

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

PAR

BENOIT D'AMOURS

CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DE
MUTANTS THERMOSENSIBLES PRÉCOCES-IMMÉDIATS
DU CYTOMÉGALOVIRUS HUMAIN

JUIN 2000

« Pendant cet unique moment, il oublia
qu'il était ce bon gros Ben Hanscom; il se
sentait comme Thor, martelant éclairs et
tonnerre à la forge des dieux. »

Stephen King, *Ça*, 1986

À Isabelle et à
toute ma famille.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
SOMMAIRE	xvi
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. INTRODUCTION	6
2. STRUCTURE DU VIRUS ET ORGANISATION DU GÉNOME	6
3. PATHOLOGIE	9
4. LE CYCLE LYTIQUE	11
5. DÉTAILS SUR LA PHASE PRÉCOCE-IMMÉDIATE	13
6. GÉNÉRALITÉS SUR L'ÉPISSAGE DIFFÉRENTIEL	16
7. LATENCE ET RÉACTIVATION	18
8. PROBLÉMATIQUE	20
MATÉRIEL ET MÉTHODES	23
1. RÉSUMÉ DES ÉTAPES PRINCIPALES	24
2. SOUCHES VIRALES	24
3. TITRAGES	25
4. CULTURES CELLULAIRES	26
5. CINÉTIQUE D'INHIBITION DE LA CROISSANCE VIRALE	27
6. RÉSISTANCE À L'ACIDE PHOSPHONOACÉTIQUE	27
7. ADN RECOMBINANT	28
7.1 Préparation des cosmides	28
7.2 Sous-clonage	29

7.3 Purification des plasmides recombinants	29
7.4 Transformation des cellules bactériennes	30
7.5 Extraction de bandes d'ADN des gels d'agarose	31
7.6 Marquage de l'ADN	31
7.7 Buvarpage Southern	32
8. ÉPREUVE DE SAUVETAGE DE MARQUEURS	33
9. IMMUNOBUVARDAGE WESTERN	34
10. BUVARDAGE NORTHERN	36
11. SÉQUENÇAGE DE L'ADN	39
RÉSULTATS	41
1. SOUCHES THERMOSENSIBLES DE DÉPART	42
2. TEST DE RÉSISTANCE À L'ACIDE PHOSPHONOACÉTIQUE ...	43
3. CINÉTIQUE D'INHIBITION DE LA CROISSANCE VIRALE	43
4. ÉPREUVE DE SAUVETAGE DE MARQUEURS	45
4.1 Préparation des cosmides	45
4.2 Sous-clonage du fragment <i>Hind</i> III-E	46
4.3 Sauvetage de marqueurs	46
5. SÉQUENÇAGE	48
5.1 Clonage du fragment <i>Hind</i> III-E des mutants	48
5.2 Sous-clonage	49
5.3 Séquençage	49
5.3.1 Souche HCMV <i>ts446</i>	51
5.3.2 Souche HCMV <i>ts486</i>	52
5.3.3 Souche HCMV <i>ts504</i>	53
6. IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN	53
6.1 Souche HCMV <i>ts446</i>	54
6.2 Souche HCMV <i>ts486</i>	55

6.3 Souche HCMV <i>ts504</i>	56
6.4 Expression des protéines précoces-immédiates dans les cellules non-permissives	57
6.5 Effets du PMA sur l'expression des protéines	58
7. BUVARDAGE DE TYPE NORTHERN	60
7.1 Expression des ARNm précoces-immédiats	60
7.2 Effet du PMA sur les ARNm précoces-immédiats	61
DISCUSSION	64
1. UTILITÉ DES MUTANTS THERMOSENSIBLES	65
2. CARACTÉRISATION PRÉLIMINAIRE DES MUTANTS	66
3. IDENTIFICATION DES MUTATIONS	69
4. CONSÉQUENCES FONCTIONNELLES DES MUTATIONS	74
4.1 Souche HCMV <i>ts446</i>	74
4.2 Souche HCMV <i>ts486</i>	76
4.3 Souche HCMV <i>ts504</i>	77
5. IMPORTANCE DE L'ÉPISSAGE DANS LA PERMISSIVITÉ	78
6. MUTANTS THERMOSENSIBLES COMME MODÈLES DE LATENCE	81
7. PERSPECTIVES	83
CONCLUSION	86
REMERCIEMENTS	89
BIBLIOGRAPHIE	92
TABLEAUX ET FIGURES	111
ANNEXE I: LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	192
ANNEXE II: PUBLICATION	195

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	:	Ampère
APA	:	Acide phosphonoacétique
ASV	:	Avian Sarcoma Virus
ATCC	:	American Type Culture Collection
dATP	:	Désoxy adénosine triphosphate
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	:	Diméthyl sulfoxide
DOTAP	:	Sulfate de N-[1-(2,3 dioleoyloxy) propyl]-N,N,N-triméthyl-ammoniumméthyl
EDTA	:	Acide d'éthylène diamine tétraacétique
HBS	:	Solution saline tamponnée à l'HÉPES
HÉPES	:	Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthane sulfonique
kb	:	Kilopaire de bases ou 10^3 paires de bases
kDa	:	KiloDalton ou 10^3 Daltons (1 Dalton = masse de l'atome d'hydrogène)
MEM	:	Minimal Eagle Medium
MIEP	:	Major Immediate-Early Enhancer/Promoter
MOI	:	Multiplicité d'infection
MOPS	:	Acide morpholino-propane sulfonique
PBS	:	Solution saline tamponnée au phosphate
PI	:	Post-infection
PMA	:	Acétate de phorbol myristique
PPP	:	Points par pouce
PVDF	:	Difluorure de polyvinyle

RPMI	:	Roswell Park Memorial Institute
SDS	:	Dodécyl sulfate de sodium
SIDA	:	Syndrome d'immunodéficience acquise
SSC	:	Solution saline de citrate de sodium
SVF	:	Sérum de veau foetal
SV40	:	Simian Virus 40
TBE	:	Tampon Tris-Borate-EDTA
TBS	:	Solution saline tamponnée au Tris
TE	:	Tampon Tris-EDTA
UFP	:	Unité formatrice de plages
V	:	Volt
WT	:	Souche sauvage

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Réplication de la souche sauvage et des mutants HCMV à températures permissive (33,5°C) et non-permissive (39,5°C).

Tableau II: Réplication de la souche sauvage et des mutants en présence ou absence d'acide phosphonoacétique (APA). Les titres sont donnés en UFP/ml.

Tableau III: Plages obtenues par sauvetage de marqueurs en utilisant des cosmides superposés représentant le génome entier du HCMV souche AD169 sauvage.

Tableau IV: Plages obtenues par sauvetage de marqueurs en utilisant des sous-fragments du plasmide pLCC1534 (fragment génomique *Hind* III-E).

Tableau V: Amorces utilisées pour le séquençage du gène IE1/2.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Architecture de la particule virale.

Figure 2: Conformations du génome du cytomégalovirus.

Figure 3: Cycle de réplication du cytomégalovirus.

Figure 4: Organisation de la section modulateur/activateur/promoteur (MIEP) du gène IE1/2.

Figure 5: Épissage différentiel du gène majeur IE1/2.

Figure 6: Fonctions des protéines de la phase précoce-immédiate.

Figure 7: Croissance de la souche HCMV *ts446*, en comparaison avec celle de la souche sauvage AD169, aux températures permissive et non-permissive.

Figure 8: Croissance de la souche HCMV *ts486*, en comparaison avec la souche sauvage AD169, aux températures permissive et non-permissive.

Figure 9: Croissance de la souche HCMV *ts504*, en comparaison avec la souche sauvage AD169, aux températures permissive et non-permissive.

Figure 10: Cinétique d'inhibition des souches mutantes à 39,5°C.

Figure 11: Cosmides dérivés du génome de la souche sauvage AD169, digérés par les enzymes *BamH I* et *EcoR I*.

Figure 12: Sous-clonage du plasmide pLCC1534 (*Hind III-E*).

Figure 13: Sauvetage de marqueurs en utilisant les sous-clones du plasmide pLCC1534 (*Hind III-E*).

Figure 14: Cosmides dérivés des souches mutantes, digérés par les enzymes *BamH I* et *Pst I*.

Figure 15: Séquence nucléotidique du gène IE1/2 de la souche AD169, des trois mutants HCMV *ts* et d'un dérivé de la séquence Chee.

Figure 16: Séquence des acides aminés de la protéine IE1 de la souche HCMV AD169, des trois mutants HCMV *ts* et d'un dérivé de la séquence Chee.

Figure 17: Séquence des acides aminés de la protéine IE2 de la souche AD169, des trois mutants HCMV *ts* et d'un dérivé de la séquence Chee.

Figure 18: Immunobuvardage de type Western des protéines de la souche sauvage AD169 dans les fibroblastes humains IAFP-1 à 1, 2, 4, 6, 8, 10 et 12 jours post-infection.

Figure 19: Immunobuvardage de type Western des protéines de la souche sauvage (WT) et mutante (*ts446*) dans les fibroblastes humains IAFP-1 après 1, 2, 4, 8, 12, 25 et 30 h d'incubation à température restrictive.

Figure 20: Immunobuvardage de type Western des protéines de la souche sauvage (WT, puits 2, 4, 6, 8, 11, 13 et 15) et mutante (*ts486*, puits 3, 5, 7, 10, 12, 14 et 16) dans les fibroblastes humains IAFP-1 après 1, 2, 4, 8, 12, 25 et 30 h d'incubation à température restrictive.

Figure 21: Immunobuvardage de type Western des protéines de la souche sauvage (WT) et mutante (*ts504*) dans les fibroblastes humains IAFP-1 après 1, 2, 4, 8, 12, 25 et 30 h d'incubation à température restrictive.

Figure 22: Immunobuvardage de type Western des souches sauvage et *ts504* en présence de cycloheximide.

Figure 23: Immunobuvardage de type Western des protéines de la souche sauvage dans les fibroblastes humains IAFP1 et dans les cellules non-permissives AV3, Caco2, THP1 et U937.

Figure 24: Production aberrante des isoformes de petite taille de la protéine IE2 par le mutant *ts486* à température permissive, dans les cellules THP1 et U937.

Figure 25: Production d'isoformes de petite taille de la protéine IE2 par le mutant *ts486* à température non-permissive dans les cellules AV3 en présence ou absence de PMA.

Figure 26: Augmentation de la production de la protéine IE1-72K par le mutant *ts504* à température non-permissive, en présence de PMA, dans les cellules IAFP1.

Figure 27: Buvardage de type Northern des ARN messagers de la souche sauvage HCMV AD169 et des mutants *ts* dans les fibroblastes humains IAFP-1 à 4 h post-infection.

Figure 28: Séparation sur gel agarose/formaldéhyde des ARN totaux extraits de cellules IAFP1.

Figure 29: Buvardage de type Northern des ARN messagers de la protéine IE1 pour la souche sauvage HCMV AD169 et les mutants *ts* dans des fibroblastes humains IAFP1 à 1, 2 et 4 h post-infection, en présence ou non de PMA.

Figure 30: Buvardage de type Northern des ARN messagers des protéines IE2 pour la souche sauvage HCMV AD169 et les mutants *ts* dans des fibroblastes humains IAFP1 à 1, 2 et 4 h post-infection, en présence ou non de PMA.

SOMMAIRE

Le cytomégalo virus humain (HCMV) est un virus enveloppé au génome d'ADN linéaire de 231 kb, dont la prévalence varie de 70 à 100% selon la population considérée. Appartenant à la famille des herpesviridae, il possède comme ceux-ci la capacité de demeurer présent à l'état latent dans l'organisme pour la durée de la vie de son hôte.

Disposant de mutants thermosensibles (*ts*) ADN⁻, nous avons déterminé quelles sont les protéines en cause et leur implication dans le cycle de réplication du virus. Des expériences de sauvetage de marqueurs et d'immunobuvardage de type Western ont permis d'identifier les protéines mutées responsables du phénotype thermosensible, soit la protéine IE1 (*ts446*) et deux isoformes de la protéine IE2 (*ts486* et *ts504*). Ces protéines sont responsables de l'activation du cycle lytique, d'où l'intérêt de ces mutants. Le séquençage des gènes codant pour ces protéines a ensuite conduit à l'identification des substitutions d'acides aminés menant à une déstabilisation de la structure de ces protéines à température restrictive.

Ces protéines, de type précoces-immédiates, sont les premières exprimées lors de l'initiation de l'infection. Elles ont pour rôle de faire démarrer la transcription des protéines responsables de la réplication de l'ADN viral, et de leur expression dépend la permissivité de la cellule hôte, ce qui leur confère une importante fonction au niveau de l'établissement de l'état latent. L'expression de ces protéines étant liée au degré de différenciation

de la cellule, nous avons alors vérifié par hybridation de type Northern et immunobuvardage de type Western l'expression de ces protéines par les souches mutantes dans des lignées cellulaires avec différents degrés de différenciation (Caco2, IAFP-1, AV3, THP-1 et U-937), parfois en présence d'esters de phorbol. Les résultats obtenus à ce jour montrent une expression aberrante de certaines de ces protéines à température restrictive, variant selon la lignée cellulaire utilisée et résultant probablement de l'accumulation de ces protéines non-fonctionnelles, normalement autorégulatrices. Ces mêmes résultats ont également permis d'identifier l'épissage différentiel du gène IE1/2 comme facteur déterminant dans la permissivité de la cellule.

Nous espérons que ces travaux permettront une meilleure compréhension de l'établissement de l'état de latence, un phénomène de très grande importance au niveau médical.

INTRODUCTION

Le cytomégalo­virus humain est un membre de la famille des herpesviridae, montrant une forte prévalence chez toutes les populations humaines, soit de 70 à 100% selon les conditions socio-économiques de celles-ci. Efficacement combattu par le système immunitaire de l'hôte, il ne cause normalement qu'une infection à peu près asymptomatique. Par contre, dans le cas d'individus immunologiquement immatures (foetus et nouveau-nés) ou immunodéficients (receveurs de greffes, sidéens), il peut causer des affections variées, allant jusqu'à la mort. Il présente également la capacité, commune à tous les herpesvirus, de demeurer présent à l'état latent pour toute la durée de vie de son hôte. Ensemble, son haut degré de prévalence et sa facilité à établir l'état de latence, font du HCMV un pathogène humain majeur dont l'importance est de plus en plus reconnue par la communauté médicale, surtout depuis la découverte du SIDA.

La latence, la réactivation et l'initiation du cycle lytique sont contrôlées par un équilibre complexe entre certaines protéines précoces-immédiates. Ces protéines originent toutes de l'épissage différentiel du même gène majeur précoce-immédiat, ce gène étant lui-même sous le contrôle d'un puissant bloc modulateur/activateur et promoteur. L'usage de promoteurs et de sites d'épissage alternatifs commande ainsi la production de nombreux polypeptides variant entre 14 et 86 kDa, aux fonctions variées et parfois antagonistes. Les fonctions de ces protéines ont été largement étudiées par clonage d'ADN et essais d'expression transitoire, mais très rarement dans le contexte du génome viral complet. De telles

expériences, indispensables dans l'étude de la latence, peuvent être menées plus facilement en utilisant des mutants thermosensibles dont la réplication peut être bloquée par transfert des cellules infectées à la température restrictive.

Ayant de tels mutants à notre disposition, nous avons d'abord déterminé le site et la nature des mutations, puis identifié les substitutions d'acides aminés menant au phénotype thermosensible. Nous avons ensuite utilisé ces mutants pour vérifier l'expression des protéines précoces-immédiates dans des cellules permissives et non-permissives, afin de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus lors d'expériences d'expression transitoire. Nous avons aussi étudié brièvement les interactions entre le démarrage de leur production (dirigée par les facteurs de transcription présents dans la cellule hôte) et la présence ou l'absence de chacune des trois principales isoformes de ces protéines, de même que l'influence d'un activateur de la transcription sur l'équilibre entre ces trois protéines. Celles-ci seraient en effet le déterminant majeur de l'établissement et du maintien de l'état latent, ainsi que de la réactivation du cycle lytique. Des expériences récentes ayant montré qu'un second facteur, autre que la capacité à démarrer la transcription, pourrait être impliqué dans la permissivité d'un type particulier de cellules, nous avons également tenté de définir ce facteur et ses implications.

Nous présenterons d'abord dans cette thèse un bref survol des recherches déjà effectuées dans le domaine, suivi d'une description des méthodes expérimentales et des résultats obtenus. Finalement, nous discuterons ces résultats en fonction des autres travaux publiés dans le domaine.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. INTRODUCTION

Le cytomégalovirus humain (HCMV), également désigné HHV5 (Human Herpes Virus 5), compte parmi les virus les plus gros et les plus complexes. Parmi les divers herpèsvirus, le HCMV appartient à la sous-famille des β -herpesvirinae, tout comme les virus HHV6 et HHV7 (Human Herpes Virus 6 et 7; Levy, 1997). Il partage de nombreuses caractéristiques avec tous les herpesviridés quant à la structure de la particule virale, son mode de réplication et son maintien à l'état latent, mais se distingue de chacun d'entre eux par sa forte spécificité d'espèce et sa croissance lente en culture cellulaire, étant dépourvu d'un mécanisme d'inhibition de la synthèse protéique de la cellule hôte. Il se distingue également par l'utilisation des cellules souches des leucocytes comme réservoirs d'infection latente (les principaux mécanismes de latence sont revus dans Hamelin et D'Amours, 1994). Les autres herpèsvirus humains incluent HSV1 et 2 (Herpes Simplex Virus 1 et 2) et VZV (Varicella Zoster Virus) chez les α -herpesvirinae (croissance rapide, latence dans les ganglions nerveux), et finalement EBV (Epstein-Barr Virus) et HHV8 (initialement appelé KSHV, Kaposi's Sarcoma associated Herpesvirus; Levy, 1997) parmi les γ -herpesvirinae, ces derniers étant lymphotropes et oncogènes.

2. STRUCTURE DU VIRUS ET ORGANISATION DU GÉNOME

La particule virale typique est formée de 4 éléments principaux (Figure 1). D'abord un noyau de forme toroïdale, constitué

de protéines fibrillaires, supportant l'ADN au centre de la capsid. Celle-ci, de forme icosaédrique, est constituée de 12 capsomères pentamériques et de 150 capsomères hexamériques pour un diamètre d'environ 100 nm. Elle est entourée du tégument, une structure amorphe plus ou moins sphérique, constituée de diverses protéines; et le tout est enveloppé par une membrane lipidique supportant les diverses glycoprotéines de surface. La capsid contient principalement la protéine majeure MCP (UL86) et la protéine mineure mCP, respectivement analogues aux protéines VP5 et VP19c du virus HSV (Braun *et al.*, 1984; Rudolph *et al.*, 1990).

Trois des six protéines du tégument nous intéressent particulièrement ici. Citons rapidement à titre informatif la protéine majeure pp150 (UL82), une protéine très immunogène de 150 kDa qui forme l'essentiel de la masse du tégument. Moins abondante, la protéine pp65 (UL83) est une protéine kinase (Britt et Auger, 1986; Michelson *et al.*, 1984; Roby et Gibson, 1986) elle-même phosphorylée et impliquée dans l'initiation de la phase précoce-immédiate. Peu abondante dans les souches cliniques (Klagues *et al.*, 1989), elle devient un constituant important du tégument dans les souches de laboratoire (AD169 et Towne) après un grand nombre de passages. La protéine pp71, la moins abondante, est un *trans*-activateur impliqué dans l'activation de la transcription des gènes précoces-immédiats (Liu et Stinski, 1992), l'équivalent fonctionnel de la protéine α -TIF du virus Herpes Simplex.

L'enveloppe du virion est dérivée de la membrane nucléaire interne, et parfois également de la membrane cytoplasmique. Elle contient plusieurs glycoprotéines aux fonctions biologiques

importantes. La protéine gpB, une glycoprotéine de 150 kDa clivée en deux sous-unités est, entre autres choses, responsable de la pénétration initiale dans la cellule (Navarro et al., 1993). Elle est l'une des cibles principales des anticorps neutralisants. La glycoprotéine gpH est également nécessaire à la pénétration dans la cellule, et s'avère une cible pour les anticorps neutralisants (Rasmussen *et al.*, 1991). Unique au cytomégalovirus, le complexe gCII (ou gp47-52) est la protéine capable de se lier à l'héparine, le premier récepteur du HCMV (Kari et Gehrz, 1992), en plus d'être une excellente cible pour les anticorps neutralisants. L'enveloppe contient de nombreuses autres glycoprotéines d'importance mineure et souvent non-indispensables à la réplication en culture cellulaire et dont les fonctions sont encore mal définies. Fait intéressant, on y retrouve également un récepteur IgG Fc d'origine cellulaire dont le gène est induit par le virus (Mocarski, 1993), dont l'un des effets pervers serait de favoriser l'entrée du virus HIV dans les cellules préinfectées par le HCMV.

Le génome des différents herpèsvirus comporte parfois des sections répétitives et ceux-ci sont divisés en 6 classes (Figure 2A) selon la taille et la disposition de ces sections. Celui du HCMV, de classe E (Hamelin et D'Amours, 1994; Chee *et al.*, 1990; Dion et Hamelin, 1990), est constitué de deux sections uniques, longue et courte (U_L et U_S), flanquées chacune de sections répétitives (TR_L et TR_S et IR_L et IR_S) et pouvant être inversées l'une par rapport à l'autre (Figure 2B). Ceci nous donne un total de quatre conformations possibles, présentes chacune en quantité équivalente dans une population virale donnée. Ces séquences répétitives contiennent

également les séquences motifs responsables du clivage et de l'encapsidation de l'ADN lors du cycle lytique (Spaete et Mocarski, 1985).

De grande taille (les génomes viraux variant habituellement entre 2 kb pour les petits virus à ARN et jusqu'à 300 kb pour les plus gros comme les poxviridés), le génome du HCMV est un ADN linéaire double brin de 231 kb, codant potentiellement pour plus de 200 polypeptides (Chee *et al.*, 1990). La fonction d'un grand nombre de ces gènes a été identifiée par homologie avec les gènes d'autres herpesvirus, particulièrement avec HSV, VZV et EBV. Plusieurs de ces gènes sont ordonnés en blocs que l'on retrouve conservés, quoique dans un ordre différent chez ces mêmes herpesvirus. Le pourcentage de G+C dans l'ADN HCMV est de 57,2%; et donc un pourcentage relativement élevé puisqu'il varie normalement entre 40 et 60% chez les virus animaux. Toutefois, ce chiffre varie selon les sections du génome, et tout particulièrement dans les sections répétitives (Chee *et al.*, 1990).

3. PATHOLOGIE

Le HCMV peut être transmis par infection congénitale, ou par contacts rapprochés, les sources de virus incluant les sécrétions oropharyngéennes et vaginales, l'urine, les excréments, le sang, le sperme, la salive, les larmes et le lait maternel. Il est endémique dans le monde entier et sa prévalence varie de 70 à 100% selon les conditions socio-économiques d'une population donnée.

Fondamentalement, le virus infecte *in vivo* les cellules épithéliales des conduits de divers organes (Ho, 1982), comme l'épithélium intestinal ou les canaux excréteurs des glandes salivaires, mais rarement les fibroblastes, contrairement à ce que l'on observe *in vitro*. Les organes les plus affectés sont les reins et les poumons, mais on observe également fréquemment des atteintes gastrointestinales, neurales, dermiques et cochléaires. Le HCMV est cependant peu pathogène, l'infection étant asymptomatique chez les individus immunocompétents. Il est toutefois responsable de maladies congénitales très graves et est dangereux pour les personnes immunosupprimées, à la suite d'une greffe ou d'une maladie comme le SIDA.

Le HCMV, par contre, ne semble pas très susceptible de causer directement des tumeurs ou des cancers, mais il est impliqué en tant que cofacteur dans le cancer de la prostate (Rapp, 1984; Rapp et Robbins, 1984). Il a également été longtemps soupçonné d'être à l'origine du sarcome de Kaposi, mais ce rôle est maintenant attribué au virus HHV8 (Le Gars *et al.*, 1998; Levy, 1997; Memar *et al.*, 1995; Offermann, 1996; Sun *et al.*, 1998). En laboratoire, le cytomégalovirus ne semble présenter qu'une faible capacité tumorigène, celle-ci demandant en plus deux étapes distinctes, soit la transformation et l'immortalisation des cellules (Yelle *et al.*, 1990).

La réponse immunologique de l'hôte est double, à la fois de type humorale et cellulaire. Lors de l'infection primaire, la réponse cytotoxique semble être la plus importante, puisque l'infection est généralement contrôlée avant que la production d'anticorps

neutralisants n'atteint un niveau significatif. Ceci n'est pas dû à un manque d'efficacité de la réponse humorale, car l'administration d'anticorps neutralisants (immunité passive) protège l'individu de l'infection, par exemple lors du transfert d'anticorps dans le lait maternel. Par contre, les anticorps pourraient jouer un rôle plus important lors de la réactivation de l'infection latente. Chez l'humain et dans les modèles animaux, la réponse par les cellules T cytotoxiques est le principal moyen de stopper la virémie. Le transfert passif de cellules cytotoxiques dirigées contre le HCMV a d'ailleurs été utilisé comme thérapie lors de maladies induites par le HCMV suite à des transplantations d'organes. La réponse immunologique contre le cytomégalovirus a fait l'objet de plusieurs revues de littérature, entre autres par Koszinowski (1990), Rasmussen (1990) et Rook (1988). Soulignons finalement que les cellules NK participent à la réponse cytotoxique, surtout avant le développement de la réponse spécifique (Borysiewicz et al., 1985), mais elles ne sont pas suffisantes pour contrôler l'infection.

4. LE CYCLE LYTIQUE

Le cycle lytique du cytomégalovirus est presque identique à celui du virus herpès simplex, à l'exception de la protéine VHS (Virion Host Shut-Off). Cette protéine, qui a pour fonction d'inhiber la synthèse des protéines cellulaires en détruisant les polyribosomes, est absente chez le HCMV ce qui a pour effet de ralentir considérablement le cycle répliatif, lequel passe de 24 h (HSV) à 4-6 jours (HCMV). Comme chez tous les herpèsvirus, le

cycle de réplication du HCMV est divisé en trois phases (Hamelin et D'Amours, 1994). La phase précoce-immédiate ou α , qui dure environ 4 h est caractérisée par la production de facteurs de transcription viraux. Elle est suivie par la phase précoce ou β durant laquelle sont d'abord produites les protéines et enzymes responsables de la réplication de l'ADN viral, puis ces enzymes entrent en fonction pour produire de multiples copies du génome viral. Cette étape est plus longue que chez les autres herpèsvirus, prenant entre 24 et 36 h. Elle est suivie de la phase tardive ou γ , durant laquelle sont produites les protéines structurales qui forment ensuite les particules virales complètes. Les virus complets commencent à s'accumuler dans les cellules après environ 24 h, pour atteindre un nombre maximal entre 72 et 96 h après le début de l'infection.

Le cycle de réplication du HCMV est représenté dans la Figure 3. Le virus se lie à la cellule par les deux récepteurs sulfate d'héparine et aminopeptidase N (CD 13, Soderberg *et al.*, 1993), ce qui permet l'entrée de la capsidie par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. La capsidie est alors transportée aux pores nucléaires, accompagnée des protéines du tégment, où l'ADN linéaire est libéré dans le noyau et se circularise. Sous l'influence de la protéine du tégment pp71 et des facteurs cellulaires de transcription, les protéines précoces-immédiates sont produites. Ces protéines vont ensuite faire démarrer la production des protéines précoces, celles-ci ayant pour tâche d'abord la réplication de l'ADN viral selon le modèle du cercle roulant, et ensuite la production de protéines tardives (protéines structurales). L'ADN nouvellement synthétisé sous la forme de longs concatémères est

empaqueté dans les précurseurs de capsides préassemblés, par la reconnaissance de certaines séquences nucléotidiques. Les capsides complétées s'enrobert ensuite des protéines du tégument et bourgeonnent à travers la membrane nucléaire interne où elles acquièrent enveloppe et glycoprotéines de surface. Les virions produits s'accumulent en majorité dans la lumière du réticulum endoplasmique jusqu'à leur libération, suite à la lyse de la cellule. Le cycle lytique du HCMV a été décrit en détail par Mocarski, 1993.

5. DÉTAILS SUR LA PHASE PRÉCOCE-IMMÉDIATE

La réactivation au sortir de l'état de latence et l'initiation du cycle lytique sont contrôlées par un équilibre complexe entre plusieurs protéines précoces-immédiates originant du gène majeur IE1/2 (Baracchini *et al.*, 1992). Celles-ci sont produites par épissage différentiel à partir d'un ensemble complexe Modulateur/Activateur/Promoteur (Figure 4), couvrant à lui seul environ 1 000 paires de bases. L'utilisation de jonctions d'épissage 3' et 5' alternatives, de plusieurs sites de polyadénylation, et de promoteurs secondaires résulte en la production d'une gamme de polypeptides variant entre 20 à 86 kDa (Figure 5). Une carte de la position des sites d'épissage est donnée au début de la Figure 15; on y détaille la position et la séquence des sites donneurs et receveurs d'épissage, utilisés ou cryptiques (Rawlinson et Barrel, 1993). Le patron d'expression de ces protéines change durant le cycle lytique, mais seulement trois protéines majeures, IE1-72K, IE2-86K et IE2-55K sont exprimées durant la phase précoce-immédiate. Les deux

premières sont les plus abondantes, tandis que IE2-55K est produite en quantité beaucoup plus faible mais son expression peut être augmentée par l'ajout de cycloheximide dans le milieu de culture. Différents transcrits de plus petite taille, dont la fonction est inconnue, peuvent également être produits à partir du gène IE1/2 (Rawlinson et Barrel, 1993).

Les fonctions de ces protéines ont beaucoup été étudiées par essais d'expression transitoire avec de l'ADN génomique (Stenberg et Stinski 1985) ou des ADN complémentaires clonés (Baracchini *et al.*, 1992). Selon le modèle communément accepté de l'expression des gènes précoces-immédiats (Figure 6), la protéine IE1-72K est la première produite, par l'intermédiaire du facteur de transcription cellulaire NF- κ -B (lequel se lie aux séquences répétées de 18bp de l'activateur) et du transactivateur pp71 du tégument, si présent. Dès que son expression atteint un niveau suffisant, IE1-72K provoque une transition vers l'expression de la protéine IE2-86K, laquelle bloque la production des ARNm originant de leurs propres promoteurs en se liant à une séquence de *cis*-répression couvrant le site d'initiation de la transcription (Cherrington *et al.*, 1991; Hermiston *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991). Ceci résulte évidemment en une baisse dramatique de sa propre expression et de celle de IE1-72K qui favorise le passage en phase précoce de l'infection (alors que IE1-72K avantage plutôt l'expression des protéines précoces-immédiates). Le rôle de la protéine IE2-55K serait de moduler plus finement l'expression des protéines précoces-immédiates car elle est capable de lever l'inhibition de IE1-72K par IE2-86K (Baracchini *et al.*, 1992). Ceci pourrait conférer une grande importance à IE2-

55K, malgré son faible niveau d'expression. Dès le début de la phase précoce, IE1-72K et IE2-86K agissent alors en synergie sous forme d'homo- et d'hétérodimères pour stimuler la transcription des promoteurs précoces. Ces protéines et les sites qu'elles reconnaissent ont surtout été étudiés pour les homodimères de IE2-86K; ces complexes se lient aux séquences riches en A/T de 10 nucléotides de long, bordées par des couples CG (Rodems *et al.*, 1998; Waheed *et al.*, 1998). La séquence cis de répression de la transcription du gène IE1/2 (CGTTTAGTGAACCG) respecte d'ailleurs ces caractéristiques. L'étude par délétion des protéines IE1 et IE2 a montré que les domaines de dimérisation sont situés à l'extrémité C-terminale de ces protéines, par exemple entre les acides aminés 388 et 542 pour la protéine IE2 (Ahn *et al.*, 1998). Le domaine de liaison à l'ADN est situé, quant à lui, entre l'extrémité N-terminale et le centre de ces protéines (Ahn *et al.*, 1998; Chee *et al.*, 1990; Wilkinson *et al.*, 1998). Une dernière caractéristique de la protéine IE2-86K est de bloquer le cycle de division cellulaire, en modifiant le taux de transcription des cyclines, les protéines responsables du contrôle de la division cellulaire (Bresnahan *et al.*, 1998; Salvant *et al.*, 1998). Ce blocage de la réplication favorise évidemment le cycle lytique du virus en monopolisant les ressources de la cellule.

Quelques autres protéines mineures sont également produites lors de la phase précoce-immédiate. Les protéines UL36-38 et US3 montrent une fonction *trans*-activatrice en association avec les protéines IE1-72K et IE2-86K, sur des gènes viraux (UL112) ou cellulaires (*hsp* 70; Colberg-Poley *et al.*, 1992). Deux autres protéines, TRS1 et IRS1 (Stasiak et Stinski, 1992), sont finalement

impliquées avec IE1-72K et IE2-86K comme *trans*-activateurs du gène UL36, un gène au promoteur complexe comprenant plusieurs boîtes TATA dont l'expression est régulée différemment lors des phases précoce et tardive. On retrouve finalement les transcrits IE3 et IE4, respectivement de 2,2 et 5,0 kpb, situés immédiatement en aval du gène IE1/2 et dont les fonctions sont inconnues à ce jour. Le transcrit IE4, non polyadénylé et dépourvu de cadre de lecture mesurant plus de 200 paires de bases semblerait posséder des propriétés transformantes (Stamminger et Fleckenstein, 1990).

6. GÉNÉRALITÉS SUR L'ÉPISSAGE DIFFÉRENTIEL.

Puisque l'épissage différentiel tient une grande place dans le déroulement de la phase précoce-immédiate, il semble approprié d'en revoir ici les principaux mécanismes.

Lors de la maturation du transcrit primaire, l'excision des introns est assurée par le "spliceosome" (Nelson et Green, 1990), un ensemble complexe de protéines et des petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNP; U1, U2, U5 et U4/6). Trois séquences doivent être reconnues afin de permettre l'assemblage du "spliceosome" (elles tolèrent une certaine variabilité): d'abord les séquences d'épissage 5' et 3', puis la séquence de branchement en amont du site d'épissage 3'. La séquence 5' ou séquence donneuse est une séquence consensus de 9 nucléotides (5'-CMG/GUAMGU-3') complémentaire à l'extrémité 5' du petit ARN nucléaire U1. La séquence 3' réceptrice est de type 5'-YSWDYAG/K-3' (Rawlinson et Barrel, 1993). Les codes d'ambiguïté utilisés sont les codes standards K= U ou G, M= A ou C, S= G ou C, W=

U ou A, Y= U ou C, et D= A ou G ou U. Après reconnaissance de la séquence 5' par l'ARN U1 et de la séquence de branchement par l'ARN U2 (Nelson et Green, 1990), le résidu G à l'extrémité de l'exon en amont est lié de façon covalente à un résidu A de la séquence de branchement; les extrémités 5' et 3' des exons sont ensuite liées après un second clivage en 3' (Maniatis, 1991). Cet épissage peut même s'effectuer en trans, entre des brins d'ARN différents (Bruzik et Maniatis, 1995; Chiara et Reed, 1995).

Lors de l'épissage différentiel, le choix entre les différents sites d'épissage serait contrôlé par des facteurs cellulaires capables de reconnaître des séquences activatrices situées près du site 3' (Schaal et Maniatis, 1999; Hertel et Maniatis, 1998; Bruzik et Maniatis, 1995; Inoue *et al.*, 1995; Watakabe *et al.*, 1993). Ces protéines forment une famille de facteurs d'épissage riches en sérine-arginine (protéines SR; Hertel et Maniatis, 1999; Gravely et Maniatis, 1998) et capables de promouvoir l'utilisation d'un site d'épissage particulier en favorisant l'assemblage du "spliceosome". Selon la nature et la concentration de ces protéines SR, lesquelles varient selon le type de cellules (Rio, 1993; Maniatis, 1991), différents sites d'épissage peuvent être sélectionnés. D'autres protéines spécifiques, comme Sxi chez la drosophile, peuvent également se lier aux différents sites récepteurs 3' et ainsi interdire leur utilisation par encombrement stérique (Maniatis, 1991).

Finalement, des mutations sur les différentes séquences reconnues lors de l'assemblage du "spliceosome" permettent des variations supplémentaires dans le choix des sites d'épissage. Des

mutations peuvent ainsi causer des variations dans l'efficacité relative des différents sites et mener également à l'utilisation de sites cryptiques, si des séquences consensus sont détruites (Nelson et Green, 1990).

7. LATENCE ET RÉACTIVATION

Si la cellule infectée, par exemple un monocyte, n'est pas immédiatement permissive, le virus entre alors en phase de latence. Dans cet état, l'ADN est maintenu sous forme épisomale et n'exprime pas de protéines précoces-immédiates. La latence du HCMV est étudiée en utilisant des lignées de cellules cancéreuses non-différenciées et non-permissives telles les lignées de tératocarcinome (une forme de cancer foetal) Tera-2 et monocyttaire leucémique THP-1. Ces deux lignées cellulaires peuvent être amenées à se différencier avec l'acide rétinoïque et les esters de phorbol, respectivement, et deviennent permissives dans cet état. La lignée THP-1 reproduit d'ailleurs un phénomène physiologique courant lorsque les monocytes circulants (non-permissifs) sortent du circuit sanguin et se différencient en macrophages permissifs (Taylor-Wiedeman *et al.*, 1991). Les premières expériences menées sur de telles cellules ont montré, dans l'état non-différencié, la liaison de protéines cellulaires sur la section modulatrice du MIEP; les mieux caractérisées d'entre elles étant les facteurs MRF qui se lient à des séquences riches en A+T (Huang *et al.*, 1996), MBF1 et YY1, lesquels se lient à l'élément répété de 21 paires de bases de l'activateur (Liu *et al.*, 1994; Sinclair *et al.*, 1992). Selon les

expériences d'expression transitoire, la liaison de ces divers facteurs au modulateur empêche la transcription du gène majeur IE1/2 et bloque ainsi l'initiation du cycle lytique. Cependant, tel qu'indiqué plus bas, il a été démontré qu'un mutant de délétion du HCMV sans le modulateur est toujours incapable de démarrer la transcription du gène IE1/2 dans ces cellules non différenciées (Meier et Stinski, 1997). La liaison des protéines MBF1 et YY1 à la séquence de 21 paires de base de l'activateur ainsi que d'autres facteurs encore inconnus sont probablement impliqués dans la régulation négative du MIEP.

Dès la disparition de ces facteurs négatifs lors de la différenciation cellulaire, la transcription du gène IE1/2 peut alors débiter, comme au début du cycle lytique, mais en l'absence du transactivateur pp71 du virion. Le démarrage peut être à ce moment un peu plus long, mais fonctionne également par l'intermédiaire du facteur NF- κ -B. Un rôle important pourrait aussi être attribué au facteur de transcription Sp1. Celui-ci peut en effet stimuler l'activateur du MIEP par l'intermédiaire des séquences répétées de 21 paires de bases, et il semble également impliqué dans la stimulation de la transcription des sous-unités fonctionnelles p65 et p105/p50 de NF- κ -B (Yurochko *et al.*, 1997; Yurochko *et al.*, 1995). Une fois la transcription du gène IE1/2 bien établie, les protéines virales IE1-72K et IE2-86K pourraient également stimuler la transcription des gènes de NF- κ -B, assurant ainsi leur production (Yurochko *et al.*, 1995).

Cette hypothèse de réactivation du virus par l'intermédiaire du facteur de transcription NF- κ -B, qui implique la voie d'activation de

la transcription par la protéine kinase C (PKC), semble également valable *in vivo* par l'intermédiaire de substances stimulant la voie de la PKC et de NF- κ -B comme le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α). On observe, en effet, une forte réactivation de virus HCMV latent dans les cellules mononucléaires du sang périphérique des individus atteints d'une maladie provoquant l'induction d'une forte concentration de TNF- α comme lors de transplantation d'organe, septicémie ou cirrhose du foie (Prösch *et al.*, 1995; Döcke *et al.*, 1994; Stein *et al.*, 1993). D'autres cytokines comme les interleukines 1 β , 6 et 10 ainsi que la prostaglandine PGE₂, toutes produites par les macrophages activés, favorisent également la réactivation du virus latent par l'intermédiaire du MIEP (Kline *et al.*, 1998). L'étude de ce phénomène de réactivation est donc de grande importance médicale.

8. PROBLÉMATIQUE

L'expression des protéines précoces-immédiates dépend donc du degré de différenciation de la cellule. Elle est le déterminant majeur de la capacité du virus à établir et maintenir l'état de latence ou à se réactiver pour compléter son cycle lytique, ce qui montre l'importance d'étudier ces protéines dans le contexte d'une infection virale réelle. La quasi totalité des travaux effectués sur ces protéines ont été réalisés par des expériences d'expression transitoire en utilisant de l'ADN cloné, étant donné la difficulté de construire des mutants artificiels d'un virus possédant un génome de cette taille. Pourtant, des travaux récents ont montré que

l'utilisation de tels mutants HCMV donnait souvent des résultats différents de ceux obtenus par expression transitoire (Greaves et Mocarski, 1998; Mocarski *et al.*, 1996). Autre exemple frappant, un mutant de délétion auquel il manque la section modulatrice du MIEP est incapable de produire les protéines IE1/2 dans des cellules non-différenciées Tera-2 et THP-1, contrairement à ce qui est observé lors d'expériences d'expression transitoires (Meier et Stinski, 1997). Ces travaux montrent à eux seuls l'importance d'étudier l'expression des protéines précoces-immédiates dans le contexte du génome viral.

Après avoir caractérisé nos trois mutants thermosensibles pour des fonctions précoces-immédiates, il nous a semblé intéressant de les utiliser pour l'étude de l'expression de ces protéines dans des conditions d'infection variées. Nous avons donc observé l'expression des protéines précoces-immédiates dans des cellules permissives normales (fibroblastes humains embryonnaires IAFP-1) au niveau de l'expression des ARN messagers et des protéines elles-mêmes; et ce, aux températures permissive et non-permissive. Nous avons repris ces expériences en tentant de stimuler l'expression de ces protéines par un ester de phorbol (PMA). Finalement, nous avons répété ces expériences dans quatre autres types de cellules, toujours aux deux températures, avec ou sans PMA. Ces cellules comprennent la lignée monocyttaire leucémique THP-1 (ATCC: TIB 202), la lignée de lymphome histiocytique U-937 (ATCC: CRL 1593), ces deux lignées étant induites à la différenciation par le PMA, la lignée Caco-2 (ATCC: HTB 37), un adénocarcinome du colon (les cellules du colon étant permissives *in vivo*) et finalement, la

lignée AV3 (ATCC: CCL 21), des cellules placentaires humaines, non-cancéreuses mais également non-différenciées. L'objet de cette expérience était de déterminer quelles protéines du gène IE1/2 sont produites en phase précoce-immédiate, selon le type de cellules infectées. Nous avons finalement examiné l'effet du PMA sur l'expression de ce même gène dans les cellules permissives normales IAHP1 et les cellules non-permissives, afin de vérifier l'effet d'une sur-stimulation du promoteur du gène IE1/2. En fonction des résultats obtenus, nous tentons alors de répondre à une question soulevée récemment par Meier et Stinski (1997), quant au second facteur déterminant la permissivité après blocage de la transcription au niveau du modulateur.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. RÉSUMÉ DES ÉTAPES PRINCIPALES

Le travail de laboratoire pour cette recherche s'est fait en deux grandes étapes. Il a d'abord fallu identifier les protéines mutées des souches thermosensibles, par vérification de leur cinétique d'expression et par buvardage de type Northern. Cette étape incluait également la localisation des mutations sur l'ADN viral et l'identification des substitutions d'acides aminés menant au phénotype thermosensible, d'abord grossièrement par sauvetage de marqueur et puis, de façon plus fine, par séquençage de fragments d'ADN clonés. Ceci ayant indiqué que les protéines précoces-immédiates étaient mutées, nous disposions alors d'un outil exceptionnel pour déterminer, dans un deuxième temps, l'influence de ces protéines mutées sur l'initiation de la réplication virale, selon la présence ou l'absence de différents facteurs de transcription, en vérifiant par buvardage de type Northern et immunobuvardage de type Western, l'expression des protéines précoces-immédiates dans divers systèmes cellulaires aux caractéristiques physiologiques différentes, et dans des conditions différentes.

2. SOUCHES VIRALES

La souche sauvage (WT) AD169 du cytomégalovirus humain nous a été fournie par le docteur Fred Rapp (Pennsylvania State University, Hershey, Pa, USA). Les mutants thermosensibles *ts446*, *ts486* et *ts504* ont été obtenus après exposition de la souche

sauvage à la nitrosoguanidine (Dion et Hamelin, 1987). Brièvement, les cellules infectées ont été incubées dans du milieu contenant de la nitrosoguanidine pendant la phase de réplication de l'ADN viral; puis la progéniture virale a ensuite été mise en contact sous agar avec des cellules fraîches. Les plages obtenues ont été repiquées en double dans des plateaux de 96 puits et incubées à 33,5 ou 39,5°C; celles présentant un phénotype thermosensible ont ensuite été repiquées plusieurs fois sous agar aux deux températures afin de s'assurer d'obtenir une souche pure et d'éliminer les éventuels révertants.

Ces mutants thermosensibles, incapables de se multiplier à 39,5°C, ont été cultivés à 33,5°C sur des cellules de poumons embryonnaires humains IAFP1. Afin de produire une réserve de virus congelés, les cellules infectées à une MOI de 1 ont été trypsinées entre 7 et 10 jours PI et congelées dans leur milieu additionné de 10% (v/v) de DMSO (Sigma). Avant utilisation, ces productions de virus ont été congelées/décongelées trois fois pour faire éclater les cellules, puis centrifugées 10 min à basse vitesse afin d'éliminer les débris cellulaires.

3. TITRAGES

Chacun des virus produits a été titré par la méthode des plages de lyse avant utilisation. Pour ce faire, des plateaux à 6 puits (Falcon) ont étéensemencés de cellules IAFP1 et incubées à 37°C jusqu'à confluence. Ces plateaux ont ensuite été infectés avec 100 µl/puits des dilutions en série (10^0 à 10^{-4}) des virus, le dernier

puits servant aux cellules témoins non-infectées. Après une période d'adsorption de 30 min à 33,5°C, chaque cupule a été recouverte de 3 ml de milieu de maintien (MEM Earle, 2% (v/v) SVF) contenant 0,8% (p/v) d'agarose. À chaque semaine, 1 ml de ce même milieu a été ajouté pour nourrir les cellules. Les plages de lyse obtenues ont été comptées sous microscope inversé après 2 et 3 semaines d'incubation à 39,5°C (température non-permissive) et 33,5°C (température permissive), respectivement.

4. CULTURES CELLULAIRES

Les cellules permissives IAFP1 utilisées pour la culture et la propagation du virus HCMV sont des cellules de poumons embryonnaires humains, analogues à la lignée bien connue WI-38 (CCL 75), mais plus récentes. Ces cellules ont étéensemencées pour multiplication à une densité variant entre $1,0 \times 10^5$ et $1,5 \times 10^5$ cellules/ml dans un milieu composé à part égale de MEM Earle et 199 Hank's additionné de 10% (v/v) SVF (P.A. Biological) et de 100 µg/ml gentamycine (Gibco BRL). À confluence, ce milieu est remplacé par le milieu de maintien MEM Earle, 10% (v/v) SVF. Les cellules utilisées lors des expériences d'expression des protéines précoces-immédiates comprennent les lignées U937(CRL 1593, Sundström et Nilsson, 1976) et THP-1(TIB 202, Tsuchiya *et al.*, 1980), cultivées dans du milieu RPMI, 10% (v/v) SVF; et les lignées AV3 (CCL 21, cellules chorioniques humaines) et Caco2 (HTB 37, carcinome du colon), cultivées, elles, dans du milieu DMEM contenant respectivement 10 et 20% (v/v) SVF. Toutes les cellules ont été

conservées congelées dans leur milieu de croissance avec 10% (v/v) DMSO.

5. CINÉTIQUE D'INHIBITION DE LA CROISSANCE VIRALE

Les cellules IAFP1 ont été multipliées dans des flacons de 25 cm² (Corning), puis infectées avec les souches WT et mutantes à une MOI de 1, à 33,5°C. Après 2, 4 et 8 h post-infection, un flacon de chaque souche a été transféré à la température non-permissive. À 72 h post-infection, 100 µl de méthyl-[³H]thymidine (New England Nuclear; 1,0 mCi/ml) ont été ajoutés à chaque flacon de cellules, puis ceux-ci ont été réincubés pour encore 24 h. Les cellules ont alors été lavées 3 fois avec du PBS froid, trypsinées, puis resuspendues dans 2 ml de milieu de maintien par flacon. Un volume de 50 µl de chaque suspension a été déposé sur des morceaux de papier 3MM qui ont été séchés, déposés dans des fioles contenant 3 ml de liquide à scintillation (Beckman Ready-Solv HP), puis comptés pour 1 et 10 min dans un compteur Beckman LS7500.

6. TEST DE RÉSISTANCE À L'ACIDE PHOSPHONOACÉTIQUE

Des cellules IAFP1 confluentes en plateaux de 6 puits ont été infectées par les souches WT et mutantes à une MOI de 0,01; puis recouvertes de milieu de maintien contenant 0,5% (p/v) d'agar additionné ou non de 100 µg/ml d'acide phosphonoacétique (APA, Sigma). Les plages de lyse ont été comptées après 2 ou 3 semaines d'incubation aux températures permissive et non-permissive.

7. ADN RECOMBINANT

7.1 Préparation des cosmides.

L'ADN viral a été purifié par centrifugation d'un lysat pronase/SDS (0.1 vol SDS 10% (p/v), 0.1 vol pronase 2 mg/ml) de cellules IAFP1 infectées sur un gradient discontinu de saccharose 10 à 40% (p/v), à 100 000 x g pour 3 h à 15°C. L'ADN de la souche sauvage a ensuite été coupé en fragments de 35 à 45 kb, par digestion partielle avec l'enzyme de restriction *Hind* III. Ces fragments ont ensuite été insérés par ligation dans le vecteur cosmique pHC 79 (Boehringer Mannheim) et les concatémères résultants ont été encapsidés en utilisant la trousse In Vitro Packaging System de Gibco BRL. Brièvement, des dilutions appropriées de la réaction de ligation (1 µg d'ADN total) ont été ajoutés aux deux lysats de bactéries infectées par des phages contenant des mutations complémentaires, ce qui permet l'assemblage *in vitro* de particules phagiques complètes. Ceux-ci ont alors été utilisés pour infecter la souche *E. coli* LE392, laquelle a ensuite été ensemencée sur des milieux nutritifs d'agar ML (10 g/l bactotryptone, 5 g/l extrait de levure, 5 g/l NaCl, 1.5% (p/v) agar) contenant 50 µg/ml d'ampicilline (Ayerst) afin de sélectionner les bactéries recombinantes.

7.2 Sous-clonage.

Certains fragments d'ADN issus des cosmides ont été sous-clonés en utilisant les enzymes de restriction *Hind* III, *Bam*H I et *Pst* I (Pharmacia et Gibco BRL), seules ou en combinaison, dans les plasmides pAT153 ou pUC19 en utilisant des procédures standards (Sambrook *et al.*, 1989). Les réactions de ligation ont été effectuées en utilisant 2U de ligase T4 (Gibco BRL) dans le tampon approprié (20 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothréitol, 0,6 mM ATP, pH 7,6) pendant 16 h à 4°C ou 2 h à 20°C, après inactivation des enzymes de restriction par incubation du mélange de digestion pendant 10 min à 65°C.

7.3 Purification des plasmides recombinants.

Pour purifier les plasmides recombinants, des cultures en phase logarithmique de 20 ml ont été centrifugées à basse vitesse pour sédimenter les cellules bactériennes, lesquelles ont été resuspendues dans 1 ml de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 25% (p/v) saccharose, 100 mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X100, 1 mg/ml lysozyme) et chauffées 90 sec dans l'eau bouillante. Les lysats cellulaires ont alors été centrifugés 30 min dans une centrifugeuse Eppendorf (15 600 x g, 4°C) et l'ADN plasmidique dans le surnageant a été précipité 30 min à -70°C dans 0.1 vol 5M NaCl et 0.25 vol de 50% (p/v) PEG 6000 (Union Carbide). L'ADN a ensuite été centrifugé 30 min, rincé avec de l'éthanol 70% (v/v) et dissout dans 400 µl de tampon TE.

7.4 Transformation des cellules bactériennes.

Nous avons utilisé comme cellules hôtes les souches bactériennes *Escherichia coli* HB101 (pour le plasmide pAT153) et JM 105 (pUC19). Ces souches ont été transformées en utilisant la méthode au CaCl₂ de Kushner (Dale et Greenaway, 1984).

Brièvement, 2 ml d'une culture en fin de phase logarithmique servent à ensemer 18 ml de milieu ML, lequel est ensuite incubé 1 h 30 à 37°C avec agitation. Cette culture est ensuite centrifugée et les cellules rincées dans le tampon Kushner 1 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, pH 7,0), puis recentrifugées, resuspendues dans le tampon Kushner 2 (100 mM MOPS, 50 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, pH 7,0) et conservées 60 min dans la glace. Avant l'ajout d'ADN, les cellules sont à nouveau centrifugées puis resuspendues dans du tampon Kushner 2. Pour la congélation, on ajoute un volume égal de glycérol 40% (v/v). Pour la transformation elle-même, un maximum de 10 µl de mélange de ligation est ajouté par 0,1 ml de suspension de bactéries et conservé sur glace pendant 30 à 45 min. Après un choc thermique de 2 min dans un bain-marie à 45°C, 2 ml de milieu ML sont ajoutés et le mélange est incubé 1 h à 37°C. Ce mélange est ensuite dilué puis étalé sur des boîtes de milieu ML contenant 50 µg/ml d'ampicilline (Ayerst), lesquelles sont ensuite incubées 16 h à 37°C.

7.5 Extraction de bandes d'ADN des gels d'agarose

Afin d'obtenir des fragments d'ADN exempts de séquences plasmidiques, les fragments d'ADN ont d'abord été séparés sur gel d'agarose après digestion par les enzymes de restriction appropriées. Les bandes ont ensuite été excisées sous une lampe à rayonnement UV longs, placées dans une seringue de 5 ml, broyées par passage à travers une aiguille N°18 dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Ce broyat a ensuite été congelé 30 min à -70°C, décongelé 10 min à 37°C puis vortexé quelques secondes. Ce cycle a été répété 3 fois puis le broyat a été centrifugé 30 min dans une centrifugeuse Eppendorf à vitesse maximale (15 600 x g). L'ADN dans le surnageant a ensuite été précipité en utilisant 0,1 vol. de NaCl 5M et 0,25 vol de 50% (p/v) PEG 6000, pendant 30 min à -70°C, puis centrifugé 30 min. Le culot a finalement été lavé avec de l'éthanol 70% (v/v), puis a été dissout dans 50% du volume initial de tampon TE.

7.6 Marquage de l'ADN

Tous les fragments d'ADN utilisés comme sondes ont été marqués à la digoxygénine par amorçage aléatoire, selon les instructions du fabricant (Boehringer Mannheim). Brièvement, environ 10 µl (2-5 µg) d'ADN est dénaturé par chauffage 10 min à 100°C puis on ajoute 2 µl d'amorces hexanucléotides aléatoires, 2 µl de mélange de marquage (dNTP + DIG-dUTP) et 1 µl d'enzyme Klenow (2U/µl) dans un volume final de 20 µl. Ce mélange est incubé au moins 3 h à 37°C. La réaction est ensuite stoppée avec 2 µl d'EDTA

0,2M, pH 8.0 et l'ADN est précipité avec 0,15 vol LiCl 4M (Sigma) et 2,5 vol éthanol 100%, pendant 30 min à -70°C. L'ADN est ensuite centrifugé 15 min dans une centrifugeuse Eppendorf et le culot lavé à l'éthanol 70% (v/v) avant d'être dissout dans 50 µl d'eau bidistillée.

7.7 Buvardage Southern

Certains clones ont été identifiés par hybridation avec une sonde de séquence connue. Les plasmides à tester, digérés par les enzymes de restriction appropriées ont, dans ce cas, été soumis à l'électrophorèse pendant 90 min à 90V dans un mini-gel (cellule Bio-Rad) d'agarose 1% (p/v), dans du tampon TBE 1X (0,1 M Tris Base, 0,1 M acide borique, 2 mM EDTA). Ces gels ont ensuite été colorés 30 min dans du tampon TBE 0,5X contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium, photographiés, puis trempés 15 min dans du TBE 0,5X sans colorant. L'ADN a ensuite été transféré sur une membrane de nylon (MSI) en utilisant une cellule d'électrobuvardage semi-sec (Bio-Rad Semi-Dry Blotter), pendant 30 min à 12 V. Afin de dénaturer l'ADN présent sur les membranes, celles-ci ont été déposées sur un papier buvard imprégné d'une solution de NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M pendant 5 min, un second buvard sec pendant 5 min, puis encore 5 min sur un troisième buvard imprégné de solution neutralisante (1M Tris-HCl, 1M NaCl, pH 8,0). L'ADN a ensuite été fixé par cuisson à 120°C pendant 30 min, puis incubé pendant 2 h à 50°C dans le tampon de pré-hybridation (5X SSC, 1% (p/v) lait écrémé et 0,1% (p/v) N-lauroylsarcosine, 0,02% (p/v) SDS). Ce

tampon a ensuite été remplacé par le tampon d'hybridation (tampon de pré-hybridation contenant 1 à 3 µg de sonde marquée à la digoxigénine et dénaturée par chauffage à 100°C pendant 10 min) et incubé à 68°C pendant 16h. Les membranes ont ensuite été lavées 2 fois à 20°C dans une solution contenant 2X SSC et 0,1% (p/v) SDS pendant 5 min, encore 2 fois pendant 15 min à 68°C dans une solution contenant 0,5X SSC et 0,1% (p/v) SDS et équilibrées 30 sec dans le tampon maléate (100 mM acide maléique, 150 mM NaCl, pH 7,5), puis bloquées pendant 1 h dans le tampon maléate contenant 2% (p/v) de lait écrémé. Les membranes ont finalement été incubées 30 min dans 10 ml de ce même tampon de blocage contenant 10 µl de conjugué Fab anti-digoxigénine/phosphatase alcaline (750 U/µl, Boehringer Mannheim), lavées 2 fois pendant 15 min dans du tampon maléate, une fois dans un tampon de phosphatase alcaline (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂), et l'ADN révélé dans cette même solution contenant les réactifs chromogènes NBT/BCIP (Boehringer Mannheim), pendant 1 à 3 h, dans le noir. Cette réaction étant finalement bloquée par lavage dans l'eau bidistillée.

8. ÉPREUVE DE SAUVETAGE DE MARQUEURS

Dans les expériences impliquant la transfection de cellules eucaryotes, l'ADN a été transfecté en utilisant le réactif DOTAP (N-[1-(2,3 dioléoyloxy) propyl]-N,N,N-triméthylammoniumméthyl sulfate, Boehringer Mannheim) selon les instructions du manufacturier. Brièvement, une quantité appropriée d'ADN de cosmides ou de plasmides dans du tampon HBS (HEPES 20 mM, NaCl

150 mM, pH 7,4) a été additionnée à un volume égal de 30% (v/v) du réactif DOTAP dans du tampon HBS. Ce mélange a ensuite été dilué dans du milieu de croissance ne contenant pas de SVF et ajouté à des cellules IAFP1 à 60-80% de confluence. Celles-ci ont ensuite été incubées 5 h à 37°C, dans un incubateur à 5% de CO₂, puis le milieu a été remplacé par du milieu de croissance supplémenté avec 10% (v/v) SVF. Après 16 h d'incubation, les cellules ont été infectées avec les souches WT et mutantes à une MOI de 0,01 (Dion et Hamelin, 1990), recouvertes de milieu de croissance contenant 0,5% (p/v) d'agar et incubées 2 semaines à température non-permissive avant comptage des plages de lyse.

9. IMMUNOBUVARDAGE WESTERN

Des cellules infectées (MOI de 1) dans des flacons de 25 cm² et incubées dans des conditions variées ont été lysées dans 150 µl de tampon de lyse (60 mM Tris HCl , 3% (p/v) sodium dodécyl sulfate, 5% (v/v) β-mercaptoéthanol, pH 7.0) et chauffées 10 min à 100°C. Des échantillons de 12 µl ont ensuite été soumis à l'électrophorèse dans des gels SDS-PAGE en gradient de 6-20% (p/v) pendant 80 min à 20 mA/gel, dans un appareil Hoefer Mighty Small II. Les protéines ont alors été transférées sur des membranes de nitrocellulose (Bio-Rad) ou de PVDF (Gelman Sciences, Bio Trace) pendant 90 min à 50V (cellule Bio-Rad Trans Blot) dans du tampon Towbin standard (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) méthanol, pH 8,3) pour les membranes de nitrocellulose, et sans méthanol pour les membranes de PVDF, celles-ci étant mouillées avec ce produit avant utilisation.

Les membranes ont ensuite été bloquées dans du TBS (20 mM Tris base, 0,5 M NaCl, pH 7,5) contenant 5% (p/v) (membranes de nitrocellulose) ou 10% (p/v) (PVDF) de lait écrémé. Les protéines virales ont ensuite été détectées en utilisant un pool d'antisérums humains anti-HCMV (Institut Armand-Frappier) dilué 1/512 dans du TBS 2,5% (p/v) de lait écrémé, pendant 16 h à 4°C. Les membranes ont alors été lavées quatre fois dans du TTBS (TBS contenant 0,2% (v/v) de Tween-20) et du TBS, incubées 1 h à 20°C avec un conjugué chèvre anti-immunoglobulines humaines (Amersham, concentration finale de 2 µg/ml), relavées dans du TBS et incubées dans un conjugué streptavidine phosphatase alcaline (GIBCO BRL, concentration finale 0.9 µg/ml). Les protéines ont finalement été révélées en utilisant les réactifs NBT/BCIP (Boehringer Mannheim) pendant 1 à 3 h dans le noir. Certains gels ont été colorés directement avec la trousse Bio-Rad Silver Stain+ afin de s'assurer qu'une quantité égale de protéines avait été déposée dans chaque puits lors de l'électrophorèse. S'il est fréquent de doser les protéines par une technique colorimétrique, comme pour la méthode de Bradford, nous avons préféré travailler dans des conditions identiques d'un échantillon à l'autre, avec des volumes égaux. Cette méthode est pour nous au moins équivalente à un dosage de protéines, compte tenu de l'imprécision inhérente à celle-ci, particulièrement au niveau des dilutions, de l'établissement de la courbe standard et des mesures au spectrophotomètre. L'examen des bandes représentant une réaction croisée avec une protéine cellulaire montre que cette solution est plus que suffisante dans notre cas. Cette technique de contrôle de la quantité de protéines a

d'ailleurs été utilisée par une autre équipe (Poma *et al.*, 1996) travaillant sur les protéines précoces-immédiates du HCMV colorées au bleu de Coomassie, une méthode beaucoup moins sensible que la coloration à l'argent utilisée dans notre cas.

10. BUVARDAGE NORTHERN

Des cellules infectées (MOI de 1) dans des flacons de 25 cm² et incubées dans des conditions variées ont été trypsinées et transférées dans des tubes Eppendorf, puis lysées dans 1 ml du réactif Trizol (Gibco BRL) par pipettage répété. Après une incubation de 5 min à 20°C, 0,2 ml de chloroforme (Fischer) a été ajouté au lysat, puis le mélange a été vortexé et centrifugé 15 min à 4°C. La phase aqueuse (supérieure, claire) a ensuite été transférée dans un second tube et l'ARN précipité avec 0,5 ml d'isopropanol (Fischer) par millilitre initial de Trizol pendant 10 min à 20°C, puis centrifugé 10 min à 4°C. Le surnageant a été jeté et l'ARN rincé dans 0,5 ml d'éthanol 70% (v/v), puis dissout dans 50 µl d'eau traitée au DEPC. Un échantillon de 3 à 5 µl de cette préparation d'ARN a ensuite été mélangé à 10 µl de tampon de charge (46% (v/v) formamide, 16% (v/v) d'une solution de formaldéhyde 37% (v/v), 5% (v/v) de glycérol, 8% (v/v) d'une solution de bleu de bromophénol 0,2% (p/v) et 0.1 vol. de tampon MOPS 10X), et l'ARN dénaturé par chauffage à 65°C pendant 5 min. Ces échantillons d'ARN ont été soumis à l'électrophorèse pendant 1 h 30 à 150 V dans un gel dénaturant d'agarose 1,1% (p/v) préparé dans un tampon MOPS (Sigma) pH 5,65 (concentration finale de 0,2 M MOPS, 50 mM acétate

de sodium et 1 mM EDTA), contenant également 0,66 M de formaldéhyde et 0,1 µg de bromure d'éthidium. Après électrophorèse, l'ARN a été transféré sur une membrane de nylon (MSI) dans une cellule d'électrobuvardege semi-sec (Bio-Rad Semi-Dry Blotter) à 12V pendant 30 min. L'ARN transféré sur la membrane a ensuite été fixé par cuisson à 120°C pendant 30 min, puis incubé pendant 2 h à 50°C dans un tampon de pré-hybridation à haute concentration de SDS (7% (p/v) SDS, 50% (v/v) formamide, 5X SSC, 50 mM phosphate de sodium pH 7,0, 2% (p/v) lait écrémé et 0,1% (p/v) N-lauroylsarcosine), tel que recommandé par la compagnie Boehringer Mannheim. Ce dernier a ensuite été jeté et remplacé par 5 ml de tampon d'hybridation (le même, contenant 1 à 3 µg de sonde d'ADN marqué à la digoxigénine par amorçage aléatoire préalablement dénaturée par chauffage à 68°C pendant 10 min), et l'incubation continuée pendant 16 h.

Les sondes utilisées pour détecter les ARN précoces-immédiats sont les fragments *BamH I-Pst I* de 0,6 et 0,8 kb bordant le site *BamH I* séparant les exons 4 et 7, et spécifiques aux protéines IE1-72K et IE2-86K + IE2-55K respectivement (voir Figure 13 et 15).

Les membranes ont ensuite été lavées 2 fois pendant 5 min à 20°C dans une solution contenant 2X SSC et 0,1% (p/v) SDS, 2 fois encore pendant 15 min à 65°C dans une solution contenant 0,5X SSC et 0,1% (p/v) SDS, et pendant 30 sec dans le tampon maléate (100 mM acide maléique, 150 mM NaCl, pH 7,5). Après un blocage pendant 1 h dans le tampon maléate contenant 2% (p/v) de lait écrémé, les membranes ont été incubées 30 min dans 10 ml de ce même tampon

de blocage contenant 2 μ l de conjugué Fab anti-digoxigénine/phosphatase alcaline (750 U/ μ l, Boehringer Mannheim). Les membranes ont ensuite été lavées 2 fois pendant 15 min dans du tampon maléate, une fois dans un tampon de phosphatase alcaline (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl), puis imbibées de 0,5 ml de solution de LumiPhos 530™ (réactif chimioluminescent, Boehringer Mannheim). Les membranes ont finalement été scellées dans un sac de plastique et exposées à 20°C contre un film BioMax MS™ (Kodak) pour une période de 2 à 16 h; puis les films ont été développés dans un appareil automatique Kodak pour films à rayons X. Ce protocole est une adaptation pour le buvardage de type Northern du système d'hybridation non-radioactif DIG de Boehringer Mannheim.

La normalisation des ARNs a été effectuée en utilisant une combinaison des techniques décrites par Duhl *et al.*, 1992 et Masters *et al.*, 1992. Brièvement, après l'électrophorèse et le transfert sur membrane de nylon, les membranes ont été photographiées et les photos numérisées à 300 ppp en 256 tons de gris, puis les images converties en négatifs. L'intensité d'une bande de référence, les ARNs ribosomiaux 5S ou 18S, a ensuite été mesurée et normalisée pour tout les puits. Les fluorogrammes obtenus après l'hybridation ont également été numérisés et l'intensité mesurée de toutes les bandes d'intérêt a ensuite été normalisée en utilisant les valeurs des bandes de références pour chaque puits. L'intensité des bandes a été mesurée en utilisant le logiciel du domaine public NIH-Image (disponible sur le site internet du NIH) et un ordinateur Apple Macintosh Quadra 605.

11. SÉQUENÇAGE DE L'ADN

De petits fragments potentiellement porteurs des mutations thermosensibles ont été clonés dans le vecteur pUC19 (Gibco BRL), en utilisant la souche réceptrice *E. coli* JM105 (Gibco BRL). Les bactéries recombinantes ont été cultivées dans 20 ml de milieu ML additionné de 50 µg/ml d'ampicilline, et l'ADN plasmidique a été isolé en utilisant une adaptation pour un volume de culture de 20 ml du système Magic Miniprep (Promega). La concentration de l'ADN obtenu a ensuite été ajustée avec de l'eau bidistillée stérile à environ 400 µg/ml, par comparaison sur gel d'agarose avec une suspension du plasmide pUC19 de concentration connue (400 µg/ml). Cette préparation d'ADN a été séquencé à l'aide d'un appareil ALF Automated DNA Sequencer (Pharmacia) selon les procédures développées par le manufacturier, en utilisant les amorces pUC/M13 universelle et pUC/M13 inversée, lesquelles bordent le site de clonage multiple de pUC19 dans lequel est inséré le fragment à séquencer. Les séquences obtenues ont été analysées sur un ordinateur Apple PowerMacintosh 8100/100 en utilisant le logiciel GeneWorks (IntelliGenetics Inc., Mountain View, Ca, USA).

Certains autres fragments du gène IE1/2 ont ensuite été séquencés par sauts de 400 paires de bases en utilisant des amorces variant entre 19 et 22 nucléotides pour obtenir une région séquencée totalisant 5,6 kpb. Ces amorces ont été localisées pour permettre l'incorporation de 2 ou 3 nucléotides ATP marqués à la fluorescéine dès le début de l'élongation lors des réactions de séquençage, et celles-ci ont été obtenues avec l'appareil ALF, comme

précédemment. La lecture de certaines régions riches en GC a également été confirmée par marquage au [^{35}S]dATP en utilisant le système T7 Deaza G/A et une électrophorèse en gel de polyacrylamide classique (5% (p/v) acrylamide, 7% (p/v) urée, TBE 1X) à l'aide d'un appareil IBI STS-45. Le séquençage (en utilisant l'appareil ALF ou des gels) ainsi que la synthèse des amorces ont été faits respectivement par le Service de séquençage et le Service de synthèse d'oligonucléotides de l'Institut Armand-Frappier.

RÉSULTATS

1. SOUCHES THERMOSENSIBLES DE DÉPART

Les souches mutantes *ts446*, *ts486* et *ts504* du cytomégalo virus humain ont été isolées il y a quelques années. Des expériences de marquage de l'ADN viral par incorporation de thymidine tritiée à températures permissive et non-permissive ont montré que ces souches étaient de type ADN négatif (Dion et Hamelin, 1987). Ces souches mutantes ainsi que la souche sauvage AD169 ont été produites en grande quantité, puis titrées à températures permissive et non-permissive (Tableau 1). Les résultats obtenus montrent que toutes les souches avaient bien résisté à un long séjour dans l'azote liquide et que les mutants avaient tous conservé leur phénotype thermosensible. À température non-permissive, la réduction de titre est d'environ 10^6 UFP/ml par rapport au titre obtenu à température permissive. Soulignons que très peu de réversions sont observées dans les cultures, le taux moyen étant de $1/10^6$, et les plages obtenues sont de plus atypiques, i.e. plus petites et montrant une lyse plus lente des cellules.

Les Figures 7, 8 et 9 montrent la courbe de réplique des souches mutantes à 33,5 et 39,5°C par comparaison avec la souche sauvage. Ces courbes ont été établies en mesurant l'incorporation de thymidine tritiée, telle que décrit dans la section Matériel/Méthodes, à 1, 2, 4 ou 8 jours post-infection. Les trois souches montrent une croissance comparable à celle de la souche sauvage à température permissive, mais la synthèse d'ADN viral est réduite à seulement 10% du niveau de la souche sauvage à

température restrictive, ceci confirmant la qualité des souches mutantes de départ.

2. TEST DE RÉSISTANCE À L'ACIDE PHOSPHONOACÉTIQUE

Une des cibles de choix pour l'obtention d'un mutant thermosensible est le gène codant pour l'ADN polymérase virale. Il a en effet été rapporté par plusieurs auteurs (Biron *et al.*, 1986; Sullivan *et al.*, 1993) qu'une mutation de cette enzyme est fréquemment accompagnée par l'apparition d'une résistance à des substances antivirales, telle l'acide phosphonoacétique (APA). L'APA s'associe au site de liaison du résidu pyrophosphate de la polymérase, ce qui empêche l'addition de nouveaux nucléotides et bloque ainsi la synthèse de la chaîne naissante. Nous avons alors décidé de tester la sensibilité des trois souches mutantes à 100 µg/ml d'APA, une concentration fréquemment rencontrée dans la littérature, ce qui pouvait nous donner rapidement une indication sur le type de mutations subies. Les résultats obtenus (Tableau 2) ne montrent cependant aucun signe de résistance à l'APA pour l'une ou l'autre des souches mutantes, peu importe la température, en comparaison avec la souche sauvage. Il ne s'agissait donc probablement pas de mutants HCMV de type pol⁻.

3. CINÉTIQUE D'INHIBITION DE LA CROISSANCE VIRALE

Lors de l'exécution des divers titrages, il nous est apparu que l'effet des mutations était très rapide, soit dès les premières

heures suivant l'infection. Il était effectivement possible de contourner les mutations et d'obtenir une croissance partielle à température non-permissive si les cultures n'étaient pas mises à 39,5°C assez rapidement. Nous avons alors décidé de déterminer quel était le point critique de l'infection où une préincubation à température permissive empêcherait la mutation de se manifester, permettant ainsi la poursuite du cycle infectieux même à température restrictive.

Pour ce faire, des cellules infectées ont été préincubées à 33,5°C pendant 2, 4 et 8 h, puis transférées à température non-permissive. À 72 h post-infection, la réplication de l'ADN viral a été mesuré par incorporation de thymidine tritiée tel que décrit plus haut. Il est à noter que dans les conditions utilisées, la réplication des cellules hôtes est terminée puisqu'elles sont infectées à 85-95% de confluence. Seul un faible niveau basal de [³H]thymidine est incorporé dans l'ADN cellulaire, tel que mesuré pour les cellules témoins non-infectées. Les résultats de la Figure 10 montrent que les trois souches mutantes devaient être transférées à température restrictive avant 4 h post-infection pour que leur multiplication soit bloquée. En effet, seule la souche sauvage est capable de poursuivre le cycle infectieux lorsque transférée avant 4 h PI. Les souches mutantes, quant à elles, montrent un niveau d'incorporation de marqueur radioactif dans l'ADN légèrement inférieur à celui des cellules témoins non-infectées, ce qui correspond au ralentissement des fonctions cellulaires dans les cellules infectées. Les mesures correspondant aux transferts après 4 et 8 h post-infection montrent pour les souches mutantes un niveau d'incorporation similaire à

celui de la souche sauvage. Ce temps de 4 h post-infection correspond à la phase précoce-immédiate du cycle de réplication du HCMV, ce qui réduit de beaucoup le nombre de gènes potentiellement mutés.

4. ÉPREUVE DE SAUVETAGE DE MARQUEURS

4.1 Préparation des cosmides.

L'ADN de la souche sauvage AD169 a été découpé en fragments de 35 à 45 kb par digestion partielle en utilisant l'enzyme *Hind* III et ces fragments ont été insérés dans le vecteur cosmique pHC 79 avant d'être encapsidés tel que décrit précédemment. Ces phages ont été utilisés pour infecter la souche réceptrice *E. coli* LE392, les cellules recombinantes étant sélectionnées par leur résistance à l'ampicilline. Parmi les colonies obtenues, quelques centaines ont été analysées quant à leurs patrons de restriction. Les clones étaient d'abord préclassés après une digestion par l'enzyme *Hind* III, puis l'identification des fragments *Hind* III a été confirmée par une deuxième digestion en utilisant les enzymes *Bam*H I et *Eco*R I selon la carte de restriction établie précédemment (Dion et Hamelin, 1990). Cette double digestion est nécessaire, car plusieurs des fragments *Hind* III sont de taille similaire ou trop grande pour obtenir une bonne résolution avec les gels d'agarose utilisés. Finalement 10 cosmides superposés à leurs extrémités et couvrant l'ensemble du génome du HCMV ont été retenus (Figure 11, digestion par *Bam*H I et *Eco*R I).

4.2 Sous-clonage du fragment *Hind* III-E

Le fragment *Hind* III-E du génome du HCMV est porteur du gène précoce-immédiat majeur IE1/2. Comme nous disposions déjà de ce fragment cloné dans le vecteur pAT153 (Dion *et al.*, 1990; plasmide pLCC1534), nous avons décidé de le sous-cloner, dans le même vecteur, en utilisant l'enzyme *Bam*H I. La digestion de ce fragment par l'enzyme *Bam*H I produit des sous-fragments de 5,0, 2,4, 2,1, 5,2 et 5,8 kb (Figure 12, puits B et BH), les deux derniers contenant respectivement l'exon spécifique à IE2, et l'exon spécifique à IE1, les exons communs et le MIEP. Nous avons ainsi obtenu les plasmides pLCY 102, 116 et 107 (Figures 12 et 13). Le plasmide pLCY 116 porte un fragment d'extrémité *Bam*H I-*Hind* III-E de 5,8 kb, contenant le modulateur MIEP et le gène IE1. Le plasmide pLCY 102 porte, quant à lui, le fragment suivant de 5,2 kb contenant les gènes IE2, IE3 et IE4; et finalement, le plasmide pLCY 107 porte les deux fragments de 5,8 et 5,2 kb, donc le gène majeur précoce-immédiat IE1/2 entier (probablement un produit de digestion partielle). Sur 200 colonies repiquées, environ 50 (25%) contenaient un fragment inséré.

4.3 Sauvetage de marqueurs

Dans un premier temps, les 10 cosmides AD 169 ont été utilisés pour localiser les mutations sur le génome viral entier. Trois séries de cellules IAFP1 en plateaux de 12 puits ont été

transfectées séparément avec environ 2,5 µg d'ADN/puits de chacun des 10 cosmides en utilisant le réactif DOTAP; puis chaque série a été infectée avec l'une des souches mutantes. Ces cellules ont été recouvertes d'agar mou et incubées à température restrictive jusqu'à l'apparition de plages de lyse. Pour les trois souches mutantes, seuls les cosmides pLCU 558 et pLCU 22 ont montré la capacité de corriger les mutations et de produire des souches révertantes (Tableau 3). Le fragment génomique *Hind* III-E est le seul commun aux deux cosmides, selon la carte de la Figure 11 et l'hybridation des cosmides sauvages et mutants avec le fragment *Hind* III-E (Figure 14). Nous avons alors repris l'expérience en guise de confirmation en utilisant le plasmide pLCC 1534 portant ce même fragment, et qui a donné des résultats comparables (Tableau 3).

Le fragment *Hind* III-E contient, entre autre, le gène majeur précoce-immédiat IE1/2 (Chee *et al.*, 1990). Après sous-clonage du plasmide pLCC 1534, nous avons utilisé les plasmides obtenus pour localiser plus précisément les mutations de chacune des souches mutantes. Le Tableau 4 et la Figure 13 montrent les résultats pour chacun de ces trois plasmides. On remarque que la souche HCMV *ts446* est sauvée par le plasmide pLCY 116 portant le gène IE1 et le modulateur/activateur MIEP; et que la souche HCMV *ts486*, quant à elle, est corrigée par le plasmide pLCY 102 portant le cadre de lecture spécifique aux protéines IE2. Finalement, la souche HCMV *ts504* n'est réchappée, elle, que par le plasmide pLCY 107 portant les deux fragments de 5,2 et 5,8 kb et représentant donc le gène IE1/2 complet. On peut donc supposer pour la souche HCMV *ts504*, soit une mutation située très près du site *Bam*H I séparant les fragments de

5,2 et 5,8 qui serait exclue d'une éventuelle recombinaison entre l'ADN plasmidique et l'ADN génomique viral, soit la présence de deux mutations, chacune affectant l'un ou l'autre des fragments.

5. SÉQUENÇAGE

5.1 Clonage du fragment *Hind* III-E des mutants.

Nous avons utilisé le clonage dans des cosmides pour isoler rapidement le fragment *Hind* III-E des souches mutantes. Les cosmides ont été préparés de la même manière que ceux de la souche sauvage, mais les clones comportant le fragment d'intérêt ont cette fois été identifiés par hybridation avec le fragment *Hind* III-E du plasmide pLCC1534. Pour ce faire, les colonies obtenues sur boîtes de Petri ont été repiquées, à la fois sur milieu sélectif et sur membrane de nylon. Les clones positifs, contenant le fragment *Hind* III-E, ont alors été identifiés par hybridation selon le protocole du buvardage Southern, à partir de la dénaturation alcaline de l'ADN. La sonde utilisée est le fragment *Hind* III-E qui a dû être isolé sur gel à partir du plasmide pLCC1534, certaines séquences plasmidiques comme la résistance à l'ampicilline étant communes entre pAT153 et pH79. Les clones positifs ont ensuite été vérifiés par analyse de restriction (avec les enzymes *Bam*H I et *Pst* I) et par hybridation avec le fragment *Hind* III-E. Les résultats pour les trois mutants et la souche sauvage apparaissent dans la Figure 14, où les cosmides dérivés de la souche sauvage (pLCU) et des souches mutantes ts446,

ts486 et ts504 (respectivement pLCAB, pLCAC et pLCAD) réagissent tous en hybridation avec le fragment *Hind* III-E.

5.2 Sous-clonage

Deux fragments de restriction *Bam*H I-*Pst* I ont ensuite été sous-clonés pour les quatre souches, cette fois dans le plasmide pUC19 avec lequel il est plus facile d'utiliser le site *Pst* I. Ces fragments bordent le site *Bam*H I séparant les sections spécifiques à chacun des gènes IE1 et IE2, et mesurent respectivement 0,8 et 0,6 kb. L'appareil ALF permettant de séquencer un maximum de 0,9 à 1 kb en séquençage bidirectionnel, ces fragments sont suffisamment courts pour être séquencés directement, et serviront aussi de sondes pour les exons spécifiques aux gènes IE1 et IE2. Les clones portant ces fragments ont également été sélectionnés par hybridation.

5.3 Séquençage.

Les huit clones portant des fragments de 0,6 et 0,8 kb ont été séquencés à l'aide de l'appareil ALF selon les procédures standards. Les séquences brutes ont ensuite été éditées selon les chromatogrammes obtenus afin d'éliminer les ambiguïtés laissées par le logiciel d'analyse de l'appareil. Certaines séquences, plutôt riches en GC ont également été reprises afin d'éliminer les ambiguïtés. Les séquences finales ont été analysées à l'aide d'un ordinateur Apple PowerMacintosh 8100/100 en utilisant le logiciel GeneWorks. La séquence témoin pour l'ADN HCMV souche AD169 est

celle de Chee *et al.* (1990). Sur le total de 1,4 kb obtenu pour chaque souche, en plus de la séquence Chee, nous n'avons observé que quelques substitutions de nucléotides dispersées çà et là, alors que nous nous attendions à observer de plus grandes différences entre toutes ces séquences (Figure 15). Il est évident que la séquence de référence a été élaborée avec le plus grand soin et ce, malgré la taille imposante du génome du HCMV, son haut pourcentage en GC et ses nombreuses séquences répétitives.

Afin de séquencer le reste de l'ADN HCMV codant pour le bloc IE1/2 (il reste 3.6 kb par souche, pour un total d'environ 5 kb/souche), nous avons utilisé des amorces synthétiques préparées par le Service de synthèse d'oligonucléotides de l'Institut Armand-Frappier (Tableau 5) ainsi que les clones de 5,2 et 5,8 kb obtenus pour chacune des souches à partir des cosmides. Toutes les amorces synthétiques se terminent par une cytosine ou une guanine pour faciliter l'attachement de l'extrémité 3' au brin à séquencer et ont été positionnées sur l'ADN de façon à ce qu'elles permettent l'incorporation de deux ou trois nucléotides fluorescéine-15-dATP dès le début de l'élongation (selon les instructions du manufacturier Pharmacia). Le choix de leurs séquences et de leurs emplacements a été fait en se basant sur la séquence Chee *et al.* (1990), celle-ci s'étant révélée des plus fiables. Quelques séquences ont été reproduites en plusieurs occasions afin de faciliter la résolution des ambiguïtés. Certaines combinaisons amorces/clones riches en GC ont également été vérifiées sur un gel classique (5% (p/v) polyacrylamide, 7% (p/v) urée, TBE 1X) par marquage au ³⁵S-dATP en utilisant la trousse de séquençage T7 Deaza G/A et l'appareil à

électrophorèse STS-45 (IBI), avec visualisation par autoradiographie. Les séquences obtenues ont été analysées comme décrit précédemment. Après assemblage des séquences, les ARNm ont été reconstitués et traduits en séquences d'acides aminés (Figures 16 et 17).

5.3.1 Souche *ts446*

La souche HCMV *ts446* est complétée en sauvetage de marqueur par le plasmide pLCY 116 portant la section IE1 du gène. Une seule substitution G → C a été observée dans la séquence, ce qui mène au remplacement du résidu alanine₃₉₀ (A) par un résidu glycine (G) dans la protéine IE1. Cette substitution rend la chaîne plus flexible et expliquerait l'inactivation de la protéine à température restrictive. Trois modifications supplémentaires sont observées dans la séquence d'ADN. D'abord le remplacement d'un A par un T au nucléotide 1781, soit 14 nucléotides derrière la séquence de polyadénylation de IE1; cette modification ne se retrouve donc pas sur l'ARNm de IE1. On note également une deuxième substitution, un T remplacé par un A au nucléotide 1805, de même que l'insertion d'un T entre les nucléotides 1801 et 1802 de la souche sauvage. Ces deux dernières mutations, situées en toute fin de l'ARNm juste devant la séquence de polyadénylation ne font pas partie du cadre de lecture de IE1 et sont donc probablement sans effet.

On remarque également la substitution de la thréonine₁₂₃ (T) pour une sérine (S) dans la protéine IE2. Ces acides aminés ont

toutefois des caractéristiques chimiques très similaires (radicaux T; $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-OH}$ et S; $-\text{CH}_2\text{-OH}$) et le changement est probablement sans conséquence notable pour le phénotype.

5.3.2 Souche *ts486*

Plusieurs substitutions sont notées dans la souche HCMV *ts486*. Concernant la protéine IE1, on remarque une substitution de l'acide aspartique⁴³² (D) par un acide glutamique (E) aux caractéristiques chimiques presque identiques (radicaux D; $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ et E; $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$). Elle est suivie d'une délétion en phase de trois nucléotides sur l'ADN résultant en la délétion de l'acide glutamique⁴³⁷. Ce dernier résidu faisant partie d'une séquence de 5 acides glutamiques consécutifs, et en tenant compte de la substitution D->E au début de cette même séquence, ces deux mutations n'ont probablement aucune conséquence phénotypique. Plus importante est la substitution cystéine³¹³ (C) -> phénylalanine (F) (radicaux C; $-\text{CH}_2\text{-SH}$ et F; $-\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$). Ce changement aurait pu être lourd de conséquences, mais comme la protéine semble fonctionner normalement, il semble pratiquement avoir peu d'effet.

Deux substitutions affectent encore la protéine IE2. D'abord une substitution acide aspartique²⁵⁷ -> asparagine (N) (radical N; $-\text{CH}_2\text{-CONH}_2$) partagée avec la souche HCMV *ts504*; de même qu'une substitution tyrosine¹⁸⁹ (Y) -> sérine (radicaux Y; $-\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-OH}$ et S; $-\text{CH}_2\text{-OH}$). La substitution D -> N affectant la section commune entre IE2-86K et IE2-55K, et partagée avec la souche HCMV *ts504*, est probablement sans effet (la souche HCMV *ts504* n'étant pas

affectée par cette mutation). La substitution Y->S, par contre, est probablement responsable du phénotype thermosensible.

5.3.3 Souche *ts504*

Avec cette souche, aucune substitution ne semble affecter la protéine IE1. Pour la protéine IE2, nous avons déjà mentionné la substitution acide aspartique²⁵⁷ -> Asparagine (N) commune avec *ts486*. Une autre substitution, probablement sans importance, est le remplacement de la valine³⁵⁴ (V) -> leucine (L) (radicaux V; -CH(CH₃)₂ et L; -CH₂-CH(CH₃)₂), des acides aminés presque identiques. Deux autres substitutions semblent, elles, particulièrement importantes. D'abord une substitution asparagine³⁵³ -> lysine (K, radical -(CH₂)₄-NH₃⁺), plus hydrophobe et qui ajoute une charge positive. L'autre substitution est à nouveau acide aspartique⁴⁶³ (D) -> asparagine (N) qui, excisée de IE2-55K, appartient au domaine "leucine zipper" de dimérisation de IE2-86K. Si les deux dernières mutations peuvent avoir un effet thermosensible, la substitution D₄₆₃->N est probablement la plus importante, par sa position, pour la structure fonctionnelle de la protéine.

6. IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN

Le gel de la Figure 18 montre la cinétique d'apparition des protéines virales de 1 à 12 jours post infection. Dans ce cas particulier, les cellules IAFP1 ont été infectées avec la souche

sauvage AD169 et incubées à 33,5°C avec collecte d'échantillons qui ont été lysés et congelés aux intervalles indiqués. La même expérience a été effectuée simultanément avec les trois souches mutantes, qui ont été transférées à température non-permissive (39,5°C) aux mêmes intervalles. Le premier transfert à 1 jour PI ayant dépassé la phase précoce-immédiate où les mutations sont importantes, une croissance complète du virus a été observée pour tous les échantillons (résultats non-montrés). Ce gel met également en relief la spécificité de l'antisérum anti-HCMV utilisé avec une réaction croisée de l'antisérum uniquement contre une protéine cellulaire de masse légèrement supérieure à 100 kDa. Cet antisérum est un mélange de sérums de receveurs de greffes décédés suite à la réactivation d'un HCMV latent, et obtenu du Service de diagnostic de l'Institut Armand-Frappier.

6.1 Souche HCMV *ts446*

L'expérience a ensuite été reprise mais, cette fois, les souches mutantes ont été incubées à température restrictive et congelées aux temps post-infection de 1, 2, 4, 8, 12, 25 et 30 h. Pour les témoins, des cellules infectées par la souche sauvage et maintenues à 39.5°C ont été congelées aux mêmes intervalles. On remarque cette fois dans la Figure 19, l'absence d'une bande à 72 kDa (flèche) pour le mutant *ts446* comparativement à la souche sauvage. Cette bande correspond à la protéine IE1, et montre une mobilité électrophorétique d'environ 60 kDa. La seconde bande positionnée à environ 75 kDa correspond, par ailleurs, à l'isoforme de 86 kDa de la

protéine IE2 (Baracchini *et al.*, 1992). La troisième bande (un peu plus de 100 kDa) correspond à une réaction croisée de l'antisérum avec une protéine cellulaire. Il est important de signaler ici que la mobilité électrophorétique des protéines majeures précoces-immédiates du HCMV ne correspond pas à leur masse réelle, ces dernières étant fortement phosphorylées (Stinski *et al.*, 1983; Chee *et al.*, 1990; Mocarski *et al.*, 1993).

6.2 Souche HCMV *ts486*

L'expression des protéines de la souche HCMV *ts486*, incubée jusqu'à 30 h à température non-permissive, montre également une expression aberrante des protéines précoces-immédiates avec une réduction de IE1-72K, seul le niveau de IE2-86K semblant normal (résultats non-montrés). Sur un second gel (Figure 20) contenant les mêmes échantillons chargés en plus grande quantité et avec des temps de révélation des bandes plus longs, on remarque cependant l'absence des isomères de IE2 de 40 kDa (*flèche noire*) et 55 kDa (*flèche blanche*), même si ces protéines sont déjà produites en plus faible quantité. Donc, une mutation affectant la production de l'isomère IE2-55K est probablement responsable du blocage de la réplication à température restrictive.

On observe également à la Figure 20 des fluctuations dans la production de la protéine IE1-72K, où sa production semble initialement plus importante à 1 h PI chez *ts486* comparativement au type sauvage, mais diminue plus rapidement à 2 h PI, pour remonter ensuite à 4 h PI avant de retomber encore. Cette

fluctuation de IE1-72K serait justement due à la perte de l'isomère IE2-55K dont la fonction est de moduler l'équilibre entre la production du transcrit primaire et l'inhibition de la transcription par IE2-86K. Les variations observées dans la production de IE1-72K selon la quantité de IE2 présente (la quantité de IE2-86K est plus importante lorsque celle de IE1-72K est à son bas niveau) respectent donc le mode de régulation de ces protéines en l'absence de IE2-55K, tel que décrit à la Figure 6.

6.3 Souche HCMV *ts504*

Des cellules IAFP-1 ont maintenant été infectées et lysées dans les mêmes conditions que précédemment, et les protéines virales détectées par buvardage Western. On remarque l'absence de la bande de 72 kDa correspondant à la protéine IE1-72K, et la présence d'une bande supplémentaire de 150 kDa (flèche), presque invisible chez le type sauvage (Figure 21). Cette bande correspond à la cinétique normale de IE1-72K avec une expression maximale entre 1 et 2 h PI, pour disparaître graduellement après 4 h PI. La protéine IE2-86K est présente, mais en quantité minime, et est d'ailleurs considérée comme la protéine mutée suite aux expériences de séquençage.

Les protéines précoces-immédiates influençant leur propre production par épissage différentiel, nous avons alors infecté des cellules avec la souche sauvage en présence de 150 µg/ml de cycloheximide (CH), ce qui bloque la traduction des ARNm en protéines et favorise l'accumulation des premiers ARNm produits

lors de l'infection. Après rincage, le milieu de culture contenant la cycloheximide a été remplacé par du milieu frais dépourvu de cette substance afin de permettre la traduction des ARNm ainsi produits. La Figure 22 montre le résultat obtenu dans ce cas (puits 2), en comparaison avec ce qui a été obtenu pour le mutant *ts504* et la souche sauvage après infection et 2 ou 4 h d'incubation à 33.5°C ou 39.5°C. On remarque la présence de deux bandes à 150 et 130 kDa, beaucoup plus évidentes avec les cellules infectées traitées à la cycloheximide et sur le mutant *ts504* maintenu à température non-permissive, qu'avec ces mêmes souches à température permissive. Il est donc possible que cette bande soit due à une erreur d'épissage ou de transcription du gène IE provoquant l'apparition d'une protéine IE1/2 non-fonctionnelle de masse moléculaire anormalement élevée. Une telle erreur pourrait par exemple être due à l'utilisation de sites cryptiques d'épissage.

6.4 Expression des protéines précoces-immédiates dans les cellules non-permissives

Les diverses lignées de cellules non-permissives décrites dans la section Matériel et Méthodes ont été infectées avec les souches HCMV sauvage et mutantes, et la production des protéines précoces-immédiates a été observée tel que décrit précédemment par immunobuvardage de type Western après 4 h post-infection, soit en fin de phase précoce-immédiate. La Figure 23 montre un résumé des résultats obtenus lors d'infections avec la souche sauvage, la position des principales protéines précoces immédiates étant

marquée par des flèches. Nous observons dans la Figure 23 que les précurseurs hématopoïétiques THP1 et U937 produisent très peu des différentes isoformes de IE1 ou IE2; alors que les cellules AV3 et Caco2, de morphologies plus ou moins épithéliales, produisent presque exclusivement des isoformes de la protéine IE2. Un second facteur pourrait donc intervenir dans ce type de cellules, l'inhibition par le modulateur observée chez les précurseurs hématopoïétiques n'étant pas spécifique à l'une ou l'autre des différentes protéines produites par le gène IE1/2.

Des résultats similaires ont été obtenus avec les trois souches mutantes, identiques à température permissive et variant selon les protéines mutées à température restrictive (résultats non-montrés). Une des souches se démarque cependant du lot, soit le mutant *ts486* dans les précurseurs hématopoïétiques (THP1 et U937) à température permissive. Dans ces conditions, cette souche produit une grande quantité de cinq isoformes de petite taille (variant de 14 à 32 kDa) de la protéine IE2 (Figure 24).

6.5 Effets du PMA sur l'expression de protéines.

Les effets du PMA sur l'expression des protéines sont très limités, et seront détaillés surtout au niveau de l'expression des ARN. Résumons simplement que la stimulation de la transcription par le PMA résulte en une légère augmentation de l'expression des protéines causant un blocage rapide de l'expression du gène par la protéine IE2-86K. Le PMA n'a donc pas d'influence sur le mode d'autorégulation du gène IE1/2. Par exemple, lors d'infections de

cellules permissives IAFP1 avec la souche HCMV *ts504*, à température restrictive et en présence de PMA (Figure 26), l'absence de la protéine inhibitrice IE2-86K fonctionnelle combinée à la stimulation de la transcription du gène IE1/2 par le PMA résultent en une production accrue de la protéine IE1-72K. Dans ces expériences, le PMA était ajouté juste avant l'infection des cellules; il est donc important de mentionner que ce délai était insuffisant pour permettre la différenciation des précurseurs hématopoiétiques THP1 et U937 (un prétraitement de 24 h est requis). Ces cellules ont donc bien été infectées dans leur état non-différencié et non-permissif.

Les résultats obtenus confirment également certains faits observés lors d'autres expériences. En effet, chez les cellules AV3, lesquelles favorisent la production des isoformes de IE2, la souche HCMV *ts486* produit à température restrictive et en présence de PMA une quantité accrue des isoformes de IE2 de taille inférieure à 55 kDa (Figure 25; panneau de droite), presque absentes même lors de l'infection de cellules permissives (Figure 25; panneau de gauche, témoin de cellules IAFP). Ceci pourrait correspondre à une tentative par la souche mutante de produire une protéine IE2-55K fonctionnelle, mais l'ARN correspondant serait mal épissé dans ce type de cellules.

7. BUVARDAGE DE TYPE NORTHERN

7.1 Expression des ARNm précoces-immédiats

Ces mêmes expériences ont ensuite été reprises afin de vérifier l'expression des ARN messagers des protéines précoces immédiates. Les cellules IAFP1 ont été infectées en double avec la souche sauvage AD169 et les mutants puis incubées à 33,5°C et 39,5°C. Des échantillons ont été lysés dans le réactif Trizol (Gibco BRL) et congelés aux intervalles de 1, 2 et 4 h post-infection. La même expérience a été effectuée simultanément avec les trois souches mutantes. La Figure 27 montre les ARN messagers des protéines mutées à 39,5°C et 4 h post-infection, en comparaison avec la souche sauvage. Chez les mutants *ts446* (mutation de IE1, ARN correspondant de 1,95 kb) et *ts486* (mutation de IE2, ARN respectivement de 2,2 et 1,7 kb pour les isoformes IE2-86K et IE2-55K) on remarque la présence des ARN messagers assignés aux protéines mutées. Ceci montre que ces mêmes protéines sont bel et bien produites mais sont non-fonctionnelles et probablement dégradées à température restrictive; ce qui indique qu'il ne s'agit pas d'un défaut de production des ARN messagers. Le mutant *ts486* montre également une tendance à produire de petits ARN réagissant avec la sonde IE2 et qui sont des isoformes de la protéine IE2 de petite taille. Le mutant *ts504* quant à lui, montre à la fois la production de l'ARNm correspondant à la protéine IE1 et celle d'un ARN d'environ 4,5 kb, lequel pourrait correspondre à la protéine inhabituelle de 150 kDa observée par immunobuvardage Western

(Figure 21), ainsi qu'une faible quantité de l'ARN de 2,2 kb correspondant à la protéine IE2-86K. Ce mutant soulève des questions concernant l'épissage des transcrits du gène IE1/2 dont il sera fait mention plus loin.

7.2 Effet du PMA sur les ARNm précoces-immédiats

La transcription du gène IE1/2 fonctionnant par l'intermédiaire de NF- κ -B et par la voie de la protéine kinase C, nous avons donc voulu vérifier l'effet du PMA, un puissant activateur de cette voie de transcription. Les cellules permissives IAFP1 ont été infectées dans des conditions identiques à celles de l'expérience précédente, mais cette fois en présence de 30 ng/ml de PMA, ajoutés au moment de l'infection. La transcription dans les cellules non-permissives THP1, U937, AV3 et Caco2 a également été mesurée aux deux températures, en présence ou absence de PMA, mais seulement à 4 h PI, les résultats étant toujours plus évidents à ce moment.

Soulignons ici que l'application du PMA s'est faite au moment de l'infection. Les cellules de type hématopoïétiques THP1 et U937 pouvant être induites à la différenciation par le PMA, il est important de noter que ces cellules n'ont pas subi de traitement préalable induisant la différenciation et sont donc non-permissives lorsqu'infectées à l'état normal. Les cellules THP1 rendues permissives par le PMA présentant une cinétique d'infection beaucoup plus lente, avec une phase précoce-immédiate durant jusqu'à 72 h (Fish *et al.*, 1995), nous avons également vérifié la transcription dans ces cellules prétraitées au PMA à 72 h PI.

La Figure 28 montre une séparation sur gel typique de l'ARN total obtenu après extraction avec le réactif Trizol (Gibco BRL) d'échantillons de cellules IAFP1 infectées dans diverses conditions. Des soins ont été apportés afin de déposer dans chaque puits une quantité équivalente d'ARN (2 µg); et la séparation en bandes distinctes, visibles surtout pour les espèces de plus faible poids moléculaire, montre l'absence de dégradation de l'ARN.

Les résultats obtenus avec les cellules permissives IAFP1, en utilisant la sonde IE1 (Figure 29) montrent que le PMA provoque une très légère baisse de la production de l'ARN IE1 à 33,5°C, et est sans effet à 39,5°C. En utilisant la sonde IE2 (Figure 30), on remarque la même légère baisse de l'ARN IE2 à 33,5°C. Par contre, à 39,5°C le PMA semble provoquer une accélération de la cinétique de la production de l'ARN IE2 de 2,2 kpb, lequel devient facilement détectable à 1 heure post-infection; cet effet étant plus marqué pour le mutant *ts446*. Le PMA provoque aussi un retour vers la forme normale de 2,2 kpb de la production de l'ARN aberrant de 4,5 kpb par la souche *ts504*.

L'effet du PMA à température permissive se résume donc à un blocage plus rapide de la production de la protéine IE1-72K. Il y a alors probablement une légère augmentation initiale de la transcription du gène IE1/2, suivie d'un blocage rapide par la protéine IE2-86K et d'une baisse de la transcription, ce qui correspond au modèle présenté à la Figure 6. À température non-permissive, le PMA n'a pas d'effet sur IE1, mais accélère la cinétique d'expression de IE2 et surtout, favorise l'épissage de la forme de 2,2 kpb chez *ts504* au détriment de l'ARN aberrant de 4,5 kpb.

L'accélération de la production de IE2-86K semble ici favoriser l'épissage de la forme 2,2 kpb, peut-être par une altération du nombre et de la nature des différents facteurs d'épissage présents dans la cellule sous l'influence du PMA.

Concernant les cellules non-permissives, on ne note aucune différence à 4 h PI (et aussi à 72 h PI avec les cellules THP1) avec les cellules permissives, au niveau de la quantité d'ARN produit en absence ou en présence de PMA (résultats non-montrés). De plus, l'absence d'une protéine sur les gels d'immunobuvardage de type Western concorde bien avec l'absence de l'ARN messager correspondant, nonobstant l'effet des mutations. Il y a donc une bonne corrélation entre les résultats qualitatifs obtenus par ces deux techniques, celle de l'immunobuvardage de type Western étant moins exigeante.

DISCUSSION

1. UTILITÉ DES MUTANTS THERMOSENSIBLES

Depuis la découverte de l'ADN, la génétique a évolué de l'étude de la transmission des caractères à la description des mécanismes moléculaires de la réplication, de la régulation et de l'expression des gènes. Suite à des expériences relativement simples ayant mené à la cartographie de génomes bactériens et à la définition des groupes de gènes liés, la découverte des enzymes de restriction et la mise au point des techniques de séquençage ont permis la dissection et l'analyse du génome des organismes vivants, depuis les virus codés par quelques milliers de nucléotides jusqu'aux millions de bases composant le génome des mammifères.

L'étude des virus a offert aux chercheurs la possibilité d'analyser le fonctionnement de systèmes simples, ne possédant que quelques gènes, plutôt que de s'attaquer directement à l'extrême complexité des chromosomes eucaryotes. Le virus simien SV40 a été le premier organisme vivant dont on a connu la séquence génomique complète, l'origine de réplication et la position des cadres de lecture des protéines ainsi que le fonctionnement des gènes menant à la production d'une progéniture virale (Fiers *et al.*, 1978; Reddy *et al.*, 1978; Nathans, 1979). Ce groupe de chercheurs introduisit également l'utilisation de mutants thermosensibles et la technique de sauvetage de marqueurs afin de localiser les gènes et d'en établir les fonctions. Les techniques qu'ils développèrent sur ce petit génome (5,2 kb) furent ensuite utilisées avec succès sur des virus de plus en plus complexes, des adénovirus (environ 35 kb) aux herpesvirus (plus de 150 kb).

Le développement subséquent des techniques de génétique moléculaire, comme le clonage et l'amplification de l'ADN, la mutagénèse dirigée et l'introduction de constructions de gènes dans les cellules pro- et eucaryotes, permit ensuite d'étudier isolément les gènes et leurs séquences régulatrices. Ce type d'expériences, plus faciles à mettre en oeuvre et à interpréter, apporta si rapidement des données essentielles sur la régulation et l'expression des gènes qu'elles se généralisèrent. L'isolement et l'étude de mutants, nettement plus ardues, perdirent ainsi de leur popularité. On oubliait toutefois le contexte génomique dans lequel les gènes se doivent d'être étudiés. Un gène isolé n'est, en effet, qu'un élément actif dans un ensemble d'interactions obscures et de nombreux résultats de biologie moléculaire, apparemment solides, sont de plus en plus souvent contredits par l'emploi de mutants viraux. Un cas frappant concerne d'ailleurs l'utilisation d'un mutant HCMV de délétion du modulateur dans des cellules non-permissives (Meier et Stinski, 1997) Dans cette expérience, en effet, l'élimination du modulateur ne rend pas les cellules permissives, contrairement à ce que pouvaient suggérer les expériences d'expression transitoire utilisant le modulateur/promoteur accolé à un gène rapporteur.

2. CARACTÉRISATION PRÉLIMINAIRE DES MUTANTS

Plusieurs mutants thermosensibles ont été produits à partir du HCMV (Yamanishi et Rapp, 1977; Ihara *et al.*, 1978), ou de son équivalent murin (MCMV; Sammons et Sweet, 1989; Kumura *et al.*,

1990; Akel et Sweet, 1993). Ces mutants furent d'abord divisés en groupe de complémentation, puis en phénotypes ADN⁻ (mutants précoces) et ADN⁺ (mutants tardifs, impliquant des protéines structurales). Presque tous ces mutants ADN⁻ furent ensuite identifiés comme mutants de l'ADN polymérase par le test simple de la résistance à l'acide phosphonoacétique (APA).

Des souches HCMV *ts* obtenues dans notre laboratoire ont été caractérisées de la même façon (Dion et Hamelin, 1987). Ayant sélectionné les trois meilleures souches ADN⁻, nous avons testé ces souches pour la résistance à l'APA afin de déterminer s'il s'agissait de mutants de polymérase. Aucune de nos trois souches mutantes n'a montré de résistance à l'APA (Tableau 2), ce qui a rapidement éliminé la possibilité de mutations similaires à celles rapportées par les auteurs mentionnés plus haut, bien que l'on ne puisse exclure la présence d'autres mutations dans la polymérase. Par contre, en menant ce type d'expérience, nous avons observé que l'effet thermosensible devait se produire très tôt après infection, bien avant l'étape de la réplication de l'ADN. En effet, dans des flacons de cellules infectées ayant passé plusieurs heures à température permissive, les souches mutantes se répliquaient comme la souche sauvage et ceci n'était pas dû à l'effet d'une infection à haute MOI. Les résultats de la Figure 10 montrent que les cellules infectées doivent absolument être placées à température non-permissive avant 4 h PI, sinon elles dépassent le temps d'action des protéines mutées et l'infection se poursuit comme chez la souche sauvage. Les résultats pour 4 h PI sont des résultats limites et ils peuvent varier selon le temps exact écoulé depuis l'entrée du virus dans la cellule

et la décapsidation de l'ADN viral (cette étape dure entre 15 et 30 min) et le transfert des cellules à température non-permissive, bien que l'effet soit très net sur les cellules transférées à 2 ou 8 h PI. Ces souches mutantes sont donc affectées pour des fonctions précoces-immédiates.

Ces résultats sont d'ailleurs confirmés par les premières expériences de visualisation des protéines mutées par immunobuvardage de type Western. Avec le transfert des cellules infectées de la température permissive à la température restrictive au moins 24 h PI, nos premiers gels ont en effet révélé une production complète des protéines virales, similaire à celle observée pour la souche sauvage dans les mêmes conditions d'incubation (Figure 18). La taille et la cinétique d'apparition de ces protéines correspondent à ce qui a été montré antérieurement dans la littérature (Stinski, 1977; Stinski et al., 1983). L'expression des protéines virales présente ainsi une forte augmentation quelques 72 h après l'infection; ce pic correspond à la phase tardive de l'infection faisant suite au début de la réplication de l'ADN viral.

Ceci a eu deux conséquences importantes sur les travaux ultérieurs. D'abord, lors de l'infection des cellules, tous les contenants ont été, lorsque requis, placés à température non-permissive au maximum 1 heure après contact entre la suspension virale et les cellules. De plus, avec le temps de 4 h PI correspondant à la phase précoce-immédiate de l'infection virale, ceci réduisait fortement le nombre de protéines potentiellement mutées, ne laissant à vérifier que les gènes précoces-immédiats, soit le gène majeur IE1/2 et les gènes mineurs IE3, IE4, UL36-38 et

US3. Les résultats des expériences de sauvetage de marqueurs ayant pointé le gène majeur IE1/2 comme porteur des mutations, l'étude de ces derniers gènes mineurs a alors été abandonnée.

Il faut noter ici que ces souches sont, au meilleur de notre connaissance, les premiers mutants thermosensibles précoces-immédiats jamais décrits pour le HCMV, les autres mutants ADN rencontrés dans la littérature étant tous de type précoces.

3. IDENTIFICATION DES MUTATIONS

Malgré les résultats indiqués par l'expérience sur la cinétique d'inhibition à 39,5°C et impliquant seulement les protéines précoces-immédiates, nous avons quand même, en guise de confirmation, commencé les expériences de sauvetage de marqueurs en utilisant le génome entier du cytomegalovirus, sous la forme de 10 cosmides superposés. Les résultats du Tableau 3 montrent que seuls les cosmides pLCU 22 et pLCU 558 ainsi que le plasmide pLCC1534 (tous contenant le fragment *Hin* dIII-E) sont en mesure de sauver les mutations et de reconstituer une souche sauvage par recombinaison, les plages obtenues pouvant être repiquées et reproduites en l'absence de tout ADN transformant (résultats non-montrés). Ces résultats indiquent également que ce fragment est le seul porteur des mutations responsables du phénotype thermosensible chez les trois souches étudiées bien qu'on ne puisse exclure la possibilité d'autres mutations ailleurs dans le génome viral.

Ce fragment porte, tout particulièrement, le gène majeur précoce-immédiat IE1/2 qui est d'une importance capitale pour l'initiation du cycle de réplication virale. En effet, tel que décrit plus haut, ce gène est responsable du démarrage de la transcription sur le génome viral, puis du passage en phase précoce où seront produites les protéines responsables de la réplication de l'ADN. Nous avons résumé dans la Figure 6 les résultats de nombreuses expériences d'expression transitoire utilisant des fragments d'ADN clonés (Cherrington *et al.*, 1991; Baracchini *et al.*, 1992; Liu et Stinski, 1992) afin de donner une vue d'ensemble des fonctions de ces protéines.

Les expériences de sauvetage de marqueurs ont été reprises avec des plasmides portant des sections du gène IE1/2. D'après les résultats du Tableau 4 et de la Figure 13, la souche HCMV *ts* 446 est sauvée par le plasmide pLCY116 portant le MIEP et l'exon 4 spécifique à IE1, ce qui correspond au résultat des expériences d'immunobuvardage Western montrant l'absence de la protéine IE1-72K sur gel (Figure 19).

La souche HCMV *ts* 486, quant à elle, est sauvée par le plasmide pLCY102 portant l'exon 7 spécifique à IE2 (Figure 13) et contenant la mutation déterminée comme la plus importante (voir résultats de séquençage). Ce résultat concorde également avec le gel de la Figure 20, montrant l'absence de l'isoforme de 55 kDa de la protéine IE2. Cette protéine est produite en très faible quantité, même dans la souche sauvage, ce qui explique qu'elle soit très difficile à détecter sur gel, surtout en l'absence de toute procédure d'enrichissement.

Finalement, la souche HCMV *ts* 504 n'est sauvée que par le plasmide pLCY107, porteur de tout le gène IE1/2. Parallèlement, les expériences d'immunobuvardage Western (Figure 21) montrent l'absence des protéines IE1 et IE2 et l'apparition d'une bande aberrante correspondant à une protéine d'environ 150 kDa. Le séquençage ne montre aucune mutation dans le cadre de lecture de la protéine IE1, mais une substitution (G → A; nucléotide 1459) est observée à 399 nucléotides de distance du site *Bam*H I (nucléotide 1858) séparant les fragments de 5,2 et 5,8 kb que l'on retrouve, respectivement, dans les plasmides pLCY102 et pLCY116. Cette mutation est probablement exclue d'une éventuelle recombinaison, étant située un peu trop près du site *Bam*H I, car la recombinaison homologue nécessite un minimum de 300 nucléotides identiques (et même de préférence, le double). Il est possible qu'elle interfère avec l'épissage lors de la maturation des ARN messagers et soit ainsi responsable de l'apparition de l'ARN de 4,5 kb visible dans les expériences de buvardage Northern (Figure 27) et de la protéine correspondante (Figure 21).

Ces expériences de sauvetage de marqueurs et d'immunobuvardage Western ont donc permis d'attribuer une protéine altérée à chacune des souches mutantes, ce qui a ensuite conduit au séquençage du gène IE1/2 des mutants.

Après vérification par des expériences de buvardage Northern, nous pouvons confirmer la présence des ARN messagers correspondant aux protéines IE1-72K, IE2-86K et IE2-55K, d'une taille respective de 1,95, 2,2 et 1,7 kb (Figure 27). Ces ARN, détectés avec les sondes IE1 et IE2 décrites dans la section Matériel

et Méthodes, correspondent à ceux déjà décrits dans la littérature (Stenberg *et al.*, 1985; Rawlinson et Barrel, 1993).

L'identification de substitutions d'acides aminés menant au phénotype thermosensible repose sur les caractéristiques chimiques des chaînes latérales en cause. Notons d'abord qu'au niveau de la séquence de l'ADN, la substitution d'un codon par un autre dont l'ARN de transfert est mal représenté peut provoquer un ralentissement marqué dans la traduction des ARN messagers correspondants. Nos mutants se répliquent normalement lorsque placés à température permissive et, par conséquent, la traduction des ARN messagers ne peut pas être mise en cause. Nous pouvons alors éliminer d'office la représentativité des codons comme un facteur pouvant causer un arrêt ou un ralentissement considérable de la production des protéines précoces-immédiates à température non permissive.

Concernant la souche HCMV *ts* 446, le remplacement d'une alanine par un résidu glycine permet une plus grande flexibilité de la chaîne polypeptidique à plus haute température, en particulier selon les graphiques de Ramachandran (Branden et Tooze, 1991), malgré la ressemblance apparente des deux acides aminés. Cette différence de flexibilité est probablement suffisante pour donner une conformation non-fonctionnelle de la protéine à température restrictive, d'autant plus qu'elle est située dans le domaine "leucine zipper" de dimérisation de la protéine (Nelson *et al.*, 1990). Ces acides aminés présentent également des constantes d'hydrophobicité assez différentes selon Kyte et Doolittle (Ala -> 1,8 et Gly -> -0,4; Branden et Tooze, 1991). Cette mutation est la seule présente dans

la protéine IE1; et seulement une substitution thréonine -> sérine, ne causant aucun effet, est observable dans la protéine IE2.

Pour la souche HCMV *ts* 486, c'est la substitution tyrosine -> sérine qui semble responsable du phénotype thermosensible. Comparativement au résidu tyrosine, le résidu sérine est beaucoup plus petit (Branden et Tooze, 1991), moins hydrophobe et incapable d'interaction π entre deux anneaux phényles adjacents (Anfinsen, 1973). Ceci peut donc provoquer un repliement de la chaîne polypeptidique, moins stable à température restrictive. Étant située sur la section commune entre les deux isomères IE2, l'absence apparente d'effet de cette mutation sur la protéine IE2-86K est probablement due à la taille de IE2-86K, pouvant amener un repliement différent de la chaîne polypeptidique; et à la position de la mutation, hors de la région responsable de la liaison à l'ADN et au signal de répression *cis* du promoteur IE. De plus, un certain degré de variabilité du génome du HCMV est observable lors de passages *in vitro* (Hamelin *et al.*, 1988; Hamelin et Dion, 1990); et la plupart des mutations rencontrées ne gênent en rien la réplication du virus. Seules certaines séquences sont toujours conservées, comme la séquence de liaison de IE2-86K au début du promoteur du gène IE1/2 (Cherrington *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1991).

Deux substitutions apparaissent finalement importantes dans la souche HCMV *ts* 504. D'abord la substitution asparagine -> lysine, la lysine étant plus hydrophobe et chargée positivement. Une autre substitution se trouve en deux endroits, soit acide aspartique⁴⁶³ -> asparagine, mais celle-ci est excisée de IE2-55K. Sa position dans le domaine "leucine zipper" de IE2-86K la rend importante pour la

structure fonctionnelle de la protéine car elle pourrait potentiellement empêcher la dimérisation de la protéine à température non-permissive, et de là, la liaison à l'ADN.

Parallèlement à la difficulté de produire des protéines IE normales, la souche HCMV *ts* 504 peut donc être définie comme porteuse d'une protéine IE2-86K altérée.

De telles mutations provoquant un phénotype thermosensible ont été décrites régulièrement dans la littérature. Par exemple, un mutant thermosensible ADN pol^γ du HCMV dont la mutation a été localisée par sauvetage de marqueurs présente deux changements d'acides aminés, soit les substitutions Y346 -> H et S536 -> L, cette dernière étant située dans une région d'homologie entre les différentes ADN polymérases des herpesvirus (Ihara *et al.*, 1994). D'autres auteurs rapportent également des substitutions d'acides aminés dans les protéines de plusieurs mutants du virus SV40 résultant en un phénotype thermosensible (Behm *et al.*, 1988); de même que dans l'ADN polymérase du virus de la vaccine (Traktman *et al.*, 1989).

4. CONSÉQUENCES FONCTIONNELLES DES MUTATIONS

4.1 Souche HCMV *ts*446

Le mutant *ts*446 est donc clairement un mutant de IE1, la protéine IE2 n'étant pas affectée. Selon le modèle de la phase précoce-immédiate (Figure 6), la protéine IE1-72K est la première protéine virale à être synthétisée lors de l'infection. Elle stimule

ensuite sa propre synthèse et celle de la protéine IE2-86K (Baracchini *et al.*, 1992). Cette dernière inhibe alors la production de la protéine IE1-72K (Cherrington *et al.*, 1991) et favorise la transition vers la phase précoce (Mocarski, 1991). Les deux protéines agissent à ce moment en synergie afin d'activer la transcription des protéines de classe β (précoces). Il est évident que l'absence de la protéine IE1-72K fonctionnelle chez le mutant *ts446* à température non-permissive bloque complètement la réplication virale. L'ARN messager correspondant étant transcrit et détectable, l'absence de la protéine IE1 peut être expliquée par la dégradation de la protéine mutée et non-fonctionnelle par la cellule, puisque rien ne semble s'opposer à sa traduction. Cette mutation n'influence donc pas la transcription et la production des isoformes de IE2, même si les protéines IE1 et IE2 sont produites par épissage différentiel à partir du même promoteur (Baracchini *et al.*, 1992).

Ce mutant est fonctionnellement équivalent à deux mutants Δ IE1 produits dans un autre laboratoire (Greaves et Mocarski, 1998; Mocarski *et al.*, 1996). Il présente également les mêmes effets lors d'infections à différentes MOI, c'est à dire aucune croissance à température non-permissive si infecté à une MOI inférieure à 0,05. Avec une MOI comprise entre 0,05 et 3, on observe une certaine production de virus au bout d'environ 3 semaines (normalement 7-8 jours), tandis qu'une MOI supérieure à 3 entraîne un cycle répliatif complet dans les délais normaux. Selon ces auteurs, l'effet de croissance à forte MOI peut être attribué à la présence du transactivateur pp71 (UL82) intégré à la particule virale, lequel a pour fonction de stimuler la transcription du gène IE1/2 dès le début

de l'infection (Mocarski *et al.*, 1996; Liu et Stinski, 1992). Ce transactivateur est d'ailleurs l'équivalent fonctionnel de la protéine α -TIF (VP16) du virus HSV (Hayward, 1993). Il semble donc que la protéine IE1 pourrait aussi être incluse dans la particule virale et, conséquemment, être présente dès le début de l'infection suivante pour assister les transactivateurs pp71 et NF- κ -B. Ceci expliquerait la présence de IE1 dès le début de l'infection (tel qu'observé par immunobuvardage Western pour la souche sauvage; voir Figures 19, 20 et 21) et, surtout, la synthèse en continu de cette protéine à faible concentration durant tout le cycle de réplication virale.

À elle seule, cette souche comportant une mutation très simple montre bien les avantages de l'utilisation de mutants, puisque cet effet de MOI ne peut être observé avec des fragments de gènes clonés. Les auteurs ayant préparé les mutants Δ IE1 ont également voulu se placer dans une condition de contexte génomique, mais on ne peut exclure la possibilité que l'ADN viral ait été altéré durant la construction de ces mutants. Les nôtres sont, par ailleurs, des plus simples à propager puisqu'ils ne nécessitent, ni virus assistant, ni lignée cellulaire exprimant la protéine IE1.

4.2 Souche HCMV *ts486*

Toujours selon le modèle de fonctionnement des protéines précoces immédiates, la perte chez le mutant *ts486* de la protéine IE2-55K détruirait l'équilibre entre la production des protéines IE2-86K et IE2-55K et provoquerait un blocage rapide de la production de la protéine IE1-72K par la protéine IE2-86K. Ceci tend à amener

prématurément le cycle viral en phase précoce, malgré la production d'une quantité insuffisante de la protéine IE1-72K. Et cela résulterait également en une production insuffisante des protéines précoces, celles-ci étant activées par les hétérodimères IE1-72K/IE2-86K. L'absence de la protéine IE1-72K sur gel peut être expliquée de la même façon que pour la souche HCMV ts446, c'est-à-dire par élimination de la protéine mutée non-fonctionnelle.

4.3 Souche HCMV ts504

Les résultats de séquençage pointent la protéine IE2-86K comme protéine mutée, aucune mutation n'affectant le cadre de lecture de la protéine IE1-72K. Cependant, on observe par immunobuvardage Western l'absence de la protéine IE1-72K, remplacée par une protéine de masse moléculaire anormalement élevée (environ 150 kDa, Figure 21), accompagnée d'un ARN correspondant (Figure 27) contenant l'exon 7 de IE2. La protéine IE2-86K est présente en très faible quantité. Ces deux protéines sont également mises en évidence par l'addition de cycloheximide lors de l'infection. Cette erreur d'épissage pourrait être due à la mutation du nucléotide 1227 (Figure 15, substitution C -> T) situé dans l'exon 7 (IE2) qui fait apparaître un site récepteur dégénéré d'épissage (la séquence ACTATCTT devient ACTATTTT). Cette mutation causerait, à température non-permissive, la fixation au mauvais endroit des facteurs d'épissage cellulaires. Ces protéines étant responsables du choix entre les sites alternatifs d'épissage (Maniatis, 1991), il en résulterait une combinaison incorrecte dont la nature exacte

resterait toutefois à déterminer. Un phénomène similaire est d'ailleurs observé avec la protéine E1B de l'adénovirus, où des mutations influencent le choix des sites d'épissage des transcrits en faisant apparaître ou disparaître des séquences donatrices ou réceptrices (Montell *et al.*, 1984). Ce mutant met ici en évidence un lien plus direct entre les mutations et l'épissage différentiel, le gène IE1/2 comportant de nombreuses jonctions d'épissage 3' et 5'. La cellule doit donc sélectionner les jonctions appropriées afin de produire la protéine voulue.

5. IMPORTANCE DE L'ÉPISSAGE DANS LA PERMISSIVITÉ

L'absence d'expression des protéines précoces-immédiates chez les précurseurs hématopoïétiques a déjà été observée par plusieurs auteurs et est attribuée à la présence de protéines inhibitrices sur la section modulatrice du gène. Ces protéines disparaissent lors de la différenciation des cellules THP1 en macrophages, rendant ainsi la cellule permissive. Cependant, des expériences récentes ont montré que la délétion du modulateur ne rend pas ces cellules permissives (Meier et Stinski, 1997) et elles introduisent un second élément, encore non-identifié, qui serait important pour l'expression correcte du gène IE1/2, d'autant plus que l'inhibition par le modulateur n'est pas spécifique à l'une ou l'autre des différentes protéines précoces-immédiates.

De façon générale, les précurseurs hématopoïétiques THP1 et U937 produisent très peu des différentes isoformes de IE1 ou IE2, probablement à cause de l'inhibition par le modulateur de la

transcription du gène correspondant (Lubon *et al.*, 1989; Meier et Stinski, 1997; Nelson *et al.*, 1987); tandis que les cellules AV3 et Caco 2 produisent presque exclusivement des isoformes de la protéine IE2. D'après les résultats obtenus lors d'infections de ces cellules non-permissives, le second facteur non encore identifié serait l'épissage différentiel du gène IE1/2. Les cellules de ce type montrent parfois une tendance à favoriser certains patrons d'épissage plutôt que d'autres, comme les cellules AV3 et les macrophages (Kerry *et al.*, 1995). De plus, l'épissage différentiel est normalement contrôlé par des facteurs cellulaires (Bruzik et Maniatis, 1995; Maniatis 1991). Ceux-ci, selon leur nature et leur affinité de séquence, couvrent ou découvrent les sites donneurs ou receveurs d'épissage et permettent ainsi de choisir quels exons seront utilisés dans l'ARN messager. De telles protéines sont ainsi responsables du choix des ARN messagers produits dans une lignée cellulaire en particulier (Latchman, 1990), et déterminent donc la permissivité de la lignée cellulaire en produisant ou non les ARNm requis, dans des proportions acceptables.

Des travaux récents ont montré l'organisation dynamique de ces facteurs d'épissage lors de l'expression du gène IE1/2. Ces protéines s'associent au transcrit primaire et commencent l'épissage avant même que la transcription ne soit terminée (Dirks *et al.*, 1997). Ceci expliquerait pourquoi l'ARN messager de la protéine IE1 est produit en premier, puisque son exon spécifique (l'exon #4, voir Figure 5) est transcrit et disponible pour l'épissage avant ceux des isoformes de IE2. La production subséquente des ARN messagers de IE2 pourrait ensuite être due à un manque de facteurs

d'épissage spécifiques à IE1 (ceux-ci étant tous en fonction), à la redistribution des facteurs d'épissage dans le noyau (un cas reconnu pour HSV; Phelan *et al.*, 1993) ou à la synthèse *de novo* d'autres facteurs d'épissage; dans ces deux derniers cas possiblement sous l'influence de protéines virales. De tels mécanismes pourraient aussi varier selon le type de cellules utilisées, apportant ainsi une seconde voie de contrôle de l'épissage du gène IE1/2 dans des lignées cellulaires différentes.

Des cas où l'épissage différentiel est un déterminant de la permissivité existent d'ailleurs dans la littérature, par exemple lors de l'infection par le virus du sarcome aviaire (ASV) dans des fibroblastes humains non-permissifs (Knight *et al.*, 1993). Nous avons nous-mêmes observé des cas d'épissage préférentiel lors d'infections de cellules non-permissives. L'expression de différentes isoformes des protéines IE1 et 2 est incomplète chez les cellules AV3 et Caco2, où l'on observe une expression préférentielle des isoformes de la protéine IE2, souvent ceux de plus petites tailles (<55 kDa, Figure 23). Les précurseurs hématopoïétiques (THP1 et U937) ne produisent, quant à eux, que peu ou pas de protéines précoces-immédiates. La présence de PMA ne facilite pas la production de protéines précoces-immédiates, sauf chez le mutant *ts486* dans les cellules AV3 à température non-permissive (Figure 25). Ce mutant produit également dans les précurseurs hématopoïétiques un surplus des petits isomères de IE2, en absence cette fois de PMA. L'expression d'une isoforme de 14 kDa de la protéine IE2 était déjà connue chez la souche THP1 rendue permissive après différenciation en macrophage par les esters de

phorbol (Kerry *et al.*, 1995); mais les altérations du gène IE2 semblent ici responsables d'une expression aberrante du gène, capable en plus de surmonter le blocage de son expression au niveau du modulateur. Il est donc possible que le mutant *ts486* tente de compenser la perte de la protéine IE2-55K en surexprimant l'ARN de IE2, mais celui-ci serait mal épissé dans les cellules et mènerait à la production d'isoformes de petite taille. Des sites d'épissage décrits comme cryptiques dans la littérature (Rawlinson et Barrel, 1993) pourraient donc être utilisés dans ces cas particuliers.

Ceci constitue un exemple majeur où l'utilisation de mutants thermosensibles dans le contexte génomique apporte des réponses à des questions, inimaginables avec l'utilisation de fragments clonés, tout en présentant une image beaucoup plus fidèle des phénomènes observés lors d'infections réelles.

6. MUTANTS THERMOSENSIBLES COMME MODÈLES DE LATENCE

Le phénomène de latence, d'une grande importance médicale, est beaucoup étudié chez les herpèsvirus. Le mode exact de l'établissement et du maintien de l'état latent varie selon la classe de virus (α , β ou γ -herpesvirinae). Chez le HCMV, de classe bêta, la latence est tributaire de l'état de différenciation de la cellule. Le virus s'installe dans les cellules insuffisamment différenciées, telles que les précurseurs hématopoïétiques, et la différenciation de la cellule amène la réactivation du virus, soit le démarrage du cycle lytique et l'excrétion de la progéniture virale. C'est ce qui se produit lorsqu'un monocyte circulant (non-permissif) sort du circuit

sanguin et se différencie en macrophage (permissif), après stimulation par d'autres molécules immunitaires. Ceci constitue le modèle de latence dépendante du modulateur du MIEP communément accepté (Nelson *et al.*, 1993; Stinski *et al.*, 1993).

Le maintien de cellules infectées à température non-permissive constitue en lui-même un second modèle de latence. Après plusieurs heures, jours ou même semaines d'incubation à 39,5°C les protéines de la particule virale, incluant le transactivateur pp71, la protéine kinase pp65 et possiblement des exemplaires de la protéine IE1, sont disparues. Lors du transfert subséquent à température permissive, le génome viral se trouve alors dans des conditions identiques à la réactivation, ne pouvant compter que sur les facteurs de transcription cellulaire.

Un nouvel avantage de ce modèle particulier de latence est la possibilité de démarrer l'expression des protéines de manière synchrone. En effet, les procédures d'infection classique ou de transfection de fragments clonés permettent l'entrée du virus ou de l'ADN dans la cellule pendant un temps relativement long, au moins une heure, et l'expression des premières protéines virales dans une cellule donnée peut débuter à tout moment pendant cet intervalle. En revanche, une culture de cellules infectées par un mutant thermosensible, en particulier *ts446* déficient en la protéine IE1-72K, et maintenue à température non-permissive permet un démarrage synchronisé du cycle lytique par un simple transfert de la culture à température permissive. Ceci devrait permettre l'étude fine de l'apparition des premières protéines dans les minutes initiales de la réactivation simulée du virus.

7. PERSPECTIVES

L'identification de l'épissage différentiel du gène IE1/2 en tant que second facteur déterminant la permissivité des cellules au HCMV peut être considéré comme un développement majeur dans la recherche sur les herpèsvirus, en particulier pour les phénomènes de latence et de réactivation où les progrès sont très lents et se résument souvent à la reprise, dans des conditions différentes, des mêmes expériences. Cette implication de l'épissage différentiel dans la latence pourrait, par exemple, jeter un éclairage nouveau sur des travaux récents montrant l'apparition de transcrits spécifiques à la latence (épissés ou non, de sens plus ou antisens) détectés dans les progéniteurs hématopoïétiques (Kondo et Mocarski, 1995).

Finalement, cette hypothèse concernant l'épissage différentiel est en accord avec une donnée importante de la biologie d'un organisme vivant, soit l'homogénéité des cellules constituant un même tissu, autant chez l'adulte que lors de l'embryogenèse. En effet, les facteurs d'épissage présents dans un tissu en particulier sont les mêmes chez toutes les cellules de ce tissu donné; et le même gène peut être épissé différemment, selon le tissu considéré. Par exemple, la troponine T, une protéine impliquée dans la régulation des contractions musculaires qui existe en 10 versions différentes produites par épissage différentiel selon le type de muscle et l'état adulte ou embryonnaire (Breitbart *et al.*, 1985). Même chose pour les facteurs de transcription présents dans une cellule qui sont les mêmes pour toutes les cellules constituant un

tissu donné (Herbomel, 1993). Le tropisme cellulaire du HCMV serait donc lié autant à l'épissage différentiel correct qu'à la présence des facteurs de transcription requis dans un tissu en particulier, ces derniers ayant déjà fait l'objet de travaux intéressants sur des souris transgéniques (Koedood *et al.*, 1995; Baskar *et al.*, 1996).

Comme le montre ce travail, les mutants létaux conditionnels sont essentiels pour mettre en évidence l'équilibre des mécanismes régulant la biosynthèse de même que l'assemblage des composantes virales. L'isolement de mutants thermosensibles affectant le gène IE1/2 est un progrès important dans la recherche sur le HCMV à plusieurs points de vue. Ceux-ci permettent d'abord un contrôle facile et rapide des conditions restrictives par un simple changement de température. De tels mutants peuvent également être utilisés comme marqueurs de recombinaison facilitant l'élaboration de la carte génétique physique et fonctionnelle du HCMV. Et finalement, ces trois mutants affectent les gènes clés de la phase précoce-immédiate et témoignent de son importance. Le gène IE1/2 est en effet le déterminant majeur du résultat de l'infection, dirigeant le virus soit vers le cycle lytique, soit vers la persistance à l'état latent.

Il ne s'agit, bien sûr, que de quelques protéines parmi les 200 potentiellement codées par le génome du HCMV. Il est cependant facile d'imaginer la somme de données importantes qu'apporterait l'isolement d'autres mutants du même type, concernant autant le cycle lytique que les fonctions associées à l'état de latence et à l'évasion du système immunitaire de l'hôte. Les phénomènes observés chez le HCMV pourraient également faciliter la

compréhension des mécanismes similaires élaborés par les autres herpèsvirus pour accomplir les mêmes fonctions, malgré les différences de tropisme cellulaire et de types de latence. Ces virus, responsables de nombreuses maladies aux conséquences parfois très graves chez des sujets de tout âge, sont en effet omniprésents dans toutes les populations humaines et animales.

Nous souhaitons que des travaux similaires se multiplient dans l'étude des herpèsvirus. Ceci ouvrira alors la voie à des stratégies inédites de traitement et de développement de vaccins, ainsi qu'à l'élaboration de nouveaux médicaments antiviraux.

CONCLUSION

L'obtention de mutants thermosensibles du HCMV et leurs caractérisation en tant que mutants précoces-immédiats a permis d'étudier les protéines majeures précoces-immédiates et leurs promoteur/activateur sous un jour nouveau, i.e. dans le contexte du génome viral. En effet, le mode d'action de ces protéines a toujours été étudié précédemment avec des expériences d'expression transitoire. Si ces expériences ont permis de déterminer le fonctionnement général des protéines précoces-immédiates, elles ne peuvent rendre compte des interactions plus fines entre elles, ni avec les composantes virales ou les composantes cellulaires, alors que ces interactions sont primordiales lors d'une vraie infection virale. À ce titre, la caractérisation de trois mutants thermosensibles du HCMV, affectant de plus les trois protéines majeures précoces-immédiates offre des ouvertures uniques, par la possibilité de bloquer l'action de l'une ou l'autre de ces trois protéines.

L'utilisation très récente de mutants de délétion du modulateur et de la protéine IE1 a également soulevé de nouvelles questions concernant la régulation de l'équilibre des trois protéines majeures précoces-immédiates. Elle a également amené l'idée qu'un second facteur, autre que le blocage de la transcription par le modulateur, soit impliqué dans le contrôle la permissivité d'un type cellulaire en particulier.

Il en ressort maintenant que la régulation par rétroaction négative du gène IE1/2 est très efficace, et que l'addition d'un activateur externe de la transcription, tel que le PMA, soit

insuffisante pour modifier l'équilibre de ces protéines, à moins que l'une d'entre elles ne soit mutée et non-fonctionnelle.

Le contrôle de la production de ces protéines par épissage différentiel s'est également montré très variable d'un type cellulaire à l'autre, souvent en ne produisant préférentiellement que l'une ou l'autre des différentes isoformes de ces protéines. Le contrôle de l'épissage différentiel étant le fait de la cellule hôte, il serait donc un déterminant majeur dans la permissivité de la cellule, le deuxième facteur requis après la levée de l'inhibition de la transcription par le modulateur. Ceci expliquerait le nombre relativement restreint de cellules permissives au HCMV, même si son activateur/promoteur isolé est si puissant et ubiquitaire qu'on le retrouve dans des vecteurs d'expression eucaryotes commerciaux. Cette hypothèse est également en accord avec la spécificité tissulaire montré *in vivo* par le HCMV, autant chez l'adulte que lors de l'embryogénèse.

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu le Dr Michel Trudel, ex-directeur du Centre de recherche en virologie, pour avoir accepté ma candidature au programme de doctorat en virologie et immunologie.

Je tiens à remercier d'une manière particulière mon directeur de recherche le Dr Claude Hamelin, qui a eu confiance en moi et m'a accepté comme étudiant, et fut davantage un complice qu'un patron pendant ces années passées à la maîtrise et au doctorat. Je me rappellerai son enthousiasme, son support dans les moments difficiles et nos longues discussions animées et passionnées sur le cytomégalovirus, la virologie, la microbiologie, la science, les arts et la vie en général où nos esprits identiques, curieux et rebelles s'accordaient parfaitement.

Un merci spécial également à madame Lise Cousineau pour son aide technique, particulièrement en culture de tissus là où les livres et les bulletins techniques n'enseigneront jamais l'élégance, la simplicité et la sûreté des gestes apportés par les années d'expériences. Et tout ceci doublé de la gentillesse, la serviabilité et le dévouement.

Je tiens aussi à remercier le Dr Pierre Talbot pour le temps et l'énergie qu'il a consacrés à la simplification du processus de passage direct au doctorat sans rédaction du mémoire de maîtrise, et pour son soutien constant.

Je remercie également le Dr Peter Tissjen, et mesdames Johanne Roger et Lise Forget du service de séquençage de l'Institut pour leurs judicieux conseils, et également le Dr François Shareck pour la synthèse d'oligonucléotides.

Viennent ensuite le Dr Daniel Oth et mesdames Francine Lambert et Mireille Varin pour certaines des lignées cellulaires utilisées dans ces travaux. Se retrouvent également ici en bloc Francine Nadon, Cécile Séguin, Céline Tremblay, Dr Lise Thibodeau, François Lalonde, Nicole Filion, Robert Alain, Nicolas LeBerre et Ginette Denis, pour emprunts divers de matériel, souches bactériennes, conseils techniques, etc.

Je remercie presque la dernière, mais non la moindre, Denise Cloutier du service de culture de tissus pour certaines lignées cellulaires, ses judicieux conseils techniques sans oublier son humour inspiré...

Un remerciement spécial également à ma conjointe Isabelle, pour des conseils techniques, mais dont le reste des mérites ne se compte pas en quelques lignes de texte.

Je remercie aussi le CRSNG et le Fonds FCAR pour le soutien financier pendant une partie de mes études.

Et, finalement, ma famille pour support, compréhension et encouragements durant toutes mes études.

BIBLIOGRAPHIE

AHN, J.H., C.J. CHIOU et G.S. HAYWARD. 1998. Evaluation and mapping of the DNA binding and oligomerization domains of the IE2 regulatory protein of human cytomegalovirus using yeast one and two hybrid interaction assays. *Gene*, **210**: 25-36.

AKEL, H.M.O. et C. SWEET. 1993. Isolation and preliminary characterization of twenty-five temperature-sensitive mutants of mouse cytomegalovirus. *FEMS Microbiol. Lett.*, **113**: 253-260.

ANFINSEN, C.B. 1973. Principles that govern the folding of proteins chains. *Science*, **181**: 223.

BARACCHINI, E., E. GLEZER, K. FISH, R.M. STENBERG, J.A. NELSON et P. GHAZAL. 1992. An isoform variant of the cytomegalovirus immediate-early auto-repressor functions as a transcriptional activator. *Virology*, **188**: 518-529.

BASKAR, J.F., P. SMITH, G. CIMENT, S. HOFFMANN, C. TUCKER, D.J. TENNEY, A. COLBERG-POLEY, J.A. NELSON et P. GHAZAL. 1996. Developmental analysis of the cytomegalovirus enhancer in transgenic animals. *J. Virol.*, **70**: 3215-3226.

BEHM, M., H. LOWMAN, S.C. NG et M. BINA. 1988. Analysis of temperature-sensitive mutations in the simian virus 40 gene encoding virion protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**: 9421-9425.

BIRON, K., J.A. FYFE, S. STANAT, L. LESLIE, J. SORREL, C. LAMBE et D. COHEN. 1986. A human cytomegalovirus mutant resistant to the

nucleoside analog 9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl] guanine (BW B759U) induces reduced level of BW759U triphosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **83**: 8769-8873.

BORYSIEWICZ, L.K., B. RODGERS, S. MORRIS, S. GRAHAM et J.G.

SISSONS. 1985. Lysis of human cytomegalovirus infected fibroblasts by natural killer cells: demonstration of an interferon-independent component requiring expression of early viral proteins and characterization of effectors cells. J. Immunol., **134**: 2695-2701.

BRANDEN, C. et J. TOOZE. 1991. Introduction to proteins structure. pp. 8-9 et pp. 210-211. Garland Publishing Inc., New York, London.

BRAUN, D.K., W. BATTERSON et B. ROIZMAN. 1984. Identification and genetic mapping of a herpes simplex virus capsid protein that binds DNA. J. Virol., **50**: 645-648.

BREITBART, R.E., H.T. NGUYEN, R.M. MEDFORD, A.T. DESTREE, V.

MAHDAVI et B. NADAL-GINARD. 1985. Intricate combinatorial patterns of exon splicing generate multiple regulated troponin T isoforms from a single gene. Cell, **41**: 67-82.

BRESNAHAN, W.A., T. ALBRECHT et E.A. THOMSON. 1998. The cyclin E promoter is activated by human cytomegalovirus 86-kDa immediate early protein. J. Biol. Chem., **273**: 22075-22082.

BRITT W.J. et D. AUGER. 1986. Human cytomegalovirus virion-associated protein with kinase activity. J. Virol., **59**:185-188.

- BRUZIK, J.P. et T. MANIATIS. 1995. Enhancer dependant interaction between 5' and 3' splice sites in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**:7056-7059.
- CHEE, M.S., A. BANKIER, S. BECK, R. BOHNI, C. BROWN, R. CERNY, T. HORSNELL, C. HUTCHISON, T. KOUZARIDES, J. MARTIGNETTI, E. PREDDIE, S. SATCHWELL, P. THOMLISON, K. WESTON et B. BARREL. 1990. Analysis of the protein-coding contents of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**: 126-170.
- CHERRINGTON, J.M., E.L. KHOURY et E.S. MOCARSKI. 1991. Human cytomegalovirus IE2 negatively regulate α gene expression via a short target sequence near the transcription start site. *J. Virol.*, **65**: 887-896.
- CHIARA, M.D. et R. REED. 1995. A two-step mechanism for 5' and 3' splice-site pairing. *Nature*, **375**: 510-513.
- COLBERG-POLEY, A.M., L.D. SANTOMENNA, P.P. HARLOW, P.A. BENFIELD et D.J. TENNEY. 1992. Human cytomegalovirus US3 and UL36-38 immediate-early proteins regulate gene expression. *J. Virol.*, **66**: 95-105.
- DALE, J.W. et P.J. GREENAWAY. 1984. Bacterial transformation (Kushner method). Dans: *Methods in Molecular Biology, Vol.2, Nucleic Acids*. pp. 241-244. Walker, J. M., éditeur, Humana Press, Clifton, NJ, USA.

- DION, M. et C. HAMELIN. 1987. Isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of human cytomegalovirus. *Virology*, **158**: 228-230.
- DION, M. et C. HAMELIN. 1990. Cartographie physique de l'ADN du cytomegalovirus humain souche AD169. *Can. J. Microbiol.*, **36**: 341-347.
- DION, M., J. YELLE et C. HAMELIN. 1990. Physical mapping of a temperature-sensitive mutation of human cytomegalovirus by marker rescue. *Genet. Anal. Techn. Appl.*, **7**: 32-34.
- DIRKS, R.W., E.S.D. de PAUW et A.K. RAAP. 1997. Splicing factors associate with nuclear HCMV-IE transcripts after transcriptional activation of the gene, but dissociate upon transcription inhibition: evidence for a dynamic organization of splicing factors. *J. Cell Sci.*, **110**: 515-522.
- DÖCKE, W.D., S. PRÖSCH, E. FIETZE, V. KIMEL, H. ZUCKERMANN, C. KLUG, U. SYRBE, D.H. KRÜGER, R. VON BAEHR et H.D. VOLK. 1994. Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor. *Lancet*, **343**: 268-269.
- DUHL, D.M., D.D. GILLESPIE et F. SULSER. 1992. Ethidium bromide fluorescence of 28S ribosomal RNA can be used to normalize samples in Northern or dot blots when analyzing small drug-induced changes in specific mRNA. *J. Neurosci. Methods*, **42**: 211-218.
- FIERS, W., R. CONTRERAS, G. HAEGEMANN, R. ROGIERS, A. VAN DE VOORDES, H. VAN HEUVERSSWYN, J. VAN HERREWEGHE, G. VOLCKAERT

- et M. YSEBAERT. 1978. Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature*, **273**(5658):113-120.
- FISH, K. N., A.S. DEPTO, A.V. MOSES, W. BRITT et J.A. NELSON. 1995. Growth kinetics of human cytomegalovirus are altered in monocyte-derived macrophages. *J. Virol.*, **69**: 3737-3743.
- GRAVELY, B.R. et T. MANIATIS. 1998. Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing. *Mol. Cell.*, **1**: 765-771.
- GREAVES, F.R. et E. S. MOCARSKI. 1998. Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus *ie1* mutant. *J. Virol.*, **72**: 366-379.
- HAMELIN, C. et B. D'AMOURS. 1994. Molecular basis for the reactivation of animal and human herpesviruses from latency. *Curr. Top. Vet. Res.*, **1**: 27-36.
- HAMELIN, C. et M. DION. 1990. Modification of specific regions of the human cytomegalovirus genome during in vitro passage. *Can. J. Infect. Dis.*, **1**: 48-50.
- HAMELIN, C., J. YELLE et M. DION. 1988. Detection of recombination events in human cells using cloned cytomegalovirus DNA fragments as probes. *Gene Anal. Techn.*, **5**: 83-86.
- HAYWARD, G.S. 1993. Immediate-early gene regulation in herpes simplex virus. *Sem. Virol.*, **4**: 15-23.

HERBOMEL, P. 1993. L'expression du génome, du noyau à l'organisme. pp. 283-307. Editions ESTEM, Paris.

HERMISTON, T.W., C.L. MALONE et M.F. STINSKI. 1990. Human cytomegalovirus immediate-early two protein region involved in negative regulation of the major immediate-early promoter. *J. Virol.*, **64**: 3532-3536.

HERTEL, K.J. et T. MANIATIS. 1998. The function of multisite splicing enhancers. *Mol. Cell.*, **1**: 449-455.

HERTEL, K.J. et T. MANIATIS. 1999. Serine-arginine (SR)-rich splicing factors have an exon-independent function in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**: 2651-2655.

HO, M. 1982. Pathology of cytomegalovirus infection. Dans: *Cytomegalovirus, Biology and Infection: Current Topics in Infectious Disease*. pp. 119-129. Greenough, W.B. et T.C. Merigan, éditeurs, Plenum Press, New York.

HUANG T.H., T. OKA, T. ASAI, T. OKADA, B.W. MERRILS, P.N. GERTSON, R.H. WHITSON et K. ITAKURA. 1996. Repression by a differentiation-specific factor of the human cytomegalovirus enhancer. *Nucl. Acids Res.*, **24**: 1695-1701.

IHARA, S., K. HIRAI et Y. WATANABE. 1978. Temperature sensitive mutants of human cytomegalovirus: Isolation and partial characterization of DNA-minus mutants. *Virology*, **84**: 218-221.

- IHARA, S., M. TAKEKOSHI, N. MORI, S. SAKUMA, J. HASHIMOTO et Y. WATANABE. 1994. Identification of mutation sites of a temperature-sensitive mutant of HCMV DNA polymerase activity. *Arch. Virol.*, **137**: 263-275.
- INOUE, K., M. OHNO et Y. SHIMURA. 1995. Aspects of splice site selection in constitutive and alternative pre-mRNA splicing. *Gene Expr.*, **4**: 177-182.
- KARI, B. and R. GEHRZ. 1992. A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J. Virol.*, **66**: 1761-1764.
- KERRY, J.A., A. SEHGAL, S.W. BARLOW, V.J. CAVANAUGH, K. FISH, J.A. NELSON et R.M. STENBERG. 1995. Isolation and characterization of a low-abundance splice variant from the human cytomegalovirus major immediate-early gene region. *J. Virol.*, **69**: 3868-3872.
- KLAGUES, S., B. RUGER et G. JAHN. 1989. Multiplicity dependant expression of the predominant phosphoprotein pp65 of human cytomegalovirus. *Virus Res.*, **12**: 159-168.
- KLINE J.N., G.M. HUNNINGHAKE, B. HE, M.M. MONICK et G.W. HUNNINGHAKE. 1998. Synergistic activation of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter by prostaglandin E2 and cytokines. *Exp. Lung Res.*, **24**: 3-14.
- KNIGHT, J.B., M.F. STINSKI et C.M. STOLTZFUS. 1993. Avian sarcoma virus RNA synthesis, RNA splicing and virus production in human

foreskin fibroblasts: Effect of co-infection with human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.*, **74**: 2629-2636.

KOEDOOD, M., A. FICHTEL, P. MEIER et P. MITCHELL. 1995. Human cytomegalovirus (HCMV) immediate-early enhancer/promoter specificity during embryogenesis defines target tissues of congenital HCMV infection. *J. Virol.*, **69**: 2194-2207.

KONDO, K. et E.S. MOCARSKI. 1995. Cytomegalovirus latency and latency-specific transcription in hematopoietic progenitors. *Scand. J. Infect. Dis. Supp.*, **99**: 63-67.

KOSZINOWSKI, U.H., M. DELVAL et M.J. REDDEHASE. 1990. Cellular and molecular basis of the protective immune response to cytomegalovirus infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**: 189-220.

KUMURA, K., K. IBUSUKI et Y. MINAMISHIMA. 1990. Independent existence of mutation responsible for temperature sensitivity and attenuation in a mutant of murine cytomegalovirus. *Virology*, **175**: 572-574.

LATCHMAN, D.S. 1990. Cell-type-specific splicing factors and the regulation of alternative RNA splicing. *New Biol.*, **2**: 297-303.

LE GARS, L., F. AGBALIKA, O. PICARD, G. KAPLAN et F. BERENBAUM. 1998. HHV-8 status in Kaposi's sarcoma associated with multiple myeloma. *Rev. Rhum. Engl. Ed.*, **65**: 788-790.

LEVY, J.A. 1997. Three new human herpesviruses (HHV6, 7, and 8). *Lancet*, **349**: 558-562.

LIU, B. et M.F. STINSKI. 1992. Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 *cis*-acting elements. *J. Virol.*, **66**: 4434-4444.

LIU, B., T.W. HERMISTON et M.F. STINSKI. 1991. A *cis*-acting element in the major immediate-early (IE) promoter of human cytomegalovirus is required for negative regulation by IE2. *J. Virol.*, **65**: 897-903.

LIU, R., J. BAILLIE, J.G.P. SISSONS et J.H. SINCLAIR. 1994. The transcription factor YY1 binds to negative regulatory elements in the human cytomegalovirus major immediate-early enhancer/promoter and mediates repression in non-permissive cells. *Nucl. Acids Res.*, **22**: 2453-2459.

LUBON, H., P. GHAZAL, L. HENNIGHAUSEN, C. REYNOLDS-KOHLER, C. LOCKSHIN et J. NELSON. 1989. Cell-specific activity of the modulator region in the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Molec. Cell. Biol.*, **9**: 1342-1345.

MANIATIS, T. 1991. Mechanisms of alternative pre-mRNA splicing. *Science*, **251**: 33-34.

MASTERS, D.B., C.T. GRIGGS et C.B. BERDE. 1992. High sensitivity quantification of RNA from gels and autoradiograms with affordable optical scanning. *Biotechniques*, **12**: 902-911.

MEIER, J.L. et M.F. STINSKI. 1997. Effects of a modulator deletion on transcription of a human cytomegalovirus major immediate-early gene in infected undifferentiated and differentiated cells. *J. Virol.*, **71**: 1246-1255.

MEMAR, O.M., P.L. RADY et S.K. TYRING. 1995. Human herpesvirus-8: detection of novel herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma and other lesions. *J. Mol. Med.*, **73**: 603-603.

MICHELSON, S., P.M. TARDY et O. BARZU. 1984. Properties of a human cytomegalovirus-induced protein kinase. *Virology*, **134**: 259-268.

MOCARSKI, E.S. 1993. Cytomegalovirus biology and replication. Dans: *The Human Herpesvirus*. pp. 173-210. Roizman, B. , R.J. Whitley et C. Lopez, éditeurs, Raven Press Ltd., New York.

MOCARSKI, E.S., G.W. KEMBLE, J.M. LYLE et R.F. GREAVES. 1996. A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1491aa is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 11321-11326.

MONTELL, C., E.F. FISHER, M.H. CARUTHERS et A.J. BERK. 1984. Control of adenovirus E1B mRNA synthesis by a shift in the activities of RNA splice sites. *Mol. Cell. Biol.*, **4**: 966-972.

NATHANS, D. 1979. Restriction endonucleases, simian virus 40, and the new genetics. *Science*, **206**: 903-909.

NAVARRO, D., P. PAZ, S. TUGIZOV, K. TOPP, J. LAVAIL et L. PREIRA. 1993. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes

penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology*, **197**: 143-158.

NELSON, J.A., C. REYNOLDS-KOHLER et B.A. SMITH. 1987. Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Molec. Cell. Biol.*, **7**: 4125-4129.

NELSON, J.A., K. FISH, C. IBANEZ, A. DEPTO, P. GHAZAL, A. MOSES et R. JUPP. 1993. Dependence of cytomegalovirus replication on monocyte differentiation. Dans: *Multidisciplinary Approach to Understanding Cytomegalovirus Disease*, Proceedings of the fourth international cytomegalovirus workshop. pp. 77-86. Michelson, S. et S.A. Plotkin, éditeurs, Excerpta medica, Amsterdam.

NELSON, J.A., J.W. GNANN Jr. et P. GHAZAL. 1990. Regulation and tissue-specific expression of human cytomegalovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**: 75-100.

NELSON, K.K. et M.R. GREEN. 1990. Mechanism for cryptic splice site activation during pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 6253-6257.

OFFERMANN, M.K. 1996. HHV-8: a new herpesvirus associated with Kaposi's sarcoma. *Trends Microbiol.* **4**: 383-386.

PHELAN, A., M. CARMO-FONSECA, J. McLAUHLAN, A.I. LAMOND et J.B. CLEMENTS. 1993. A herpes simplex virus type 1 immediate-early gene product, IE63, regulates small nuclear ribonucleoprotein distribution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **90**: 9056-9060.

- POMA, E.E., T.F. KOWALIK, L. ZHU, J.H. SINCLAIR et E.S. HUANG. 1996. The human cytomegalovirus IE1-72 protein interacts with the cellular p107 protein and relieves p107-mediated transcriptional repression of an E2F-responsive promoter. *J. Virol.*, **70**: 7867-7877.
- PRÖSCH, S., K. STAAK, J. STEIN, C. LIEBENTHAL, T. STAMMINGER, H. VOLK et D. KRÜGER. 1995. Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNF- α is mediated via induction of NF- κ -B. *Virology*, **208**: 197-206.
- RAPP, F. 1984. Cytomegalovirus and carcinogenesis. *J. Natl. Canc. Inst.*, **72**: 783-787.
- RAPP, F. et D. ROBBINS. 1984. Cytomegalovirus and human cancer. Dans: *CMV: Pathogenesis and Prevention of Human Infection*. pp175-192. Plotkin, S.S., S. Michelson, J.S. Pagano et F. Rapp, éditeurs, A.R. Liss Inc., New York.
- RASMUSSEN, L. 1990. Immune response to cytomegalovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**: 221-254.
- RASMUSSEN, L., S. RESTA et T. MERIGAN. 1991. Human cytomegalovirus glycoprotein-receptor interactions. *Transplant. Proc.*, **23**(Suppl. 3): 60-63.
- RAWLINSON, W.D et B.G. BARREL. 1993. Spliced transcripts of human cytomegalovirus. *J. Virol.*, **67**: 5502-5513.

REDDY, V.B., B. THIMMAPAYA, R. DHAR, K.N. SUBRAMANIAN, B.S. ZAIN, J. PAN, P.K. GHOSH, M.L. CELMA et S.M. WEISSMAN. 1978. The genome of simian virus 40. *Science*, **200**(4341): 494-502.

RIO, D.C. 1993. Splicing of pre-mRNA: mechanism, regulation and role in development. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **3**: 574-584.

ROBY, C. et W. GIBSON. 1986. Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particules, and dense bodies of human cytomegalovirus. *J. Virol.*, **59**: 714-727.

RODEMS, S.M., C.L. CLARK et D.H. SPECTOR. 1998. Separate DNA elements containing ATF/CREB and IE86 binding sites differentially regulate the human cytomegalovirus UL112-113 promoter at early and late times in the infection. *J. Virol.*, **72**: 2697-2707.

ROOK, A.H. 1988. Interactions of cytomegalovirus with the human immune system. *Rev. Infect. Dis.*, **10**(Suppl. 3): 460-467.

RUDOLPH, S.A., J.E. KHUN, K. KORN, R.W. BRAUN et G. JAHN. 1990. Prokaryotic expression of the major capsid protein of human cytomegalovirus and antigenic cross-reactions with herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.*, **71**: 2023-2031.

SALVANT, B.S., E.A. FORTUNATO et D.H. SPECTOR. 1998. Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. *J. Virol.*, **72**: 3729-3741.

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Edition. pp. 5.28-5.32. Nolan, C. et M. Ferguson, éditeurs, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

SAMMONS, C.C. et C. SWEET. 1989. Isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of mouse cytomegalovirus of differing virulence for 1-week-old mice. *J. Gen. Virol.*, **70**: 2373-2381.

SCHAAL, T.D. et T. MANIATIS. 1999. Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. *Mol. Cell Biol.*, **19**: 1705-1719.

SINCLAIR, J.H., J. BAILLIE, L.A. BRYANT, J.A. TAYLOR-WIEDEMAN et J.G.P. SISSONS. 1992. Repression of human cytomegalovirus major immediate-early gene expression in a monocytic cell line. *J. Gen. Virol.*, **73**: 433-435.

SODERBERG, C., T.D. GIUGNI, J.A. ZAIA, S. LARSSON, J.M. WAHLBERG et E. MOLLER. 1993. CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J. Virol.*, **67**: 6576-6585.

SPAETE, R.R. et E.S. MOCARSKI. 1985. The α sequence of the cytomegalovirus genome function as a cleavage/packaging signal for herpes simplex virus defective genomes. *J. Virol.*, **54**: 817-824.

STAMMINGER, T. et B. FLECKENSTEIN. 1990. Immediate-early transcription regulation of human cytomegalovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **154**: 3-19.

STASIAK, P.C. et M.F. STINSKI. 1992. *Trans*-activation of the cytomegalovirus ICP36 gene promoter requires the alpha gene product TRS1 in addition of IE1 and IE2. *J. Virol.*, **66**: 1050-1058.

STEIN, J., H. VOLK, C. LIEBENTHAL, D.H. KRÜGER et S. PRÖSCH. 1993. Tumor necrosis factor α stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate-early enhancer/promoter in immature monocytic cells. *J. Virol.*, **74**: 2333-2338.

STENBERG, R.M. et M.F. STINSKI. 1985. Autoregulation of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *J. Virol.*, **56**: 676-682.

STENBERG, R.M., P.R. WITTE et M.F. STINSKI. 1985. Multiple spliced and unspliced transcripts from human cytomegalovirus immediate-early region 2 and evidence for a common initiation site within immediate-early region 1. *J. Virol.*, **56**: 665-675.

STINSKI, M.F. 1977. Synthesis of proteins and glycoproteins in cells infected with human cytomegalovirus. *J. Virol.*, **23**: 751-767.

STINSKI, M.F., M.P. MACIAS, C.L. MALONE, A.R. THROWER et L. HUANG. 1993. Regulation of transcription from the cytomegalovirus major immediate early promoter by cellular and viral proteins. Dans: *Multidisciplinary Approach to Understanding Cytomegalovirus Disease*, Proceedings of the fourth international cytomegalovirus workshop. pp. 3-12. Michelson, S. et S.A. Plotkin, éditeurs, Excerpta medica, Amsterdam.

STINSKI, M.F., D.R. THOMSEN, R.M. STENBERG et L.C. GOLDSTEIN. 1983. Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J. Virol.*, **46**: 1-14.

SULLIVAN, V., K. BIRON, C. TALARICO, S. STANAT, M. DAVIS, L. POZZI et D.M. COEN. 1993. A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene confers resistance to Ganciclovir and phosphonylmethoxyalkyl derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**: 19-25.

SUN, R., S.F. LIN, L. GRADOVILLE, Y. YUAN, F. ZHU et G. MILLER. 1998. A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**: 10866-10871.

SUNDSTRÖM, C. et K. NILSSON. 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U937). *Int. J. Canc.*, **17**: 565-577.

TAYLOR-WIEDEMAN, J.A., J.G.P. SISSONS, L.K. BORYSIEWICZ et J.H. SINCLAIR. 1991. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.*, **72**: 2059-2064.

TRAKTMAN, P., M. KELVIN et S. PACHECO. 1989. Molecular genetic analysis of vaccinia virus DNA polymerase mutants. *J. Virol.*, **63**: 841-846.

TSUCHIYA, S., M. YAMABE, Y. YAMAGUCHI, Y. KOBAYASHI, T. KONNO et K. TADA. 1980. Establishment and characterization of a human

acute monocytic leukemia cell line (THP1). *Int. J. Canc.*, **26**: 171-176.

WAHEED, I., C.J. CHIOU, J.H. AHN et G.S. HAYWARD. 1998. Binding of the human cytomegalovirus 80-kDa immediate-early protein (IE2) to minor groove A/T-rich sequences bounded by CG dinucleotides is regulated by protein oligomerization and phosphorylation. *Virology*, **252**: 235-257.

WATAKABE, A., K. TANAKA et Y. SHIMURA. 1993. The role of exon sequence in splice site selection. *Genes Dev.*, **7**: 407-418.

WILKINSON, G.W., C. KELLY, J.H. SINCLAIR et C. RICKARDS. 1998. Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product. *J. Gen. Virol.*, **79**: 1233-1245.

YAMANISHI, K. et F. RAPP. 1977. Temperature sensitive mutants of human cytomegalovirus. *J. Virol.*, **24**: 416-418.

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

YUROCHKO, A.D., M.W. MAYO, E.E. POMA, A.S. BALDWIN JR et E. HUANG. 1997. Induction of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediate upregulation of the p105/p50 and p65 NF- κ -B promoters. *J. Virol.*, **71**: 4638-4648.

YUROCHKO, A.D., T.F. KOWALIK, S. HUONG et E. HUANG. 1995. Human cytomegalovirus upregulates NF- κ -B activity by transactivating the NF- κ -B p105/p50 and p65 promoters. *J. Virol.*, **69**: 5391-5400.

TABLEAUX ET FIGURES

Tableau I

**Réplication de la souche sauvage et des
mutants HCMV à température permissive (33,5°C)
et non-permissive (39,5°C).
(<1: inférieur à 1 plaque/ml)**

Titres (UFP/ml)	33,5°C	39,5°C	Ratio 39,5°/33,5°
WT	$2,3 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$	2,0
<i>ts446</i>	$3,7 \times 10^6$	<1	$2,7 \times 10^{-7}$
<i>ts486</i>	$1,8 \times 10^6$	<1	$5,6 \times 10^{-7}$
<i>ts504</i>	$2,0 \times 10^6$	<1	$5,0 \times 10^{-7}$

Tableau II

**Réplication de la souche sauvage et des mutants en présence ou absence d'acide phosphonoacétique (APA).
Les titres sont donnés en UFP/ml.
(<1: inférieur à 1 plage/ml)**

Souche	Température 33,5°C		39,5°C	
	Avec APA	Sans APA	Avec APA	Sans APA
WT	<1	4,07 x 10 ⁶	<1	2,26 x 10 ⁶
<i>ts446</i>	<1	1,45 x 10 ⁶	<1	<1
<i>ts486</i>	<1	1,77 x 10 ⁶	<1	<1
<i>ts504</i>	<1	3,45 x 10 ⁶	<1	<1

Tableau III

Plages obtenues par sauvetage de marqueurs en utilisant des cosmides superposés représentant le génome entier du HCMV souche sauvage AD169
Exprimé en plages/ μ g d'ADN
(<1: inférieur à 1 plage/ μ g d'ADN)

Souche ADN	<i>ts446</i>	<i>ts486</i>	<i>ts504</i>
Aucun	<1	<1	<1
pLCU 22	$3,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	$1,6 \times 10^3$
pLCU 100	<1	<1	<1
pLCU 101	<1	<1	<1
pLCU 114	<1	<1	<1
pLCU 162	<1	<1	<1
pLCU 204	<1	<1	<1
pLCU 247	<1	<1	<1
pLCU 320	<1	<1	<1
pLCU 322	<1	<1	<1
pLCU 558	$5,2 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$	$2,8 \times 10^3$
pLCC 1534	$8,8 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$5,3 \times 10^2$

Tableau IV

**Plages obtenues par sauvetage de marqueurs en utilisant des sous-fragments du plasmide pLCC1534 (fragment génomique *Hind* III-E)
Exprimé en plages/ μ g d'ADN
(<1: inférieur à 1 plage/ μ g d'ADN)**

Souche ADN	<i>ts446</i>	<i>ts486</i>	<i>ts504</i>
Aucun	<1	<1	<1
pLCY 102	<1	$1,0 \times 10^4$	<1
pLCY 116	$1,0 \times 10^4$	<1	<1
pLCY 107	$7,1 \times 10^3$	$9,4 \times 10^3$	$5,2 \times 10^3$

Tableau V

Amorces utilisées pour le séquençage du gène IE1/2.

Amorce	Séquence	Taille (nt)	%GC	Tm °C
IE11	AAGCCATAATCTCATCAGGG	20	45	57
IE12	GACCCTGATAATCCTGACGAG	21	52	59
IE13	GTCATAAGCACATGGGTAC	20	50	56
IE14	GGCTCTTTGCCACAACCTCTC	20	55	60
IE15	TCCGTGTCAGTCTCTGAAGG	20	55	59
IE16	GGCAGTACATCTACGTATTAG	21	43	49
IE21	TCCTCTTCCCGATCCCTTG	19	58	62
IE22	ACCAACCAGGGTGGGTTTCATG	21	57	66
IE23	ATGAACCCACCCTGGTTGGTG	21	57	66

Figure 1: Architecture de la particule virale du HCMV, montrant les principaux composants.

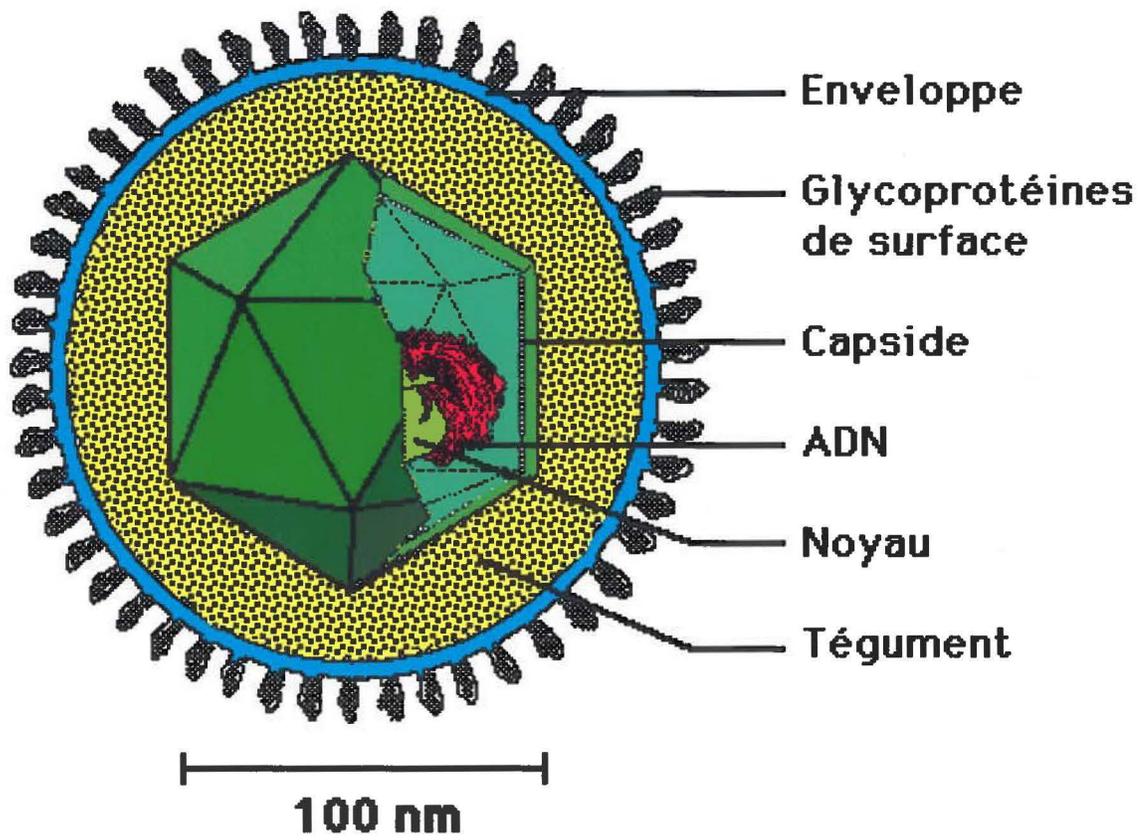


Figure 2: (A) Les 6 classes du génome des herpèsviridés. Symboles: *boîtes blanches*, sections répétitives longues; *boîtes hachurées*, sections répétitives courtes; *traits pleins*, sections uniques. (B) Conformations du génome du cytomégalovirus, de classe E. L'inversion l'un par rapport à l'autre des segments UI et Us du génome du HCMV résulte en un total de quatre conformations équimolaires.

A

Classe Isomères		Structure de l'ADN
A	1	
B	1	
C	1	
D	2	
E	4	
F	1	

B



Figure 3: Cycle de réplication du cytomégalovirus: (1) entrée du virus par attachement aux récepteurs et fusion des membranes; (2) décapsidation de l'ADN viral aux pores nucléaires; (3) transcription et synthèse des protéines précoces-immédiates, aidées de l'activateur viral pp71; (4) transcription et synthèse des protéines précoces; (5) transcription et synthèse des protéines tardives; (6) réplication de l'ADN viral par le modèle du cercle roulant; (7) assemblage des précurseurs de la capsid; (8) encapsidation de l'ADN viral; (9) addition des protéines du tégument; (10) addition de l'enveloppe virale par bourgeonnement à travers la membrane nucléaire avec insertion des glycoprotéines de surface; (11) les particules virales complètes s'accumulent dans le réticulum endoplasmique et sont finalement libérées par lyse cellulaire.

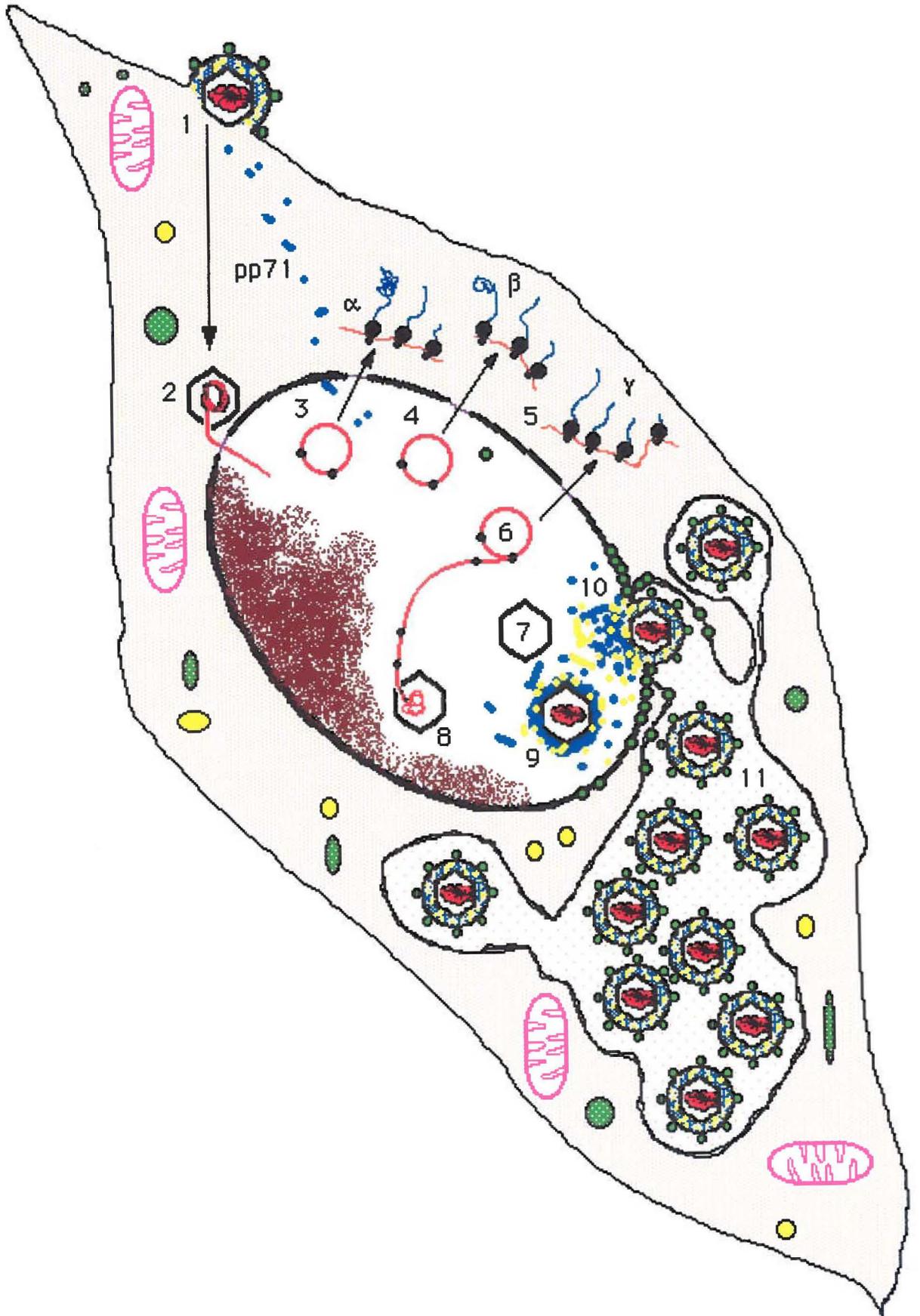
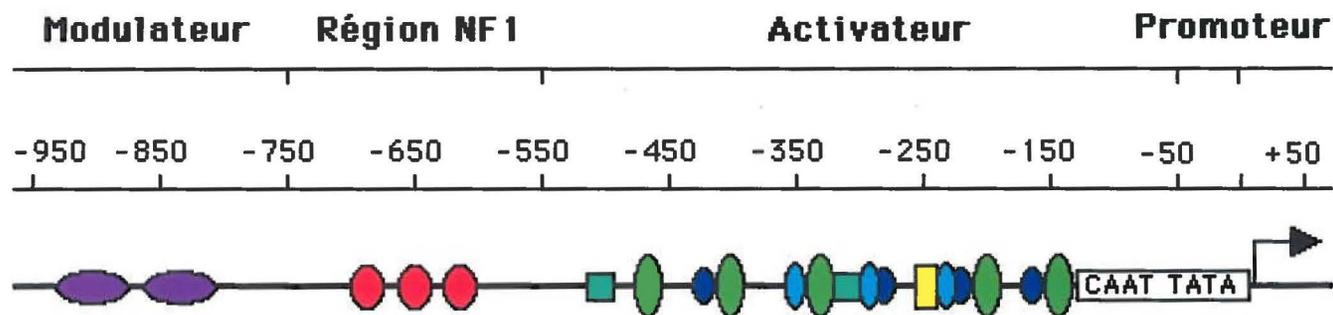


Figure 4: Organisation de la section modulateur/activateur/promoteur (MIEP) du gène IE1/2 et position des éléments répétitifs. Symboles: (MBF1, ATF, AP1, NF1, NF-k-B, SP1) facteurs de transcription; (Séquences) séquences reconnues par les différents facteurs de transcription. La flèche représente le site d'initiation de la transcription.



-  MBF1 (GATTTTTGGGCATACGCGATATCTG)
-  19 bp ATF (TTGACGTCAA)
-  AP1 (TTAGTCA)
-  13 bp NF1 (GGC(N₅)GCCAA)
-  18 bp NF-κ-B (CGGGGACTTTCC)
-  21bp SP1 (GGCGGG)
-  16bp (CTTGGCAGTACATCAA)

Figure 5: Epissage différentiel du gène majeur IE1/2 montrant les quatre principales protéines produites. D'autres isoformes mineures de IE2, variant entre 14 et 30 kDa, peuvent également être produites dans certaines conditions. Symboles: (1-7) numéro des différents exons; (A) séquence de polyadénylation; (LP) promoteur tardif. Les boîtes colorées représentent les sections codantes, les boîtes hachurées représentent les sections non-traduites de l'ARN messager, et les traits obliques, les introns.

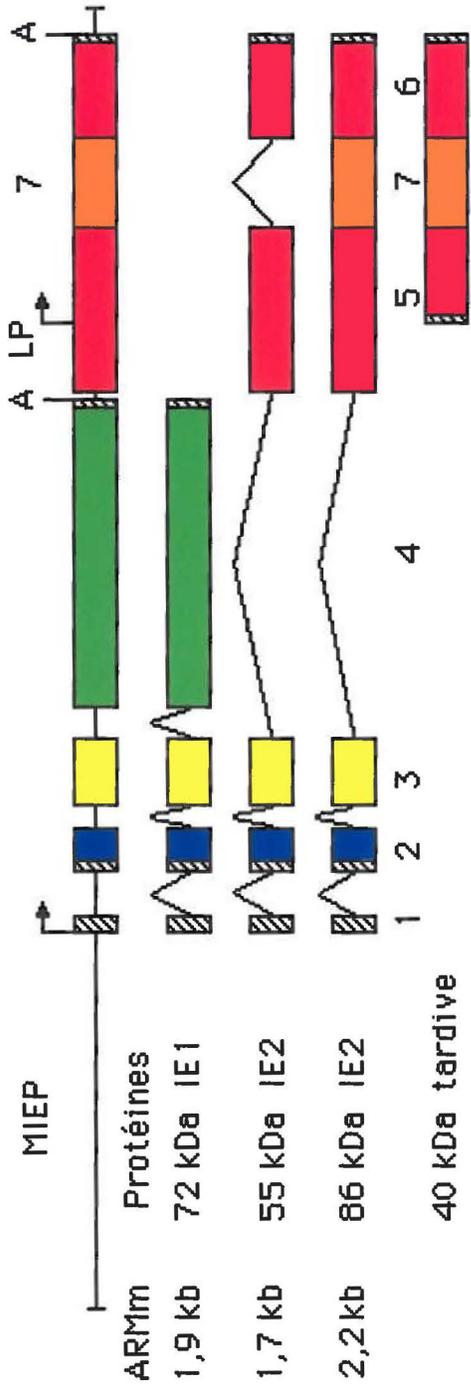


Figure 6: Fonctions des protéines de la phase précoce-immédiates. Les transactivateurs viral (pp71) et cellulaire (NF- κ -B) stimulent la production de la protéine IE1-72K. Celle-ci dirige ensuite la production de IE2-86K, celle de IE2-55K et également sa propre production en stimulant le gène cellulaire de NF- κ -B. IE1-72K et IE2-86K stimulent ensuite l'expression des gènes β (précoces). IE2-86K inhibe également sa propre synthèse et celle de IE1-72K, mais cette inhibition est modulée par IE2-55K.

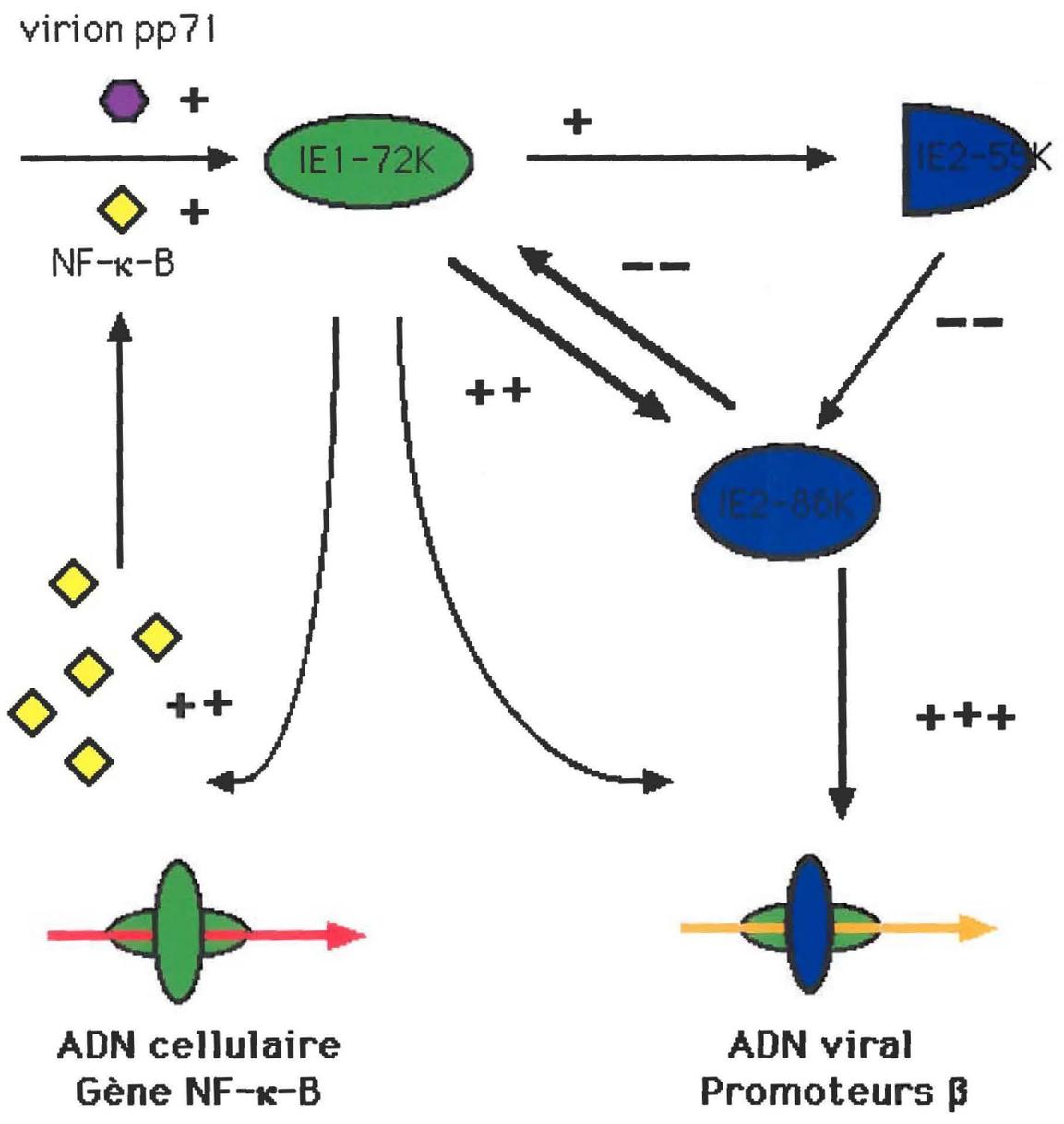


Figure 7: Croissance de la souche ts446 en comparaison avec la souche sauvage AD169, à température permissive et non-permissive, mesurée par incorporation de thymidine tritiée dans le génome viral (6 430 cpm/100%).

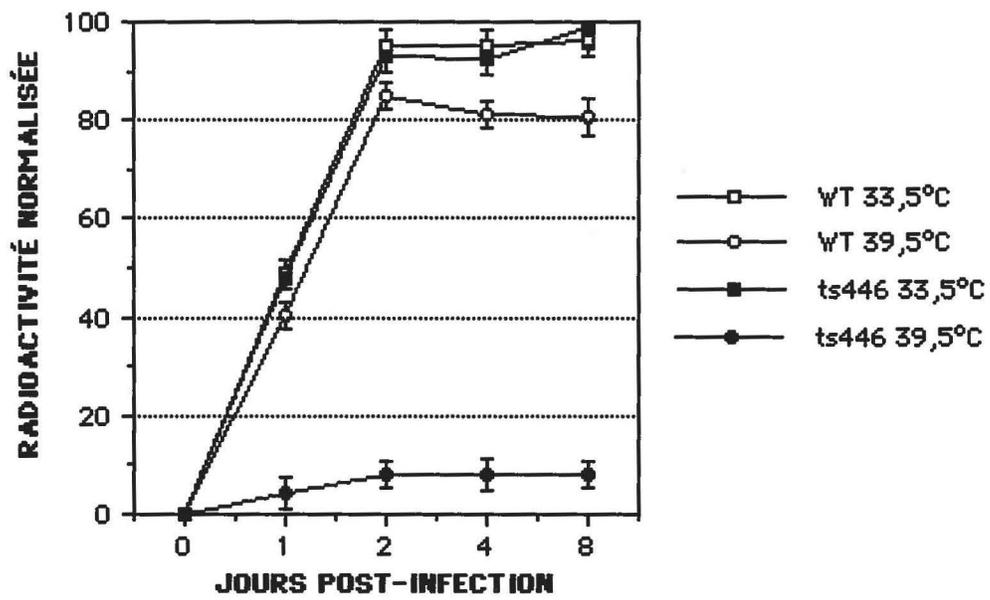


Figure 8: Croissance de la souche ts486 en comparaison avec la souche sauvage AD169, à température permissive et non-permissive, mesurée par incorporation de thymidine tritiée dans le génome viral (6 911 cpm/100%).

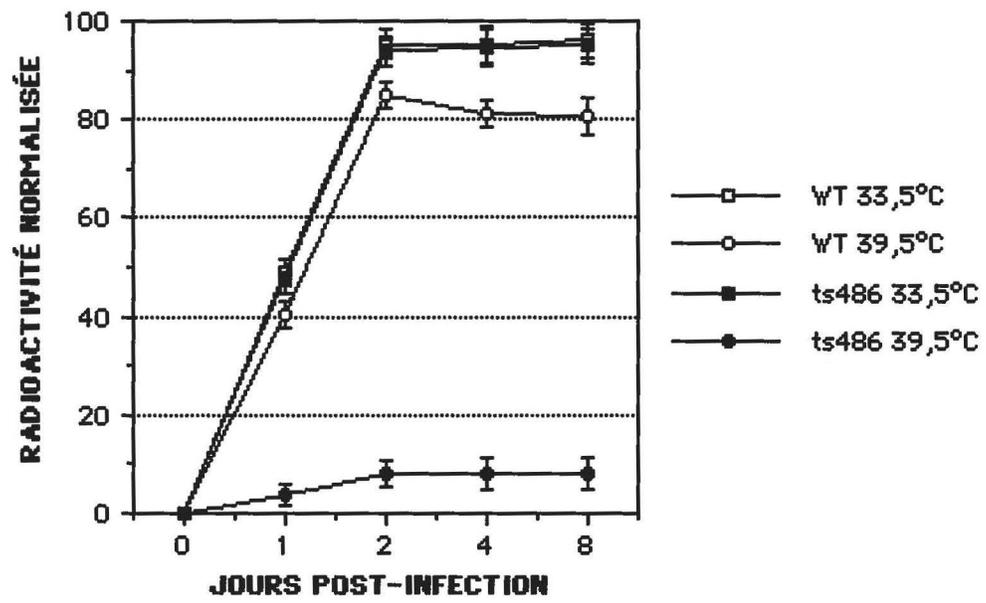


Figure 9: Croissance de la souche ts504 en comparaison avec la souche sauvage AD169, à températures permissive et non-permissive, mesurée par incorporation de thymidine tritiée dans le génome viral (5 375 cpm/100%).

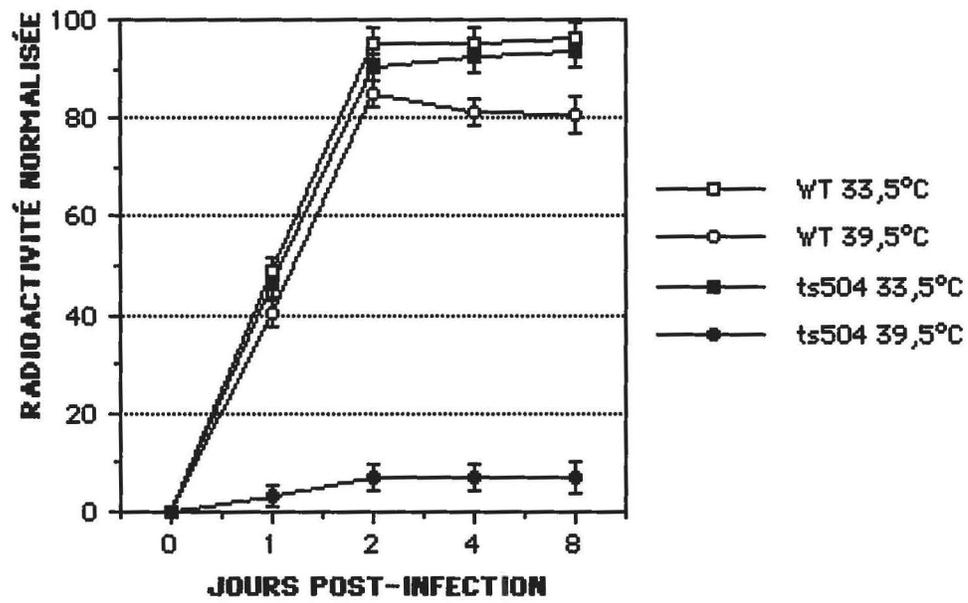


Figure 10: Cinétique d'inhibition des souches mutantes à 39,5°C. Lorsque transférées à températures non-permissive à partir de 4 h PI, les mutants continuent leur cycle répliatif tout comme la souche sauvage, et se montrent capables de répliquer leur ADN. La répliation est mesurée par incorporation de thymidine tritiée dans le génome viral.

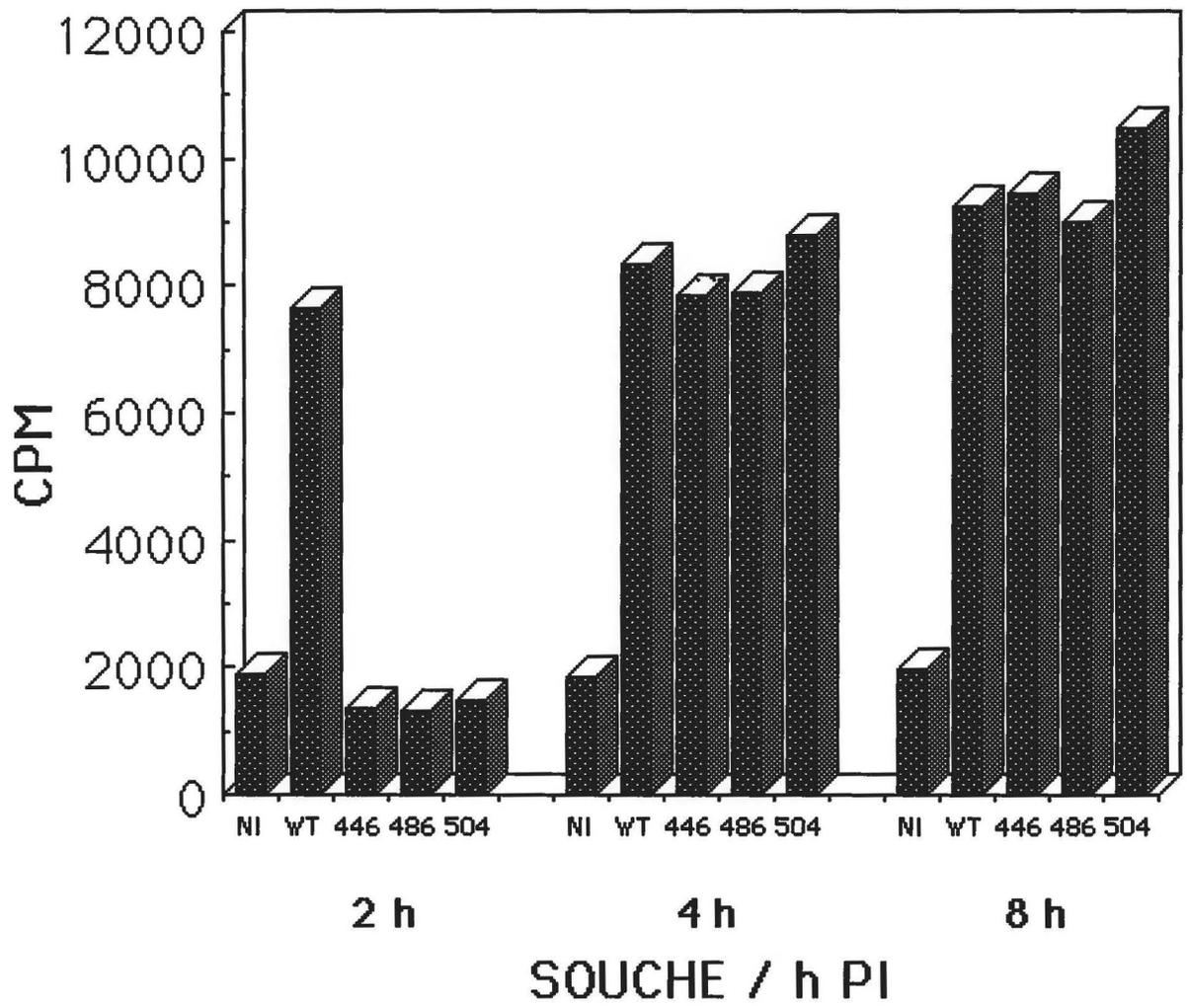
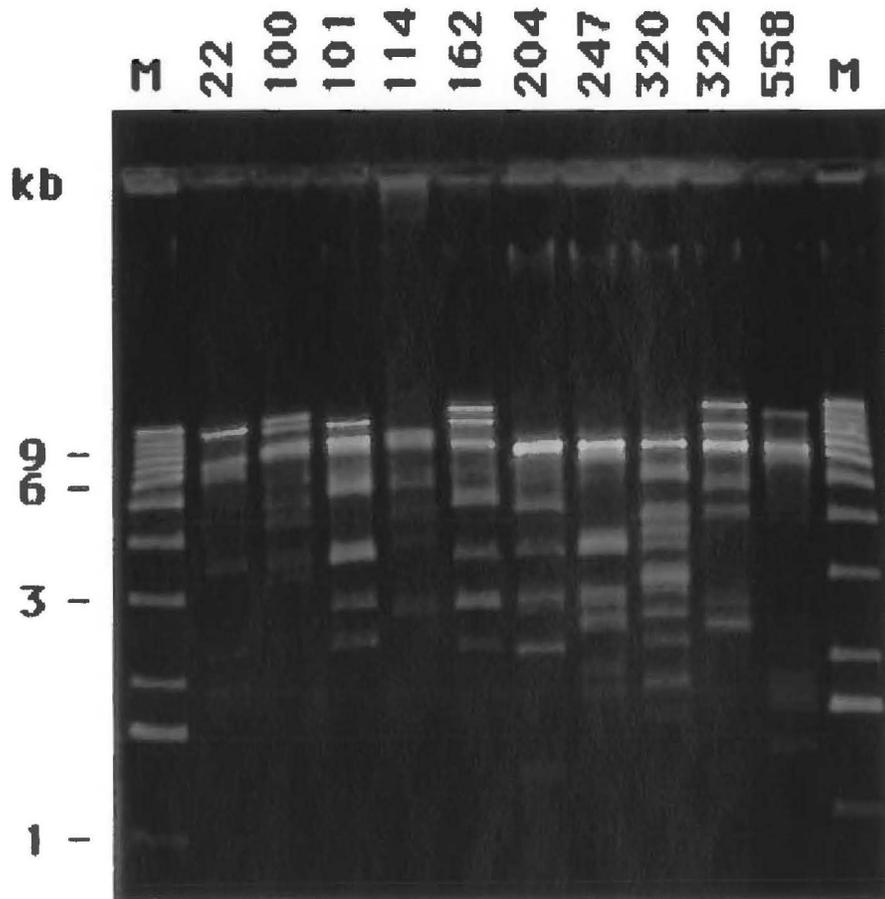


Figure 11: Clonage du génome du HCMV dans des cosmides. (A) Analyse de restriction des 10 clones finaux, digérés par les enzymes *BamH I* et *EcoR I*. (B) Positionnement de ces cosmides sur le génome viral, selon la carte de restriction de l'enzyme *HindIII*. Symbole: (M) marqueurs GIBCO BRL - échelle de 1 kb.

A



B

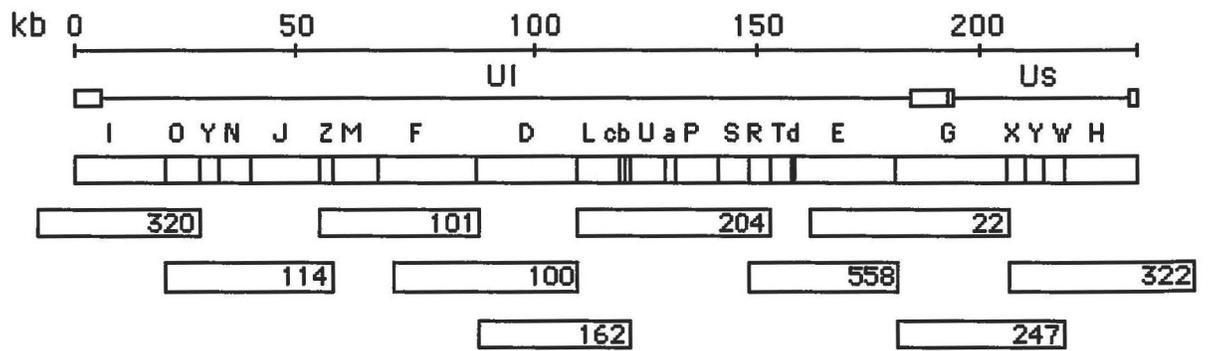


Figure 12: Sous-clonage du plasmide pLCC1534 (fragment *Hind* III-E). Symboles: (102, 107 et 116) plasmides pLCY 102 (fragment 5,2 kb), pLCY 107 (fragments 5,2 + 5,8 kb) et pLCY 116 (fragment 5,8 kb); (B) plasmide pLCC 1534 digéré par *Bam*H I; (BH) plasmide pLCC 1534 digéré par *Bam*H I et *Hind* III, correspondant aux fragments de la Figure 13; (M) marqueurs GIBCO BRL - échelle de 1 kb.

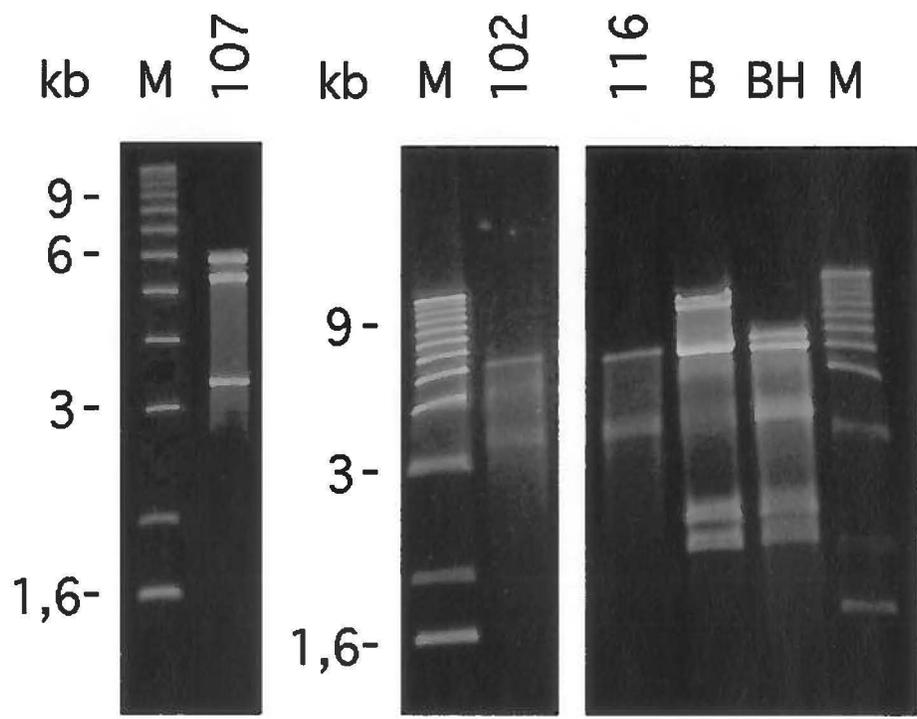
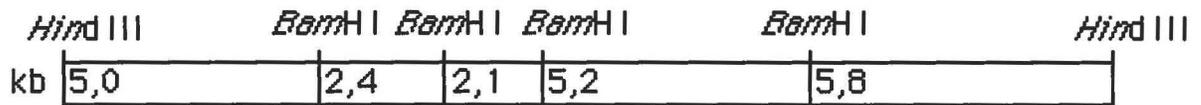


Figure 13: Sauvetage de marqueurs en utilisant les sous-clones du plasmide pLCC1534 (*Hind* III-E). Les plasmides pLCY 102, 107 et 116 contiennent les fragments du gène IE1/2, représentés sous la carte du fragment. Les sections en gris représentent les plasmides capables de sauver les mutations, selon la souche utilisée.

pLCC 1534 *Hind* III-E



Exon 7 4 321 Miep

Proteine IE2 IE1

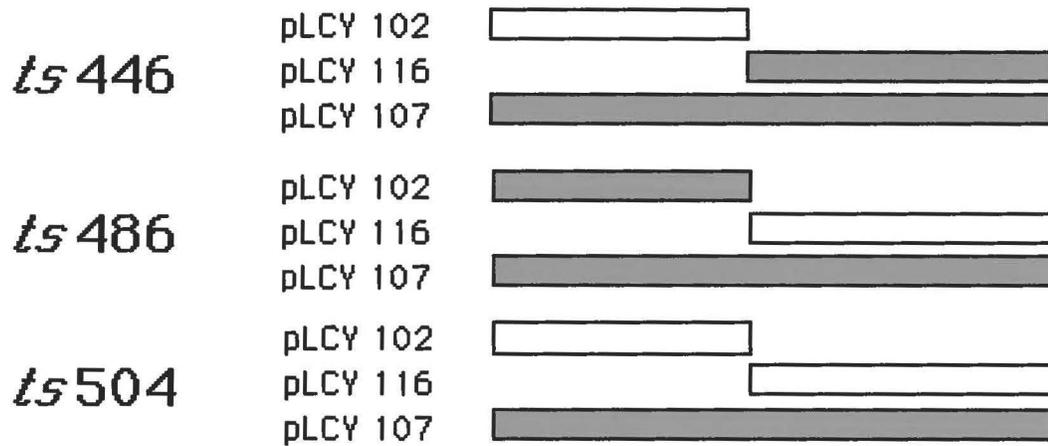
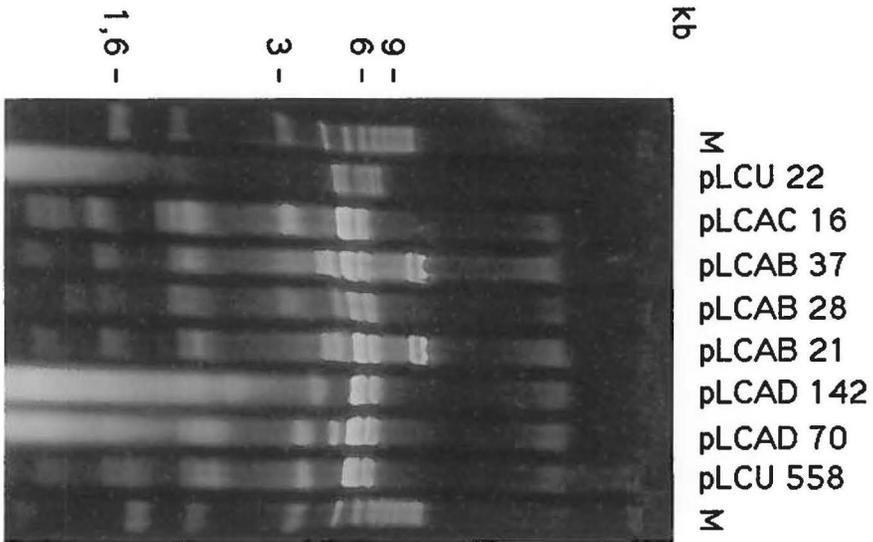


Figure 14: Cosmides dérivés des souches sauvage et mutantes, digérés par les enzymes *BamH* I et *Pst* I. Gels: (A) ADN digéré des cosmides; (B) hybridation du même gel avec le fragment *Hind* III-E, montrant la présence de ce fragment dans les différents cosmides. Symboles: (M) marqueurs GIBCO BRL - échelle de 1 kb; (pLCU) cosmides souche sauvage; (pLCAB) cosmides souche *ts446*; (pLCAC) cosmides souche *ts486*; (pLCAD) cosmides souche *ts504*.

A



B

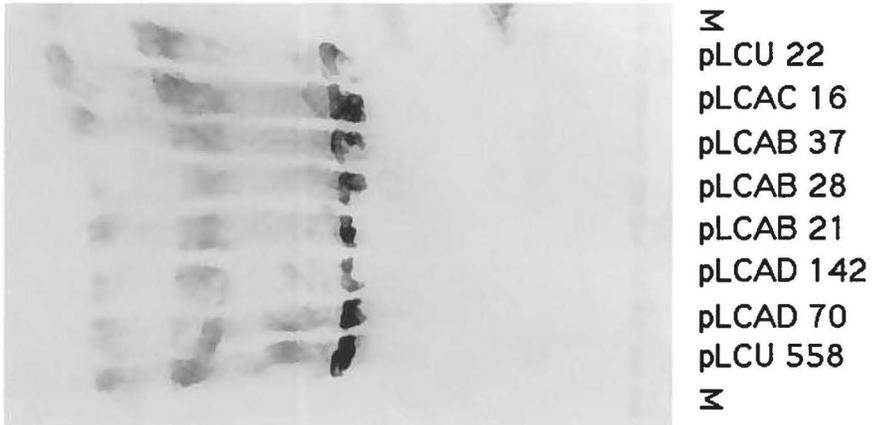


Figure 15: Séquence nucléotidique du gène IE1/2 de la souche AD169, des trois mutants HCMV *ts* et d'un dérivé de la séquence Chee, accompagnée d'un schéma du contenu de la séquence. Cette séquence est donnée dans l'orientation de la conformation prototype du génome.

Gene IE Formatted Alignment

Chee GeneIE	50
WT GeneIE	50
TS446 Gene IE	50
TS486 GeneIE	50
TS504 GeneIE	50
Consensus	CAAGAGATTC	TAAGTCTCCC	TGGGTGGGG	GAGCAGATGT	AAGTCCCGTA	50
Chee GeneIE	100
WT GeneIE	100
TS446 Gene IE	100
TS486 GeneIE	100
TS504 GeneIE	100
Consensus	TGTGCCTCTC	GCCATCAGGG	CCATACACAT	GAGGGGAGA	AGGACAATTA	100
Chee GeneIE	150
WT GeneIE	150
TS446 Gene IE	150
TS486 GeneIE	150
TS504 GeneIE	150
Consensus	TCCGGGACCA	CCCGCACCCC	CACATCACGA	GACCAGAGAC	GGAGATGTAT	150
Chee GeneIET.....	200
WT GeneIEA.....	200
TS446 Gene IEA.....	200
TS486 GeneIEA.....	200
TS504 GeneIEA.....	200
Consensus	AAAAAAGCT	ACTTTWATTA	AACAGCATTC	TCACCACAG	TTAATACTGT	200
Chee GeneIE	250
WT GeneIE	250
TS446 Gene IE	250
TS486 GeneIE	250
TS504 GeneIE	250
Consensus	CACGGGGAAT	CACTATGTAC	AAGAGTCCAT	GTCTCTCTTT	CCAGTTTTTC	250
Chee GeneIE	300
WT GeneIE	300
TS446 Gene IE	300
TS486 GeneIE	300
TS504 GeneIE	300
Consensus	ACTTACTGAG	ACTTGTCCT	CAGTCTCTGG	ATGGCTGCCT	CGATGGCCAG	300
Chee GeneIE	350
WT GeneIE	350
TS446 Gene IE	350
TS486 GeneIE	350
TS504 GeneIE	350
Consensus	GCTCAGGGTG	TCCAGGTCTT	CGGAGGGGT	CTCGGTGGGC	TGCTCAAAC	350
Chee GeneIE	400
WT GeneIE	400
TS446 Gene IE	400
TS486 GeneIE	400
TS504 GeneIE	400
Consensus	GCCCCACGGC	GTAGGCCTTC	GCGGCCGTCT	CGTAGATAGG	CAGCATGAAC	400

Gene IE Formatted Alignment

Chee GeneIE	450
WT GeneIE	450
TS446 Gene IE	450
TS486 GeneIE	450
TS504 GeneIE	450
Consensus	CCACCCTGGT	TGGTGGAGAA	GATGCGCACC	ATGACCTGTT	TGGGAAACTT	450
Chee GeneIE	500
WT GeneIE	500
TS446 Gene IE	500
TS486 GeneIE	500
TS504 GeneIE	500
Consensus	TTGCATCAGG	GGCAGGCACA	GGTTGAGAGC	GCCCAACAGG	TCCACGGGGG	500
Chee GeneIE	550
WT GeneIE	550
TS446 Gene IE	550
TS486 GeneIE	550
TS504 GeneIE	550
Consensus	TGGCAGCGTG	GATGATCATG	TTGCGGTAAT	CGGAGGAACG	GGGGCATAAT	550
Chee GeneIE	600
WT GeneIE	600
TS446 Gene IE	600
TS486 GeneIE	600
TS504 GeneIE	600
Consensus	TGGTGGGTGT	GCAATTCFTT	GAGGCTCCAC	GCGGCCTTGA	CGCCTTCGTT	600
Chee GeneIEC	650
WT GeneIEC	650
TS446 Gene IEC	650
TS486 GeneIET	650
TS504 GeneIET	650
Consensus	ACAAGCATYG	GCTGTGCGCT	GCGCCACTTC	GGGTGGATGT	GTCACGGGCA	650
Chee GeneIE	700
WT GeneIE	700
TS446 Gene IE	700
TS486 GeneIE	700
TS504 GeneIE	700
Consensus	TGGTGTGCTC	CATGAGGAAG	GGAGTGGAGA	GGCCAGGTT	GCACATGGTG	700
Chee GeneIE	750
WT GeneIE	750
TS446 Gene IE	750
TS486 GeneIE	750
TS504 GeneIE	750
Consensus	CCCAGGCGAC	ACCGCACCGC	ATCCACCTCA	CTCTCACCT	CATGATTGCG	750
Chee GeneIE	800
WT GeneIE	800
TS446 Gene IE	800
TS486 GeneIE	800
TS504 GeneIE	800
Consensus	GGTGTAGATA	ATCTGGATGC	CCTTGTGTGT	CACCTGCATG	GTTTTGCAGG	800

Gene IE Formatted Alignment

Chee GeneIE	850
WT GeneIE	850
TS446 Gene IE	850
TS486 GeneIE	850
TS504 GeneIE	850
Consensus	CTTTGATGGC	CTCATCTAAC	ACCTGGTGCA	TACTGGGAAT	CGTGAAGGGC	850
Chee GeneIE	900
WT GeneIE	900
TS446 Gene IE	900
TS486 GeneIE	900
TS504 GeneIE	900
Consensus	AGGTTCTTGT	ACTCAAGAGA	GCGATTGGTG	TTGCGGAACA	TGCGGCTCAC	900
Chee GeneIECG...	950
WT GeneIECG...	950
TS446 Gene IECG...	950
TS486 GeneIECG...	950
TS504 GeneIEGC...	950
Consensus	CTCGTCAATC	TTGACGCGAC	CCCGCCGAGT	CTGCASSTTG	GGTGTGCAGA	950
Chee GeneIE	1000
WT GeneIE	1000
TS446 Gene IE	1000
TS486 GeneIE	1000
TS504 GeneIE	1000
Consensus	AGGGGGTGT	CTTATCTTTC	ATGATATTGC	GCACCTTCTC	GTTGTCCAAC	1000
Chee GeneIE	1050
WT GeneIE	1050
TS446 Gene IE	1050
TS486 GeneIE	1050
TS504 GeneIE	1050
Consensus	TCGGAGATGC	GTTTGCTCTT	CTTCTTGCGG	GGTCCGGTGC	TCGCCCCGCC	1050
Chee GeneIE	1100
WT GeneIE	1100
TS446 Gene IE	1100
TS486 GeneIE	1100
TS504 GeneIE	1100
Consensus	GCTGCTCTGA	TGGCCGCAGC	TCAGCAGAGA	GGAGGAGGCC	GCGCCACCAA	1100
Chee GeneIE	1150
WT GeneIE	1150
TS446 Gene IE	1150
TS486 GeneIE	1150
TS504 GeneIE	1150
Consensus	AACCGCCGCG	CCCATGGTGG	CTCGAGGTCA	CGGATGCTCC	TCCGCCACTG	1150
Chee GeneIE	1200
WT GeneIE	1200
TS446 Gene IE	1200
TS486 GeneIE	1200
TS504 GeneIE	1200
Consensus	CTGCATTCA	TCTCCTCGGA	CTCACTCTCC	GAGTCCGAAG	CCGAAGTGCA	1200

Gene IE Formatted Alignment

Chee GeneIEC..	1250
WT GeneIEC..	1250
TS446 Gene IEC..	1250
TS486 GeneIEC..	1250
TS504 GeneIET..	1250
Consensus	GGAGGAGGAA GACGAAGAGG AACTATYTTT C ATCGGGCCGG CCCAAGGGAT	1250
Chee GeneIE	1300
WT GeneIE	1300
TS446 Gene IE	1300
TS486 GeneIE	1300
TS504 GeneIE	1300
Consensus	CGGGAAGAGG AGGGTGGTTC ATCTGGGAGA GCGGGTGCCT GGGAGAGGTC	1300
Chee GeneIE	1350
WT GeneIE	1350
TS446 Gene IE	1350
TS486 GeneIE	1350
TS504 GeneIE	1350
Consensus	ACTCGCGGCG TGCCGCTGCC GGTGGAAGGG GAAGACGCGG TAGCACC GCG	1350
Chee GeneIE	1400
WT GeneIE	1400
TS446 Gene IE	1400
TS486 GeneIE	1400
TS504 GeneIE	1400
Consensus	GGTTTCGACT TCTTCACCCT GTTCTTCTC GCTATCAGAG ATCACGATAC	1400
Chee GeneIEGT	1450
WT GeneIEGT	1450
TS446 Gene IEGT	1450
TS486 GeneIETG	1450
TS504 GeneIEGT	1450
Consensus	AGCCGGCGGT ATCGATAATC TTGTTGCGKK ACTGGATGGT AAAGTCGGGC	1450
Chee GeneIE	..G....G.	1500
WT GeneIE	..C....G.	1500
TS446 Gene IE	..C....G.	1500
TS486 GeneIE	..C....G.	1500
TS504 GeneIE	..C....A.	1500
Consensus	TCSGGCTTRA TGTCTTCTG TTTGATGAGG GGCAGCATGA TAGGCGCGGG	1500
Chee GeneIE	1550
WT GeneIE	1550
TS446 Gene IE	1550
TS486 GeneIE	1550
TS504 GeneIE	1550
Consensus	AGGCACGGGC GGTTTAATAA TCACCTTGAA AGGACGCGTG GTTTTGCGCG	1550
Chee GeneIEC..	1600
WT GeneIEA..	1600
TS446 Gene IEA..	1600
TS486 GeneIEA..	1600
TS504 GeneIEA..	1600
Consensus	GTTTCTTACG CGGGCTGAGC TCGGGAGTAG CGGATGCMCC GGGGAGAGGA	1600

Gene IE Formatted Alignment

Chee GeneIEG..	1650
WT GeneIEG..	1650
TS446 Gene IEC..	1650
TS486 GeneIEG..	1650
TS504 GeneIEG..	1650
Consensus	GTGTTAGTAA CCGCGACGCT GGTGGGGSTC GGCTTGTTAA GAGGGGCGCT	1650
Chee GeneIE	1700
WT GeneIE	1700
TS446 Gene IE	1700
TS486 GeneIE	1700
TS504 GeneIE	1700
Consensus	GCTAACGCTG CAAGAGTGGG TTGTCAGCGT GGGGCCGGTG CTACTIONGGAAT	1700
Chee GeneIE	1750
WT GeneIE	1750
TS446 Gene IE	1750
TS486 GeneIE	1750
TS504 GeneIE	1750
Consensus	CGATACCGGC ATGATTGACA GCCTGGGCGA GGATGTCACC TGATGGTGAT	1750
Chee GeneIEA.....	1800
WT GeneIEA.....	1800
TS446 Gene IET.....	1800
TS486 GeneIEA.....	1800
TS504 GeneIEA.....	1800
Consensus	AAGAAGACAC GGGAGACTTA GTACGGTTTC WCAGGCGTGA CACGTTTATT	1800
Chee GeneIE	..-..T.....	1849
WT GeneIE	..-..T.....	1849
TS446 Gene IE	...A.....	1850
TS486 GeneIE	..-..T.....	1849
TS504 GeneIE	..-..T.....	1849
Consensus	GTAGWAGGAT TACAGAGTAT AACATAGAGT ATAATATAGA GTATAACAATA	1850
Chee GeneIE	1899
WT GeneIE	1899
TS446 Gene IE	1900
TS486 GeneIE	1899
TS504 GeneIE	1899
Consensus	GTGACGTGGG ATCCATAACA GTAAGTATA TATATATACA ATAGTTTACT	1900
Chee GeneIE	1949
WT GeneIE	1949
TS446 Gene IE	1950
TS486 GeneIE	1949
TS504 GeneIE	1949
Consensus	GGTCAGCCTT GCTTCTAGTC ACCATAGGGT GGGTGCTCTT GCCTCCAGAG	1950
Chee GeneIE	1999
WT GeneIE	1999
TS446 Gene IE	2000
TS486 GeneIE	1999
TS504 GeneIE	1999
Consensus	CGGTGGGTT CCTCAGCACC ATCTCTCTCT TCCTCTGGGG CAACTTCCTC	2000

Gene IE Formatted Alignment

Chee GeneIE	2049
WT GeneIE	2049
TS446 Gene IE	2050
TS486 GeneIE	2049
TS504 GeneIE	2049
Consensus	TATCTCAGAC	ACTGGCTCAG	ACTTGACAGA	CACAGTGTCC	TCCCGCTCCT	2050
Chee GeneIE	2099
WT GeneIE	2099
TS446 Gene IE	2100
TS486 GeneIE	2099
TS504 GeneIE	2099
Consensus	CCTGAGCACC	CTCCTCCTCT	TCCTCATCAC	TCTGCTCACT	TTCTTCCTGA	2100
Chee GeneIE	2149
WT GeneIE	2149
TS446 Gene IE	2150
TS486 GeneIE	2149
TS504 GeneIE	2149
Consensus	TCACTGTTCT	CAGCCACAAT	TACTGAGGAC	AGAGGGATAG	TCGCGGGTAC	2150
Chee GeneIE	2199
WT GeneIE	2199
TS446 Gene IE	2200
TS486 GeneIE	2199
TS504 GeneIE	2199
Consensus	AGGGGACTCT	GGGGGTGACA	CCAGAGAATC	AGAGGAGCTG	ACACCAGCGG	2200
Chee GeneIE	..G.....	2249
WT GeneIE	..G.....	2249
TS446 Gene IE	..C.....	2250
TS486 GeneIE	..G.....	2249
TS504 GeneIE	..G.....	2249
Consensus	TGSCCAAAGT	GTAGGCTACA	ATAGCCTCTT	CCTCATCTGA	CTCCTCGGCG	2250
Chee GeneIE	2299
WT GeneIE	2299
TS446 Gene IE	2300
TS486 GeneIE	2299
TS504 GeneIE	2299
Consensus	ATGGCCCGTA	GGTCATCCAC	ACTAGGAGAG	CAGACTCTCA	GAGGATCGGC	2300
Chee GeneIEG.....	2349
WT GeneIEG.....	2349
TS446 Gene IEG.....	2350
TS486 GeneIET.....	2349
TS504 GeneIEG.....	2349
Consensus	CCCAGAATG	TACTGGGCAA	AGACCTTCAT	GCAKATCTCC	TCAATGCGGC	2350
Chee GeneIE	2399
WT GeneIE	2399
TS446 Gene IE	2400
TS486 GeneIE	2399
TS504 GeneIE	2399
Consensus	GCTTCATTAC	ACTGATAACC	TCAGGCTTGG	TTATCAGAGG	CCGCTTGGCC	2400

Gene IE Formatted Alignment

Chee GeneIEC.....	2449
WT GeneIEC.....	2449
TS446 Gene IEC.....	2450
TS486 GeneIEA.....	2449
TS504 GeneIEC.....	2449
Consensus	AGCATCACAC	TAGTCTCCTC	TAAGACATAG	CAGMACAGCA	CCCGACAGAA	2450
Chee GeneIE	2499
WT GeneIE	2499
TS446 Gene IE	2500
TS486 GeneIE	2499
TS504 GeneIE	2499
Consensus	CTCACTTAAG	AGAGAGATGC	CCCCGTACAT	GGTCATCATA	CAAGCGTCAC	2500
Chee GeneIE	2549
WT GeneIE	2549
TS446 Gene IE	2550
TS486 GeneIE	2549
TS504 GeneIE	2549
Consensus	TAGTGACCTT	GTACTCATT	CACATTGTTT	CCACACATGT	AGTGAGGATA	2550
Chee GeneIE	2599
WT GeneIE	2599
TS446 Gene IE	2600
TS486 GeneIE	2599
TS504 GeneIE	2599
Consensus	TCCATAAATA	TGTGATCAAT	GTGCGTGAGC	ACCTTGTCCTC	TCTCCTCATC	2600
Chee GeneIE	2649
WT GeneIE	2649
TS446 Gene IE	2650
TS486 GeneIE	2649
TS504 GeneIE	2649
Consensus	CAAAATCTTA	AATATTTTCT	GGGCATAAGC	CATAATCTCA	TCAGGGGAGC	2650
Chee GeneIE	2699
WT GeneIE	2699
TS446 Gene IE	2700
TS486 GeneIE	2699
TS504 GeneIE	2699
Consensus	ACTGAGGCAA	GTTCTGCAGT	GCCGCCATGG	CCTGACTGCA	GCCATTGGTG	2700
Chee GeneIE	2749
WT GeneIE	2749
TS446 Gene IE	2750
TS486 GeneIE	2749
TS504 GeneIE	2749
Consensus	GTCTTAGGGA	AGGCTGAGTT	CTTGGTAAAG	AACTCTATAT	TCCTGTAGCA	2750
Chee GeneIE	2799
WT GeneIE	2799
TS446 Gene IE	2800
TS486 GeneIE	2799
TS504 GeneIE	2799
Consensus	CATATACATC	ATCTTTCCTC	TAAGTTCATC	CTTTTTAGCA	CGGGCCTTAG	2800

Gene IE Formatted Alignment

Chee GeneIE	2849
WT GeneIE	2849
TS446 Gene IE	2850
TS486 GeneIE	2849
TS504 GeneIE	2849
Consensus	CCTGCAGTGC	ACCCCCAAC	TTGTTAGCGG	CGCCCTTGCT	CACATCATGC	2850
Chee GeneIE	2899
WT GeneIE	2899
TS446 Gene IE	2900
TS486 GeneIE	2899
TS504 GeneIE	2899
Consensus	AGCTCCTTAA	TACAAGCCAT	CCACATCTCC	CGCTTATCCT	CAGGTACAAT	2900
Chee GeneIE	2949
WT GeneIE	2949
TS446 Gene IE	2950
TS486 GeneIE	2949
TS504 GeneIE	2949
Consensus	GTAGTTCTCA	TACATGCTCT	GCATAGTTAG	CCCAATACAC	TTCATCTCCT	2950
Chee GeneIE	2999
WT GeneIE	2999
TS446 Gene IE	3000
TS486 GeneIE	2999
TS504 GeneIE	2999
Consensus	CGAAAGGCTC	ATGAACCTTA	TCTAAGATAT	CTAAGGCATT	CTGCAAACAT	3000
Chee GeneIE	3049
WT GeneIE	3049
TS446 Gene IE	3050
TS486 GeneIE	3049
TS504 GeneIE	3049
Consensus	CCTCCCATCA	TATTAAAGGC	GCCAGTGAAT	TTCTCTCCG	TCTGGGTATA	3050
Chee GeneIE	3099
WT GeneIE	3099
TS446 Gene IE	3100
TS486 GeneIE	3099
TS504 GeneIE	3099
Consensus	TTTTTTCAGC	ATGTGCTCCT	TGATTCTATG	CCGCACCATG	TCCACTCGAA	3100
Chee GeneIE	3149
WT GeneIE	3149
TS446 Gene IE	3150
TS486 GeneIE	3149
TS504 GeneIE	3149
Consensus	CCTTAATCTG	TTTGACTGTA	GAGGAGGATA	ACAACACATA	TAAGTATCCG	3150
Chee GeneIE	3199
WT GeneIE	3199
TS446 Gene IE	3200
TS486 GeneIE	3199
TS504 GeneIE	3199
Consensus	TCCTCCTGAC	TCATTATCG	CTATCTCGAT	GCCCCGCTCA	CATGCAAGAG	3200

Gene IE Formatted Alignment

Chee GeneIE	3249
WT GeneIE	3249
TS446 Gene IE	3250
TS486 GeneIE	3249
TS504 GeneIE	3249
Consensus	TTAATCTTTA	CTCTATCTGA	CATACACAAG	TAAATCCACG	TCCCATGCAG	3250
Chee GeneIE	3299
WT GeneIE	3299
TS446 Gene IE	3300
TS486 GeneIE	3299
TS504 GeneIE	3299
Consensus	GTTAGTATAC	ATCACATACA	TGTC AACAGA	CTTACCGAGT	TCTGCCAGGA	3300
Chee GeneIE	3349
WT GeneIE	3349
TS446 Gene IE	3350
TS486 GeneIE	3349
TS504 GeneIE	3349
Consensus	CATCTTTCTC	GGGGTTCTCG	TTGCAATCCT	CGGTCACTTG	TTCAAAAGTT	3350
Chee GeneIE	3399
WT GeneIE	3399
TS446 Gene IE	3400
TS486 GeneIE	3399
TS504 GeneIE	3399
Consensus	TTGAGGGATT	CTTCGGCCAA	CTCTGGAAAC	AGCGGGTCTC	CCAGACTCAG	3400
Chee GeneIE	3449
WT GeneIE	3449
TS446 Gene IE	3450
TS486 GeneIE	3449
TS504 GeneIE	3449
Consensus	CTGACTGTTA	ACCTCCTTCC	TCAACATAGT	CTGCAGGAAC	GTCGTGGCCT	3450
Chee GeneIE	3499
WT GeneIE	3499
TS446 Gene IE	3500
TS486 GeneIE	3499
TS504 GeneIE	3499
Consensus	TGGTCACGGG	TGCTCGGGC	CTAAACACAT	GAGAAATAGA	GTCATAAGCA	3500
Chee GeneIE	3549
WT GeneIE	3549
TS446 Gene IE	3550
TS486 GeneIE	3549
TS504 GeneIE	3549
Consensus	CATGGGTCAC	ATACAGGAGA	TATGTATATA	ACATTAATAC	AATTTTATTA	3550
Chee GeneIE	3599
WT GeneIE	3599
TS446 Gene IE	3600
TS486 GeneIE	3599
TS504 GeneIE	3599
Consensus	AAAAAAAAGG	GGGGGCACAA	ACCCCGACAC	GTACCGTGGC	ACCTTGGAGG	3600

Gene IE Formatted Alignment

Chee GeneIE	3649
WT GeneIE	3649
TS446 Gene IE	3650
TS486 GeneIE	3649
TS504 GeneIE	3649
Consensus	AAGGGCCCTC	GTCAGGATTA	TCAGGGTCCA	TCTTTCTCTT	GGCAGAGGAC	3650
Chee GeneIE	3699
WT GeneIE	3699
TS446 Gene IE	3700
TS486 GeneIE	3699
TS504 GeneIE	3699
Consensus	TCCATCGTGT	CAAGGACGGT	GACTGCAGAA	AAGACCCATG	GAAAGGAACA	3700
Chee GeneIE	3749
WT GeneIE	3749
TS446 Gene IE	3750
TS486 GeneIE	3749
TS504 GeneIE	3749
Consensus	GTCGTTAGT	CTGTCAGCTA	TTATGTCTGG	TGGCGCGCGC	GGCAGCAACG	3750
Chee GeneIE	3799
WT GeneIE	3799
TS446 Gene IE	3800
TS486 GeneIE	3799
TS504 GeneIE	3799
Consensus	AGTACTGCTC	AGACTACACT	GCCCTCCACC	GTTAACAGCA	CCGCAACGGG	3800
Chee GeneIE	3849
WT GeneIE	3849
TS446 Gene IE	3850
TS486 GeneIE	3849
TS504 GeneIE	3849
Consensus	AGTTACCTCT	GACTCTTATC	AGAACACAAC	AACTCAGCTG	CCTGCATCTT	3850
Chee GeneIE	3899
WT GeneIE	3899
TS446 Gene IE	3900
TS486 GeneIE	3899
TS504 GeneIE	3899
Consensus	CTTCTGCCGC	TGCCTTAAGT	CTTCCAAATG	CGTCAGCGGT	GCAAGCCCGC	3900
Chee GeneIE	3949
WT GeneIE	3949
TS446 Gene IE	3950
TS486 GeneIE	3949
TS504 GeneIE	3949
Consensus	TCCCCGAGCT	CATTTTCAGA	CACATACCCT	ACCGCCACGG	CCTTGTGCGG	3950
Chee GeneIE	3999
WT GeneIE	3999
TS446 Gene IE	4000
TS486 GeneIE	3999
TS504 GeneIE	3999
Consensus	CACACTGGTG	GTGGTGGGCA	TCGTGCTGTG	CCTAAGTCTG	GCCTCCACTG	4000

Gene IE Formatted Alignment

Chee GeneIE	4049
WT GeneIE	4049
TS446 Gene IE	4050
TS486 GeneIE	4049
TS504 GeneIE	4049
Consensus	TTAGGAGCAA	GGAGCTGCCG	AGCGACCATG	AGTCGCTGGA	GGCATGGGAG	4050
Chee GeneIE	4099
WT GeneIE	4099
TS446 Gene IE	4100
TS486 GeneIE	4099
TS504 GeneIE	4099
Consensus	CAGGGCTCGG	ATGTAGAAGC	TCCGCCGCTA	CCGGAGAAGA	GCCCATGTCC	4100
Chee GeneIE	4149
WT GeneIE	4149
TS446 Gene IE	4150
TS486 GeneIE	4149
TS504 GeneIE	4149
Consensus	GGAACACGTA	CCCAGATTTC	GCGTGGAGAT	CCCACGTTAT	GTTTAATAAA	4150
Chee GeneIET.T	4199
WT GeneIEG.A	4199
TS446 Gene IEG.A	4200
TS486 GeneIEG.A	4199
TS504 GeneIET.T	4199
Consensus	AACTGCCGGC	ACTGGGGACG	GTGGTGTKGW	ATATGTGAAT	TTGTAAATAA	4200
Chee GeneIE	4249
WT GeneIE-	4248
TS446 Gene IE-	4249
TS486 GeneIE-	4248
TS504 GeneIE-	4249
Consensus	TAAATGAGAC	CCCATCCTGT	AAAATAACAG	AGTCCGTGTC	AGTCTCTGAA	4250
Chee GeneIE	4299
WT GeneIE	4298
TS446 Gene IE	4299
TS486 GeneIE	4298
TS504 GeneIE	4299
Consensus	GGACAGTGTA	TTGGCATATA	GCCAATAAAG	AGAGTTGTGG	CAAAGAGCCA	4300
Chee GeneIE	4349
WT GeneIE	4348
TS446 Gene IE	4349
TS486 GeneIE	4348
TS504 GeneIE	4349
Consensus	TGTTATGGAT	TAGTAATGGA	AAGTATCGTC	ACCAATAGGG	GAGTGGTCAA	4350
Chee GeneIE	4399
WT GeneIE	4398
TS446 Gene IE	4399
TS486 GeneIE	4398
TS504 GeneIE	4399
Consensus	TAAFGGTCAA	TAACCCACAC	CTATAGGCTA	AGCTATACCA	TCACCTATAA	4400

Gene IE Formatted Alignment

Chee GeneIE	4449
WT GeneIE	4448
TS446 Gene IE	4449
TS486 GeneIE	4448
TS504 GeneIE	4449
Consensus	CATGAGGAAG	CGGGGGTGTGTA	TAGACCCCAA	GCCAAAAACA	GTATAGCATG	4450
Chee GeneIE	4499
WT GeneIE	4498
TS446 Gene IE	4499
TS486 GeneIE	4498
TS504 GeneIE	4499
Consensus	CATAAGAAGC	CAAGGGGGTG	GGCCTATAGA	CTCTATAGGC	GGTACTTACG	4500
Chee GeneIE	4549
WT GeneIE	4548
TS446 Gene IE	4549
TS486 GeneIE	4548
TS504 GeneIE	4549
Consensus	TCACTCTTGG	CACGGGGAAT	CCGCGTCCA	ATGCACCGTT	CCCGCCGCG	4550
Chee GeneIE	4599
WT GeneIE	4598
TS446 Gene IE	4599
TS486 GeneIE	4598
TS504 GeneIE	4599
Consensus	GAGGCTGGAT	CGGTCCCCTG	GTCTTCTATG	GAGGTCAAAA	CAGCGTGGAT	4600
Chee GeneIE	4649
WT GeneIE	4648
TS446 Gene IE	4649
TS486 GeneIE	4648
TS504 GeneIE	4649
Consensus	GGCGTCTCCA	GGCGATCTGA	CGGTTCACTA	AACGAGCTCT	GCTTATATAG	4650
Chee GeneIE	4699
WT GeneIE	4698
TS446 Gene IE	4699
TS486 GeneIE	4698
TS504 GeneIE	4699
Consensus	ACCTCCCACC	GTACACGCCT	ACCGCCATT	TGCGTCAATG	GGGCGGAGTT	4700
Chee GeneIE	4749
WT GeneIE	4748
TS446 Gene IE	4749
TS486 GeneIE	4748
TS504 GeneIE	4749
Consensus	GTTACGACAT	TTTGAAAAGT	CCCGTTGATT	TTGGTGCCAA	AACAAACTCC	4750
Chee GeneIE	4799
WT GeneIE	4798
TS446 Gene IE	4799
TS486 GeneIE	4798
TS504 GeneIE	4799
Consensus	CATTGACGTC	AATGGGGTGG	AGACTTGAA	ATCCCCGTGA	GTCAAACCGC	4800

Gene IE Formatted Alignment

Chee GeneIE	4847
WT GeneIE	4846
TS446 Gene IE	4847
TS486 GeneIE	4846
TS504 GeneIE	4847
Consensus	TATCCACGCC	CATTGATGTA	CTGCCAAAAC	CGCATCACCA	TGGTAATA	4848

Figure 16: Séquence en acides aminés de la protéine IE1 de la souche AD169, des trois mutants HCMV *ts* et d'un dérivé de la séquence de Chee.

Alignment IE1 Formatted Alignment

Chee IE1	50
WT IE1	50
TS446 IE1	50
TS486 IE1	50
TS504 IE1	50
Consensus	MESSAKRKMD	PDNPDEGPSS	KVPRPETPVT	KATTFLOQTML	RKEVNSQLSL	50
Chee IE1	100
WT IE1	100
TS446 IE1	100
TS486 IE1	100
TS504 IE1	100
Consensus	GDPLFPELAE	ESLKTFEQVT	EDCNENPEKD	VLAELVKQIK	VRVDMVRHRI	100
Chee IE1	150
WT IE1	150
TS446 IE1	150
TS486 IE1	150
TS504 IE1	150
Consensus	KEHMLKKYTQ	TEEKFTGAFN	MMGGCLQNAL	DILDKVHEPF	EEMKCIGLTM	150
Chee IE1	200
WT IE1	200
TS446 IE1	200
TS486 IE1	200
TS504 IE1	200
Consensus	QSMYENYIVP	EDKREMWMAC	IKELHDVSKG	AANKLGGALQ	AKARAKKDEL	200
Chee IE1	250
WT IE1	250
TS446 IE1	250
TS486 IE1	250
TS504 IE1	250
Consensus	RRKMMYMCYR	NIEFFTKNSA	FPKTTNGCSQ	AMAALQNLQ	CSPDEIMAYA	250
Chee IE1	300
WT IE1	300
TS446 IE1	300
TS486 IE1	300
TS504 IE1	300
Consensus	QKIFKILDEE	RDKVLTHIDH	IFMDILTTCV	ETMCNEYKVT	SDACMMIMYG	300
Chee IE1	350
WT IE1	350
TS446 IE1	350
TS486 IE1F.....	350
TS504 IE1	350
Consensus	GISLLSEFCR	VLCCYVLEET	SVMLAKRPLI	TKPEVISVMK	RRIEEICMKV	350
Chee IE1	400
WT IE1	400
TS446 IE1G.....	400
TS486 IE1	400
TS504 IE1	400
Consensus	FAQYILGADP	LRVCSPSVDD	LRAIAEESDE	EEAIVAYTLA	TAGVSSSDSL	400

Alignement IE1 Formatted Alignment

Chee IE1	450
WT IE1	450
TS446 IE1	450
TS486 IE1E.....-	449
TS504 IE1	450
Consensus	VSPFESPVPA TIPLSSVIVA ENSDQEESEQ SDEEEEGAQ EEREDTVSVK	450

Chee IE1	491
WT IE1	491
TS446 IE1	491
TS486 IE1	490
TS504 IE1	491
Consensus	SEPVSEIEEV APEEEEDGAE EPTASGGKST HPMVTRSKAD Q	491

Alignement IE2 Formatted Alignment

Chee IE2	50
WT IE2	50
TS446 IE2	50
TS486 IE2	50
TS504 IE2	50
Consensus	MESSAKRKMD	PDNPDEGPSS	KVPRPETPVT	KATTFQLQTML	RKEVNSQLSL	50
Chee IE2	100
WT IE2	100
TS446 IE2	100
TS486 IE2	100
TS504 IE2	100
Consensus	GDPLFPELAE	ESLKTFEQVT	EDCNENPEKD	VLAELGDILA	QAVNHAGIDS	100
Chee IE2	150
WT IE2	150
TS446 IE2S.	150
TS486 IE2	150
TS504 IE2	150
Consensus	SSTGPTLTH	SCSVSSAPLN	KPTPTSVAVT	NTPLPGASAT	PELSPRKKPR	150
Chee IE2	200
WT IE2	200
TS446 IE2	200
TS486 IE2S.	200
TS504 IE2	200
Consensus	KTRPFKVII	KPPVPPAPIM	LPLIKQEDIK	PEPDFTIQYR	NKIIDTAGCI	200
Chee IE2	250
WT IE2	250
TS446 IE2	250
TS486 IE2	250
TS504 IE2	250
Consensus	VISDSEEEQG	EEVETRGATA	SSPSTGSGTP	RVTSPHPLS	QMNHPPLDP	250
Chee IE2	300
WT IE2	300
TS446 IE2	300
TS486 IE2N.	300
TS504 IE2N.	300
Consensus	LGRPDEDSS	SSSSSCSSAS	DSESESEEMK	CSSGGGASVT	SSHHRGGFG	300
Chee IE2	350
WT IE2	350
TS446 IE2	350
TS486 IE2	350
TS504 IE2	350
Consensus	GAASSLLSC	GHQSSGAST	GPRKKKSKRI	SELDNEKVRN	IMDKNTPFC	350
Chee IE2	400
WT IE2	400
TS446 IE2	400
TS486 IE2	400
TS504 IE2	..KL.	400
Consensus	TPNVQTRRGR	VKIDEVSRMF	RNTNRSLEYK	NLPFTIPSMH	QVLDEAIKAC	400

Alignment IE2 Formatted Alignment

Chee IE2	450
WT IE2	450
TS446 IE2	450
TS486 IE2	450
TS504 IE2	450
Consensus	KTMQVNNKGI	QIIYTRNHEV	KSEVDAVRCR	LGTMCNLALS	TPFLMEHTMP	450
Chee IE2	500
WT IE2	500
TS446 IE2	500
TS486 IE2	500
TS504 IE2N.....	500
Consensus	VTHPPEVAQR	TADACNEGVK	AAWSLKELHT	HQLCPRSSDY	RNMIIHAATP	500
Chee IE2	550
WT IE2	550
TS446 IE2	550
TS486 IE2	550
TS504 IE2	550
Consensus	VDLLGALNLC	LPLMQKFPKQ	VMVRIFSTNQ	GGFMLPIYET	AAKAYAVGQF	550
Chee IE2	580
WT IE2	580
TS446 IE2	580
TS486 IE2	580
TS504 IE2	580
Consensus	EQPTETPPED	LDTLSLAIEA	AIQDLRNKSQ	580

Figure 18: Immunobuvardage de type Western des protéines de la souche sauvage HCMV AD169 dans les fibroblastes humains IAFP-1 à 1, 2, 4, 6, 8, 10 et 12 jours post-infection. Les protéines sont détectées avec un mélange d'antisérums humains anti-HCMV.

Symboles: (B) marqueurs Bio-Rad biotinylés; (NI) cellules non-infectées.

B NI 1 2 4 6 8 10 12 B

kDa
200-
116-
97-
66-
45-
31-
22-
14-

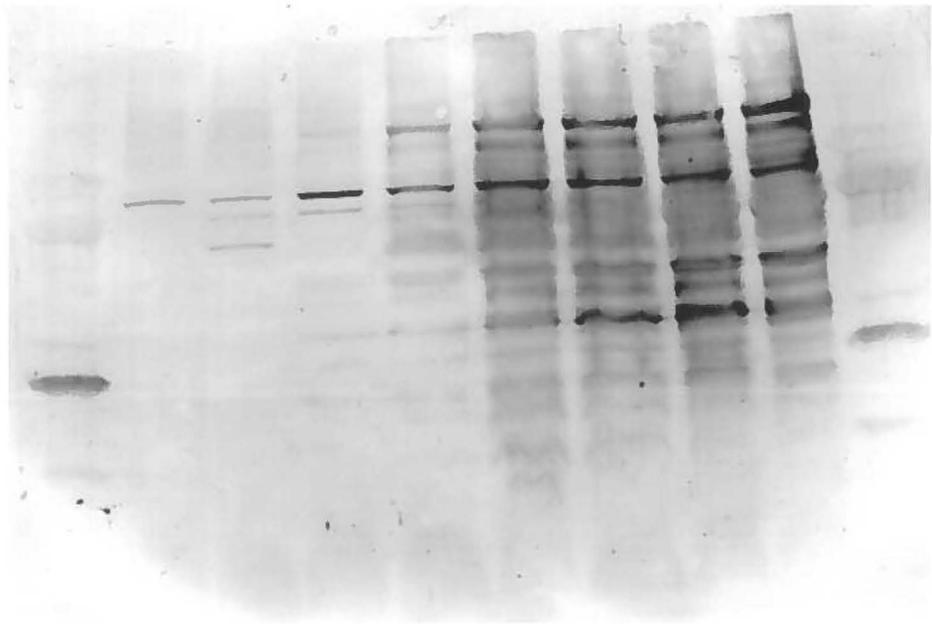
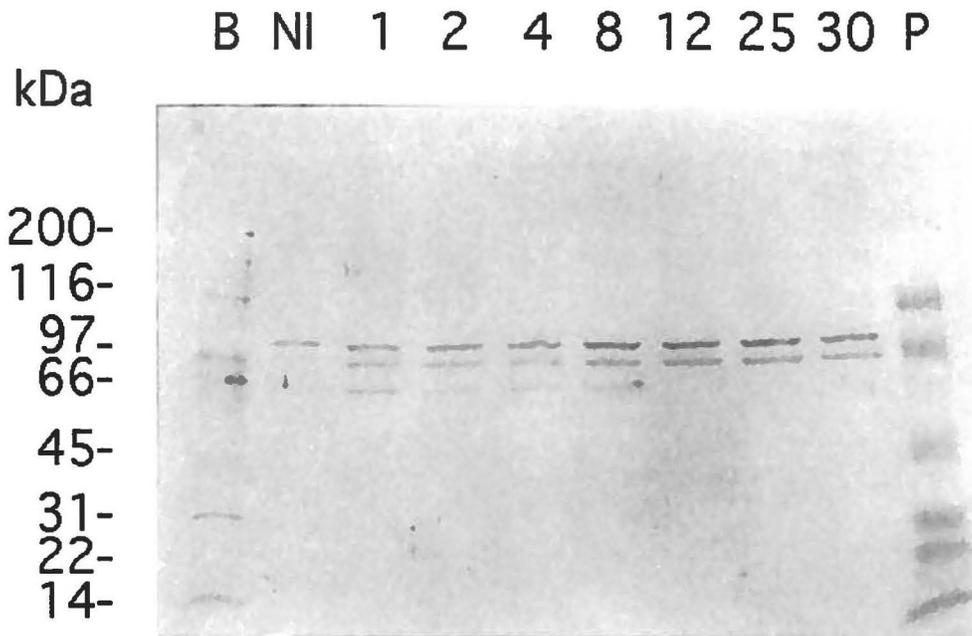


Figure 19: Immunobuvardage de type Western des protéines des souche sauvage (WT) et mutante (*ts446*) dans les fibroblastes humains IAFP-1 après 1, 2, 4, 8, 12, 25 et 30 h d'incubation à température restrictive (puits 2-8). La flèche représente la position de la protéine IE1-72K manquante pour la souche *ts446*.
Symboles: (B) marqueurs Bio-Rad biotinylés; (1) cellules non-infectées; (P) marqueurs Bio-Rad précolorés.

WT



ts446

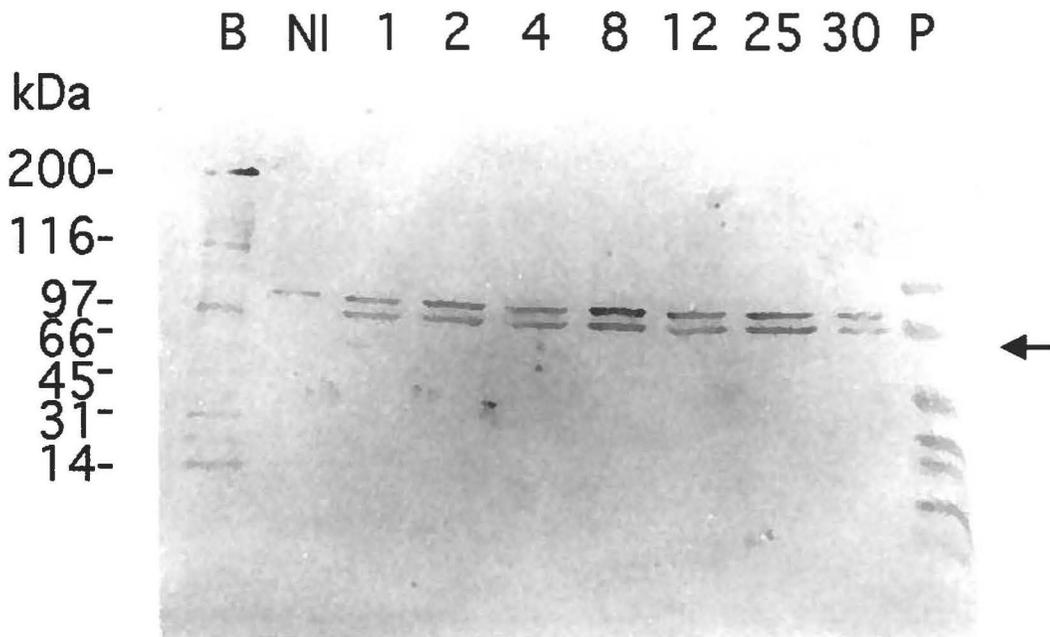


Figure 20: Immunobuvardage de type Western des protéines des souches sauvage (WT, puits 2, 4, 6, 8, 11, 13 et 15) et mutante (*ts486*, puits 3, 5, 7, 10, 12, 14 et 16) dans les fibroblastes humains IAFP-1 après respectivement 1, 2, 4, 8, 12, 25 et 30 h d'incubation à température restrictive. Les flèches blanche et noire représentent respectivement la position des protéines IE2-55K et d'un isomère IE2 de 40 kDa, manquants pour la souche *ts486*. Symboles: (B) marqueurs Bio-Rad biotinylés; (NI) cellules non-infectées; (P) marqueurs Bio-Rad précolorés.

WT/ts486

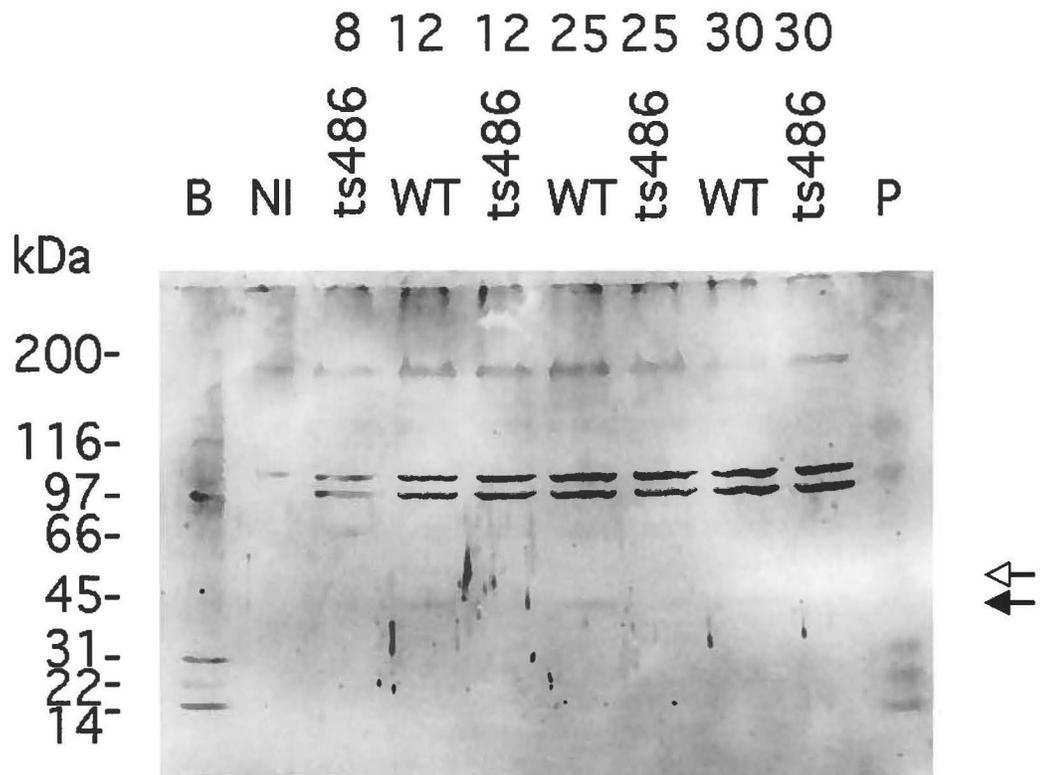
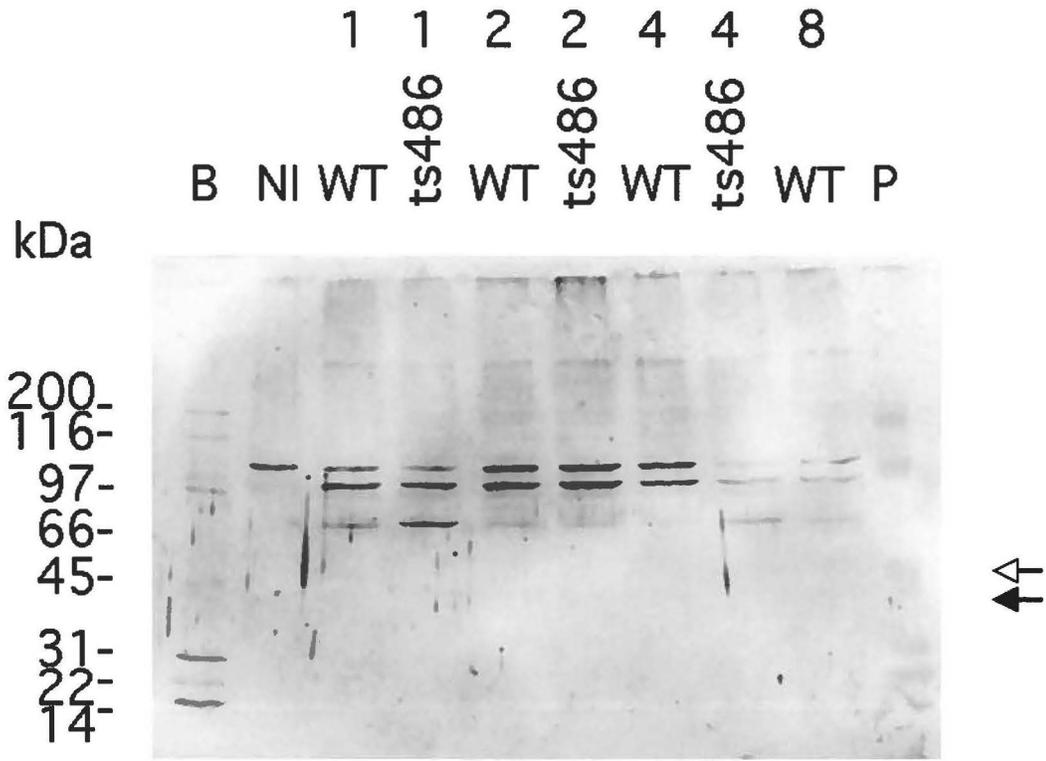


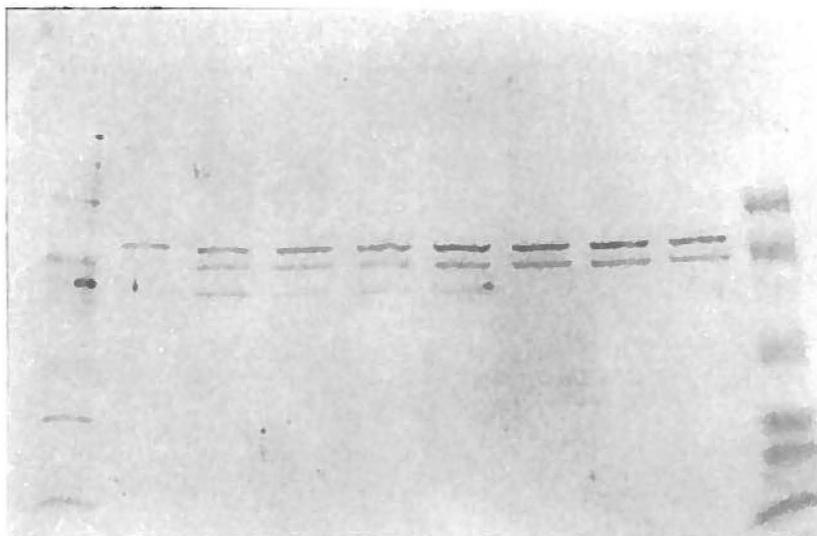
Figure 21: Immunobuvardage de type Western des protéines des souches sauvage (WT) et mutante (*ts504*) dans les fibroblastes humains IAFP-1 après 1, 2, 4, 8, 12, 25 et 30 h d'incubation à température restrictive (puits 2-8). La flèche représente la position de la protéine aberrante de 150 kDa pour la souche *ts504*. Symboles: (B) marqueurs Bio-Rad biotinylés; (1) cellules non-infectées; (P) marqueurs Bio-Rad précolorés.

WT

B NI 1 2 4 8 12 25 30 P

kDa

200-
116-
97-
66-
45-
31-
22-
14-



ts504

B NI 1 2 4 8 12 25 30 P

kDa

200-
116-
97-
66-
45-
31-
22-
14-

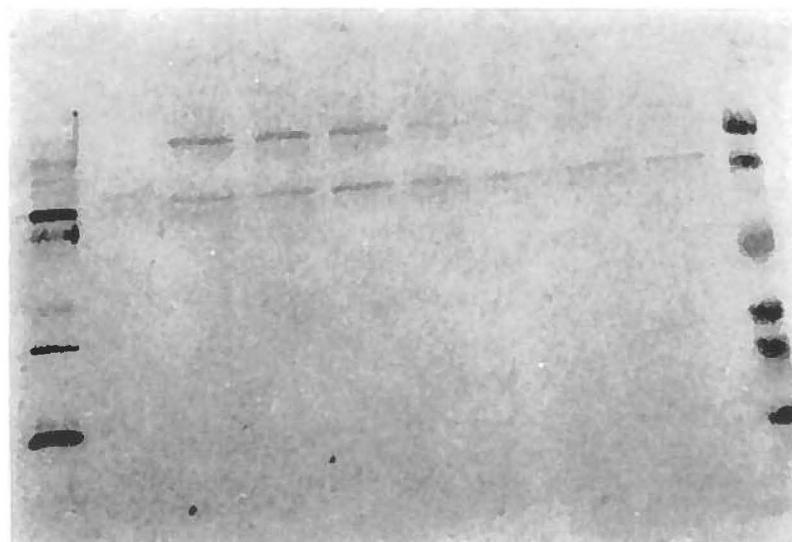


Figure 22: Immunobuvardage de type Western des souches sauvage et mutante (*ts504*) en présence de cycloheximide. La flèche représente la position de la protéine aberrante de 150 kDa pour la souche *ts504* dont l'expression est augmentée en présence de cycloheximide. Symboles: (B) marqueurs Bio-Rad biotinylés; (1) cellules IAFP1 non infectées; (2) souche sauvage à 33,5°C + cycloheximide; (3 et 6) souche sauvage à 33,5°C, 2 et 4 h PI; (4 et 7) souche *ts504* à 33,5°C, 2 et 4 h PI; (5 et 8) souche *ts504* à 39,5°C, 2 et 4 h PI; (P) marqueurs Bio-Rad précolorés.

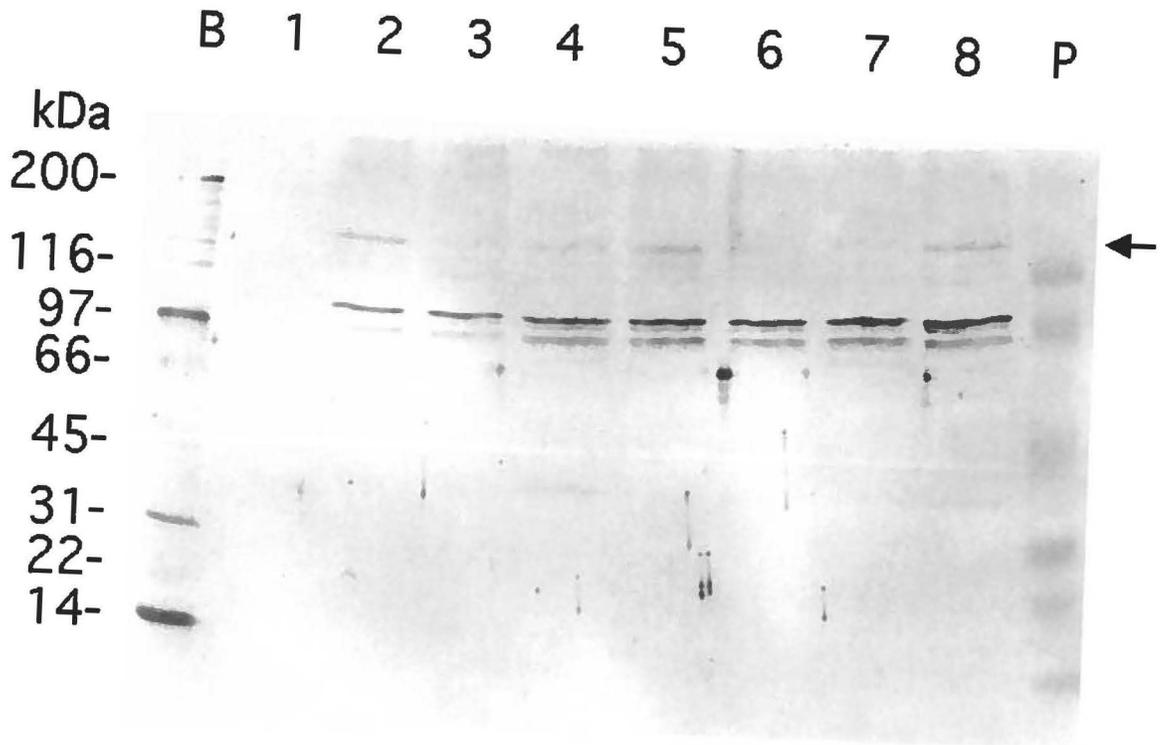


Figure 23: Immunobuvardage de type Western des protéines de la souche sauvage dans les fibroblastes humains IAFP1 et dans les cellules non-permissives AV3, Caco2, THP1 et U937. Alors que les cellules THP1 et U937 ne produisent que très peu des protéines précoces-immédiates, les cellules AV3 et Caco2 produisent presque exclusivement des isoformes de IE2. Symboles: (NI) cellules non-infectées; (WT) cellules infectées avec la souche sauvage, température permissive; *flèche blanche*, IE2-86K; *flèche noire*, IE1-72K; *flèche grise*, IE2-55K.

WT 33,5°C

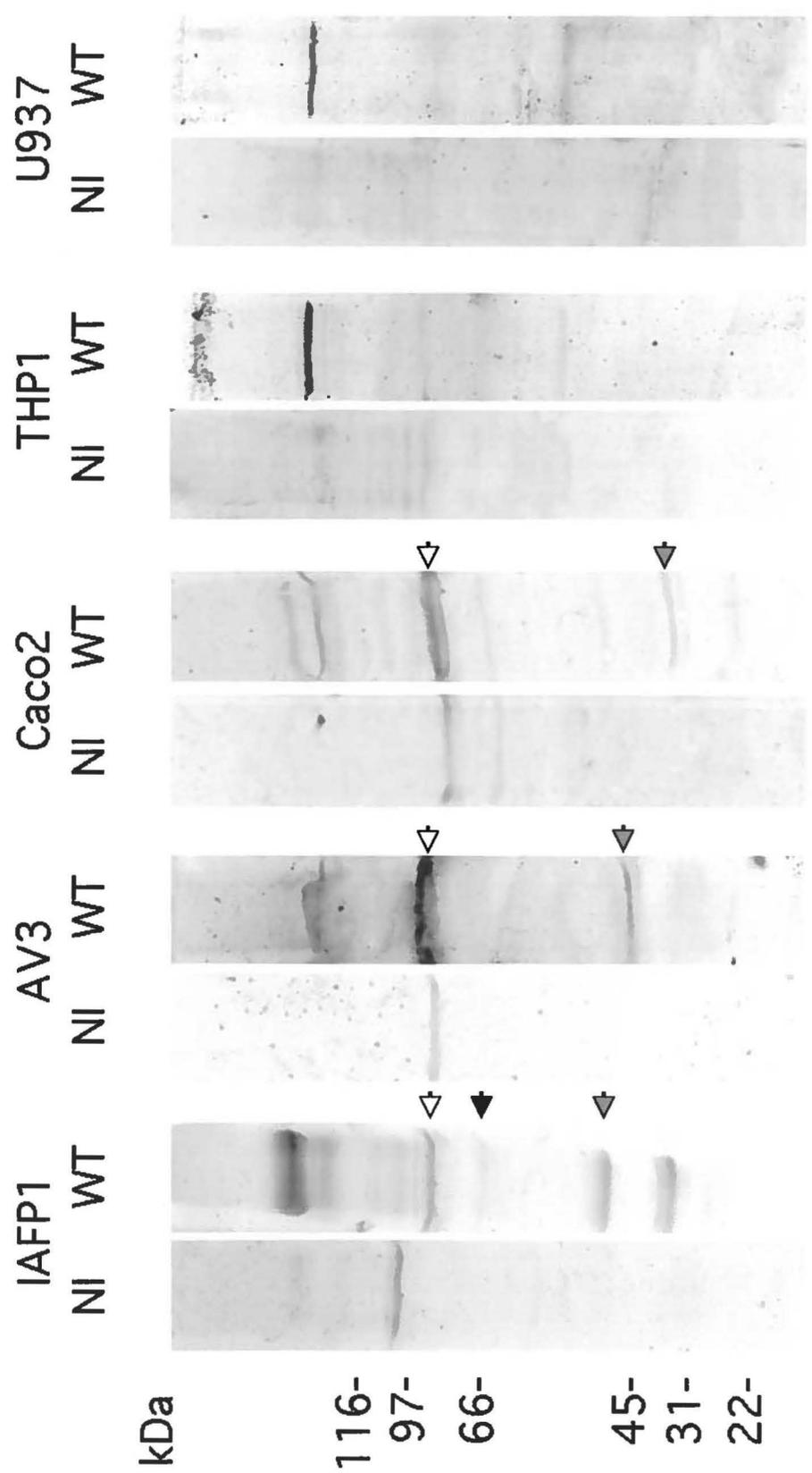


Figure 24: Production aberrante des isoformes de petite taille de la protéine IE2 par le mutant *ts486* à température permissive, dans les cellules THP1 et U937. Symboles:(NI) cellules non-infectées à 33,5°C; *flèche blanche*, IE2-86K; *barres noires*, isoformes de IE2 de petite taille.

ts486

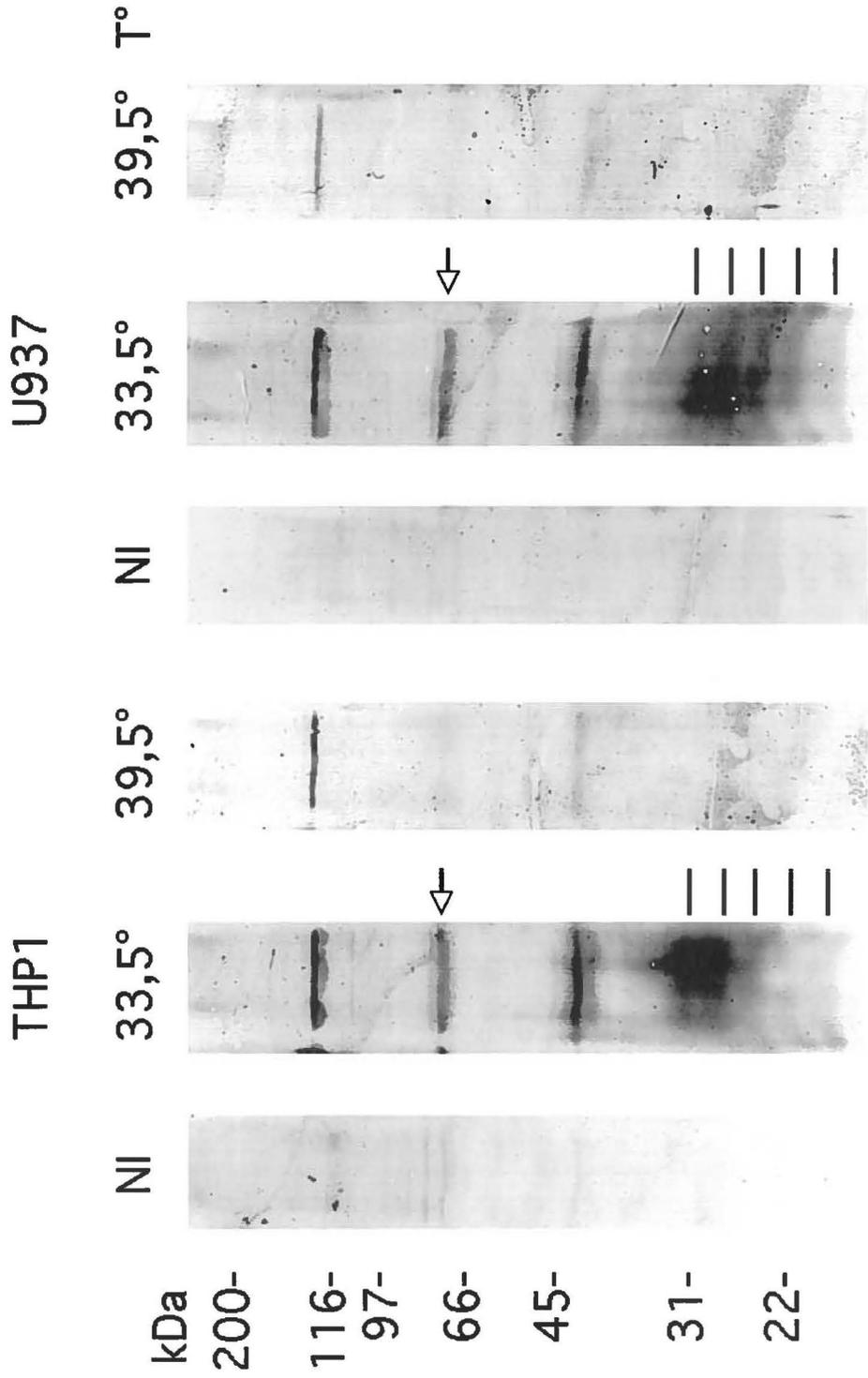


Figure 25: Production accrue d'isoformes de petite taille de la protéine IE2 par le mutant *ts486* à température non-permissive, dans les cellules AV3 en présence de PMA, accompagné d'un témoin des cellules IAFP1. Symboles: (NI), cellules non-infectées; *flèche blanche*, IE2-86K; *flèche noire*, IE1-72K; *flèche grise*, IE2-55K; *barres noires*, isoformes de IE2 de petites tailles dont la production est stimulée par le PMA.

ts486

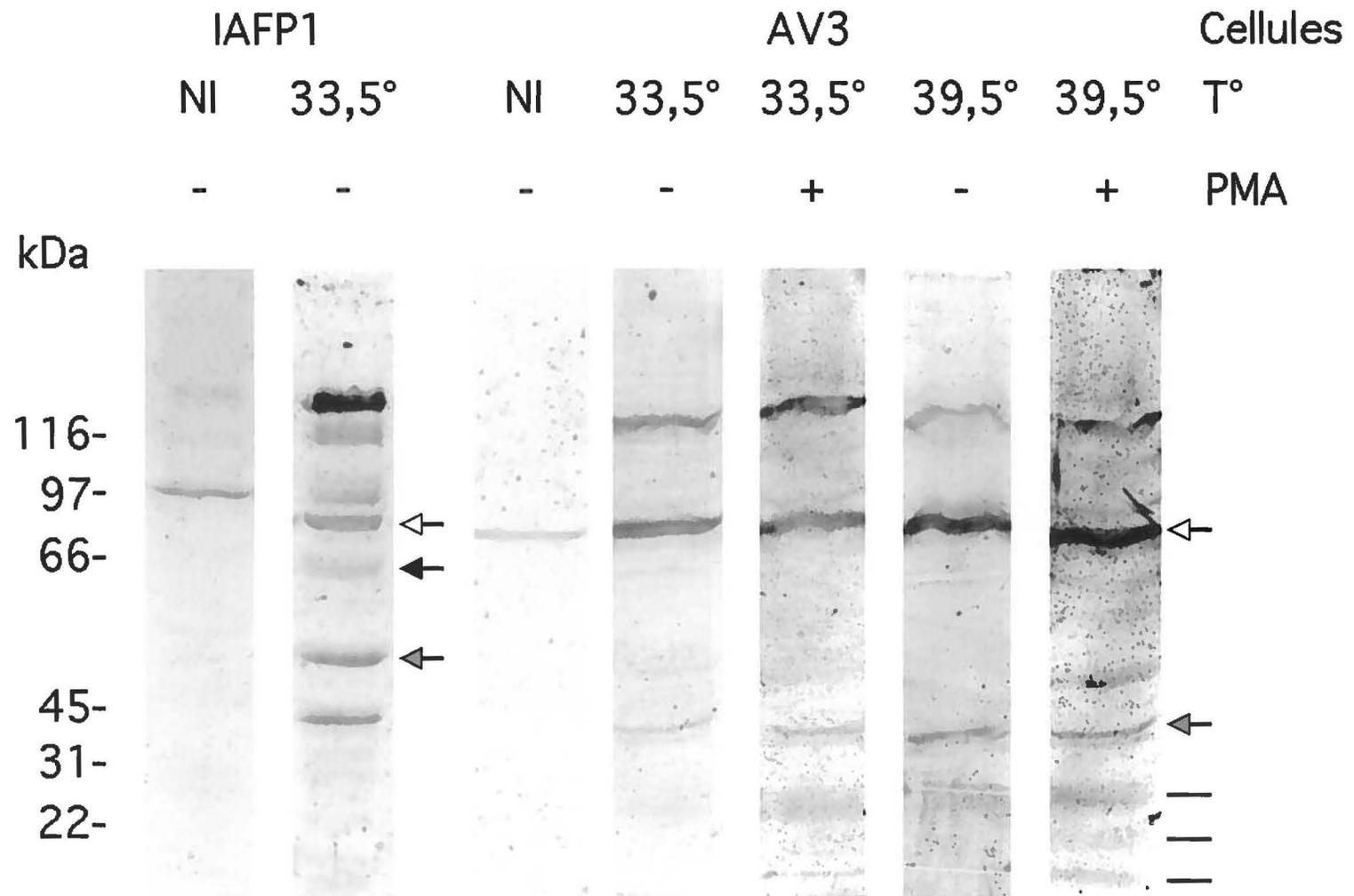


Figure 26: Augmentation stimulée par le PMA de la production de la protéine IE1-72K par le mutant *ts504* à température non-permissive, dans les cellules IAFP1. Cette augmentation n'est pas réprimée par une augmentation équivalente de la production de IE2-86K, et permet l'accumulation de la protéine IE1-72K. Symboles: (NI) cellules non-infectées, température permissive; *flèche noire*, IE1-72K.

ts504

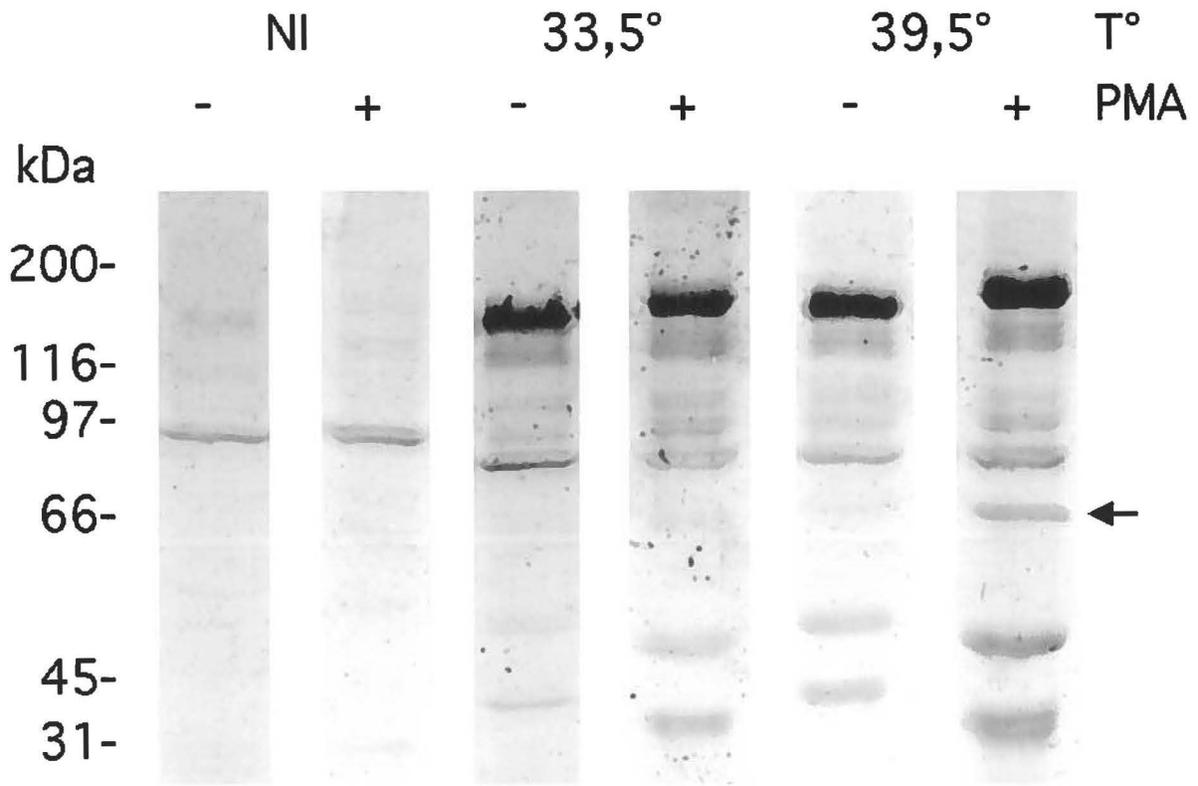


Figure 27: Buvardage de type Northern des ARN messagers de la souche sauvage HCMV AD169 et des mutants dans les fibroblastes humains IAFP-1 à 4 h post-infection et température non-permissive. Cette figure montre que les ARN messagers des gènes mutés sont bel et bien produits, même si les protéines non-fonctionnelles sont ensuite dégradées par la cellule. Symboles: (WT) souche sauvage.

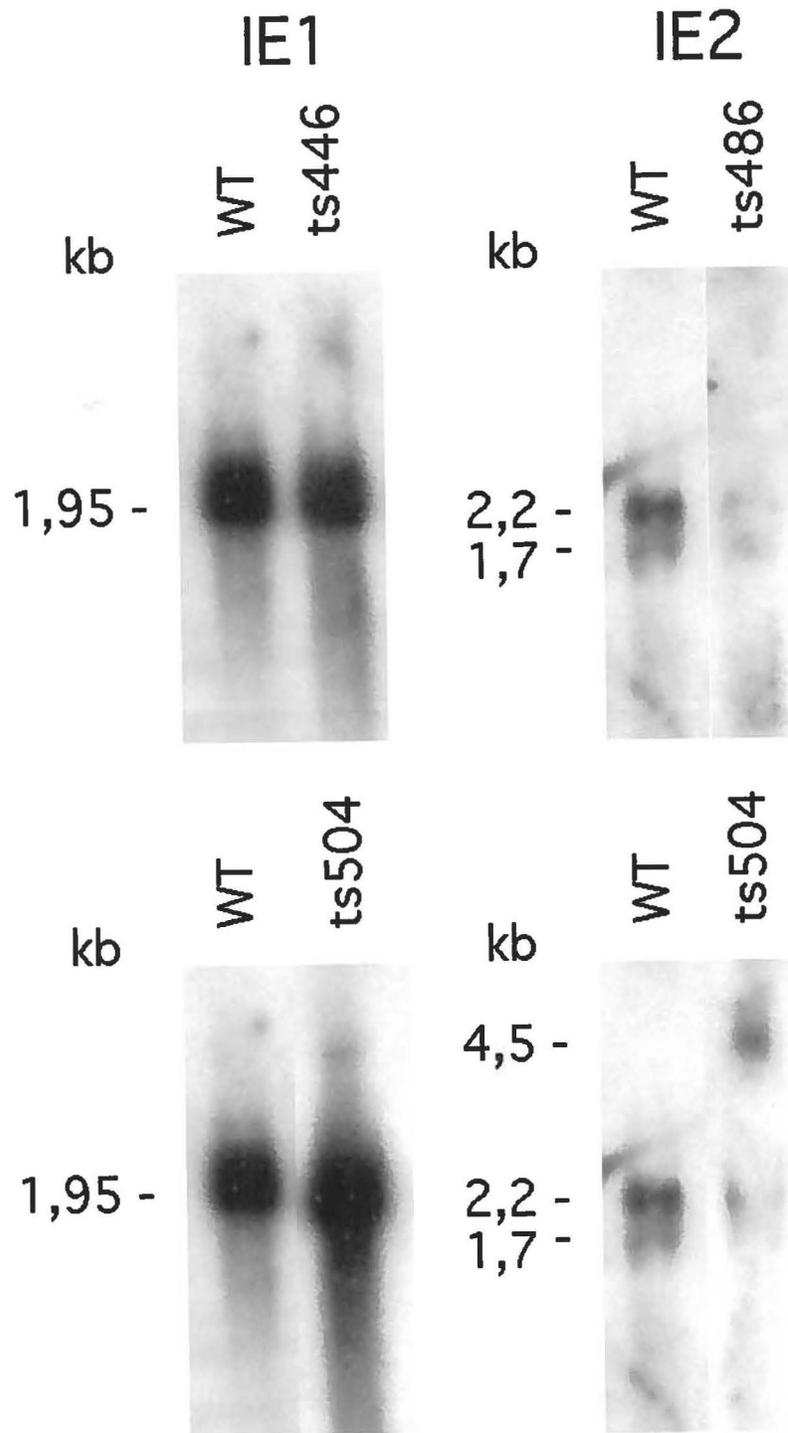


Figure 28: Séparation sur gel agarose/formaldéhyde d'échantillons d'ARN totaux extraits de cellules IAFP1 infectées par le virus HCMV (2 µg/puit). Symbole: (M) marqueurs Gibco BRL - 0,24-9,5 kb RNA Ladder.

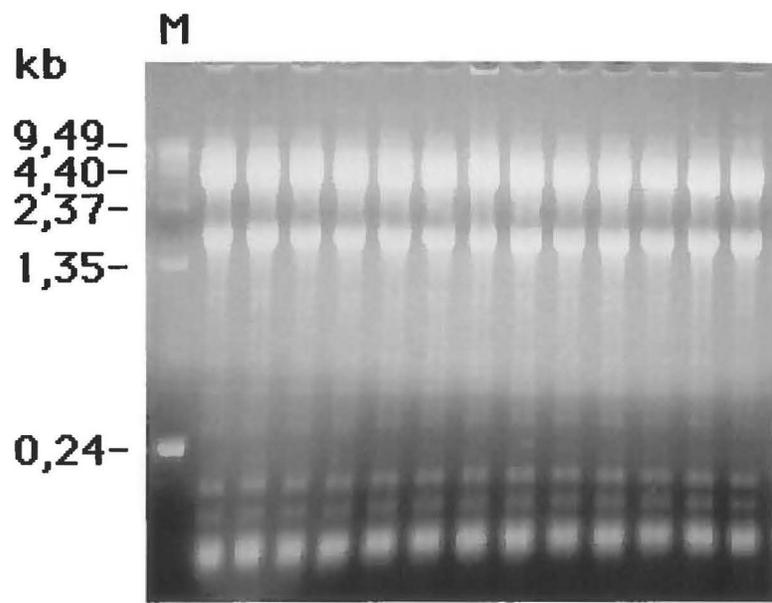


Figure 29: Buvardage de type Northern de l'ARN messager de la protéine IE1-72K pour la souche sauvage HCMV AD169 et les mutants, dans des fibroblastes humains IAFP1 à 1, 2 et 4 h post-infection. Les cellules sont incubées à température permissive (33,5°C; rangée du haut) et non-permissives (39,5°C; rangée du bas). Les sondes utilisées sont décrites dans la section Matériel et Méthodes. Symboles: (1, 2 et 4) lyse des cellules à 1, 2 ou 4 heures post-infection; (- et +) incubation en absence (-) ou présence (+) de PMA. La barre à 1,95 kpb indique la position de l'ARN messager de la protéine IE1-72K. Les bandes très foncées visibles dans le puits 1 h PI de la souche WT à 39,5°C en présence de PMA sont le résultat d'une coloration non-spécifique des ARN ribosomiaux causée par une surcharge des standards de taille d'ARN marqués à la digoxygénine dans le puits voisin. Elles ne correspondent d'ailleurs pas à la taille des ARNm précoces-immédiats.

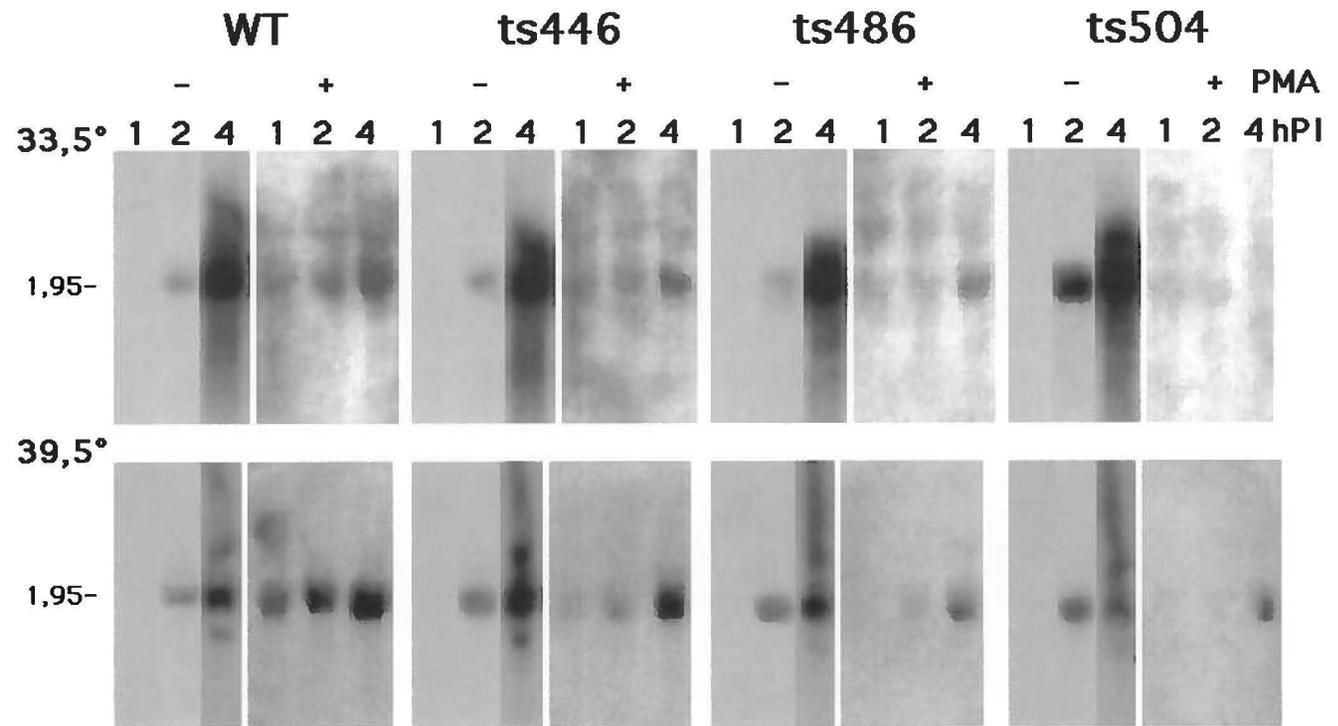
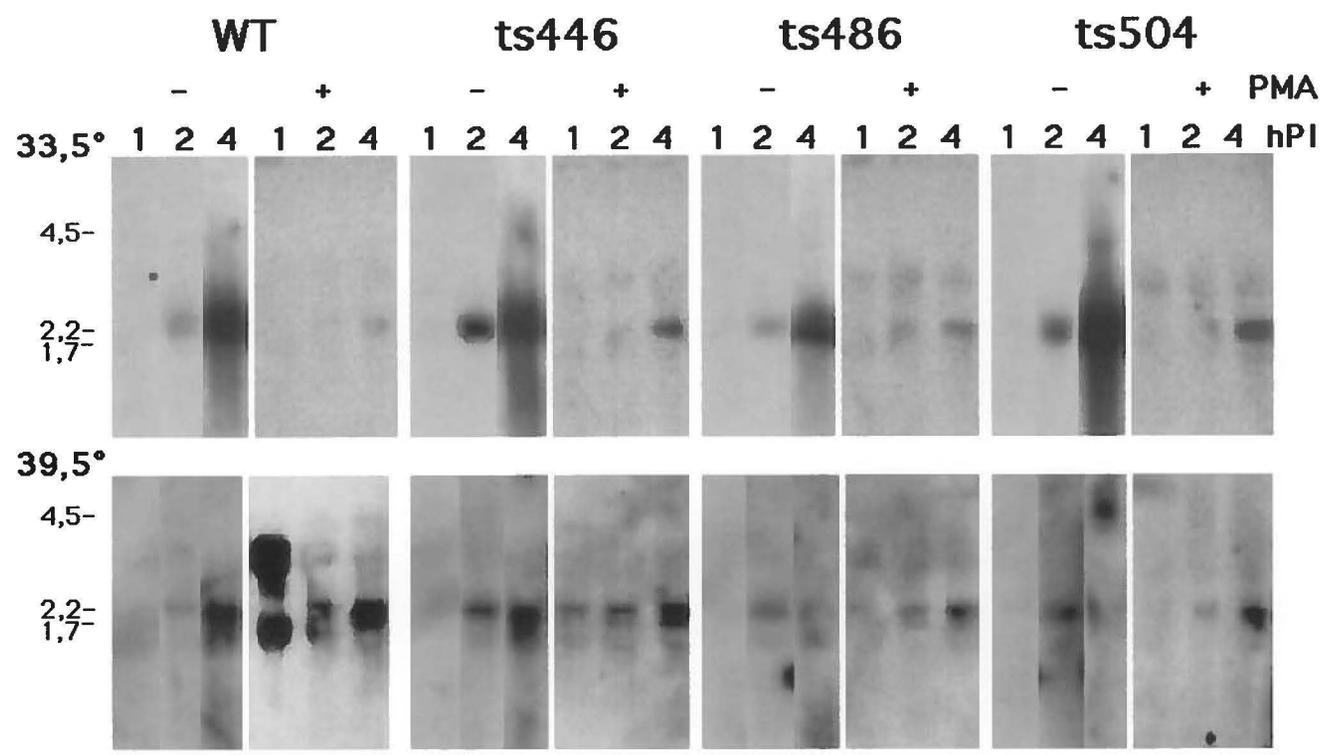


Figure 30: Buvarpage de type Northern de l'ARN messenger des protéines IE2 pour la souche sauvage HCMV AD169 et les mutants, dans des fibroblastes humains IAFP1 à 1, 2 et 4 h post-infection. Les cellules sont incubées à température permissive (33,5°C; rangée du haut) et non-permissives (39,5°C; rangée du bas). Les sondes utilisées sont décrites dans la section Matériel et Méthodes.

Symboles: (1, 2 et 4) lyse des cellules à 1, 2 ou 4 heures post-infection; (- et +) incubation en absence (-) ou présence (+) de PMA. Les barres à 2,2 et 1,7 kpb indiquent la position de l'ARN messenger des protéines IE2-86K et IE2-55K respectivement. Celle de 4,5 kpb (ts504, 4 h PI, 39,5°C, pas de PMA) correspond à la forme aberrante de la protéine IE2 de 150 kDa. Les bandes très foncées visibles dans le puits 1 h PI de la souche WT à 39,5°C en présence de PMA sont le résultat d'une coloration non-spécifique des ARN ribosomiaux causée par une surcharge des standards de taille d'ARN marqués à la digoxygénine dans le puits voisin. Elles ne correspondent d'ailleurs pas à la taille des ARNm précoces-immédiats.



ANNEXE I: LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

1. Hamelin, C., J. Yelle, **B. D'Amours** and Y.S. Chung. SV40 DNA extracted from persistently infected Vero cells using miniprep columns for plasmids. *Cell. Molec. Biol. Res.* **39**: 289-293, 1993
2. Jacques, C., **B. D'Amours** and C. Hamelin. Genetic relationship between mouse adenovirus-2 (strain K87) and human adenovirus-2. *FEMS Microbiol. Lett.* **115**: 7-12, 1994
3. Pramatarova, A., J. Yelle, **B. D'Amours** and C. Hamelin. Efficient recovery of cloned human cytomegalovirus DNA fragments from agarose gels. *J. Virol. Meth.* **46**: 1-10, 1994.
4. Jacques, C., L. Cousineau, **B. D'Amours**, G. Lussier and C. Hamelin. Molecular cloning, physical mapping and cross-hybridization of the murine adenovirus type 1 and type 2 genomes. *J. Gen. Virol.* **75**: 1311-1317, 1994
5. Hamelin, C., **B. D'Amours**, C. Pagé and Y.S. Chung. DNA topoisomerase activity associated with simian virus 40 nucleoprotein complexes. *Biochem. Cell. Biol.* **72**: 195-201, 1994
6. Hamelin, C. and **B. D'Amours**. Molecular basis for the reactivation of animal and human herpesviruses from latency. *Curr. Top. Vet. Res.* **1**: 27-36, 1994

Communications

1. **D'Amours, B.** and C. Hamelin. HCMV *ts* 504: a temperature-sensitive mutant of human cytomegalovirus defective in the synthesis of immediate-early protein IE1. 4th International CMV Conference, Paris, France (April 18-21, 1993). Résumé page 85
2. **D'Amours, B.** et C. Hamelin. Isolement d'un mutant de température du cytomégalovirus humain affectant la synthèse de la protéine précoce immédiate IE1. 61e Congrès de l'Association canadienne-française pour l'avancement des sciences, Rimouski, Québec (17-21 mai 1993). Résumé page 22
3. **D'Amours, B.** et C. Hamelin. HCMV *ts*446: un mutant thermosensible du cytomégalovirus humain incapable de synthétiser la protéine précoce-immédiate IE1 sous conditions restrictives. 62e Congrès de l'Association canadienne-française pour l'avancement des sciences, Montréal, Québec (16-20 mai 1994). Résumé page 19
4. **D'Amours, B.** et C. Hamelin. Localisation d'une mutation affectant la synthèse de la protéine précoce-immédiate IE1 dans le génome du cytomégalovirus humain. 37e Congrès de la Fédération canadienne des sociétés de biologie, Montréal, Québec (16-18 juin 1994). Résumé page 66
5. **D'Amours, B.** and C. Hamelin. Identification of the mutation in a temperature-sensitive mutant of HCMV defective in the synthesis of immediate-early protein IE1 (*ts* 446). 5th International CMV Conference, Stockholm, Suède (April 21-25, 1995). Résumé page 88
6. **D'Amours, B.** et C. Hamelin. Identification de la mutation bloquant la synthèse de la protéine précoce-immédiate IE1 chez un mutant thermosensible du cytomégalovirus humain (HCMV *ts*446). 45e Congrès annuel de la Société canadienne des microbiologistes, Kingston, Ontario (12-15 juin 1995). Résumé page 63

ANNEXE II: PUBLICATION

Molecular basis for the reactivation of animal and human herpesviruses from latency

Claude Hamelin and Benoit D'Amours

Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier, C.P. 100, Laval-des-Rapides, Québec, Canada H7N 4Z3

ABSTRACT

Latency is a general mechanism used by herpesviruses to exist for extended periods of time in an infected host. Copies of the viral genetic information persist in animals or humans by processes not requiring the continuous production of infectious virus. Serious economical, scientific and medical problems are caused by the reappearance of infectious virus in a population. Many research works have been done lately with human and animal herpesviruses so as to get information on latency and reactivation at the molecular level.

INTRODUCTION

Animal herpesviruses, like their human counterparts, have a propensity to exist in an infected host in a latent form for extended periods of time without signs of overt clinical disease. Later reactivation of infectious virus within the individual harboring the latent infection has at least two biologically important consequences: 1) the appearance of clinically apparent features, which may or may not resemble those associated with the disease event during initial infection; and 2) the neoplastic alteration of the latently infected cell with the subsequent appearance of tumors. Because of the

medical and economical problems caused by the reappearance of infectious virus in a population, much attention has been given lately to a wide variety of human and animal herpesviruses capable of existing in the latent state (Table 1). Some of them, like the murine cytomegalovirus, already appear as *in vivo* or *in vitro* model systems to analyze the virus-host cell interactions with respect to productive virus-replication, virus latency, and virus-induced cell transformation [1-4].

All herpesviruses examined to date are similar in morphology and have four biological properties in common: 1) their genome codes for enzymes involved in nucleic acid metabolism; 2) DNA synthesis and capsid assembly occur in the nucleus; 3) production of infectious progeny virus is invariably accompanied by cell killing; and 4) viruses remain latent in their natural host. In this state, the viral genome takes a circular form and only a small subset of viral genes are expressed. These properties shared by herpesviruses are important with regards to the phenomenon of latency.

ARCHITECTURE OF VIRUS PARTICLES

The typical herpesvirion (Fig. 1) is made of four architectural elements: 1) a core consisting of a fibrillar spool on which