU 11. Activité cytosolique^a de la protéine kinase C (PKC) dans les cellules HPV16-I6: comparaison des traitements par rapport aux témoins correspondants.

**	Témoin	DMSO	4%	Ca ²⁺	0.25 mM	1.8 mM	RA	TPA
		1%					.3 μM	1 μM
10 min	hs(2)	ns	hs	ths	ths		ths	ths
30 min	ths(2)	ths	s	ns	ths		hs	ths
24 hrs	ths(2)	s	ths	hs	ths		ths	
48hrs ^{***}		ths	ths	ths	ths		ths	
72 hrs	ths(2)	ns	ths	s	hs		s	

L'activité de la PKC est exprimée en p moles de substrat phosphorylé par 0.1 mg de protéines membranaires totales. Le TPA a été utilisé comme témoin positif endogène seulement pour 30 min, au delà, l'effet est complexe.

^a La préparation du cytosol a été décrite dans la section matériel et méthodes (section 13).

** Les cellules ont été traitées aux concentrations indiquées de DMSO, Ca²⁺, RA et TPA. La durée du traitement a été également indiquée. Les cellules sont cultivées dans du milieu à faible teneur en Ca²⁺ (0.05 mM).

*** L'activité à 48 hrs a été testée sur les cellules transfectées pour renforcer les résultats obtenus à 24 et 48 hrs. Le temps 7 jours n'a pas été testé.

- nd (non déterminé)
- s (significatif à 90%)
- hs (hautement significatif à 99%)
- ths (très hautement significatif à 99.9%)
- ns (non significatif à plus de 95%)

(2) comparaison des témoins des cellules I6 et HPV16-I6

TABLEAU 13. Activité spécifique de la protéine kinase C (PKC) membranaire[†] dans les kératinocytes (Balbc/MK): comparaison des traitements par rapport aux témoins correspondants.

**	Témoins	Ca ²⁺ 1.8 mM	DMSO 1%	DMSO 4%	RA 3 μM	TPA 1 μM
10 min		hs	ns	ns	s	ths
30 min	s ⁽²⁾	ths	ths	s	s	ths
30 hrs	hs ⁽²⁾	ths	s	ns	ths	ths
48 hrs	ns ⁽²⁾	ths	ths	ths	ths	ths
120 hrs	ths ⁽²⁾	ths	ths	s	s	ths

TABLEAU 14. Activité de la protéine kinase C (PKC) membranaire[†] dans les kératinocytes transformés par le virus du papillome humain type 16 (HPV16-Balbc/MK): comparaison des traitements par rapport aux témoins correspondants.

**	Témoins	Ca ²⁺ 1.8 mM	DMSO 1%	DMSO 4%	RA .3 μM	TPA 1 μM
30 min	s ⁽²⁾	s	ns	ns	ns	hs
30 hrs	hs ⁽²⁾	hs				
48 hrs ^{††††}	ns ⁽²⁾	ns	s	ths	ns	
120 hrs	ths ⁽²⁾	ns	ns	s	ths	

L'activité de la PKC est exprimée en p moles de substrat phosphorylé par 0.1 mg de protéines membranaires totales. Le TPA a été utilisé comme témoin positif exogène seulement pour 30 min, au delà, l'effet est complexe.

† La préparation des membranes a été décrite dans la section matériel et méthodes (section 13).

** Les cellules ont été traitées aux concentrations indiquées de DMSO, Ca²⁺, RA et TPA. La durée du traitement est également indiquée. Les cellules ont été cultivées dans du milieu EMEM à faible teneur en Ca²⁺ (0.05 mM).

††† L'activité à 10 min a été mesurée chez les témoins seulement, afin de préciser exactement le délai dans la réponse précoce. Cela n'était pas nécessaire pour les cellules transfectées.

nd (non déterminé)

s (significatif à 90%)

hs (hautement significatif à 99%)

ths (très hautement significatif à 99.9%)

ns (non significatif à plus de 95%)

(2) comparaison des témoins des cellules L6 et HPV16-L6

ANNEXE III

"Gene clean": Protocole du manufacturier

The GENE CLEAN® Kit
BIO 101 Inc.

P.O. Box 2284
La Jolla, CA 92038-2284
(619) 546-0556 (800) 424-6101

General Outline of GENE CLEAN® Procedure: (When DNA is contained in agarose, include the parenthetical statements).

1. (Excise band from agarose gel.)
2. Add 2.5 to 3 volumes of NaI stock solution. (Incubate 5 minutes at 45 to 55 C to dissolve agarose.)
3. Add GLASSMILK® suspension. Incubate for 5 minutes.
4. Pellet GLASSMILK®/DNA complex for 5 seconds. Remove supernatant and set aside.
5. Wash pellet 3 times with NEW.
6. Elute DNA into water or low-salt buffer.

The above procedure takes about 15 (20) minutes to complete.

If the user is not familiar with the details of the above outline of procedure, read NOTES ON THE GENERAL OUTLINE.



ANNEXE IV

Publications