

50376
1990
227

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES - ARTOIS

50376
1990
227

N° d'Ordre :

THESE

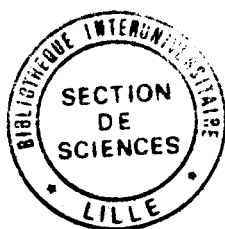
présentée pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES - ARTOIS
spécialité "Sciences de la Vie et de la Santé"**

par

Benoît van HILLE

**ANALYSE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE DE L'ACTIVITE
ANTINEOPLASIQUE DU PARVOVIRUS MINUTE VIRUS OF MICE
SUR DES LIGNEES FIBROBLASTIQUES DE RAT TRANSFORMEES
PAR DIFFERENTS ONCOGENES.**



Soutenue le 09/07/90 devant la commission d'examen

Président : Pr. J. MONTREUIL

Rapporteurs : Pr. J. KREMBEL
Pr. D. MARZIN

Examineur : Dr. J. SCHLEHOFER
Pr. J. ROMMELAERE



5 années dans un même lieu laissent des traces, beaucoup de reconnaissance que je ne pourrai que bien imparfaitement exprimer dans ces quelques lignes.

Je remercie Dominique STEHELIN, je le remercierai même doublement, d'une part pour avoir lancé le groupe "Oncosuppression Parvovirale" dans son unité U 186, et d'autre part pour m'avoir permis d'y effectuer ma thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie Jean ROMMELAERE de m'avoir accueilli dans son équipe, d'avoir su être un directeur de thèse enthousiaste et exigeant, et pour m'avoir inculqué la rigueur scientifique. Il a aussi maintenu intact mes tendances végétales ; nos conversations et échanges botaniques ont probablement du servir d'adjuvant pour poursuivre certaines expériences d'abord peu probantes !

Je remercie Monsieur le Président et Messieurs les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail, et plus particulièrement Jorg SCHLEHOFER qui a accepté de venir de Heidelberg pour quelques heures.

Je remercie Nathalie SALOME pour sa patience et ses encouragements, en particulier quand il fallait sub-cultiver et analyser des séries de 10 à 15 clones cellulaires. Oui, la synergie aidant, je crois que nous avons formé un duo efficace.

Je remercie Jan CORNELIS pour le temps qu'il passait pour répondre à mes nombreuses questions, et pour les conseils qu'il me prodiguait volontiers.

Je remercie tous les membres du groupe "PARVO" pour leur disponibilité et leur sympathie. La diversité des points de vue, exprimée formellement dans les réunions du mercredi 11h ou librement entre deux pains au chocolat a toujours été fructueuse. Qu'ils soient aussi remerciés pour leur patience face aux débordements de verdure que je leur imposais, les baobabs restant les moins envahissants !

Je remercie également Nicole DEVASSINE et Marie-Christine BOUCHER pour leur aide dans la dactylographie de ce mémoire.

Enfin, je remercie tous les membres de l'U 186 et de l'équipe de l'ULB que je n'ai pas encore nommés pour leur aide constante et l'ambiance chaleureuse qu'ils ont su créer, à Lille comme à Bruxelles.

Je remercie le Centre National de la Recherche Scientifique et la Ligue Contre le Cancer pour l'aide financière qu'ils m'ont accordée durant la préparation de cette thèse.

PUBLICATIONS

Salomé, N., van Hille, B., Geuskens M. and Rommelaere, J.
Partial reversion of conditional transformation correlates with a decrease in the sensitivity of Rat cells to killing by parvovirus MVMp but not in their capacity for virus production : effect of a temperature-sensitive *v-src* oncogene.
Journal of Virology 63, 4797-4807 (1989).

van Hille, B., Duponchel, N., Salomé, N., Spruyt, N., Cotmore, S.F., Tattersall, P., Cornelis, J.J. and Rommelaere, J.
Limitations to the expression of parvoviral nonstructural proteins may determine the extent of sensitization of EJ-*ras*-transformed rat cells to minute virus of mice.
Virology 171, 89-97 (1989).

Salomé, N., van Hille, B., Duponchel, N., Meneguzzi, G., Cuzin, F., Rommelaere, J. and Cornelis, J.J.
Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMp is restricted to specific oncogenes.
Oncogene 5, 123-130 (1990).

TABLE DES MATIERES

	<u>page</u>
AVANT-PROPOS	6
INTRODUCTION	8
I). Les Parvovirus.	10
1. Propriétés Générales des Parvovirus.	10
1.1. Nomenclature et Classification des Parvovirus.	10
1.2. Pathogénicité des Parvovirus.	11
2. Les Parvovirus Autonomes.	12
2.1. Généralités.	12
2.2. Le Parvovirus Minute Virus of Mice (MVM).	12
2.2.1. Organisation du Génome de MVMp.	13
2.2.2. Fonctions et Rôles de la Protéine NS-1.	14
2.2.3. Organisation des Promoteurs de MVMp.	16
2.2.4. Le Mécanisme d'Atténuation de la Transcription.	18
2.3. Le Cycle Viral de MVMp.	19
2.3.1. L'Infection Virale.	19
2.3.2. La Réplication de MVMp.	19
2.3.3. La Synthèse des Protéines.	21
2.3.4. L'Assemblage et la Maturation de Virions.	21
2.4. Les Interactions entre Virus et Cellules-Hôtes.	22
2.4.1. L'Infection Restrictive.	22
2.4.2. L'Infection Abortive.	23
2.4.3. L'Infection Cryptique.	23
II). La Transformation Cellulaire.	24
1. Introduction.	24
2. Quelques Oncogènes.	25
2.1. <i>v-src</i> .	25
2.2. <i>c-Ha-ras</i> .	26
2.3. <i>v-myc</i> .	27
3. Quelques Virus Transformants à ADN.	27
3.1. Le Virus Simien 40.	27
3.2. Le Virus du Papillome Bovin.	27
4. L'Activation d'Oncogènes et la Progression Tumorale.	28
5. La Mort Cellulaire.	29
III). Parvovirus et Oncosuppression.	31
1. L'Association des Parvovirus avec les Tumeurs.	31
2. L'Infection Parvovirale, Persistance, Latence et Activation.	31
3. La Surveillance de Tumeurs Spontanées par les Parvovirus.	33
4. L'Inhibition par les Parvovirus de la Tumorigenèse Induite.	33
5. Les Mécanismes Possibles de l'Oncosuppression Parvovirale.	35
5.1. La Réponse Immunitaire.	35
5.2. Induction de l'Interféron.	36
5.3. Induction du TNF.	36
5.4. Effets Directs des Parvovirus sur les Cellules Transformées.	36
5.4.1. Réversion du Phénotype Transformé par les AAV.	37
5.4.2. Action Cytocide des AAV sur des Cellules Initiées.	38
5.4.3. Action Cytotoxique des Parvovirus Autonomes sur des Cellules Transformées.	38
5.4.4. Vers des Applications Thérapeutiques ?	39
6. Conclusion.	40

RESULTATS, DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS	42
I. Présentation du Travail.	43
II. Action du Parvovirus MVMP sur une Lignée de Cellules NRK Transformées par un Mutant Thermosensible de l'Oncogène v-src.	44
Résumé de l'Article 1.	44
1. Caractérisation des Lignées Cellulaires Etudiées.	44
2. Sensibilité des Cellules ts339/NRK à l'Action Lytique de MVMP.	45
3. Etape du Cycle Viral Impliquée dans la Sensibilisation des Cellules ts339/NRK.	46
4. Conclusion.	46
III. Influence de Facteurs Cellulaires et Viraux sur l'Oncolyse Exercée par MVMP.	47
Résumé de l'Article 2.	47
1. Caractérisation et Sensibilité à MVMP des Cellules FR3T3 et NRK Transformées par c-Ha-ras.	47
2. Analyse du cycle viral de MVMP.	47
3. Conclusion.	48
IV. Influence de l'Agent Transformant sur l'Oncolyse Exercée par MVMP.	49
Résumé de l'Article 3.	49
1. Obtention et Caractérisation de Lignées Cellulaires Transformées par Différents Oncogènes.	49
2. Sensibilité à MVMP des Lignées FR3T3 Transformées Obtenues.	49
3. Conclusion.	50
V. La Transformation de la Lignée FR3T3 par l'Oncogène c-Ha-ras Stimule la Transcription des Gènes Viraux Initiés au Niveau du Promoteur Promoteur P4.	51
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	54
1. Rôle de l'Oncogène.	55
2. Rôle du Type Cellulaire.	55
3. Relation entre Sensibilisation et Déroulement du Cycle Parvoviral.	56
4. Modèle Unificateur.	57
5. Nature des Facteurs Cellulaires Impliqués.	59
5.1. Le Facteur H.	59
5.2. Le Facteur X.	59
BIBLIOGRAPHIE	61
ANNEXE : Articles 1 à 3	75

AVANT-PROPOS

Parmi les maladies modernes, dites de société, le cancer est probablement l'une des plus porteuses de tabous et de frayeurs. Apparemment spontanés, mais en fait le plus souvent favorisés par des facteurs externes de l'environnement, la plupart des cancers sont associés à l'activation de gènes cellulaires appelés oncogènes (*onc*) que de nombreuses équipes de recherche, à travers le monde, décortiquent avec pugnacité. Directeur de l'une d'entre-elles, et non des moindres - l'U186 - Dominique Stéhelin pouvait dire : "découvrir et comprendre les mécanismes qui engendrent les processus cancéreux, et nous pourrons les contrer plus finement que ne le font les traitements d'aujourd'hui, chimiothérapie et radiothérapie, qui ressemblent trop à de l'artillerie lourde". Et tel David face à Goliath, l'un des plus petits virus à ADN, le parvovirus, ne pourrait-il pas devenir un jour l'un des agents de cette unité légère de commando si recherchée.

Pour les parvovirus, tout commença vraiment avec le travail historique de Toolan en 1967 qui montra qu'une infection par des parvovirus entraînait une inhibition spectaculaire de la formation de tumeurs spontanées chez des hamsters. Plus tard, des études épidémiologiques réalisées chez l'homme suggérèrent qu'une infection parvovirale latente pourrait être associée à une réduction de l'incidence de certains carcinomes. Depuis, un faisceau d'observations a permis d'accorder à la famille des parvoviridés un réel pouvoir antinéoplasique. Toutefois, son analyse chez l'animal était entravée par la complexité des événements qui se déroulent *in vivo*. Mais Suzanne Mousset et Jean Rommelaere, en 1982, ont pu transposer ces résultats *in vitro* en montrant que le parvovirus MVM inhibait la transformation de cellules murines, en provoquant la lyse préférentielle des cellules transformées par le virus SV40.

L'équipe "Parvovirus et Oncosuppression" de l'U186, dont je fais partie depuis plus de quatre ans, s'attache actuellement à vérifier cette hypothèse d'oncolyse sélective des parvovirus, et à évaluer les possibilités d'applications thérapeutiques de l'activité antinéoplasique de ces parvovirus.

Dans ce mémoire, après un rappel sur la biologie des parvovirus, je décrirai, d'une part, les mécanismes qui conduisent et accompagnent la transformation cellulaire, et d'autre part, ce que nous connaissons de l'oncosuppression parvovirale. Ensuite je présenterai notre travail qui vise à définir les aspects cellulaires et moléculaires de l'oncolyse sélective exercée par le parvovirus Minute Virus of Mice sur des fibroblastes de rat transformés par différents oncogènes.

INTRODUCTION

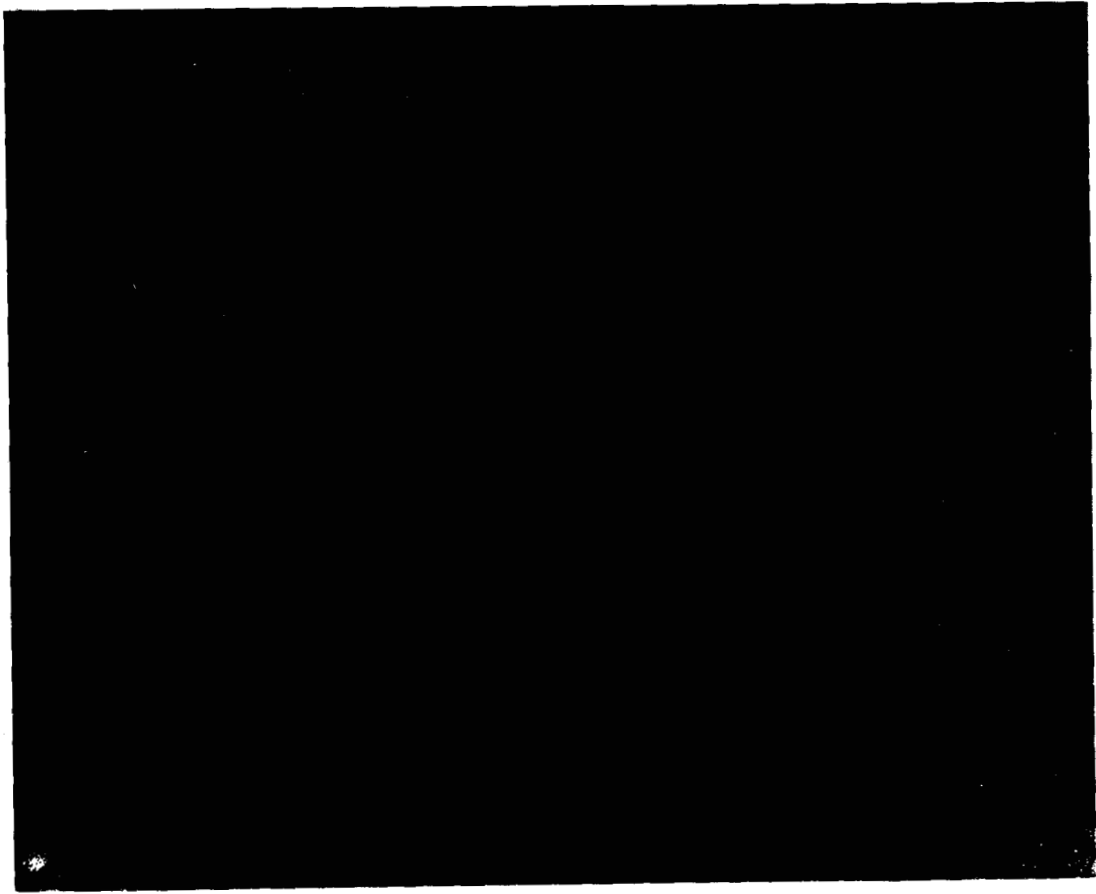


Figure 1. Photographie en microscopie électronique de particules virales extraites de cellules murines A9 après infection par le parvovirus Minute Virus of Mice.

Tableau 1. Classification et origine des membres de la famille des Parvovirus (d'après Tattersall et Cotmore 1987).

Acronyme	Nom développé	Source et date du premier isolement
Genre des Parvovirus (non défectifs)		
RV	Kilham rat virus	sarcome de foie de rat (1959)
H-1	Hamster osteolytic virus	tumeur humaine transplantée HEP-1 (1960)
RT	RT virus	lignée établie de cellules de rat AT (1967)
TVX	Tumor virus	lignée établie de cellules tumorales (1971)
MVM	Minute virus of mice	stock d'adénovirus de souris (1966)
LuIII	LuIII virus	lignée établie de cellules humaines Lu 106 (1971)
B19	B19 virus	Sérum de sang de donneur asymptomatique (1975)
BPV	Bovine parvovirus	fèces de veau (1961)
PPV	Porcine parvovirus	stock de virus cholérique de porc (1966)
FPV	Feline parvovirus	
variants à spécificité d'hôte de FPV :		
-FPLV	Feline panleukopenia virus	rate de léopard (1965)
-MEV	Mink enteritis virus	rate et foie de vison (1952)
-CPV	Canine parvovirus	fèces de chien (1979)
LPV	Lapine parvovirus	fèces de lapin (1977)
ADV	Aleutian mink disease virus	tissus de vison (1973)
GPV	Goose parvovirus	tissus d'oie (1973)
membres possibles		
MVC	Minute virus of canines	fèces de chien (1968)
HB	HB virus	tumeurs et placentas humains (1964)
RA-1	----	----
Genre des Dépendovirus (défectifs)		
AAV-1	Adeno-associated virus type 1	stock de virus simien 15 (macaque rhesus) (1865)
AAV-2	Adeno-associated virus type 2	stock d'adénovirus 12 humain (souche H.M.) (1966)
AAV-3	Adeno-associated virus type 3	stock d'adénovirus 7 humain (sources H.K. et T) (1966)
AAV-4	Adeno-associated virus type 4	stock de virus simien 12 (singe vert africain) (1967)
AAV-5	Adeno-associated virus type 5	lésion condylomateuse pénienne humaine (1984)
BAAV	Bovine adeno-associated virus	stock d'adénovirus bovin 1 (1970)
CAAV	Canine adeno-associated virus	stock de virus hépatique canin (1969)
AAAV	Avian adeno-associated virus	stock de virus bronchitique de caille (1967)
membres possibles		
EAHV	Equine adeno-associated virus	----
OAAV	Ovine adeno-associated virus	fèces de mouton (1979)
Genre des Densovirus		
Galleria DNV	----	chenille de Galleria mellonella (1964)
Junonia DNV	----	chenille de Junonia coenia (1972)
Agraulis DNV	----	----
Bombyx DNV	----	----
membres possibles		
Aedes DNV	----	----
Acheta DNV	----	----
Sibine DNV	----	----
Diatraea DNV	----	----
Pieris DNV	----	----
Leucorrhinia DNV	----	----
Periplaneta DNV	----	----
Simulium DNV	----	----

I) Les Parvovirus.

1. Propriétés Générales des Parvovirus.

1.1. Nomenclature et Classification.

Les parvovirus (du latin parvus = petit) comptent parmi les plus petits virus à ADN connus et ont été isolés tant chez les invertébrés que chez les vertébrés, dont l'homme (Cukor et al. 1984, Siegl 1985).

L'appartenance au groupe des parvovirus est basée sur les caractéristiques physico-chimiques suivantes. Les virions sont des particules non-enveloppées dont le diamètre est compris entre 18 et 26 nm ; ces dernières renferment une molécule d'ADN linéaire monocaténaire d'environ 5000 nucléotides dont le poids moléculaire varie de $1,2$ à $2,0 \times 10^6$ Daltons. Des observations au microscope électronique ont mis en évidence une capsid à symétrie icosaédrale formée de 32 capsomères (figure 1). Les particules virales ont une densité de $1,38$ à $1,47$ g/ml en gradient de chlorure de césium et sédimentent à environ 110 unités de Svedberg. Leur poids moléculaire est de $5,5$ à $6,2 \times 10^6$ Daltons. Les parvovirus sont extrêmement stables à la chaleur (ils résistent 60 minutes à 56°C), à la dessiccation et à la congélation, aux solvants lipidiques et détergents, à des pH variant de 3 à 9, et à de fortes concentrations en sels (Tattersall et Ward 1978, Siegl 1985, Cotmore et Tattersall 1987). De plus les particules ne contiennent pas de quantités détectables d'ARN, de carbohydrates, de lipides, d'enzymes d'origine cellulaire, ni de protéines de bas poids moléculaire de type-histone (Siegl 1985). Les virions infectieux peuvent contenir, soit le brin négatif d'ADN, soit l'un ou l'autre des deux brins complémentaires encapsidés séparément. La réplication virale s'accompagne d'une accumulation de molécules d'ADN et de protéines virales dans le noyau, sous la forme de capsides vides et de virions infectieux, et elle est dépendante d'une ou plusieurs fonctions cellulaires actives en phase S tardive ou G2 précoce du cycle cellulaire (Matthews 1982). Ces caractéristiques - et le fait que certains parvovirus ne se multiplient, dans des conditions normales, qu'en présence d'un virus aidant - ont été utilisées pour diviser la famille des Parvoviridés en trois genres : les Densovirus, les Virus Adéno-Associés, et les Parvovirus, repris dans le **Tableau I** avec l'origine et la date de leur isolement (Tattersall et Ward 1978, Siegl 1985, Cotmore et Tattersall 1987).

Les Densovirus infectent des insectes, principalement des lépidoptères, ils sont autonomes et les deux brins de polarité "plus" ou "moins" d'ADN peuvent être encapsidés, séparément.

La réplication des Virus Adéno-Associés (ou AAV), parfois aussi appelés Dépendovirus, est généralement déficiente et dépend alors d'une co-infection par un virus aidant, le plus souvent un adénovirus (d'où leur nom générique), ou un virus herpès (Siegl 1985).

Le genre des Parvovirus, ou parvovirus autonomes, comprend tous les parvovirus qui infectent des vertébrés et se répliquent sans l'aide d'autres virus auxiliaires dans la cellule-hôte.

A côté de leurs caractéristiques physicochimiques communes, les deux sous-groupes des parvovirus autonomes et déficients présentent d'importantes différences, outre leurs exigences en virus aidant : i) peu d'homologies de séquences rapprochent les virus des deux genres ; ii) le

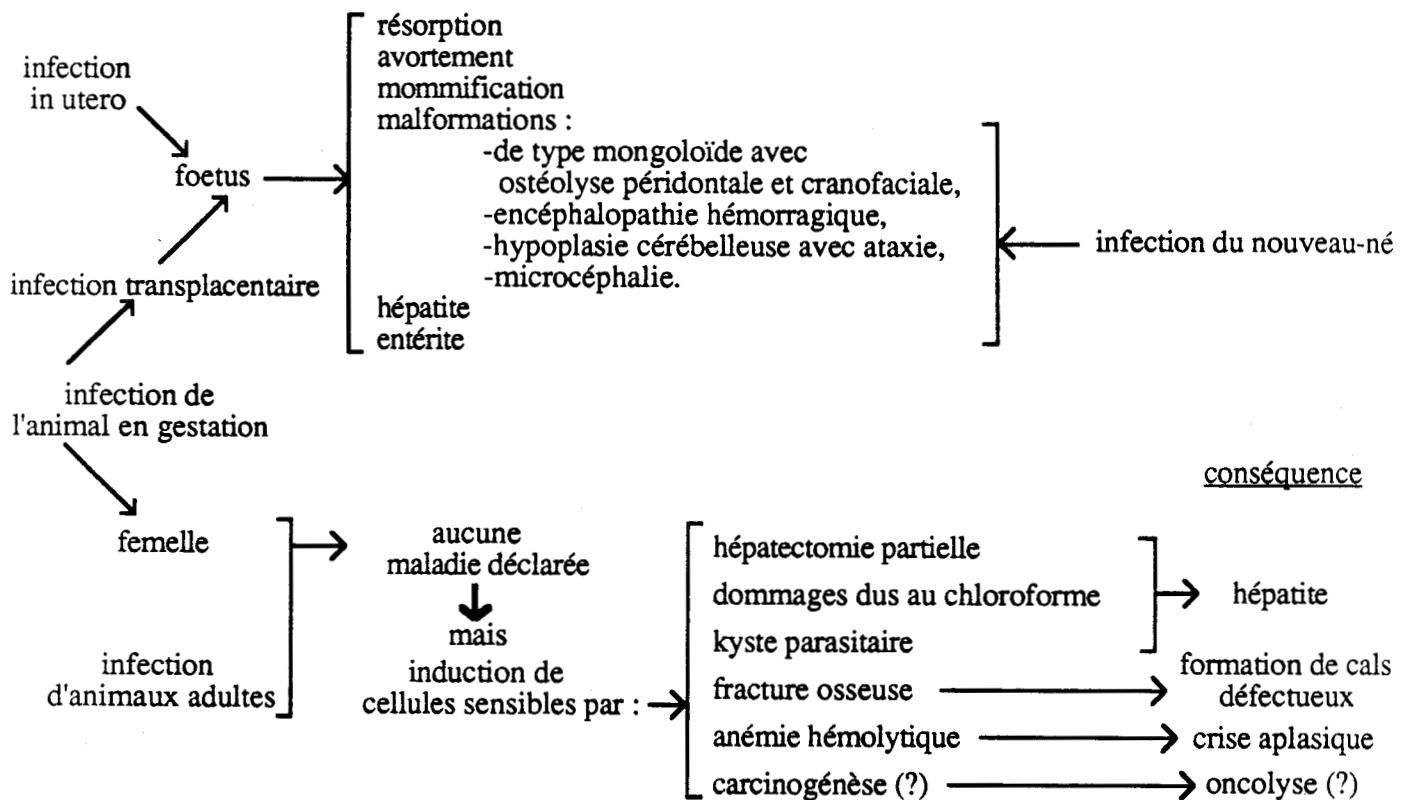


Figure 2. Spectre pathologique des Parvovirus (d'après Cotmore et Tattersall 1987).

génomique des AAV présente des séquences terminales répétées inversées identiques, tandis que celui des autonomes possède des séquences terminales palindromiques différentes aux deux extrémités (avec toutefois l'exception du parvovirus B19) (Tattersall et Ward 1978) ; iii) les AAV ne paraissent être associés à aucune maladie (Georg-Fries et al. 1984), tandis que les parvovirus autonomes peuvent conduire, dans des cas précis, à toute une série de pathologies.

1.2. Pathogénicité des Parvovirus.

Ce chapitre concerne dans les faits essentiellement les parvovirus autonomes. De nombreuses études sur la pathogénicité de ces derniers ont montré que ces virus peuvent occasionner des anomalies et morts fœtales et néonatales en détruisant spécifiquement certaines populations de cellules qui prolifèrent rapidement durant le développement normal des tissus (Siegl 1984). Certains parvovirus traversent la barrière placentaire et infectent les fœtus. Dans ce cas, les infections précoces au cours de la gestation sont susceptibles d'entraîner des syndromes généralisés souvent létaux qui impliquent les tissus mésodermiques et conduisent à des résorptions, avortements ou momifications. Des inoculations plus tardives permettent des naissances viables mais accompagnées d'anomalies congénitales telles qu'hypoplasie cérébelleuse et encéphalopathie, dégénérescences musculaire et osseuse, hépatite ou entérite néo-natale. L'intensité et la gravité de ces désordres cliniques varient avec la voie et l'importance de l'inoculation, la souche virale, l'espèce hôte, et la période de gestation (Siegl 1984).

Les animaux sont aussi particulièrement sensibles à certaines infections parvovirales durant les premiers jours post-partum, causant par exemple une entérite chez le chien et le vison, et une panleucopénie chez le chat (Siegl 1984). En outre, l'inoculation de certaines souches parvovirales à des hamsters nouveau-nés conduit à des croissances retardées et des déformations de type "mongoloïde" dues à des attaques sélectives sur les tissus squelettiques et dentaires en développement (Toolan 1960). Au contraire, chez l'animal mature, ces mêmes tissus sont habituellement résistants, et, par conséquent, rares sont les parvovirus qui causent des désordres cliniques chez l'adulte. La pathologie occasionnelle que l'on observe chez ces individus n'affecte que des cellules cibles en multiplication active, tels que l'épithélium intestinal (entérite), le foie en régénération (hépatite), la rate, les tissus lymphoïdes et la moelle osseuse (Siegl 1984).

Jusqu'à présent, seul le parvovirus B19 est connu pour être étiologiquement associé à des maladies chez l'homme (Anderson et Pattison 1984). Les effets pathologiques majeurs de ce virus peuvent être attribués à son tropisme préférentiel pour les cellules précurseurs de la lignée érythroïde (Kimsey et al. 1986). B19 est ainsi responsable d'érythème infectieux (cinquième maladie) chez l'enfant, de crises aplasiques associées à certaines anémies hémolytiques, et d'arthropathies transitoires (consécutives à une infection chez l'adulte). Beaucoup d'infections restent cependant asymptomatiques, la majorité de la population est séropositive ; on estime ainsi que 30 à 60 % de la population anglaise a développé une virémie à B19. B19 peut traverser la barrière placentaire chez des femmes infectées et induire quelques cas d'avortements (Morinet 1987, Leads from the MMWR 1989, Pattison 1989).

2. Les Parvovirus Autonomes.

2.1. Généralités.

Les parvovirus autonomes possèdent un génome formé d'une molécule d'ADN linéaire simple brin, d'environ 5000 à 5500 paires de bases (pb), de polarité généralement moins (brin complémentaire des ARNm), et terminé à ses deux extrémités par une structure dite en épingle à cheveux. Les différents parvovirus autonomes de mammifères présentent une stratégie de réplication et une organisation de leur génome similaires. Ainsi la partie 5' code pour les protéines de capsides, et la partie 3' pour les protéines non-structurales (Cotmore et al. 1983).

Les parvovirus autonomes peuvent infecter, naturellement, l'homme, le chat, le chien, le vison, le raton laveur, la souris, le rat, le lapin, le bétail et l'oie avec une spécificité d'hôte relativement étroite. Toutefois, sous certaines conditions expérimentales, cette dernière peut être étendue à d'autres espèces. Ainsi, des virus de souris (MVM), de rat (H-1) et humain (LuIII) sont capables de se répliquer dans le hamster syrien. Le virus H-1, dont l'hôte naturel est le rat, peut également induire une virémie chez l'homme. La transmission des parvovirus est généralement horizontale (par les fèces, sécrétions salivaires et expéditions) et parfois verticale (transplacentaire chez les mammifères et chez l'oiseau) (Matthews 1982).

Outre la spécificité d'espèce précédemment citée, la réplication de ces parvovirus dépend également de certaines fonctions cellulaires exprimées transitoirement en phase S ou G2, en conséquence, les parvovirus se multiplient préférentiellement dans les noyaux de cellules en division active. Cette multiplication s'accompagne de la formation d'inclusions intranucléaires, le nucléole reste présent mais est légèrement hypertrophié (Matthews 1982).

La réplication des parvovirus autonomes est aussi contrôlée par le stade de différenciation de la cellule infectée, propriété attendue du fait que la plupart des parvovirus autonomes ont été isolés à partir de tissus tumoraux. Le cas le plus exemplaire concerne deux souches du parvovirus MVM, MVMp et MVMi qui présentent des spécificité cellulaires exclusives, respectivement pour des fibroblastes et des lymphocytes (Cotmore et Tattersall 1987).

Ces différentes caractéristiques virales sont communes à la plupart des espèces de parvovirus autonomes isolées à ce jour (cf Tableau I). Les disparités observées lors de l'analyse de leurs **protéines de capsides** et de leur identité antigénique ont seulement permis de répartir ces virus en deux sous-groupes, d'une part les virus du sérotype FPV, et d'autre part, autour de RV, les espèces MVM, H-1, PPV et LuIII (Mengeling et al. 1986).

Le parvovirus MVM, l'un des mieux étudiés, possède une organisation génomique représentative de celle des autres parvovirus autonomes et fera l'objet d'une description détaillée dans le chapitre suivant. En outre, les travaux développés dans cette thèse concerneront plus particulièrement le virus MVM.

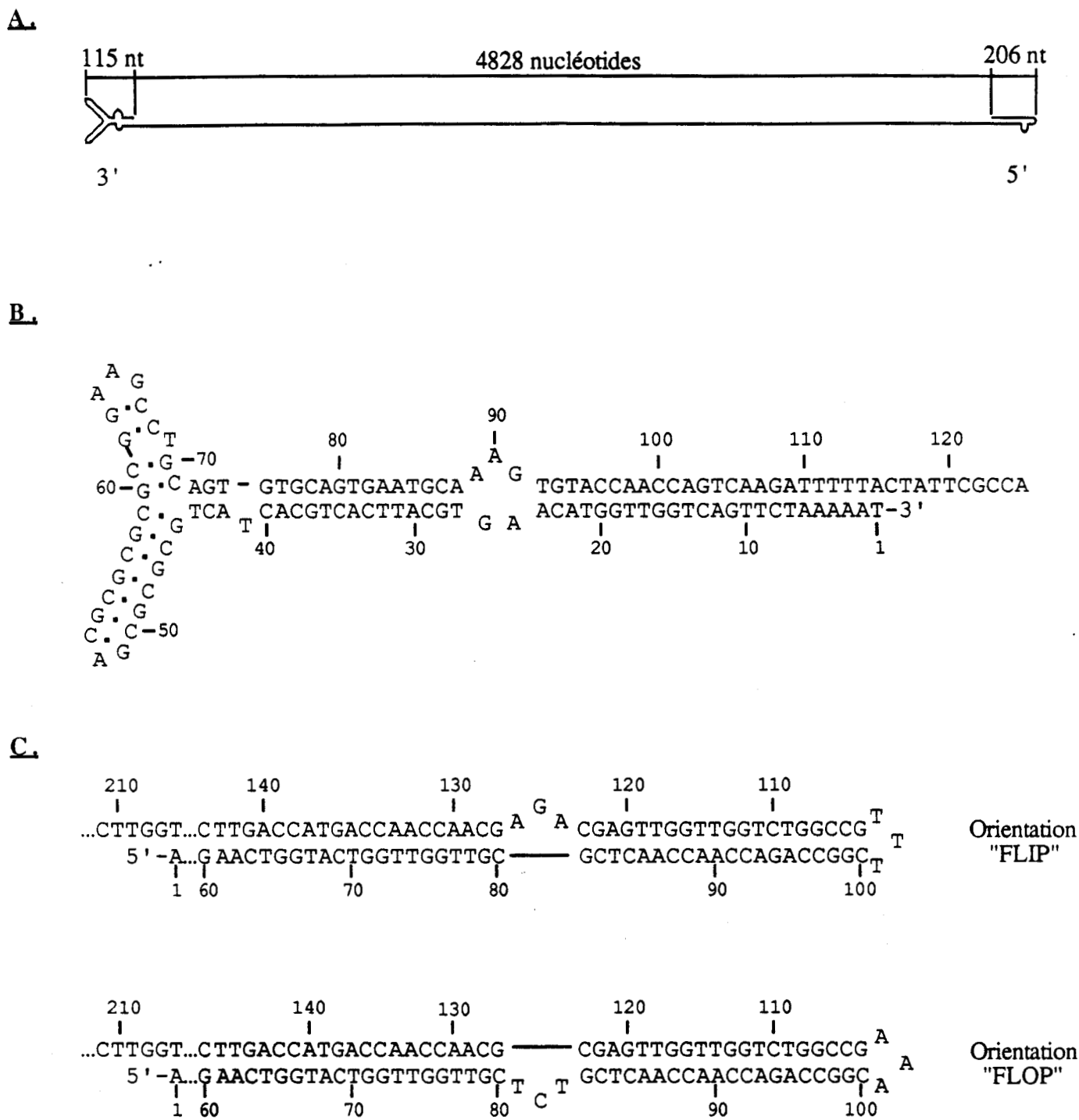


Figure 3. Structure de l'ADN viral de MVM (A) et de ses terminaisons 3' (B) et 5' (C) (D'après Astell et al. 1983 et 1985).

2.2. Le Parvovirus Minute Virus of Mice (MVM).

Au cours d'une étude concernant l'adénovirus de souris, Hartley et Rowe (1960) ont mis en évidence un virus contaminant, nommé Minute virus of Mice ou MVM ("minute" dénotant sa petite taille). Initialement décrit par Crawford en 1966, ce virus fut par la suite rattaché au groupe des parvovirus autonomes (Ward et Tattersall 1982).

Deux souches de MVM ont été isolées indépendamment : MVMP (p pour prototype), celui décrit par Crawford en 1966, et MVMI (i pour immunosuppressif) isolé d'une lignée de lymphome murin (EL-4) (Bonnard et al. 1976, Engers et al. 1981, Mac Master et al. 1981). Ces deux souches ont des spécificités tissulaires différentes - respectivement des fibroblastes et des lymphocytes - malgré une très forte homologie de séquence au niveau de l'ADN, nous reviendrons sur ce point au chapitre I.2.3. La souche décrite et utilisée dans ce mémoire est MVMP.

2.2.1. Organisation du Génome de MVMP.

Le génome de MVMP est constitué d'un ADN linéaire de 5149 bp. Il a été entièrement cloné (Merchinsky et al. 1983), séquencé (Astell et al. 1983 et 1986) et analysé pour la présence de sites consensus de régulation (Bodnar 1988). Ce génome se présente sous une forme simple brin sur 90% de sa longueur (4828 nucléotides) et est encadré par deux régions terminales palindromiques. Ces deux séquences sont capables de se replier par auto-hybridation en forme duplex, dites en épingle à cheveu, dont les conformations indiquées sur la figure 3A correspondent aux structures les plus stables (Bourguignon et al. 1976, Cotmore et Tattersall 1987). Les deux extrémités 3' (gauche) et 5' (droite) recouvrent respectivement 115 et 206 nucléotides (figures 3B et 3C) (Astell et al. 1979 et 1983). Les analyses de cartographie par digestions enzymatiques et par séquençage de l'ADN ont montré que l'extrémité 5' de l'ADN de MVMP existait dans deux orientations alternatives, appelées "flip" et "flop". Ces deux formes apparaissent avec une fréquence égale dans les formes répliquatives (en double-brin) monomériques du génome isolées à partir de cellules infectées (Astell et al. 1983 et 1985).

L'organisation générale du génome de MVMP est représentée sur la figure 4A. Les régions transcrites sont toutes situées sur le brin moins. Deux principaux cadres ouverts de lecture (ORF) recouvrent ensemble presque la totalité du génome : l'ORF de gauche code pour une protéine non-structurale majeure et l'ORF de droite procure l'essentiel de la séquence codant pour les polypeptides de capsides. Deux promoteurs P4 et P38 situés à 4 et 38 mu (map units ou unités génomiques), respectivement aux nucléotides 177 et 1977 (Astell et al. 1983), contrôlent deux unités de transcription chevauchantes initiées respectivement aux nucléotides 201 et 2005 (Pintel et al. 1983). Ces deux unités génèrent trois ARNm, R1 et R2 pour la première, R3- et R3'- pour la seconde, dont les tailles sont respectivement de 4.8, 3.3 et 3.0 kilobases et qui constituent environ 10-15, 15-20, et 65-70% de la population totale en ARNm spécifiques de MVMP (Pintel et al. 1983). Ces trois ARNm subissent un épissage commun entre 41 et 46 m.u. (figure 4A) (Morgan et Ward 1986), et sont polyadénylés en un site préférentiel situé au nucléotide 4885 (Clemens et Pintel 1987). Un hypothétique quatrième transcrit R4 de 1.8 kb a parfois été observé, mais son abondance et sa taille exacte varient d'une préparation à une autre, il semble possible qu'il ne soit que le produit

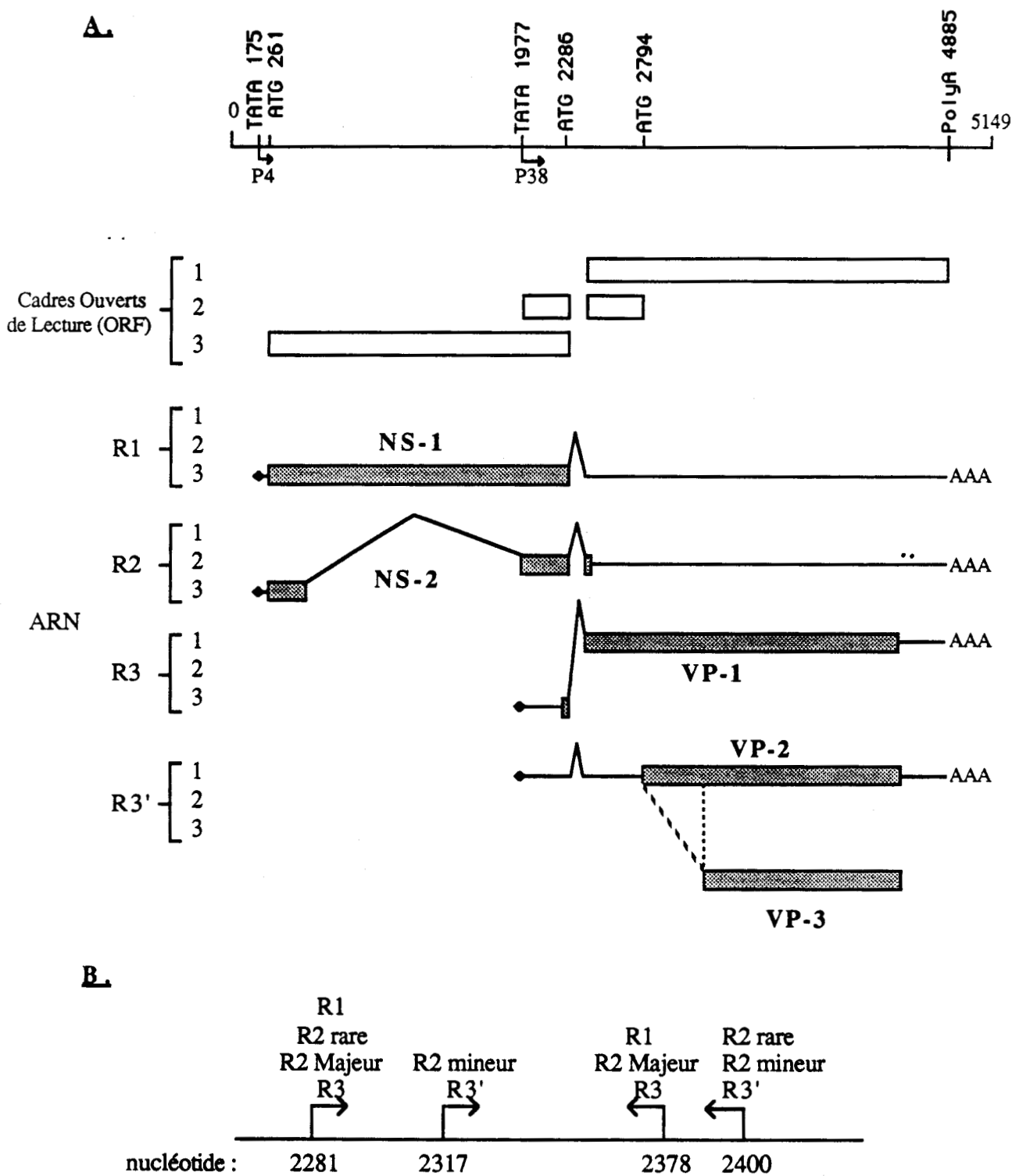


Figure 4 : Organisation du génome de MVM (A), et carte détaillée des épissages médians (B) (D'après Cotmore et Tattersall 1987, et Jongeneel et al. 1986).
Le signe ♦ correspond au site de début d'initiation de la transcription.

d'une forme sous-génomique, défective, du virus (Cotmore et Tattersall 1987).

Les transcrits R3 et R3' sont traduits, tardivement au cours de l'infection, en deux protéines de capsid, VP-1 (83 kDa) et VP-2 (64 kDa) (Labienec-Pintel et Pintel 1986, Clemens et Pintel 1988). La traduction différentielle de ces deux ARNm est la conséquence d'un épissage alternatif, avec changement de cadre de lecture pour l'ARNm R3' qui est traduit en la protéine de capsid VP-1 à partir de l'AUG présent dans l'exon 1 et appartenant à l'ORF 3 (Jongeneel et al. 1986). Toutefois, cet ARNm R3' qui répond aux exigences de l'initiation de la traduction et rend compte de la taille de protéine - VP-1 - n'a pas encore pu être clairement visualisé du fait de sa similitude de longueur avec le transcrit R3 codant pour VP-2. Une troisième protéine de capsid, VP-3 (62 kDa), dérive d'un clivage protéolytique de VP-2, qui retire 20 acides aminés de l'extrémité NH₂ terminale de cette protéine. VP-3 apparaît seulement après l'assemblage de la capsid et l'encapsidation du génome viral (Tattersall et al. 1977). L'extrémité amino-terminale ainsi dégagée de VP-3 est riche en glycine, donc hydrophobe, propriété qui pourrait être impliquée dans le phénomène de pénétration du virus infectieux dans la cellule hôte (Tattersall et al. 1977, Cotmore et Tattersall 1987). Aucune de ces trois protéines ne semble toxique pour les cellules qui les synthétisent (Labienec-Pintel et Pintel 1986).

L'ARNm R2 se caractérise par l'épissage d'un intron de 1476 nucléotides, entre les nucléotides 534 et 1990 avec changement du cadre de lecture, la partie 5' est codée dans l'ORF 3 et la partie 3' dans l'ORF 2 entre les nucléotides 2075 et 2291 (Jongeneel et al. 1986, Cotmore et Tattersall 1987). L'ARNm R2 est traduit en une protéine non-structurale NS-2 de 24 kDa. La variation du petit épissage entraîne la formation de trois isoformes de NS-2, majeure, mineur et rare, dont les rôles sont encore inconnus (figure 4B). Des études menées dans notre laboratoire montrent que la protéine NS-2 a une localisation principalement cytoplasmique (Cornelis comm. pers.). Ses fonctions dans le cycle réplcatif de MVM restent ouvertes à toutes les hypothèses. Mais il est envisageable que NS-2 puisse réguler une ou plusieurs des activités de NS-1 par compétition de structure - leurs régions amino-terminales partagent une séquence commune de 84 acides aminés (Cotmore et Tattersall 1986a) - et exercer des fonctions de régulation propres par le biais de sa région carboxy-terminale.

Le transcrit R1 code pour une protéine non-structurale NS-1 (83 kDa) qui s'accumule dans le noyau où, à des temps précoces après l'infection, elle existe sous deux formes, selon qu'elle est phosphorylée ou non. Les formes phosphorylées sont plus abondantes peu de temps après l'infection, et décroissent ensuite ; elles pourraient être associées à des événements précoces de l'infection parvovirale (Cotmore et Tattersall 1987). Cette variation de formes de NS-1 se refléterait dans son ou ses activité(s) au sein des cellules infectées (Cotmore et Tattersall 1986b).

2.2.2. Fonctions et Rôles de la Protéine NS-1.

Rhode a montré en 1985 que le promoteur P38 du parvovirus H-1 (apparenté à MVM) est activé en trans- par le produit d'un gène viral, et que cette trans-activation disparaissait quand il introduisait une mutation dans le cadre de lecture de R1. Rhode et Richards (1987) ont ensuite pu

localiser une séquence appelée TAR ou "Trans-Activating Responsive element" située entre les nucléotides 1860 et 1875, en amont de P38, dont la fonction de stimulation de P38 est favorisée en présence de protéine virale NS-1. Cette région TAR semble agir très spécifiquement puisque son insertion en amont du promoteur de SV40 ne rend pas ce dernier trans-activable par NS-1, tandis que d'autres promoteurs viraux sans séquence TAR peuvent être contrôlés par NS-1 (Rhode 1987, Rhode et Richards 1987). Les fortes homologues de séquence entre H-1 et MVM expliquent que ce système de trans-activation spécifique ait été retrouvé chez MVM ; il a ainsi été montré que la protéine NS-1 de MVM est nécessaire et suffisante pour trans-activer P38 (Doerig et al. 1988) par l'intermédiaire d'une séquence consensus TAR présentant de bonnes similitudes avec celle de H-1 : 3'-CNTGGTTGGTNA-5'.

	<u>Position /Promoteur</u>
"TAR" de H-1 (P38) : gtg CTTGGTTGGTAAA gaa	-139 à -127
*** ***** ** ***	
"TAR" de MVM (P38) : gtg CTTGGTTGGTGAA gaa	-138 à -126
* ***** *	
"TAR" de MVM (P4) : tca CATGGTTGGTCAG ttc	-107 à -95
et de H-1 (P4)	

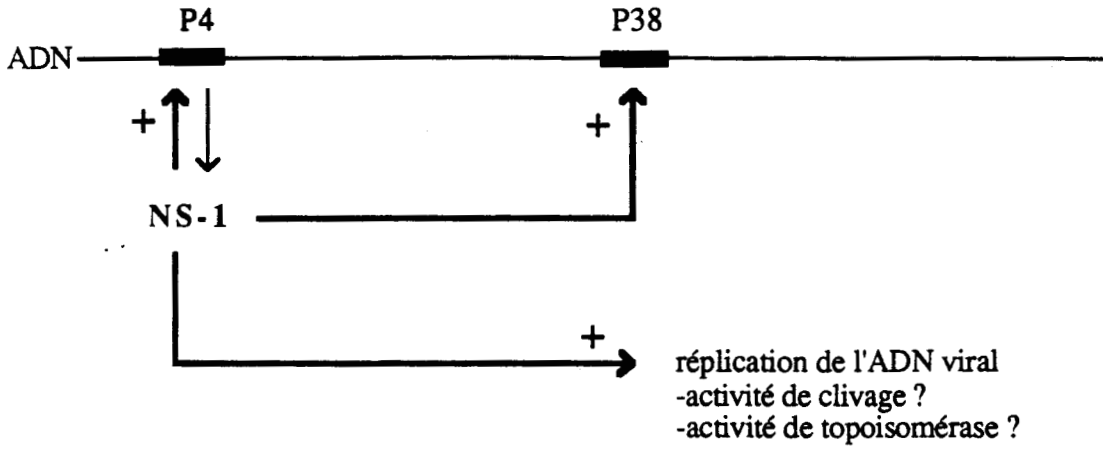
Nous parlerons de MVM d'une manière générique, car si l'étude a été effectuée sur MVMi, les régions concernées ont la même séquence nucléotidique dans les deux variants allotropiques. Toutefois, différents auteurs ont noté que l'efficacité d'action de la séquence TAR peut varier, d'une cellule à l'autre (Rhode 1987, Doerig et al. 1988, Cornélis comm. pers.).

Doerig et al. (1990) ont mis en évidence, en amont du promoteur P4, entre les positions -107 et -95 par rapport au site d'initiation des ARNm R1 et R2, une seconde séquence TAR, similaire en séquence à celle de P38. Les auteurs suggèrent que, à l'instar du TAR de P38, NS-1 pourrait également contrôler son propre promoteur, P4.

La présence de ces séquences hautement homologues en amont des deux promoteurs de MVM pourrait signifier que la trans-activation de ces derniers implique un mécanisme commun. Deux protéines cellulaires de 90 et 110 kDa seraient associées à NS-1 et capables de reconnaître la région promotrice P38, et probablement aussi P4 (Thèse de Doerig 1988). Ainsi, lorsque la machinerie cellulaire de transcription initie la synthèse des ARNm à partir des deux promoteurs dans des cellules HeLa, l'activité de P4 prime alors sur celle de P38. De fait, des études effectuées sur des populations de cellules hautement synchronisées montrent que le déclenchement de l'activité de P38 est postérieure à celle de P4 (Clemens et Pintel 1988). La protéine NS-1 traduite progressivement interagit alors avec un facteur cellulaire de 90 kDa pour former un complexe qui trans-activerait la transcription à partir des deux promoteurs, mais à des taux différents ($\pm 60x$ pour P38 et $\pm 5x$ pour P4 dans le cas de cellules EL4 infectées par MVMi) (Thèse de Doerig 1988).

Plusieurs possibilités se profilent concernant cette protéine de 90 kDa : i) elle est un répresseur reconnaissant le TAR et inactivé par NS-1 (des expériences de dilution d'extraits

A.



B.

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
ATTTT TAGA AACTGACCAACCATGTTACGTAAGTGACGTGATGACGCGCGCTGCGCGCGC
                                     site PEA-1

70      80      90      100     110     120
|      |      |      |      |      |
GCCTTCGGACGTCAACGTCACTTACGTTTCACATGGTTGGTTCAGTTCTAAAAATGATAA
      deux sites ATF                séquence Tar

130     140     150     160     enhancer 180
|      |      |      |      |      |
GCGGTT CAGGGAGTTTAAACCAAGGCGCGAAAAGGAAGTGGGCGTGGTTTAAAGTATATA
                                     site PEA-3 boîte GC boîte TATA

190     200     210     220     230     240
|      |      |      |      |      |
AGCAACTACTGAAGTCAGTTACTTATCTTTCTTTTCATTCTGTGAGTCGAGACGCACAGA
                                     → ARNm R1 et R2

250     260     270     280     290     300
|      |      |      |      |      |
AAGAGAGTAACCAACTAACCATGGCTGGAAATGCTTACTCTGATGAAGTTTGGGAGCAA
                                     → protéines N-1 et NS-2

310     320     330     340     350
|      |      |      |      |
CCAAGTGGTTAAAGGAAAAAGTAACCAGGAAGTGTCTCATTGTTTAAAAA
  
```

Figure 5. Régulation des promoteurs de MVM. **A.** : activités de la protéine virale NS-1. **B.** : séquences consensus connues, fonctionnelles (soulignées) et putatives du promoteur P4.

nucléaires de cellules infectées par un extrait de cellules non infectées vont dans ce sens) ; ii) elle est un facteur de transcription reconnaissant le TAR et rendu plus performant par NS-1 ; iii) avec NS-1 elle forme un complexe capable alors d'une activité (dérépressive ou activatrice) stimulant la transcription.

La protéine de 110 kDa serait un facteur cellulaire de transcription reconnaissant spécifiquement une région promotrice de l'ADN viral (Thèse de Doerig 1988).

Ce modèle revient en fait à suggérer que NS-1 agit en modulant l'activité des facteurs cellulaires impliqués dans la transcription parvovirale. Ceci est corroboré par l'observation d'une augmentation du taux des ARNm R3 au cours du temps par rapport aux messagers R1 et R2 dominants au début de l'infection (Clemens et Pintel 1988). La protéine NS-1 serait, indirectement, responsable de la production de grandes quantités de protéines de capsides requises en fin de cycle viral pour l'assemblage des virions.

En plus de son rôle de trans-activateur de la transcription, NS-1 possède différentes autres fonctions, à l'instar d'autres protéines virales issues également de systèmes à capacité codante limitée (par exemple l'antigène grand T des papovavirus). Ainsi : i) NS-1 est indispensable pour assurer l'excision, et donc l'infection, de clones plasmidiens de MVM (Tullis et al. 1988); ii) NS-1 possède un domaine putatif d'activité ATPasique, et un site de liaison à l'ADN qui suggèrent, par analogie avec d'autres protéines, que NS-1 pourrait agir par modification d'autres protéines liées au processus de transcription (Astell et al. 1987, Tullis et al. 1988) ; iii) NS-1 est fixée de manière covalente aux extrémités 5' de la forme répliquative monomérique bicaténaire, et de la forme simple brin de l'ADN viral des virus néoformés. Du fait de cette propriété de liaison, NS-1 serait un bon candidat pour les activités de clivage et de topoisomérase intervenant au cours de la répllication de l'ADN de MVM (cf § I.2.3.2) (Cotmore et Tattersall 1988).

Ainsi, la protéine NS-1 est nécessaire, et de manière indépendante, pour la répllication du génome et pour la régulation de l'expression temporelle entre les deux unités de transcription de MVM (figure 5A.) (Tullis et al. 1988, Clemens et Pintel 1988).

L'expression de NS-1 semble aussi être associée à la mort cellulaire, donc à la cytotoxicité parvovirale. D'une part, Rhode (1987) n'a jamais pu isoler de clones cellulaires exprimant constitutivement des taux importants de la protéine NS-1 après co-transfection en présence d'un marqueur de résistance à la néomycine. D'autre part, Brandenburger et al. (1990) ont montré que l'accumulation intracellulaire de quantités suffisantes de protéine NS-1, obtenues au moyen d'un clone moléculaire du gène NS-1 placé sous le contrôle d'un promoteur induit par la dexaméthasone, était associée à une mort cellulaire. La voie par laquelle NS-1 induit la mort cellulaire reste à déterminer, toutefois, les fonctions connues et précédemment décrites de NS-1 permettent de s'orienter vers une perturbation du déroulement du cycle cellulaire (Cotmore et Tattersall 1987).

2.2.3. Organisation des Promoteurs de MVMp.

La figure 5B expose les éléments fonctionnels et supposés de la régulation génique intervenant au niveau du promoteur P4 de MVM. Par l'intermédiaire de la protéine NS-1 et de la séquence TAR, nous avons dévoilé un pan de la régulation génique des promoteurs P4 et P38 de

MVMp. Ces derniers présentent chacun, classiquement, une boîte TATA située à environ 30 nucléotides des séquences des sites de la transcription; P4 possède en outre une boîte fonctionnelle GC située à 55 nucléotides du site d'initiation (Ahn et al. 1989). Cette boîte GC est parfaitement homologue à la séquence de reconnaissance du facteur humain de transcription Sp1 : 5'-TGGGCGTGGT-3' (Ahn et al. 1989). Toutefois, si les deux boîtes TATA et GC sont essentielles à la transcription programmée par P4 (avec une interaction probable entre les protéines de reconnaissance spécifiques de chaque élément, du fait de la proximité de ces séquences sur le génome), une transcription optimale est obtenue en présence de séquences additionnelles situées entre les positions -139 et -55 (Ahn et al. 1989).

D'autres éléments de régulation potentiels ont été recherchés sur le génome de MVM, par comparaison de séquences avec d'autres virus tels que l'adénovirus, SV40 et le virus du polyome (Bodnar 1988). Toutefois, nous restons dans le domaine des hypothèses et aucune certitude sur le rôle effectif de chacun n'est acquis. Bodnar (1988) a ainsi pu définir toute une série d'homologies de séquences localisées :

- au niveau du promoteur P4 :

i) une séquence GTGGTTT, entre les nucléotides 164 et 170, homologue à la région activatrice de la transcription ou "enhancer" (G)TGG(T/A) (T/A) (T/A) (G) du virus du Polyome et du gène E1A de l'Ad5, ou de la séquence "72 bp repeat" de SV40, aucune activité en *cis* n'a toutefois pu être mise en évidence à ce jour (Cotmore et Tattersall 1987).

ii) aux nucléotides 69 et 76, deux séquences 5'-TGACGT(A/C)A-3' correspondant au site de liaison du facteur d'activation de la transcription (ATF) inducible par le produit du gène E1A de l'adénovirus. Cette séquence est également retrouvée autour de promoteurs activés par l'AMP-cyclique (cAMP) d'où le nom de CRE (Elément de Réponse au cAMP) qu'on lui donne aussi. Des observations montrant d'une part, que MVM se réplique dans des cellules Hela suite à une co-infection par l'adénovirus, et d'autre part, la présence de ces séquences à proximité du promoteur P4, suggèrent que ces dernières auraient une fonction dans la régulation de la transcription de MVM.

iii) un site potentiel de fixation de PEA1 (TGACGTGA) entre les nucléotides 234 et 241, et une séquence consensus PEA3 (AGGAAG) entre les nucléotides 153 et 158. PEA1 et PEA3 sont deux facteurs de transcription qui semblent être des relais cruciaux entre des produits d'oncogènes, le sérum ou le TPA, et l'activation de gènes cellulaires (Herrlich et Ponta 1989, Wazylyk et al. 1989).

- au niveau du promoteur P38 :

i) une boîte CAAT éventuelle (la séquence CCAAT) présente à 87 nucléotides en amont de la boîte TATA de P38. Pour d'autres parvovirus autonomes tels que CPV et FPV, cette boîte CAAT est mutée en TGAAT, il est donc possible qu'un tel signal ne soit pas essentiel pour l'efficacité de la transcription parvovirale (Cotmore et Tattersall 1987).

ii) une boîte GC à 53 nucléotides du promoteur P38 mais apparemment inactive (Ahn et al. 1989).

iii) deux sites potentiels PEA1 à 66 et 133 nucléotides en amont du promoteur P38.

Δ -ATTENUATION

177 TATAA 1-201 ACUUAUCUUUUUCUUUA 210 U-A-240 250 AGAGAGUAA

$\Delta G \sim -6$ Kcal

280-C
 U
 A
 U
 ① U
 C
 G
 U
 270-A
 A
 G
 G
 C
 U
 A
 260-C
 C
 A
 A
 C
 U
 A
 C
 A
 C
 220-C-G
 U-A-240

640 GAUGAAGUUU U-A 350 UUUUUUUUA
 Termination sites

② A-U ③
 G-U
 C-G
 A-U
 300-A
 C-G
 A-C-G
 C-G
 U-A
 G-C
 G-C
 U-A
 310-U-A
 A-U
 A
 G
 A
 A-320
 G
 A
 A
 A

$\Delta G \sim -14$ Kcal

B-HEADTHROUGH

$\Delta G \sim -19$ Kcal

G A A G
U U
A U-290
G U U
U C-G C-340
U-C-G
U-C-G
A-U-G
① U-A ② U ③
C-G G
G-C G
U-A U
270-A A-300 GA
AG-C G⁻330
G-C
U-A
G-C-A
U
A-U
260-C-G C
C-G C
A-U A
A-U-310 A
U-A U
220-C-G AC-U-AA
U-A-240 AC-G-AA
U-A C-G A
177 i-201 210 TATAA.....ACUUUUCUUUUUA AGAGAGUAA AAAAAA
250 320

Figure 6. Schéma des deux conformations potentielles alternatives Atténuée ou "Attenuation" (A), et Passage ou "Readthrough" (B), de l'extrémité 5' de l'ARN viral initié au promoteur P4 (D'après Ben Asher et Aloni 1984).

iiii) en outre il vient d'être mis en évidence deux zones supplémentaires de régulation de l'initiation de la transcription, entre les nucléotides 2287 et 2652, c'est-à-dire en 3' du second site d'initiation. Une première séquence DPE ou "Downstream Promoter Element" est nécessaire pour assurer une initiation efficace de la transcription à partir de P38. Krauskopf et al. (1990) viennent de montrer que NS-1 y serait associée, directement ou indirectement. Une seconde région aurait une action répressive, mais son étude commence à peine (Krauskopf et al. 1989).

2.2.4. Le Mécanisme d'Atténuation de la Transcription.

Un second mode de régulation de l'expression d'un promoteur concerne l'étape d'élongation de la transcription et implique un phénomène d'atténuation qui engendre une terminaison prématurée des transcrits. Les sites d'atténuation de la transcription se caractérisent par une région en amont riche en cytosine avec souvent une partie palindromique, et une séquence de résidus uridine qui correspond au site de terminaison (Rosenberg et Court 1979). Ce phénomène d'atténuation semble être une étape importante de la régulation de l'expression de nombreux gènes; les exemples relativement bien étudiés concernent notamment des oncogènes cellulaires [*c-myc* (Bentley et Groudine 1986), *c-fos* (Fort et al. 1987), *c-myb* (Bender et al. 1987)] et viraux [le gène tardif de SV40 (Hay et al. 1982), le promoteur majeur tardif de l'adénovirus 2 (Mok et al. 1984)].

L'équipe de Aloni (Ben-Asher et Aloni 1984, Resnekov et Aloni 1989) a montré l'existence d'un tel processus d'atténuation, in vitro comme in vivo, dans la régulation du promoteur P4 de MVM, avec la présence d'un ARNm atténué supplémentaire de 142 nucléotides cartographié entre les nucléotides 201 et 342. Cette terminaison précoce de la transcription serait due à la possibilité des transcrits de se replier pour prendre l'une ou l'autre de deux conformations, encore théoriques, en tiges-et-boucles, appelées atténuation et passage (ou "readthrough") (figure 6). Dans le cas de la conformation atténuée, l'activité de la RNA-polymérase II ralentirait au passage de la structure tiges-et-boucles et cesserait prématurément toute activité au niveau de la séquence de résidus d'uridine située immédiatement en aval de cette structure. Une terminaison précoce de la transcription et le décrochage de l'ARN atténué pourrait être expliqué par des interactions particulièrement instables entre la matrice ADN et le transcrit naissant (Ben-Asher et Aloni 1984, Cotmore et Tattersall 1987). Ben-Asher et Aloni (1984) suggèrent qu'un mécanisme rétroactif **modulerait la transcription** de MVM par l'intermédiaire de produits des gènes viraux. Ces derniers **agiraient comme un atténuateur** ou un anti-atténuateur en stabilisant, d'une manière ou d'une autre, une des deux structures alternatives de l'ARNm.

Les résultats de l'équipe d'Aloni (Ben-Asher et Aloni 1984, Resnekov et Aloni 1989) montrent une proportion significative de transcrits atténués produits à partir du promoteur P4 à des temps tardifs; ce phénomène d'atténuation traduit un effet de régulation négative des transcrits R1 et R2. Une hypothétique protéine atténuatrice pourrait être associée à, ou même consister en une protéine programmée par le promoteur P38, c'est-à-dire une protéine de capsid. Cette voie de régulation interne permettrait une synthèse coordonnée des différentes protéines virales, non-structurales et de capsides, issues des deux unités de transcription. Ainsi, en balance avec la trans-activation de P38 par la protéine NS-1, il existerait un mécanisme qui préviendrait des

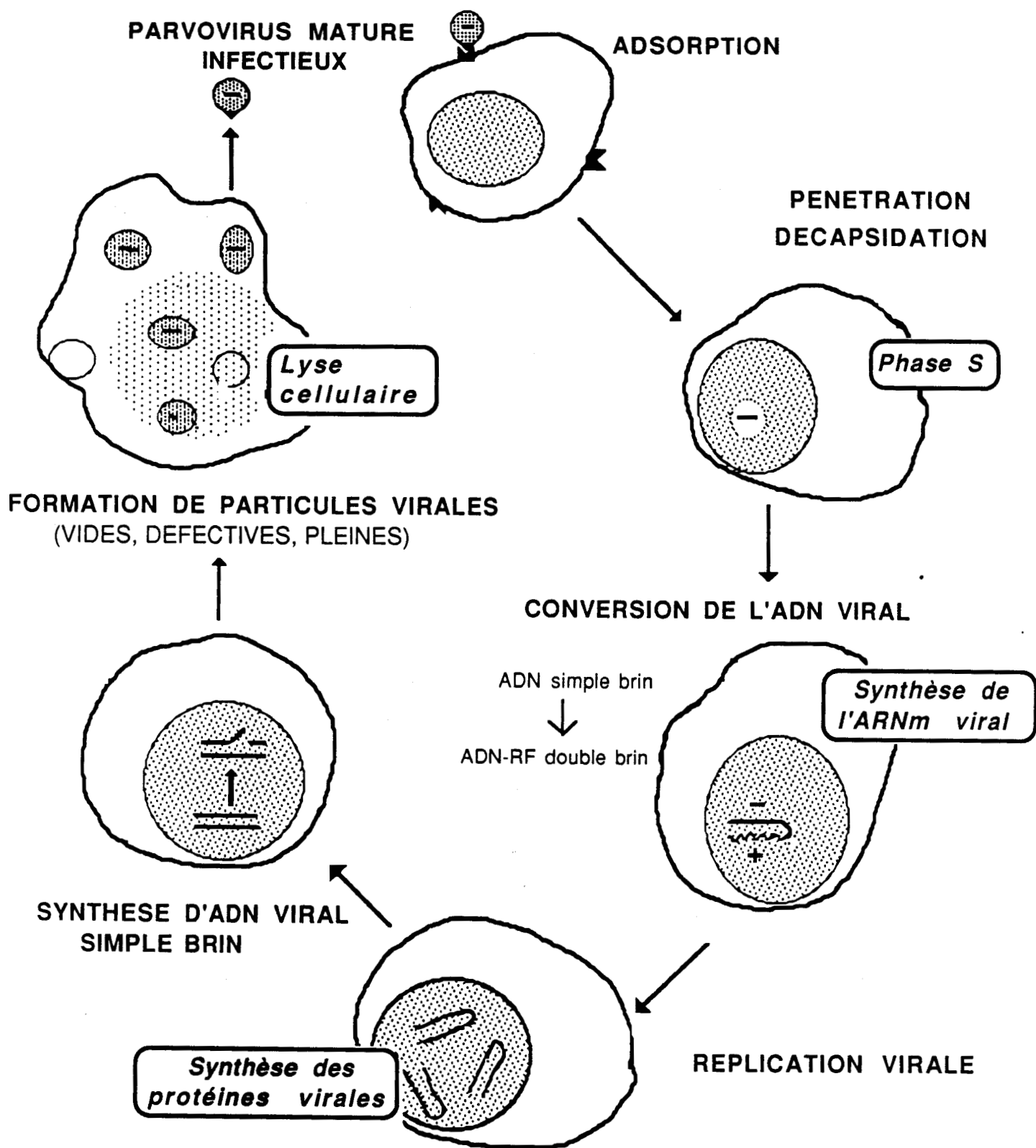


Figure 7. : Cycle lytique des parvovirus autonomes (d'après Hauswirth 1984).

interférences entre l'expression des deux unités de transcription adjacentes commandées par les promoteurs P4 et P38, en rendant un site de terminaison précoce de la transcription de la première contrôlable par les produits de la seconde.

2.3. Le Cycle Viral de MVMp.

2.3.1. L'Infection Virale.

Le cycle biologique de MVMp débute par l'adsorption, réversible, des virions sur des récepteurs cellulaires spécifiques de la membrane plasmique (figure 7) (Ward et Tattersall 1982). Le nombre de ces récepteurs et leur accessibilité varierait selon l'état de la cellule, et notamment son type de différenciation (Siegl 1984). MVM est connu pour se lier efficacement, *in vitro*, à bon nombre de cellules d'origines tissulaires et d'espèces différentes. Il y a, en moyenne, entre 10^5 et 5×10^5 récepteurs spécifiques de liaison par cellule (Linser et al. 1977). La pénétration dans le cytoplasme s'effectue selon un processus d'endocytose par invagination de replis membranaires (Linser et al. 1977, Ward et Tattersall 1982). Entre 1 et 6 heures p.i. (après l'infection), les particules virales migrent dans le noyau, où a lieu la décapsidation du génome viral par des mécanismes encore mal connus (Cotmore et Tattersall 1987).

Ces trois étapes d'adsorption, de pénétration et d'accumulation des virions infectieux dans le noyau peuvent se produire dans toutes les cellules d'une population infectée possédant des récepteurs, sans égard à leur situation dans le cycle cellulaire (Cotmore et Tattersall 1987). Par contre, la réplication de l'ADN viral et l'expression génique sont strictement dépendantes de une ou plusieurs fonctions cellulaires exprimées transitoirement durant la phase S du cycle de la cellule (Tattersall 1972). En l'absence de ces facteurs, le blocage serait situé au niveau de la réplication du brin complémentaire du brin viral (Cotmore et Tattersall 1987). Les parvovirus étant incapables d'induire l'entrée des cellules en phase S, ils doivent attendre, silencieusement, que les cellules infectées atteignent ce stade pour se répliquer. Ainsi, l'infection d'une population non synchronisée de cellules en division conduit à des cycles asynchrones de réplication de MVMp (Tattersall 1972). Dans aucun des cas étudiés jusqu'à présent, le génome de MVMp ne s'intègre dans l'ADN cellulaire (Richards et Armentrout 1979).

La réplication de l'ADN viral implique apparemment trois étapes distinctes : i) une conversion de l'ADN simple brin parental (VPar) en une forme répllicative (FR) monomérique après la synthèse du brin complémentaire, ii) une amplification des formes monomériques puis dimériques, et iii) le déplacement et l'encapsidation progressive des brins d'ADN viral néoformé (Vprog).

2.3.2. La Réplication de l'ADN de MVMp.

Astell et ses collaborateurs (1980), puis Cotmore et Tattersall (1987), ont proposé un modèle de réplication du génome de MVMp compatible avec la séquence de l'ADN et rendant compte des différentes structures observées (mono- et bicaténares, mono- et multimériques, inversions de séquences au niveau de l'extrémité 5' palindromique). Ce modèle a été appelé "modified rolling hairpin", ou modèle modifié de déplacement d'épingle à cheveux, et fait intervenir

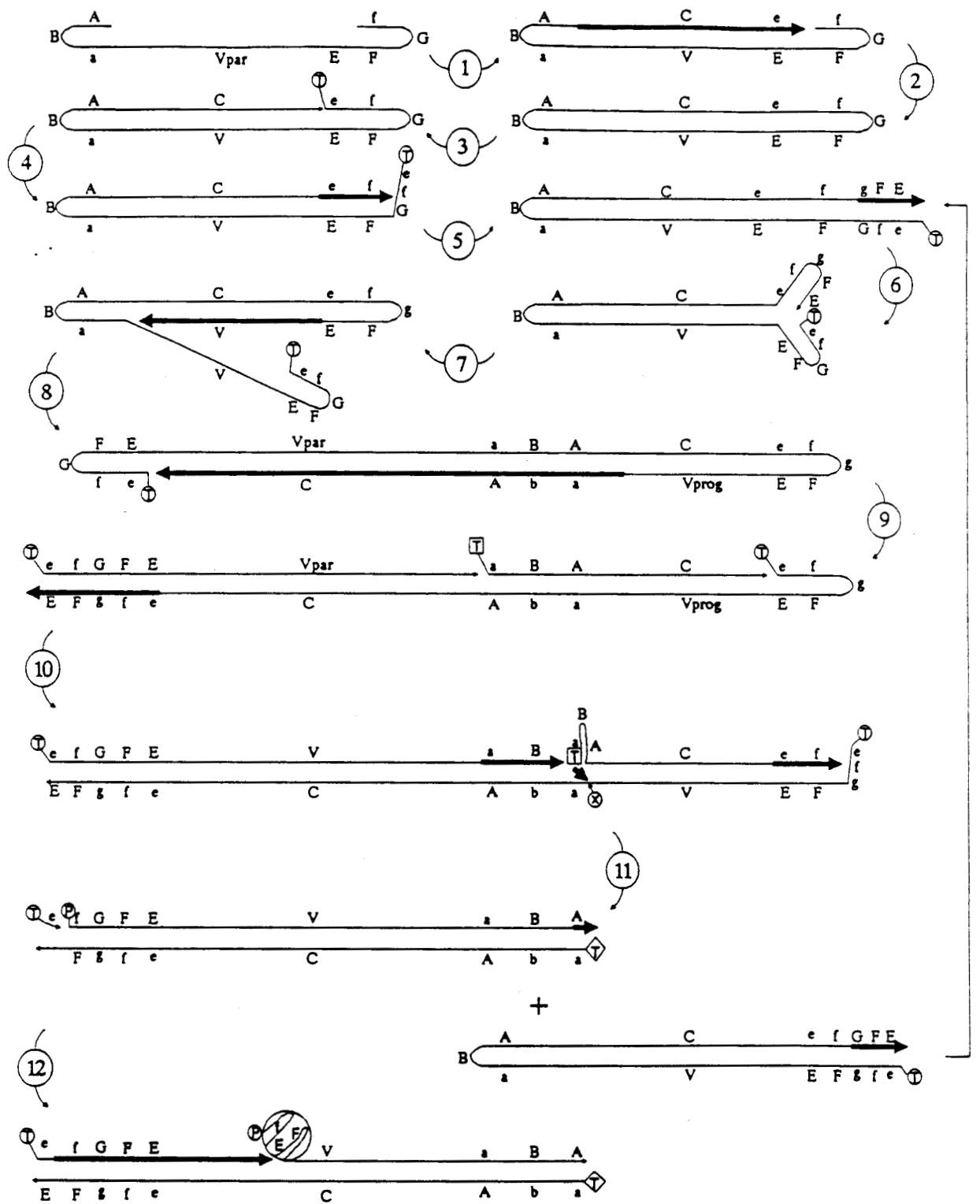


Figure 8. Modèle de réplication de l'ADN du parvovirus MVM (D'après Cotmore et Tattersall 1987).

la copie et le réarrangement des séquences palindromiques terminales (figure 8).

Dans cette hypothèse, l'extrémité 3' du palindrome terminal gauche (figure 8) du brin parental viral VP^{ar} sert d'amorce pour initier, en présence d'une ADN-polymérase cellulaire (probablement α ou γ) la synthèse du brin complémentaire (Cotmore et Tattersall 1987) ; ce processus engendre une FR monomérique dont les deux extrémités gauches sont liées de façon covalente (Astell et al. 1985) (étape 1). Les extrémités 5' et 3' sont alors soudées en une forme intermédiaire transitoire (étape 2) (Cotmore et al. 1989). Cette dernière est clivée 18 nucléotides en amont de l'extrémité 5' du brin viral ; un lien covalent est formé entre la nouvelle extrémité ainsi créée et une protéine terminale - très probablement la protéine non-structurale NS-1 (Cotmore et Tattersall 1988, Gunther et Tattersall 1988) - notée par un T cerclé (étape 3); on suppose que cette protéine catalyse la réaction de clivage. L'extrémité 3' de cette coupure sert d'amorce pour la synthèse par déplacement d'un nouveau brin (étapes 4 à 8), produisant une FR dimérique de 10 kb. Au cours de cette synthèse, il apparaît une structure dite en "oreille de lapin" due à l'auto-hybridation des palindromes constitués par les extrémités des deux brins du côté droit de la FR en cours de synthèse. La FR dimérique contient une copie unique de l'extrémité gauche du génome viral en position médiane, appelée "dimer bridge", et, à chaque extrémité, la séquence terminale droite de l'ADN viral, réhybridée sur elle-même (étapes 6, 7 et 8). Les FR multimériques sont ensuite clivées en monomères par un processus qui n'est pas totalement élucidé, mais pour lequel les données connues permettent de supposer l'enchaînement suivant : une topoisomérase terminale notée par un T encadré cliverait la FR multimérique dans le brin viral parental VP^{ar}, au niveau de l'extrémité gauche du "dimer bridge" (étape 9). A partir de l'extrémité située à gauche de cette coupure, le brin viral est allongé. L'extrémité déplacée située à droite de cette même coupure peut alors se replier en forme d'épingle à cheveux, du fait de sa séquence palindromique. Un second clivage est alors introduit dans le brin viral, à l'extrémité droite du "dimer bridge", par une protéine notée X (étape 10). Cette coupure est suivie de la soudure (flèche) de l'extrémité gauche de l'épingle à cheveux formée précédemment, avec le brin viral néoformé de droite. Ces événements conduisent à la séparation de deux FR monomériques (étape 11).

Une protéine P se lie alors à l'extrémité gauche du brin viral de la FR monomérique de gauche. Le rôle de cette protéine serait de diriger l'encapsidation progressive du brin viral néosynthétisé déplacé dans des capsides préformées. La maturation du brin viral est assurée par un nouveau clivage de son extrémité gauche et de l'accrochage en 5' d'une protéine terminale T identique à celle observée à l'étape 4, en un site spécifique situé à 18 nucléotides de l'extrémité gauche de la FR monomérique. Ce fragment de 18 nucléotides permet la réinitiation de la synthèse d'un nouveau brin viral et le déplacement d'un brin viral encapsidable (étape 12). Notons que différentes observations suggèrent que l'excision et le déplacement des brins néoformés semblent ne dépendre que de la disponibilité en protéines de capside (Richards et al. 1977, Muller et Siegl 1983).

La seconde FR monomérique issue de la coupure de l'étape 11, engendre des FR dimériques puis à nouveau monomériques par formation d'une structure en forme "d'oreille de

lapin" (étape 13, et retour à l'étape 6).

Astell et son groupe (1985) ont proposé, sur la base de l'homologie des séquences sur lesquelles agissent les différentes protéines P,T et X, que les nickases et topoisomérases spécifiques ainsi que la protéine terminale T pourraient être une seule et même enzyme multifonctionnelle, qui subsisterait à l'extrémité du génome et ferait irruption à la surface de la capsid mature (Cotmore et Tattersall 1988). D'autre part, Cotmore et Tattersall (1988) ont aussi montré que la protéine non-structurale NS-1 est liée de façon covalente aux extrémités 5' des RF et des brins viraux néosynthétisés encapsidés, et subsiste ensuite à la surface du virion infectieux libéré dans le milieu extracellulaire.

Bien que le rôle exact de NS-1 dans la réplication ne soit pas encore connu précisément, cette protéine semble jouer un rôle central. Et Cotmore et Tattersall (1988) ont proposé que NS-1 serait un candidat potentiel pour les fonctions de nickases et de topoisomérases spécifiques intervenant lors de la réplication de l'ADN.

Les cycles de réplication des parvovirus autonomes étudiés jusqu'à présent (MVM, H-1, LuIII, B19) diffèrent l'un de l'autre, dans les proportions et la nature des brins viraux encapsidés (brin plus et/ou moins, extrémités flip et/ou flop en 3' et/ou 5'). Et à partir de ces données, le groupe d'Astell a proposé un nouveau modèle de réplication unique pour l'ensemble du groupe des parvovirus, qui intègre et justifie ces différentes observations. Ce modèle dit de "cinétique de transfert de l'épingle à cheveu" se base sur le principe des variations de facteurs de cinétique entre les différentes formes de réplication de l'ADN viral. Ce modèle est encore théorique mais a le mérite de formuler des prédictions qui sont en cours de vérification expérimentale (Chen et al. 1989).

2.3.3. La Synthèse des Protéines.

Cet aspect a été traité au § I.2.2.1. La traduction des protéines non-structurales NS-1 et NS-2 est précoce, tandis que celle des protéines de capsides VP-1, VP-2 est plus tardive.

2.3.4. L'Assemblage et la Maturation des Virions.

Les deux étapes d'assemblage et de maturation des virions ont été relativement peu étudiées et restent sujettes à de nombreuses hypothèses. Après leur traduction, les protéines migrent vers le noyau où a lieu l'encapsidation, de 20 à 30 h p.i. (figure 7). Etant donné le nombre élevé de virions vides non infectieux (en moyenne 249/250), l'assemblage des capsides serait indépendant de la présence d'ADN viral. On ne connaît pas grand chose sur la nature des modifications de structure qui accompagnent la maturation des virions. Le phénomène d'encapsidation lui-même semble être assez complexe, et impliquerait une ou plusieurs protéines d'origine virale ou cellulaire (Cotmore et Tattersall 1987, Ward et Tattersall 1982). Il semble notamment, comme nous l'avons décrit plus haut, que l'extrémité 5' de l'ADN soit liée à la protéine virale non-structurale NS-1. De plus, comme nous l'avons déjà évoqué, c'est le brin de polarité négative qui prédomine dans les virions matures de MVM (>99%) (Cotmore et Tattersall 1984). Toutefois, l'existence de particules défectives de MVM, contenant uniquement l'extrémité 5' du génome, semble indiquer que les éventuelles séquences d'ADN ou les structures tridimensionnelles impliquées dans le processus

d'encapsulation résident dans cette courte séquence terminale (Faust et Ward 1979).

Parallèlement à l'assemblage des virions, des changements dans la morphologie des noyaux cellulaires commencent à apparaître. Au vu des ressemblances de comportement entre les différents parvovirus de rongeur, il est très probable que les modifications cellulaires induites par MVMp soient semblables à celles induites par H-1. On a montré dans des cellules infectées par H-1, une condensation de l'hétérochromatine et de la chromatine associée au nucléole, à la périphérie du noyau, dès une douzaine d'heures p.i.. Cette condensation est suivie d'une désorganisation des fibres ribonucléoprotéiques du nucléole, qui entraîne la formation de vacuoles nucléolaires où vont s'accumuler les capsides nouvellement constituées (Singer et Rhode 1978).

A environ 30 h p.i., un processus généralisé de marginalisation de la chromatine et de boursoufflement de la membrane nucléaire s'accompagne de l'expulsion des particules virales du noyau vers le cytoplasme. Les virions sont déversés dans un cytoplasme déjà très désorganisé, puis, suite à la rupture de la membrane plasmique, relargués dans le milieu. Des fragments de membranes nucléaires tapissées de virus ont été observés dans les milieux de culture, à des temps tardifs p.i. (Richards et al. 1977).

La population virale obtenue lors d'un cycle reproductif est assez hétérogène et comprend à la fois, des particules infectieuses complètes, des particules défectives (dont l'ADN a subi des délétions plus ou moins importantes) et des particules vides (totalement dépourvues d'ADN) (Cotmore et Tattersall 1987).

2.4. Les Interactions entre Virus et Cellules Hôtes.

Les cellules qui permettent la réplication des parvovirus et produisent des particules infectieuses sont dites "permissives". Habituellement, l'infection productive d'une cellule permissive conduit à sa lyse. Toutefois, plusieurs types d'infections incomplètes sont aussi possibles : de telles interactions virus-cellule hôte sont divisées en trois catégories appelées, restrictive, abortive, et cryptique.

2.4.1. L'Infection Restrictive.

Dans le cas de l'infection restrictive, les premières étapes de la multiplication du parvovirus ne sont pas perturbées jusqu'à la conversion de l'ADN viral en forme répllicative monomérique. Mais pour les étapes suivantes, le taux de réplication de l'ADN viral ne représente que 5 à 20% de celui observé dans une infection productive ; de plus, aucune protéine de capside, aucun virion ni ADN simple brin néoformé ne sont observés dans les cellules ainsi infectées. Un blocage majeur se situerait au niveau de l'initiation de la transcription virale et serait dû à l'absence d'une protéine cellulaire spécifique agissant positivement (Tattersall et Bratton 1983).

L'infection restrictive a été étudiée sur les deux variants de MVM, MVMp (prototype) et MVMI (souche immunosuppressive). Ces deux souches virales sont sérologiquement identiques mais diffèrent l'une de l'autre par leur inaptitude à croître dans les cellules permissives pour l'autre souche, respectivement des fibroblastes et des lymphocytes T. Tattersall et Bratton (1983) ont montré que des hybrides somatiques entre ces deux types de cellules permettent une infection

productive par ces deux variants allotropiques. Ces premiers résultats suggèrent que la cellule hôte manque de facteur(s) nécessaire(s) à la réplication productive de la souche restreinte, et que ces facteurs sont l'expression de fonctions caractéristiques de l'état de différenciation de la cellule. Par la construction de recombinants hybrides entre MVMi et MVMp, des déterminants allotropiques ont été localisés dans la région codant pour la protéine de capsid VP-2. La séquence de 235 nucléotides située entre les nucléotides 3522 et 3757 (soit 4,5% du génome) contient près de 10% des différences de bases entre les variants : 13 changements conservateurs d'acides aminés, et surtout de 2 des 3 modifications de classe d'acides aminés entre les gènes de capsid de ces deux virus ($\text{Pro}_i \Rightarrow \text{Ser}_p$ et $\text{Glu}_i \Rightarrow \text{Gly}_p$) (Astell et al. 1986, Antonietti et al. 1988, Gardiner et Tattersall 1988b). Ces différences importantes seraient à l'origine de la spécificité allotropique de cette région des deux variants de MVM. Ceci est conforté par deux séries d'observations : i) la sélection de mutants de spécificité d'hôte ou "host range" dont la mutation est localisée au sein de cette séquence (Ron et al. 1984), et ii) l'accroissement du rendement de production virale dans le cas d'une transfection de l'ADN de MVMi plutôt qu'une infection, dans des cellules normalement permissives pour MVMp (Gardiner et Tattersall 1988a). Ces données montrent que les protéines de la capsid joueraient un rôle déterminant dans la spécificité cellulaire du virus, en interagissant avec des facteurs cellulaires (eux-mêmes régulés par la différenciation) qui contrôlent l'expression des gènes parvoviraux.

2.4.2. L'Infection Abortive.

Dans le cas d'une infection abortive, principalement lors d'infections interspécifiques, les niveaux d'expression des protéines de capsides et non-structurales sont significatifs, voire équivalents à ceux observés lors d'une infection productive, mais aucune production détectable de virions matures ne peut être décelée (Chen et al. 1986). En fait, le virus ne peut établir son programme de réplication de l'ADN. L'infection peut résulter ou non en une mort cellulaire, suivant les combinaisons de souches virales et de lignées cellulaires.

2.4.3. L'Infection Cryptique.

Enfin, l'infection cryptique est caractérisée par une internalisation des virions infectieux et par une **absence** de réplication et d'expression des gènes viraux. C'est le cas de l'infection de cellules quiescentes (sans activité mitotique) qui privent les parvovirus des fonctions nécessaires de réplication cellulaire.

Ainsi, la capacité d'un parvovirus à infecter et tuer sa cellule cible et produire des virions infectieux, dépend de l'espèce, de l'état de prolifération et du phénotype de différenciation de la cellule hôte.

II. La Transformation Cellulaire.

1. Introduction.

Divers agents tumorigènes viraux, chimiques et physiques (rayonnements) peuvent entraîner la transformation des cellules in vitro et l'apparition de tumeurs in vivo (Bishop 1987). Les cellules transformées se distinguent des cellules normales par une série de caractéristiques à la fois morphologiques et biochimiques. La transformation implique notamment l'un et/ou l'autre des changements suivants : désorganisation du cytosquelette et de la matrice cellulaire, se traduisant par un arrondissement de la cellule, altérations de la composition en glycolipides et glycoprotéines de la membrane plasmique, et apparition de néo-antigènes. Ces changements sont associés à des modifications du comportement cellulaire, comme la perte de l'inhibition de la multiplication suite aux contacts intercellulaires, la formation de foyers tridimensionnels ou de clones en milieu semi-solide (agar), une prolifération accélérée, des exigences réduites en facteurs de croissances exogènes, la production de protéases (Alberts 1983). Enfin, au niveau génique, à titre d'exemple, Groudine et Weintraub (1980) ont estimé qu'un millier de transcrits nouveaux sont induits dans des cellules transformées par le virus du sarcome de Rous (RSV).

Un certain nombre de virus à ADN ont un pouvoir transformant, citons l'adénovirus, le virus du papillome bovin, et deux papovavirus, SV40 et le virus du polyome. En outre, une série de gènes viraux d'origine cellulaire, appelés oncogènes et dotés de pouvoir transformant, ont été identifiés chez les rétrovirus : ces oncogènes viraux (*v-onc*) dérivent de séquences cellulaires (*c-onc*) que l'on pense impliquées dans l'ontogenèse (Bishop 1987).

Les rétrovirus sont des virus à ARN(+) contenant plusieurs gènes codant respectivement pour des protéines de structure (le gène *gag*), une reverse-transcriptase (le gène *pol*) et des protéines de l'enveloppe (le gène *env*); ils possèdent en outre des séquences d'initiation de transcription et de polyadénylation regroupées dans une structure appelée LTR ou "Long Terminal Repeat" (Saulle 1988). Après infection de la cellule cible, il y a passage de la forme ARNm simple brin à une forme ADN bicaténaire par rétro-transcription. Le rétrovirus a la capacité de s'intégrer au sein du génome hôte sous la forme d'un provirus. A la suite de phénomènes de recombinaisons, certains rétrovirus peuvent **transduire** (par substitution ou addition) un gène cellulaire qui sera plus ou moins modifié après sa **capture** et sa propagation par le virus. Lorsque ce gène est un proto-oncogène (*c-onc*) ontogénique, les rétrovirus acquièrent des propriétés tumorigènes en interférant avec le déroulement de la mitose et/ou de la différenciation cellulaire. L'équivalent cellulaire *c-src* du gène viral *v-src* du Virus du Sarcome de Rous a été le premier identifié et a la capacité d'induire des sarcomes chez le poulet (Stéhelin et al. 1976) ; par la suite d'autres rétrovirus ont été mis en évidence, pouvant provoquer des leucémies, des carcinomes, ou des lymphomes (Bishop 1987). Au total, plus d'une quarantaine d'oncogènes viraux et cellulaires ont été isolés à ce jour. Le mode d'action des protéines codées par ces gènes diffèrent, mais très souvent, l'une des caractéristiques des cellules transformées est de présenter un pouvoir mitogène accru par rapport aux cellules normales. Ainsi a-t-on pu attribuer à ces oncogènes des rôles perturbateurs dans le déroulement des étapes de la

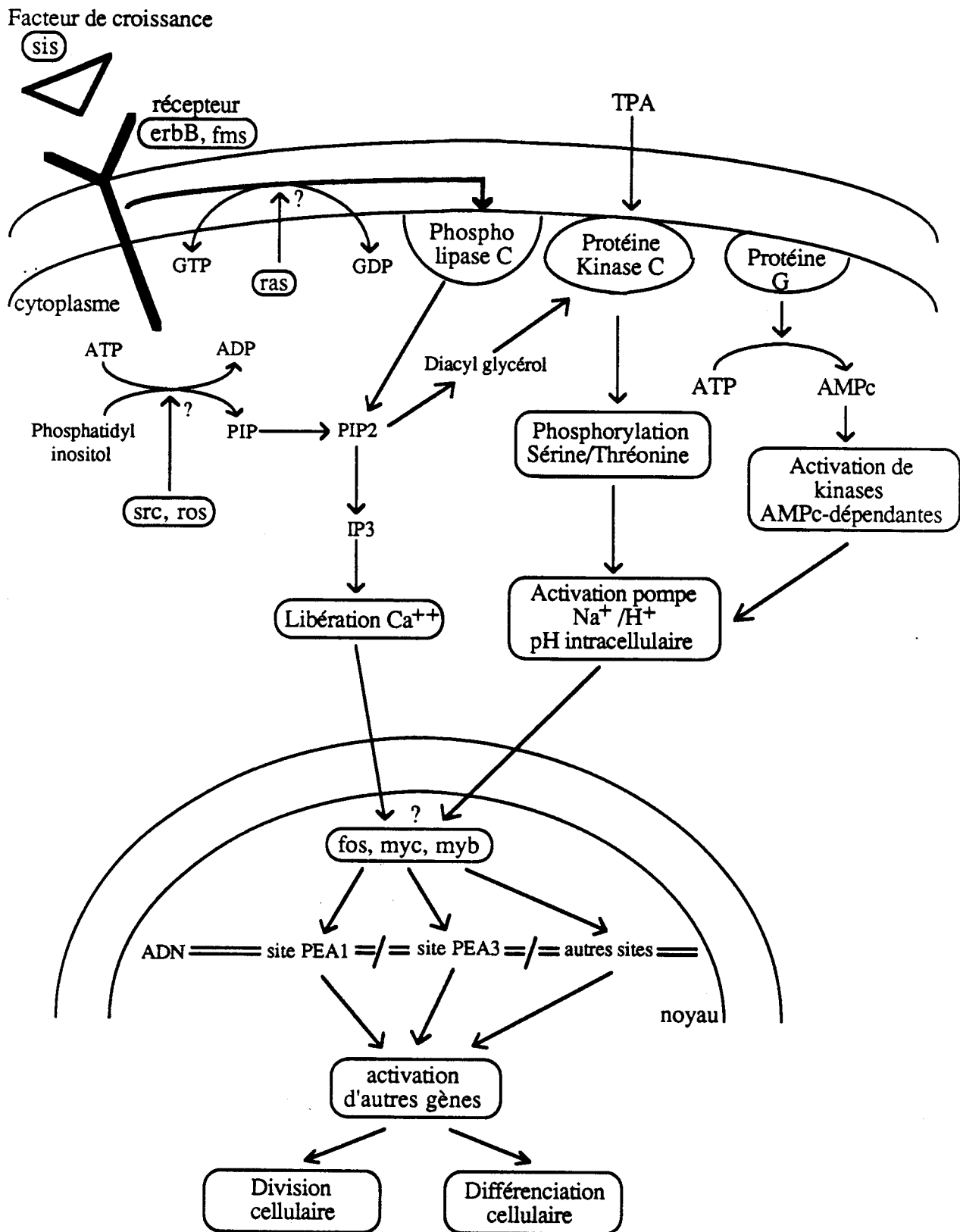


Figure 9 : La cascade des oncogènes (D'après Goustin et al. 1986).

division cellulaire.

Les oncogènes ont pu être regroupés dans plusieurs classes fonctionnelles. Ces fonctions peuvent concerner toutes les étapes qui assurent le passage du signal extracellulaire, fourni par un facteur de croissance par exemple, à l'activation de gènes effecteurs responsables de la progression de la cellule à travers les différentes phases de son cycle. La cascade d'événements pouvant conduire à la mitose et dans laquelle interviendraient les produits de traduction des oncogènes est schématisée sur la figure 9. (Goustin et al. 1986).

Ainsi, les protéines oncogènes peuvent être :

i) un facteur de croissance : *v-sis* code pour l'une des deux sous-unités du PDGF (William et al. 1985).

ii) un récepteur membranaire, *v-erbB* code pour une version tronquée et constitutivement fonctionnelle du récepteur de l'EGF (Downward et al. 1984).

iii) une protéine sous-membranaire ou cytosolique dont le rôle sera de transmettre le signal mitotique vers le noyau. La transduction membranaire peut impliquer la stimulation d'une phospholipase ou d'une adénylate cyclase qui sont associées à la membrane plasmique et qui catalysent la formation d'intermédiaires agissant sur des ionophores et des protéines-kinases spécifiques de résidus tyrosine (*v-src*) ou sérine et thréonine (*v-mil/raf*). Ces changements ioniques et les phosphorylations de protéines cibles affecteront le métabolisme et le comportement des cellules qui en sont le siège (Gilman 1984, Denhez et al. 1988).

iiii) une protéine nucléaire, faisant éventuellement office de récepteur intracellulaire (aux hormones thyroïdiennes pour le produit de l'oncogène *c-erbA*), ou capable d'interagir avec l'ADN (*v-myc*, *v-myb*, *v-fos*) et de moduler directement ou indirectement la transcription d'autres gènes susceptibles de contrôler la division et/ou la différenciation cellulaire. Ainsi, les produits des oncogènes *v-fos* et *v-jun* s'associent en un complexe qui se fixe spécifiquement sur une séquence nucléotidique de reconnaissance (site AP-1/PEA-1) présente dans le promoteur de gènes cibles (Curran et Franza 1988).

2. Quelques Oncogènes.

2.1. *v-src*.

L'un des oncogènes les plus étudiés est probablement l'oncogène *v-src* transduit dans le rétrovirus du sarcome de Rous (RSV). Ce virus a été initialement isolé à partir d'une tumeur de poulet, et il existe sous forme de plusieurs souches distinctes, par exemple Schmidt-Ruppin (SR) et Prague (Pr). L'oncogène *v-src* code pour une protéine pp60^{*v-src*} de 526 acides aminés. Cette protéine a un poids moléculaire d'environ 60 kDa et est localisée sur la face interne de la membrane plasmique et au niveau des contacts intercellulaires. Elle possède comme seule fonction connue une activité kinase spécifique des résidus tyrosine, et subit deux types de modifications post-traductionnelles : i) une myristilation de son extrémité amino-terminale qui permet une association avec la membrane cytoplasmique, et ii) une phosphorylation des résidus sérine Ser 17 et tyrosine Tyr 416, et de plusieurs autres sites mineurs dans sa moitié amino-terminale. La

phosphorylation (en fait une autophosphorylation) de la Tyr 416 située dans le domaine catalytique jouerait un rôle de régulation positive de l'activité kinase exogène de la protéine. La principale différence entre les gènes cellulaire et viral affecte l'extrémité carboxy-terminale de leur produit de traduction : le remplacement de 19 acides aminés de la pp60^{C-src} par 12 acides aminés de la pp60^{V-src} élimine, dans le produit viral, la tyrosine Tyr 527, site majeur de phosphorylation de la protéine cellulaire contrôlant négativement la phosphorylation de la Tyr 416.

Le ou les substrats spécifiques de la pp60^{src} ne sont pas connus, mais différentes études *in-vitro* ont permis de dégager certaines présomptions : i) plusieurs protéines cellulaires possédant des tyrosines phosphorylées ont pu être mises en évidence dans des cellules transformées par l'oncogène *v-src*. Ce sont principalement des protéines associées au cytosquelette (vinculine, calmoduline, taline, p36 et p42), ainsi que des enzymes glycolytiques (énolase). La phosphorylation de constituants du cytosquelette par la pp60^{V-src} pourrait être responsable des altérations de l'architecture cellulaire associées au phénotype transformé; ii) la protéine pp60^{V-src} pourrait agir sur la voie des inositides dont le cycle permet la libération du calcium intracellulaire et active la protéine kinase C. Cette dernière possède une activité sérine et thréonine kinase, est stimulée par le diacylglycérol et le calcium, et est le récepteur de substances chimiques promotrices de tumeurs telles que le TPA (Jove et Hanafusa 1987); iii) l'activité tyrosine kinase de la pp60^{C-src} de xénope est augmentée dans les cellules en mitose (Chackalaparampil et Shalloway 1988). La protéine pp60^{V-src} pourrait ainsi être l'un des substrats de l'activité kinase associée à la protéine p34^{cdc2}, un facteur essentiel impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (Morgan et al. 1989).

2.2. *c-Ha-ras*.

Le gène *ras* a été initialement identifié dans les souches Harvey (Ha) et Kirsten (Ki) des virus de sarcome de rat, deux virus hautement transformants engendrés par la transduction des deux proto-oncogènes cellulaires *Ha-ras* et *Ki-ras* (Barbacid 1987). Ces gènes codent pour une protéine p21^{ras} de 21 kDa associée à la membrane plasmique. Cette protéine est capable de fixer et d'hydrolyser le GTP, et présente de bonnes homologues de séquences en acides aminés avec les protéines G. Ces protéines G contrôlent le métabolisme de l'adénylate cyclase, une enzyme qui, en réponse entre autres à des stimuli β -adrénergiques, active la synthèse de l'AMPC, un médiateur intracellulaire ubiquitaire. Ces différentes caractéristiques suggèrent que la protéine p21^{ras} pourrait participer à la transduction des signaux à travers la membrane cellulaire.

Une des différences entre les produits de traduction du proto-oncogène cellulaire et de l'oncogène viral réside dans la mutation de la glycine en position 12 en une valine. Cette modification n'altère pas l'aptitude de la protéine p21^{ras} à fixer le GTP mais entraîne une diminution de sa capacité à l'hydrolyser en GDP. En fait, une protéine activatrice de l'activité GTPasique (ou protéine GAP) se lie au complexe p21^{ras}-GTP et augmente son activité GTPasique, laquelle entraîne la conversion de ce complexe en p21^{ras}-GDP inactif, puis s'en dissocie. Au contraire, la protéine GAP a une action réduite sur la p21 mutée qui tend à rester associée au GAP, sous la forme d'un complexe p21^{ras}-GTP constitutivement actif. Ceci pourrait conduire à une transmission incontrôlée des signaux de transduction (McCormick 1989). L'acquisition d'un tel

pouvoir transformant peut aussi être favorisée par d'autres mutations du gène *ras*, qui touchent en particulier les acides aminés 59 et 61 de la protéine p21^{ras} et réduisent également son activité GTPasique (Barbacid 1987).

2.3. v-myc.

L'oncogène *v-myc* a été isolé à partir de virus de leucémie aiguë du poulet (MC29, CMII, OK10 et MH2) qui induisent des myélocytomatoses, ou des carcinomes du foie et du rein, et qui transforment, in vitro, les fibroblastes et les macrophages. L'oncoprotéine virale est généralement une protéine de fusion entre le produit du gène *myc* et celui d'autres gènes rétroviraux (*gag*, *pol*). Dans les cellules normales en croissance, le gène *c-myc* s'exprime sous la forme d'une protéine nucléaire dont le poids moléculaire est voisin de 60 kDa. Localisée dans la matrice nucléaire, et capable de se lier à l'ADN, la protéine *myc* semble être associée à l'activation de gènes cellulaires (par exemple le gène de la "Heat Shock Protein 70") (Kingston et al. 1984). Les actions transformantes de *v-myc* dépendent du type de cellule et de l'espèce animale étudiés, et incluent la modification de la morphologie, la capacité à croître en milieu semi-solide, l'immortalisation et la capacité de tumorigénicité accrue des cellules dans des animaux syngéniques. Toutefois, dans les cellules murines, le produit de *v-myc* semble principalement induire une immortalisation (Land et al. 1983).

L'activation du gène *c-myc* s'effectue par une dérégulation du contrôle de son expression, par l'intégration de séquences promotrices rétrovirales ou des translocations chromosomiques (Saule 1988).

3. Quelques Virus Transformant à ADN.

3.1. Le Virus simien 40.

Le virus simien 40, ou SV40, est un virus transformant dont l'un des produits de traduction précoce, l'Antigène Grand T, (Ag-T), constitue une oncoprotéine virale sans équivalent cellulaire. L'Ag-T, est une phosphoprotéine multifonctionnelle dont le poids moléculaire est de 81 kDa. L'Ag-T est responsable de l'immortalisation de certaines cultures primaires et de la transformation phénotypique de lignées établies de cellules de mammifères. Cependant, on ne connaît pas ou peu les mécanismes par lesquels l'Ag-T exerce ces effets biologiques. Sa forme nucléaire (99%) semble responsable de l'immortalisation cellulaire, alors que sa forme cytoplasmique minoritaire (1%) pourrait participer à la transformation morphologique de la cellule. Outre ses fonctions spécifiquement virales de contrôle de la réplication et de la transcription de SV40, l'Ag-T est capable, in vitro, de fixer et d'hydrolyser l'ATP, de se lier à l'ADN double-brin, de s'associer spécifiquement aux protéines p53 et HSP70, à l'ADN-polymérase α et au produit du gène du rétinoblastome Rb (Livingston et Bradley 1987). Il est concevable qu'en s'associant avec la protéine Rb, l'Ag-T inhibe son activité et provoque ainsi une dérégulation de la prolifération cellulaire (cf § III.4.) (Green 1989).

3.2. Le Virus du Papillome Bovin.

Les virus de papillome engendrent des tumeurs épithéliales bénignes et sont parfois associés à des tumeurs malignes chez leurs hôtes naturels. In vitro, ils induisent la transformation de fibroblastes murins. Les études génétiques ont été surtout développées sur l'un d'entre-eux, le virus du papillome bovin (BPV-1). Le génome de BPV-1 contient deux gènes transformants (E5 et E6) dont les produits de traduction possèdent des poids moléculaires respectifs de 15,5 et 7 kDa et sont considérés comme des oncoprotéines. La première de ces deux protéines a une localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique, la seconde est trans-membranaire. Des travaux récents suggèrent que E5 pourrait stimuler l'activité des récepteurs membranaires de l'EGF et du CSF-1 ; cette stimulation s'accompagne d'une augmentation de la demi-vie et de l'endocytose de ces récepteurs, et conduit à la synthèse d'ADN cellulaire (Talmage et al. 1989). Les deux protéines programmées par les gènes E5 et E6 sont chacune suffisantes pour transformer des cellules et semblent utiliser pour ce faire des mécanismes au moins en partie différents puisqu'elles n'agissent pas avec la même efficacité sur les mêmes cellules (Martin et al. 1989).

De manière générale, les lignées transformées in vitro par BPV-1 présentent des traits de transformation morphologique peu développés, ce qui contraste avec leur fort pouvoir tumorigène et métastatique dans des animaux syngéniques (Binetruy et al. 1987).

4. L'Activation d'Oncogènes et la Progression Tumorale.

Le processus de carcinogenèse, c'est-à-dire pour une cellule le passage d'un état normal vers un état de transformation maligne, est un phénomène à étapes multiples. Quatre phases principales peuvent être distinguées : l'initiation, la promotion, la progression et l'invasion (par métastases). Ces événements ont pu, dans certains cas, être associés à l'activation d'oncogènes. Cette activation peut être qualitative (*ras*, *erb-B*) et/ou quantitative (*myc*) et résulter de mutations ponctuelles, de l'intégration en cis d'éléments viraux de régulation, de translocations chromosomiques, et de l'amplification de séquences d'ADN (Bishop 1987).

Si la transformation cellulaire est séquentielle, deux ou plusieurs oncogènes activés doivent vraisemblablement intervenir, chacun à leur niveau, pour assurer la progression tumorale. Ainsi on a pu mettre en évidence, in vitro, une coopération entre deux classes d'oncogènes appelées "immortalisants" (*myc*) et "transformants" induisant la transformation morphologique (*ras*) (Murray et al. 1983).

Toutefois, la progression tumorale ne se résume pas à une pièce en deux actes aussi simpliste. Un exemple particulièrement frappant concerne le cancer du colon dont on a pu jalonner l'évolution. Cette dernière implique des activations et des inhibitions successives de gènes (Marx 1989). Parmi ces gènes, figurent des candidats au titre de suppresseurs de tumeurs, à savoir des gènes dont la perte ou l'activation coïncide avec un avancement dans la voie de la cancérisation. Plusieurs de ces gènes, parfois aussi appelés anti-oncogènes ont été isolé à ce jour, en particulier le gène du rétinoblastome Rb, p53, et le gène de la tumeur de Wilm (Weinberg 1988, Finlay et al. 1989, Hoffman 1989). Le mode d'action des anti-oncogènes est mal connu et est

vraisemblablement aussi complexe que celui des oncogènes. Les protéines Rb et p53 ont la faculté de se lier spécifiquement à diverses protéines oncogènes telles que l'Ag-T de SV40, E1A de l'adénovirus, E5 de BPV et E7 de HPV. Cette association pourrait être un moyen commun, pour ces différents virus transformants, d'induire la transformation cellulaire en inhibant le pouvoir "suppresseur" d'anti-oncogènes (Green 1989). En outre, l'expression de Rb et de p53 semble être modulée au cours du cycle cellulaire. Ainsi, p53 pourrait être impliquée dans le contrôle du passage de la cellule des stades G₀ en G₁ et S (Coulier et al. 1985). La réplication du virus SV40 est rendu plus efficace dans des cellules en phase de croissance, et serait ainsi augmentée par l'inactivation, par l'Ag-T, des produits de tels anti-oncogènes (Green 1989). Ces différents résultats permettent de construire un modèle mécanistique général où une régulation positive de la division cellulaire serait contrôlée par une régulation négative, la vie d'une cellule normale résultant de cet équilibre subtil entre contrôles positifs et négatifs. Les tumeurs proviendraient d'un dérèglement de cette balance par la rupture d'un des fléaux, c'est-à-dire par une modification activatrice d'oncogène ou inhibitrice d'anti-oncogène en laissant intact le gène antagoniste (Weinberg 1988).

5. La Mort Cellulaire.

La transformation la plus radicale que puisse subir une cellule est le passage de la vie à la mort. Si cette mort est inéluctable, elle n'en est pas pour autant fortuite ; elle est programmée, au même titre que la multiplication et la migration cellulaire qui constituent avec elle les étapes majeures du destin d'une cellule. La mort d'une cellule peut revêtir deux formes : la nécrose ou assassinat quand il y a intervention d'agents extérieurs physiques, chimiques ou biologiques (hyperthermie, virus, molécules toxiques), et l'apoptose ou suicide pour répondre aux exigences de l'ontogenèse (l'exemple le plus connu est la résorption de la queue du têtard).

Le processus de nécrose le mieux connu résulte d'une "perforation" de la membrane plasmique. Les stimuli létaux augmentent la perméabilité cellulaire, par le biais d'altérations de la structure membranaire et/ou de l'activité des pompes cationiques. Ces changements modifient la distribution de l'eau dans les différents compartiments cellulaires et s'accompagnent : i) d'une dilatation du réticulum endoplasmique, ii) de modifications du cytosquelette et donc de la morphologie extérieure de la cellule, iii) d'une densification des mitochondries, iv) de la floculation de la chromatine, et v) d'une inhibition de la synthèse protéique. Cette phase encore réversible est alors suivie de changements irréversibles que l'on pense être associés à : la libération d'enzymes lysosomales, la formation de radicaux oxygénés toxiques, une chute de la concentration en ATP cellulaire et l'activation de phospholipases dépendantes du calcium. Dans l'hypothèse la plus probable, les mouvements de calcium activeraient les phospholipases qui provoqueraient des ruptures au sein de la membrane plasmique.

L'apoptose, dont le nom rappelle à juste titre la mort et la chute programmée des feuilles d'arbres à l'automne, découle d'une cascade d'événements comprenant, après induction et transduction du signal correspondant, une série d'étapes intracellulaires. Ce déroulement

programmé comporte, sur le plan morphologique, une condensation cytoplasmique avec de profondes invaginations donnant un aspect bulleux à la surface cellulaire. Parallèlement, l'ADN se concentre sous la forme de masses sous-jacentes à la membrane nucléaire et le nucléole se fragmente. Ces phénomènes s'accompagnent d'une dégradation de l'ADN en fragments de 180 à 200 paires de bases correspondant sensiblement à la taille d'un nucléosome, suggérant l'intervention précoce d'endonucléases. On a mis en évidence une induction de gènes et une synthèse de macromolécules dont la nature et la fonction ne sont pas connues à ce jour. Une phase ultérieure de ce processus consiste en une fragmentation cellulaire se traduisant par la formation de lobules ou corps apoptotiques constitués de cytosol et de fragments de noyau entourés de membrane plasmique. Ces micro-cellules non viables sont ensuite rapidement dégradées par des protéases issues des lysosomes, ou phagocytées in vivo (Duvall et Willie 1986, Sellins et Cohen 1987, Golstein 1989).

Notons que Avery et Horvitz (1987) ont commencé à lever un coin du voile sur les aspects génétiques de cette mort cellulaire en démontrant l'existence d'un gène *ced-3* dont la mutation prévient la mort programmée de cellules neuronales dans le développement de *Caenorhabditis elegans*.

III. Parvovirus et Oncosuppression.

1. Association des Parvovirus avec les Tumeurs.

La plupart des parvovirus ont initialement été isolés à partir de tumeurs, de stocks de virus oncogènes, de lignées de cellules tumorales ou d'animaux soumis à des traitements carcinogéniques (Tableau 1). Aucune corrélation n'a toutefois pu être établie entre la présence de l'un ou de l'autre de ces parvovirus et quelque type particulier de tumeur (Parker et al. 1970). D'autres observations allaient renforcer l'idée d'une association entre les parvovirus et les cancers : i) les tentatives d'isolement de parvovirus à partir de tissus normaux ont échoué (Kilham et Olivier 1959), à l'exception toutefois d'embryons et de placentas humains (Toolan 1961), ii) les parvovirus AAV dépendent pour leur réplication d'une co-infection par des virus oncogènes (adéno- ou herpès-virus) (Rose 1974) ; il n'est donc pas étonnant que ces virus aient souvent été isolés de tissus cancéreux soupçonnés d'héberger ces virus transformants (Bantel-Schaal et Zur Hausen 1984, Tattersall et Ward 1978).

L'oncotropisme des parvovirus soulève la question de l'influence possible de ces parvovirus sur le développement des désordres néoplasiques. Cette interaction pourrait revêtir deux formes : soit un rôle causal des parvovirus dans l'oncogenèse, soit l'apparition au sein des tumeurs d'un micro-environnement à haute activité mitotique favorable à la réplication des parvovirus (d'où l'enrichissement de ces tissus en particules virales pour des raisons opportunistes). La première de ces deux hypothèses - une action oncogène des parvovirus - fut infirmée par la constatation que des animaux porteurs chroniques de parvovirus ne présentent aucun symptôme de type cancéreux (Tattersall et Ward 1978). Bien au contraire, des études ultérieures montrèrent que l'effet opposé prévalut : les parvovirus réduisent voire suppriment la formation de tumeurs chez leurs hôtes. En d'autres termes, les parvovirus exercent in vivo une activité d'oncosuppression qui consiste en la prévention de la formation de cancers ou de tumeurs préexistantes.

2. Persistence, Latence et Activation Parvovirales.

Un certain nombre d'études a montré que la persistance des parvovirus dans l'organisme, soit sous forme latente, soit en tant que virus infectieux, était une conséquence à long terme, fréquente, voire inévitable, de l'infection parvovirale. Ainsi, la plupart des souches de parvovirus de rongeurs ont été isolées à partir d'animaux infectés qui exprimaient des taux parfois importants en anticorps dirigés contre ces virus (Kilham et Olivier 1959, Csiza et al. 1971, Bonnard et al. 1976, van der Eb et Bernards, 1984) ; en outre, des animaux infectés expérimentalement présentent des niveaux appréciables d'anticorps pendant de longues périodes, voire de manière permanente (Robey et al. 1968, Parker et al. 1970, Robinson et al. 1971). Comme les virus infectieux ne sont généralement détectables que pendant les deux semaines suivant l'infection, de tels titres en anticorps suggèrent que le système immunitaire hôte pourrait être exposé à une stimulation continue, à un niveau bas, par des antigènes viraux qu'il serait incapable d'éradiquer complètement.

L'interprétation de ces observations en terme d'infection chronique persistante, plutôt que de ré-infections enzootiques successives au sein de la population, est appuyée par le fait que des particules virales infectieuses ont pu être isolées à partir de tissus présentant des taux significatifs en anticorps anti-parvovirus. Ainsi, MVM a pu être détecté dans des extraits rénaux et sanguins de souris séropositives (Parker et al. 1970) ; il en a été de même pour le virus de rat (RV) dans la plupart des tissus de rat testés sur des cellules en culture (Robey et al. 1968) ; enfin, les parvovirus PFLV et PPV ont pu aussi être récupérés à partir d'animaux séropositifs infectés in utéro (Curran et Franza 1988).

La plupart des infections chroniques latentes par des parvovirus ne sont pas délétères pour leur hôte ; seules quelques maladies y sont associées. Par exemple, une infection persistante engendrera une hépatite ou la formation de cals osseux défectueux lorsque des cellules susceptibles au virus sont induites à se multiplier au cours d'une régénération accidentelle de foie ou d'os (Tattersall et Ward 1978).

Au niveau moléculaire, plusieurs équipes ont montré que l'ADN des AAV s'intégrait dans le génome cellulaire après infection en l'absence de virus auxiliaire. Le provirus demeure silencieux et n'est réactivé qu'après une sur-infection de cellules par un adéno-ou un herpès-virus (Laughlin et al. 1986, Berns et Bohnzky 1987, Walz et Schlehofer 1989, Krauskopf et al. 1989). Par contre, rien ne permet actuellement d'adopter ce même schéma pour les parvovirus autonomes : personne n'a, à ce jour, mis en évidence de provirus intégrés dans le génome de cellules infectées de manière persistante par des parvovirus autonomes. Les différences entre les structures terminales du génome des AAV et des parvovirus autonomes pourraient déterminer la capacité de l'ADN viral à s'intégrer ou non. On peut donc supposer que la persistance des parvovirus autonomes dans une population cellulaire résulte d'une restriction à leur multiplication, qui limite la production et l'effet cytopathique de ces virus à une fraction, sans cesse renouvelée, des cellules. Il est également concevable que dans certaines conditions un mode non lytique de production virale s'établisse. La raison pour laquelle les parvovirus échappent, du moins en partie, à la neutralisation immunitaire, in vivo, n'est pas connue.

Un autre aspect important de la latence parvovirale, dans ses implications pour les interactions virus-cellule hôte, concerne la réactivation possible des virus endogènes et la réapparition de virions infectieux dans des animaux apparemment indemnes de virus. Deux scénarios principaux de réactivation peuvent être envisagés : l'immunosuppression et l'induction de tissus cibles, en particulier de tumeurs. Ainsi plusieurs souches de RV furent isolées de rats cliniquement normaux après l'administration d'une dose non létale de cyclophosphamide (ElDadah et al. 1967), après l'induction de tumeurs hépatiques (Kilham et Olivier 1959) ou à la suite d'un traitement carcinogène (Payne et al. 1963). Les mécanismes impliqués dans ce phénomène de réactivation parvovirale restent à déterminer. Ces observations peuvent être reliées à l'oncotropisme parvoviral, c'est-à-dire au fait que la transformation néoplasique fait apparaître des cellules cibles particulièrement permissives à la réplication virale. Ainsi, qu'elle soit latente ou chronique, une infection parvovirale laisse dans l'animal hôte une empreinte durable qui est susceptible d'être révélée à l'occasion d'accidents néoplasiques. Un aspect potentiellement important de la persistance

parvovirale serait de fournir un réservoir de virus rapidement disponible par réactivation, afin d'assurer une protection à long terme contre d'éventuelles maladies néoplasiques spontanées ou induites, comme cela sera discuté ultérieurement.

3. La Surveillance de Tumeurs Spontanées par les Parvovirus.

... L'association très fréquente des parvovirus avec des tissus néoplasiques a conduit à impliquer ces agents dans l'oncogenèse. Cependant, des études menées à long terme ont montré que les infections persistantes parvovirales ne sont pas associées à une fréquence accrue de cancers. Au contraire, des animaux infectés de manière persistante se révèlent être protégés contre l'apparition de tumeurs spontanées. Des hamsters survivant, sans syndrome pathologique, à une infection à la naissance par le parvovirus H-1 ou H-3, ont un taux d'apparition de tumeurs spontanées 5 fois inférieur à celui de leurs congénères non infectés, ce taux peut être réduit de 20-25 fois chez les individus infectés ayant subi des lésions cranofaciales de type mongoloïde (Toolan 1967).

Il est possible qu'une telle protection parvovirale puisse aussi s'exercer chez l'homme, mais les rares données disponibles ne permettent pas de tirer de conclusions définitives. Plusieurs études épidémiologiques sur la population humaine ont montré qu'un pourcentage élevé (20 à 60%) des individus sont séropositifs pour des parvovirus de type autonome (H-1, B19) (Benchimol et al. 1982, Anderson et Pattison 1984) et défectif (AAV) (Sprecher-Goldberger et al. 1970, Mayor et al. 1976, Georg-fries et al. 1984, Berns et Bohenzky 1987). Certains cancers sont apparemment plus fréquents dans la sous-population n'ayant pas subi d'infection parvovirale. Par exemple, Mayor et al. (1976) ont observé que l'indice de séropositivité pour AAV est 3 à 4 fois moindre chez les patients atteints de carcinomes cervicaux et prostatiques que dans un groupe contrôle. On peut interpréter ces données en termes d'une protection conférée par l'infection parvovirale latente contre le développement de cancers. Si tel était le cas - ce qui reste à démontrer - nous aurions là, un exemple de l'adaptation réussie d'un parasite à un hôte, accompagnée d'un phénomène de symbiose où l'homme trouverait pleinement son avantage médical.

Ainsi, au lieu de parler d'un éventuel rôle causal des parvovirus sur l'induction tumorale (cf § III.1.), il faut plutôt voir dans cette association, une situation où les parvovirus sont "attirés" par les tumeurs pré-existantes, en raison de leur affinité particulière pour des cellules en prolifération et à un stade de la différenciation plus immature. Il est probable que la formation spontanée de tumeurs active ou amplifie une infection parvovirale persistante, et engendre une association de type opportuniste entre ces virus et les cancers. Et le fait que les animaux soient porteurs permanents et sains de parvovirus, modifie apparemment l'équilibre entre le développement de tumeurs et les réaction de défense de l'hôte, au profit de ce dernier. Les parvovirus pourraient ainsi interférer avec les processus physiologiques complexes qui conditionnent le développement des tumeurs, ce qui se traduit par un phénomène de surveillance parvovirale anticancéreuse.

Tableau 2 : Inhibition par les parvovirus de la tumorigénèse induite.

<u>Activité antinéoplasique^a.</u>				
<u>Traitement tumorigène</u>	<u>animal hôte</u>	<u>Parvovirus autonomes</u>	<u>AAV</u>	<u>Référence</u>
<u>virus tumorigènes</u>				
Ad2, 12, 31	hamster	H-1 : +	AAV-1 : + AAV-2 : +	Kirschtein et al. 1968 Toolan & Ledinko 1968 Mayor et al. 1973 de la Maza & Carter 1981
SV40	hamster	H-1 : +	AAV-2 : -	Siegl 1984 Mayor et al. 1973
MoMuLV	rat	RV : +		Bergs 1969
<u>Carcinogène chimique</u>				
7,12 DMB(a)A	hamster	H-1 : +		Toolan et al. 1982

^a. + : plus de 50% d'inhibition de la transformation.
- : différence non significative.

Tableau 3 : Suppression par les parvovirus de cellules tumorales implantées.

<u>cellules transplantées</u>		<u>Activité antinéoplasique^a.</u>			
<u>Origine</u>	<u>agent transformant</u>	<u>Animal hôte</u>	<u>Parvovirus autonomes</u>	<u>AAV</u>	<u>Référence</u>
hamster	Ad5	hamster		AAV-2 : +	Ostrove et al. 1981
hamster	Ad12	hamster		AAV-2 : +	de la Maza & Carter 1981
hamster	HSV-2	hamster		AAV-1 : +	Cukor et al. 1975 Blacklow et al. 1978
hamster	SV40	hamster		AAV-1 : -	Cukor et al. 1975 Blacklow et al. 1978
hamster	DMBA	hamster		AAV-2 : -	Ostrove et al. 1981
hamster	DMNA	hamster		AAV-1 : -	Blacklow et al. 1978
souris	c-Ha-ras activé Ascites de	souris "nude"		AAV-2 : +	Katz & Carter 1986
souris	Ehrlich	souris	MVMp : +		Guetta et al. 1986
chien	sarcome vénérien transmissible	chien	CPV : + FPV : +		Yang 1987
humain	SV40	souris "nude"	H-1 : +		Dupressoir et al. 1989

^a. + : plus de 50% d'inhibition de la transformation.
- : différence non significative.

4. L'Inhibition par les Parvovirus de la Tumorigenèse Induite.

Les parvovirus ne sont pas seulement capables d'interférer avec la tumorigenèse spontanée, mais peuvent aussi supprimer efficacement l'induction expérimentale de tumeurs dans des animaux (Siegl 1984, Berns et Bohenzky 1987).

Le tableau 2 montre que l'infection parvovirale de rongeurs nouveau-nés les protège significativement contre la formation de tumeurs induites, simultanément ou postérieurement, par des agents transformants viraux et chimiques. 95% des hamsters traités au DMBA à l'âge d'un mois forment des tumeurs; ce pourcentage chute à 38% lorsque les animaux subissent une injection de parvovirus H-1 à la naissance, cette protection persistant à long terme (Toolan et al. 1982). Le virus H-1 supprime aussi l'induction de tumeurs par l'adénovirus 12 chez le hamster (Toolan et Ledinko 1968). De même, le parvovirus RV réduit de moitié l'incidence de leucémies chez des rats exposés au virus Moloney de la leucémie murine (MoMuLV) (Bergs 1969). Dans toutes ces études le parvovirus est inoculé au moment ou avant le traitement carcinogène et prévient alors la formation de tumeurs.

Les résultats consignés dans le tableau 3 indiquent que cette propriété inhibitrice peut être étendue à des tumeurs transplantées, lorsque les parvovirus sont inoculés, soit aux animaux, soit aux cellules transformées, avant ou au moment de la transplantation. Les parvovirus réduisent la fréquence des cancers (de l'ordre de deux tiers en moyenne) et ils retardent l'apparition et diminuent la taille des tumeurs résiduelles dans les animaux infectés. Ainsi, les parvovirus semblent aussi perturber le développement de tumeurs établies. Les parvovirus autonomes sont peu spécifiques quant à la nature des tumeurs (leucémie, sarcome, carcinomes) et des agents transformants (virus tumorigènes, carcinogènes chimiques) qu'ils antagonisent, tandis que les parvovirus défectifs s'opposent plus particulièrement à la transformation cellulaire induite par les adéno- et herpès-virus dont ils dépendent pour se répliquer. Cette dernière caractéristique suggère que l'activité antinéoplasique des AAV est en grande partie liée à leurs relations étroites avec les virus auxiliaires. Le fait que les parvovirus autonomes puissent se répliquer dans une gamme plus vaste de cellules transformées expliquerait la large ouverture de leur spectre d'oncosuppression par rapport aux AAV.

L'isolement fréquent de parvovirus à partir de tumeurs transplantées indique que l'oncotropisme des parvovirus n'abolit pas nécessairement le développement néoplasique. Récemment, Yang (1987) a montré que des souches de parvovirus FPV et CPV interféraient avec la transplantation d'un sarcome vénérien canin transmissible. Cependant, l'efficacité de cette inhibition décroît si le traitement parvoviral est retardé, suggérant que l'inoculum parvoviral peut devenir limitant au fur et à mesure du développement tumoral. L'activité oncosuppressive des parvovirus pourrait alors être saturée par l'augmentation du nombre de cellules tumorales par rapport au titre en virus infectieux dans l'animal (Ostrove et al. 1981, Katz et Carter 1986). Par conséquent, des

facteurs tels que la taille de la tumeur, la dose infectieuse, la voie de l'inoculation ou les restrictions immunitaires à l'envahissement de l'organisme par le virus, affectent probablement l'efficacité des interférences entre les parvovirus et l'oncogenèse. Ceci implique que des infections protégeant les animaux contre la formation de novo de cancers, n'enraieraient pas nécessairement le développement de tumeurs préétablies.

5. Les Mécanismes Possibles de l'Oncosuppression Parvovirale.

Le mécanisme de l'inhibition de la tumorigenèse par les parvovirus est encore mal connu, mais il pose toute une série de questions touchant aux inter-relations biologiques entre les parvovirus et leurs cellules hôtes. L'association d'une infection virale avec une diminution de l'incidence de cancers n'est pas sans précédent, mais l'oncosuppression par les parvovirus est remarquable par ses potentialités et son caractère général. Ce phénomène d'oncosuppression parvovirale est très certainement multi-factoriel, et nous avons essayé d'en relever les différentes voies possibles, tout en gardant à l'esprit que celles-ci ne sont pas mutuellement exclusives. Les processus envisagés ci-dessous sont encore hypothétiques in vivo, mêmes si certains sont observables in vitro.

5.1. La Réponse Immunitaire.

Déjà, dans le passé, différentes équipes avaient observé qu'une infection par certains virus, en particulier les rétrovirus de type C protégeaient les animaux concernés contre l'apparition de tumeurs, qu'elles soient spontanées ou induites par un carcinogène (le DMBA) (Kelloff et al. 1976, Weislow et al. 1978). Ces infections s'accompagnent de l'apparition de nouveaux antigènes d'origine virale sur la surface des cellules tumorales, conséquence du mode de production de ces virus par bourgeonnement (Kelloff et al. 1976). Cependant, comme nous l'avons mentionné plus haut, les parvovirus ne bourgeonnent pas à partir de la membrane plasmique, mais s'accumulent dans les noyaux des cellules infectées et sont libérés, dans la plupart des cas, au moment de la lyse de la cellule (Rose 1974, Chow et al. 1986). De ce fait, la reconnaissance d'antigènes spécifiques des parvovirus sur la surface des cellules tumorales infectées, comme cibles d'une réaction immune augmentée, n'est probablement pas la cause majeure de l'oncosuppression parvovirale. En outre, d'autres éléments concourent à infirmer l'hypothèse d'un rôle prépondérant de la réponse immunitaire dans le mécanisme de l'oncosuppression parvovirale : i) la capacité des virus AAV présentant d'importantes délétions (jusqu'à 70%) à supprimer l'oncogénicité des adénovirus (de la Maza et Carter 1981) ; ii) l'absence de corrélation simple entre le titre de parvovirus H-1 produits et le taux d'inhibition de l'apparition de tumeurs induites par le DMBA chez le hamster (Toolan et al. 1982) ; iii) l'exercice d'une surveillance parvovirale par H-1 contre l'implantation de cellules humaines transformées par SV40 chez des souris immunodéficientes (Dupressoir et al. 1989).

Toutefois, les implications de la réponse immunitaire de l'hôte ne peuvent être négligées. En effet, les virus AAV ralentissent voire inhibent la croissance, in vitro, de cellules transformées

par l'adénovirus. Si un tel phénomène existait aussi in vivo, ce délai de croissance pourrait être mis à profit par le système immunitaire pour enrayer la croissance des tumeurs. Par ailleurs, une autre contribution du système immunitaire à l'oncosuppression parvovirale est suggérée par d'autres observations, comme l'invasion lymphocytaire de tumeurs (Toolan et al. 1982), la baisse du potentiel métastatique de tumeurs résiduelles (Bender et al. 1987) et l'acquisition par les animaux d'une résistance à long terme à des transplantations répétées de tumeurs (Guetta et al. 1986).

5.2. Induction de L'Interféron.

Les virus sont susceptibles d'inhiber la transformation en induisant la production d'interféron (IFN) dans leurs cellules hôtes. En plus de son action antivirale, l'IFN est connu pour ses propriétés cytostatiques sur certaines cellules tumorales (Clemens et McNurlan 1985). Toutefois, il est peu vraisemblable que ce mécanisme contribue de façon importante à l'oncosuppression parvovirale. Les parvovirus étudiés à ce jour se sont en effet avérés être de mauvais inducteurs d'IFN; de plus, l'activité antinéoplasique des AAV ne peut être reproduite au moyen de poly(dI-dC), connu pour être un inducteur puissant de l'IFN (de la Maza et Carter 1981).

5.3. Induction du TNF.

Certains virus comme les virus de Sendaï ou de la maladie de Newcastle (NDV), exercent une action antitumorale qui résulte, au moins en partie, de la stimulation de la synthèse d'un facteur cellulaire, le facteur nécrosant de tumeurs ou TNF ("Tumor Necrosis Factor"). Ces virus semblent également augmenter la sensibilité de cellules transformées à l'effet cytotoxique du TNF (Lorence et al. 1988, Berent et al. 1986). La question reste ouverte pour les parvovirus. Toutefois, nous venons de voir que les parvovirus sont de mauvais inducteurs d'IFN, et le fait que l'induction du TNF puisse être couplé avec celle de l'IFN (Berent et al. 1986) ne milite pas en faveur d'un rôle majeur du TNF dans l'oncosuppression parvovirale.

5.4. Effets Directs des Parvovirus sur les Cellules Transformées.

Guetta et al. (1986) ont récemment montré que le parvovirus MVMP supprimait la croissance de tumeurs ascitiques de Ehrlich inoculées à des souris, pourvu que le virus soit viable et ait un **tropisme adéquat** permettant l'infection productive des cellules cibles et l'accumulation de particules virales dans la tumeur. Des capsides virales vides, des virus inactivés par les UV ou le variant allotropique MVMI n'exercent en effet aucune action inhibitrice sur la croissance des ascites. Ces observations suggèrent que le phénomène de l'oncosuppression parvovirale pourrait impliquer, au moins en partie, une interaction directe entre les parvovirus infectieux et les cellules cancéreuses ou leur précurseurs.

Différentes études suggèrent par ailleurs que des gènes cellulaires non indispensables pour la multiplication mais sous le contrôle de la différenciation, seraient requis pour permettre la répllication efficace des parvovirus (Tattersall 1978, Spalholz et Tattersall 1983, Tattersall et Bratton 1983). L'absence d'expression de ces gènes conduit au blocage du cycle viral à l'une ou l'autre des

Tableau 4 : Inhibition par les parvovirus défectifs AAV de la transformation cellulaire.

<u>Origine des cellules</u>	<u>Parvovirus</u>	<u>Transformation</u>		<u>Inhibition^a</u>	<u>Référence</u>
		<u>Agent transformant</u>	<u>Critère de transformation</u>		
embryon de hamster	AAV-1	Ad12 Si.Ad7 et 11	foyers	+	Casto & Goodheart 1972
embryon de hamster	AAV-2	Ad5	saturation élevée indép d'ancrage	+ +	Ostrove et al. 1981
embryon de souris	AAV-2	c-Ha-ras activé	foyers saturation élevée efficacité de clonage	- + +	Katz & Carter 1986

^a. + : plus de 50% d'inhibition de la transformation.

- : différence non significative.

étapes suivantes : adsorption virale (Spalholz et Tattersall 1983), translocation nucléaire (Tattersall 1978), initiation de la transcription virale (Spalholz et Tattersall 1983), synthèse de l'ADN viral (Spalholz et Tattersall 1983, Ron et Tal 1986, Chen et al. 1986, Gardiner et Tattersall 1988b, Cornelis et al. 1988a). La transformation maligne induit des changements dans le programme complexe de l'expression génique des cellules hôtes, avec la réactivation (ou l'extinction) de fonctions cellulaires normalement silencieuses (ou actives). Si certaines de ces fonctions cellulaires contrôlent positivement la réplication virale, elles pourraient accroître l'aptitude des cellules néoplasiques à subir les effets cytopathiques des parvovirus.

Cette hypothèse de travail pose les questions suivantes : i) la transformation cellulaire stimule-t-elle la croissance des parvovirus ? et ii) puisque la réplication virale s'accompagne de modifications cytopathologiques, les modifications de permissivité cellulaire aux parvovirus dues à la transformation affectent-elles le comportement et la survie des cellules infectées ? Ces questions expliquent l'intérêt croissant manifesté depuis quelques années pour le développement de systèmes de cultures cellulaires, in vitro, afin d'étudier les effets des parvovirus sur des cellules transformées en l'absence de facteurs intervenants extérieurs, tels que les réponses immunitaire et hormonale de l'animal hôte.

5.4.1. Réversion du Phénotype Transformé par les AAV.

En présence de parvovirus défectifs, des cellules transformées par un adénovirus, un herpès-virus, ou un oncogène *ras* activé, perdent, totalement ou en partie, leurs caractères de transformation tels que la haute densité de saturation et la capacité à croître en milieu semi-solide ou à former des foyers (cf tableau 4). Ainsi les AAV-1 inhibent-ils la transformation in vitro de cellules embryonnaires de hamster par l'adénovirus 12 (Casto et Goodheart 1972). De plus, si l'adéno- et l'herpès-virus favorisent la réplication des AAV, ces derniers inhibent la réplication des premiers (Carter 1984, Berns et Bohenzky 1987). Cependant, il est peu probable que l'inhibition de la réplication des virus transformants soit impliquée dans la suppression de l'oncogénicité de ces derniers, car : i) les particules défectives d'AAV inhibent efficacement l'oncogénicité des virus auxiliaires (de la Maza et Carter 1981) alors qu'elles ne perturbent pas la réplication adénovirale (Carter 1984, Carter et al. 1984) ; ii) les AAV inhibent l'oncogénicité de cellules transformées par l'adénovirus dont le phénotype transformé se maintient en l'absence de la réplication de l'ADN adénoviral (Tooze 1973) ; iii) les interférences entre l'AAV-1 et les adénovirus Ad-12, SA-7 ou SV-11 dans des cellules embryonnaires de hamster sont plus marquées pour la réplication des adénovirus que pour leur activité transformante (Casto et Goodheart 1972) ; iv) les parvovirus font aussi régresser des tumeurs induites par des agents non viraux, et des tumeurs transplantées qui ne nécessitent pas la réplication du virus transformant pour leur maintenance (Carter et al. 1984).

L'approche moléculaire du phénomène de réversion du phénotype transformé a débuté avec l'étude de cellules transformées par différents variants d'adénovirus. En effet, en se basant sur la fréquence d'apparition de tumeurs après l'infection de hamsters syriens, les adénovirus humains connus sont oncogéniques à des degrés divers. Une relation a été établie entre le pouvoir oncogène de ces adénovirus et : i) la capacité des cellules transformées à échapper au contrôle immunitaire

(Schrier et al. 1983, Bernards et al. 1983), et ii) la taille d'oncoprotéine Ag-T du gène adénoviral E1B, respectivement de 55 kDa et 58 kDa pour les adénovirus non-oncogéniques (Ad-5) et oncogéniques (Ad-12). La protéine E1B joue un rôle essentiel dans la transformation cellulaire par l'adénovirus (van der Eb et Bernards 1984). Ostrove et al. (1981) ont montré que le parvovirus AAV-2 supprimait les caractères de transformation induits par l'Ad12 dans des cellules de hamster, et que cet effet s'accompagnait d'une chute importante (de l'ordre de 80%) du taux en protéine E1B (58 kDa) disponible dans les cellules (50). Cette observation est d'autant plus intéressante que cette protéine est non seulement associée à la protéine cellulaire p53 (Sarnow et al. 1982), mais est aussi impliquée dans la régulation de l'expression adénovirale et dans le contrôle des synthèses cellulaires (Rowe et al. 1984, Babiss et Ginsberg 1984). L'indisponibilité de la protéine E1B de 58kDa semble être directement responsable de la réversion du phénotype transformé par les AAV. Toutefois, le mécanisme par lequel les AAV réduisent la concentration intracellulaire de la protéine E1B reste obscur (non synthèse? dégradation ? inactivation ?).

En outre, les AAV pourraient exercer une action cytotoxique aspécifique. Cet effet a été observé après l'inoculation dans des cellules de quantités importantes de particules virales, que celles-ci soient infectieuses ou inactivées. Ceci se traduit par une inhibition équivalente de la multiplication de cultures normales ou transformées, suite au blocage du cycle cellulaire en phase S ou G2 (Winocour et al. 1988). Il semble donc que la multiplication cellulaire soit affectée, négativement, par une interaction précoce entre les virions parentaux (ou certains de leurs composants) et des cibles cellulaires, sans que l'expression des gènes parvoviraux ne soit requise.

5.4.2. Action Cytocide des AAV sur des Cellules Initiées.

Les AAV sont capables d'avoir une action cytotocique sur des cellules exposées à des agents initiateurs de l'oncogenèse, en particulier des agents génotoxiques. Cette action est susceptible d'empêcher l'apparition de clones de cellules néoplasiques, bien que son rôle dans l'inhibition de la transformation reste à évaluer.

La dépendance des AAV vis-à-vis d'un virus auxiliaire n'est pas absolue. Les AAV peuvent se répliquer en l'absence de virus auxiliaire dans des cellules préalablement traitées avec des agents tumorigènes physiques, chimiques ou viraux (Schlehofer et al. 1986). Cette permissivité accrue s'accompagne i) d'une inhibition de l'amplification d'ADN induite par l'agent carcinogène (Schlehofer et al. 1986, Bantel-Schaal et Zur Hausen 1988), et ii) d'une lyse cellulaire. Ainsi, des cellules de hamster sont sélectivement lysées par des AAV-5 en l'absence de virus aidant, si elles sont exposées à des concentrations subléthales de carcinogènes chimiques au moment de l'infection ou juste après (Heilbronn et al. 1984). Il a été proposé que l'amplification génique constitue une réponse d'adaptation permettant aux cellules de mieux survivre aux traitements initiateurs (Schimke 1984). Les AAV interféreraient avec ce processus par compétition de liaison aux enzymes cellulaires qui modulent l'amplification génique. D'autre part, les cellules traitées par des agents carcinogènes soutiennent un certain taux de répllication et d'expression d'AAV (Schlehofer et al. 1986) ; l'ADN et/ou les protéines parvovirales ainsi produits pourraient également contribuer à la cytotoxicité observée. Ces résultats suggèrent que des agents initiateurs de la transformation cellulaire

Tableau 5 : Susceptibilité au parvovirus H-1 de lignées cellulaires humaines transformées.

Type cellulaire	origine	Agent transformant	Sensibilité à la lyse par H-1
<u>Fibroblastique</u>	prépuce	SV40	++
	rein	SV40	+++
	poumon	SV40	++
	poumon	rayons γ	++
	foie	4-NQO	+
	embryon	rayons γ	+++
	fibrosarcome	ND	++
<u>Epithéliale</u>	peau	spontané	+
	peau	c-Ha-ras activé	+
	peau	SV40	+++
	peau	SV40 + c-Ha-ras activé	+++
	sein	SV40	+
	carcinome de sein	ND	+
	carcinome	ND	(+)++
	de cellules squameuses		

ND : non déterminé. 4-NQO : 4-Nitroquinoline 1-oxide.

+, ++ et +++ correspondent à des degrés croissants de sensibilité à H-1.

induiraient des fonctions cellulaires capable de se substituer aux facteurs apportés par les virus auxiliaires (Ad, HSV) et conduirait ainsi à une perturbation par les AAV de l'établissement de la transformation.

5.4.3. Action Cytotoxique des Parvovirus Autonomes sur des Cellules Transformées.

Mousset et Rommelaere (1982), furent les premiers à mettre en évidence un cas d'interférence in vitro entre la transformation cellulaire et le parvovirus autonome MVMP. Ces auteurs ont isolé des cellules de souris Balb/C 3T3, dénommées PVR, résistantes à la lyse par MVMP du fait d'un blocage intracellulaire au niveau de la réplication parvovirale. L'infection par MVMP réduit de manière drastique la capacité de SV40 à transformer les cellules PVR. Cette inhibition a pu être attribuée à une augmentation de la permissivité des cellules transformées à la lyse par le parvovirus. Après une infection par SV40, en l'absence de MVMP, une fraction des cellules PVR transformées devient capable d'entretenir une infection productive de MVMP (Mousset et Rommelaere 1982).

De même, la transformation de cellules de souris NIH3T3 (Mousset et al. 1986) et de fibroblastes humains (Cornelis et al. 1988a) par SV40 est associée à stimulation de l'activité lytique du parvovirus MVMP. Ces travaux menés sur le parvovirus MVMP ont été, par la suite, vérifiés pour le parvovirus H-1 dans différents systèmes : transformation de fibroblastes humains par SV40, carcinogènes chimique et physique (Singer et Rhode 1978, Chen et al. 1986, Cornelis et al. 1988a), transformation in vitro et in vivo de kératinocytes et de cellules épithéliales mammaires humaines (Dupressoir et al. 1989) (Tableau 5). Ces résultats montrent, d'une part, que la sensibilité accrue à la lyse parvovirale est une propriété partagée par toute une série de cellules d'origines diverses, transformées, in vitro, par différents agents ; et d'autre part que le gène transformant est soit capable de compléter une fonction cellulaire manquante pour assurer la réplication complète des parvovirus MVMP et H-1 dans la cellule hôte, soit d'activer un ou des gènes cellulaires dont le(s) produit(s) est(sont) requis pour la multiplication virale. La simple expression de l'oncoprotéine ne suffit toutefois pas à outrepasser le blocage de la réplication virale. En effet, Mousset et Rommelaere (1988) ont montré que : i) l'infection abortive par SV40 ne sensibilise pas les cellules à l'infection par MVMP, et ii) une transformation réversible ou incomplète induite par des agents promoteur de tumeurs (TPA) a peu d'effet sur la susceptibilité de cellules de souris à MVMP.

5.4.4. Vers des Applications Thérapeutiques ?

L'homme peut héberger divers AAV et le parvovirus autonome H-1 - des séropositivités l'attestent - sans aucune conséquence pathologique apparente (cf § I.1.1.2.). D'autre part, des cultures in vitro de cellules fibroblastiques ou épithéliales issues de tumeurs humaines ou transformées expérimentalement sont sensibles à la lyse provoquée par le parvovirus H-1 (cf tableau 5). En outre, le virus H-1 inhibe le pouvoir oncogène d'une de ces lignées transformées humaines après son implantation dans des souris "nude" immunodéficientes (Dupressoir et al. 1989).

A partir de ces différentes observations, il est permis de rêver à une future orientation thérapeutique des propriétés oncosuppressive des parvovirus. Dans des conditions certes bien particulières, une première tentative a déjà été effectuée. En se basant sur l'activité ostéolytique de H-1 chez le hamster, Toolan et al. (1965) ont injecté ce virus chez deux patientes souffrant d'ostéosarcomes disséminés dont le contrôle ne pouvait plus être assuré par des traitements conventionnels. H-1 s'est multiplié chez ces malades, entraînant une virémie suivie de séroconversion. A part une stase de courte durée, cette réplication virale n'eut malheureusement aucun effet à long terme sur le développement des sarcomes. Il convient de souligner que ces deux patientes étaient à des stades terminaux de la maladie et que le temps du traitement et la quantité de virus inoculé ont peut-être été inadéquats pour combattre efficacement le cancer. Un phénomène de saturation de l'effet oncosuppressif des parvovirus pourrait être une explication, au moins partielle à cet échec (cf § II.4.).

Il est évident qu'aucune conclusion définitive ne peut encore être tirée d'un essai aussi ponctuel. Il est nécessaire de préciser la valeur thérapeutique éventuelle des parvovirus par des essais cliniques contrôlés, dont les protocoles d'expérimentation sont actuellement en cours d'élaboration.

6. Conclusion.

Les parvovirus autonomes et défectifs inhibent la transformation in vitro de cellules en culture et perturbent le processus de tumorigénisation in vivo. Les mécanismes impliqués sont vraisemblablement différents, au moins en partie. Les AAV diminuent plus spécifiquement l'oncogénicité de leurs virus auxiliaires (Ad et HSV), tandis que le spectre anticancéreux des parvovirus autonomes est large, incluant des cancers spontanés (Toolan 1967) ou induits par des carcinogènes viraux (Siegl 1984) et chimiques (Toolan et al. 1982).

La réplication lytique des parvovirus est favorisée, in vitro, dans les cellules transformées par rapport aux cellules normales. Il est tentant d'extrapoler ces premiers résultats à la situation in vivo et de faire ainsi l'hypothèse que les parvovirus pourraient détruire certaines cellules tumorales tout en préservant les cellules normales voisines. Toutefois, une telle surveillance que l'on pourrait dénommer "virolytique" n'a pas encore été avalisée expérimentalement chez l'animal. Quoiqu'il en soit, il est évident qu'un parvovirus ne constitue pas une panacée susceptible d'agir sur n'importe quelle cellule cancéreuse. Ainsi, le tropisme tissulaire particulier à chaque parvovirus restreindra leur activité oncolytique à des cancers d'origine homologue. Certaines tumeurs seront vraisemblablement épargnées par un parvovirus donné du fait de l'absence de récepteurs de surface, ou d'une permissivité cellulaire insuffisante. En outre, l'efficacité du traitement parvoviral risque d'être diminué par la réponse immunitaire de l'animal à l'encontre du virus infectieux. Ceci pourrait expliquer le développement d'un lymphome transplanté dans des souris infectées par MVMMi, alors qu'il est fortement sensible à l'action lytique de cette souche virale in vitro (Tattersall et Bratton 1983).

L'inhibition, par MVMp, de la transformation in vitro de cellules de souris par le virus oncogène SV40, ainsi que l'augmentation de la sensibilité des cellules à l'effet cytotoxique de MVM consécutif à leur transformation (Mousset et Rommelaere 1982), suggèrent toutefois que, au moins dans certains cas, les parvovirus pourraient être utilisés comme agents d'oncolyse, c'est-à-dire pour induire la destruction préférentielle de cellules néoplasiques. Cette perspective est compatible avec le fait que l'état de différenciation et de prolifération des cellules détermine leur permissivité au déroulement du cycle lytique des parvovirus.

Dans ce mémoire, nous allons nous appliquer à vérifier l'hypothèse de l'oncolyse parvovirale. La transformation cellulaire induit-elle des modifications susceptibles de favoriser le déroulement du cycle lytique des parvovirus autonomes ? Lesquelles ? Quelles sont les étapes cibles du cycle réplcatif des parvovirus ? Pour aborder ces questions, nous construirons et analyserons des systèmes cellulaires transformés de manière définie et modulable par différents oncogènes, puis nous étudierons les mécanismes moléculaires sous-jacents de la cytotoxicité parvovirale.

RESULTATS, DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

I. Présentation du Travail.

L'analyse du mécanisme d'oncosuppression exercée par les parvovirus chez l'animal est entravée par la complexité des événements qui se déroulent *in vivo* (réponse immunitaire...). C'est pourquoi nous nous sommes attachés à analyser, *in vitro*, cette activité antinéoplasique des parvovirus. Mousset et Rommelaere (1982) ont en effet pu démontrer que le parvovirus Minute Virus of Mice (MVMp) inhibe effectivement la transformation *in vitro* de cellules de souris par le virus oncogène SV40. Ces résultats suggèrent que l'activité antinéoplasique des parvovirus pourrait résulter, au moins en partie, d'une oncolyse sélective, cette hypothèse étant compatible avec le fait que l'état de différenciation et de prolifération des cellules détermine leur permissivité au déroulement du cycle lytique des parvovirus. Depuis, d'autres travaux réalisés au sein du laboratoire du Pr Jean Rommelaere ont corroboré ces observations en montrant que des cellules d'origines diverses (fibroblastiques ou épithéliales, murines ou humaines) qui normalement résistent à l'infection par MVMp deviennent sensibles à l'effet cytotoxique de ce virus après transformation par des radiations, des carcinogènes chimiques (Cornelis et al. 1988a) et des virus tumorigènes (Cornelis et al. 1988b, Mousset et Rommelaere 1988) ou un oncogène humain activé (Mousset et al. 1986).

La transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale conduit à plusieurs changements phénotypiques dont certains peuvent être induits *in vitro* par des oncogènes. Notre étude vise à vérifier l'hypothèse d'oncolyse exercée par les parvovirus en recherchant une corrélation qualitative et/ou quantitative entre l'expression de facettes spécifiques de la transformation maligne (immortalisation, organisation du cytosquelette, croissance en milieu semi-solide, perte d'inhibition de contact, formation de foyers tridimensionnels), et le déroulement de certaines étapes du cycle lytique des parvovirus (adsorption et internalisation, réplication, expression et encapsidation de l'ADN viral, maturation des virions). Cette analyse a été effectuée dans des cellules de rat (FR3T3 et NRK), normalement résistantes au parvovirus MVMp, transformées de manière contrôlée par différents oncogènes et virus transformants (c-Ha-ras, v-src, v-myc, SV40, BPV-1) susceptibles d'induire différents aspects de la transformation.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence les interventions respectives de facteur(s) cellulaire(s), de l'agent transformant et de fonction(s) virale(s) sur le phénomène d'oncolyse parvovirale.

Ces résultats ont fait l'objet de trois publications dans les revues *journal of Virology* (1989), *Virology* (1989) et *Oncogene* (1990).

II. Action du Parvovirus MVMP sur une Lignée de Cellules NRK Transformée par un Mutant Thermosensible de l'Oncogène v-src.

Résumé de l'Article 1.

1. Caractérisation des Lignées Cellulaires Étudiées.

Nous avons débuté cette étude avec un système cellulaire qui exprime un phénotype transformé susceptible d'être modulé par la température. L'utilisation d'un tel modèle permet en effet de réduire au maximum les variations liées à l'emploi de clones cellulaires normaux et transformés distincts. Ce système consiste en une lignée de cellules de rat transformée par un mutant thermosensible du virus du sarcome de Rous (mutant *ts339* de l'oncogène *v-src* de souche B77). Cette lignée *ts339/NRK* est analysée à température permissive (34,5°C) et à température restrictive (39,5°C) pour l'expression du phénotype transformé.

A titre de contrôle, nous avons également sur-transformé la lignée *ts339/NRK* par un rétrovirus murin construit in vitro et exprimant l'oncogène *v-src* de souche Schmidt-Ruppin A (SRA). L'isolement des clones sur-transformés s'est effectué sur la base de leur phénotype transformé à 39,5°C, et un des clones *ts339-wtSRA/NRK* a été étudié plus en détail par la suite.

La thermo-dépendance du phénotype transformé des cellules *ts339/NRK* avait été préalablement établie par l'étude, à température permissive et restrictive, de plusieurs critères de transformation (Graf et Friis 1973). L'expression et l'activité tyrosine kinase (par l'analyse in vitro de la phosphorylation d'un substrat émolase) de la protéine pp60^{v-src} se sont avérées être inférieures, de l'ordre de 3 à 4 fois, pour les cellules *ts339/NRK* maintenues à 39,5°C par rapport à 34,5°C ; en revanche, les niveaux d'activité sont beaucoup plus élevés, mais à des taux similaires aux deux températures, dans les cellules *ts339-wtSRA/NRK*.

2. Sensibilité des Cellules *ts339/NRK* à l'Action Lytique de MVMP.

Une analyse préalable de la lignée parentale NRK, par la technique de la clonogénicité sur plastique, a montré que ces cellules présentaient une résistance naturelle au parvovirus MVMP d'environ 95% après infection à une MOI (multiplicité d'infection) de 10 (pfu) particules infectieuses par cellule. Une étude semblable a été effectuée sur la lignée *ts339/NRK*. A température permissive (34,5°C, permettant l'expression du phénotype transformé) nous observons une résistance de 5% et à température restrictive (39,5°C, réprimant cette expression) elle est de 75%, ceci pour une même MOI d'infection de 10 pfu. Une analyse complémentaire de la croissance cellulaire après infection à diverses MOI confirme ce résultat. Nous observons ainsi une corrélation entre l'acquisition du phénotype transformé et la sensibilité cellulaire à l'action cytotoxique de MVMP.

L'analyse, par la technique de clonogénicité sur plastique, de la survie au parvovirus MVMP d'un des clones *ts339-wtSRA/NRK* a montré qu'il présente une sensibilité marquée au

parvovirus MVMp aussi bien à température permissive qu'à température restrictive.

Nous pouvons donc conclure que la survie de la lignée *ts339/NRK* est modulée par l'expression du phénotype transformé, et plus particulièrement par l'expression d'une protéine pp60^{V-src} fonctionnelle. Ce premier résultat suggère qu'une ou plusieurs barrières à l'action du virus MVMp ont été levées suite à la transformation des cellules par l'oncogène *v-src*.

3. Etape du Cycle Viral Impliquée dans la Sensibilisation des Cellules *ts339/NRK*.

Pour préciser la localisation de ce(s) blocage(s), nous avons étudié le déroulement de certaines étapes du cycle du parvovirus MVMp dans la cellule : l'adsorption et la pénétration des virus parentaux dans la cellule, les taux d'amplification de l'ADN parvoviral et de production de particules infectieuses ainsi que le pourcentage de cellules infectées capables de libérer des virions infectieux.

Le parvovirus MVMp est adsorbé sur la membrane plasmique et internalisé à des taux équivalents (13 à 19%) par la lignée *ts339/NRK* à l'état transformé et à l'état dit de réversion. De plus, et c'est là un fait inhabituel, nous avons montré que la lignée *ts339/NRK* amplifie l'ADN parvoviral et produit des particules infectieuses de MVMp, aussi bien à température restrictive que permissive. Nous observons en outre qu'à ces deux températures, environ 50% des cellules infectées sont capables de libérer des particules infectieuses de MVMp. Autrement dit, les cellules *ts339/NRK* permettent un déroulement complet du cycle viral aux deux températures. Cependant, ces cellules, sensibles à l'activité lytique de MVMp à température permissive (c'est-à-dire lorsqu'elles présentent un phénotype transformé), restent résistantes à cette cytotoxicité virale à température restrictive.

De ce fait, la résistance à la cytolysse parvovirale des cellules *ts339/NRK*, après incubation à 39,5°C, est compatible non seulement avec une réplication virale forte mais aussi avec la libération de virions infectieux matures. Pour expliquer un tel phénomène, nous avons émis l'hypothèse d'un mode de production non cytotocique de MVMp, notion nouvelle pour un virus dit lytique. Nous avons pu étayer cette hypothèse grâce à des observations de microscopie électronique. L'analyse de coupes de cellules préalablement infectées par MVMp et incubées à température restrictive a révélé que les virions libérés du noyau, restent circonscrits dans des vésicules de type autophagique. Ces vésicules ont tendance à s'amalgamer entre elles, mais cette accumulation ne paraît pas altérer la croissance de la cellule. Il est probable que par la suite, ces vésicules sécrètent les particules virales qu'elles contiennent.

Dans cette étude, nous constatons que l'expression d'un gène *v-src* mutant thermosensible peut être associée à une lyse cellulaire sélective. Nous savons que la protéine pp60^{V-src} a une localisation membranaire (notamment au niveau des contacts intercellulaires, des plaques d'adhésion et du cytosquelette), mais son rôle métabolique exact et ses substrats de phosphorylation restent encore inconnus. Toutefois, du fait de cette localisation, nous pouvons émettre l'hypothèse que la protéine pp60^{V-src} est impliquée dans la stimulation de l'activité autophagique observée à 39,5°C.

4. Conclusion.

1) Dans ce système, la sensibilité des cellules à l'activité lytique de MVMP est liée, au moins en partie, à l'expression d'une oncoprotéine pp60^{v-src} fonctionnelle.

2) La sensibilisation des cellules transformées par l'oncogène v-src au parvovirus MVMP n'est pas due à une stimulation de l'adsorption virale.

3) La production de particules infectieuses de MVMP n'est pas nécessairement associée à la lyse des cellules qui les produisent, ce qui suggère un mode non cytocide de libération virale ; une telle observation n'avait encore jamais été décrite pour les parvovirus.

III. Influence de Facteurs Cellulaires et Viraux sur l'Oncolyse Exercée par MVMp.

Résumé de l'Article 2.

1. Caractérisation et Sensibilité à MVMp des Cellules FR3T3 et NRK Transformées par c-Ha-ras.

Deux lignées de fibroblastes de rat, NRK et FR3T3, résistantes à l'action lytique de MVMp, ont été transformées par l'oncogène c-Ha-*ras* humain activé. Les clones transformants, respectivement dénommés NREJ et FREJ, possèdent un phénotype transformé pour tous les critères étudiés, notamment : la morphologie, l'expression de l'oncoprotéine, la capacité à croître en milieu semi-solide et l'organisation du réseau d'actine. Ces différentes lignées ont ensuite été analysées pour leur sensibilité à MVMp. Il apparaît que les 4 clones FREJ sont significativement plus sensibles à l'action cytotoxique de MVMp que leur lignée FR3T3 parentale, alors que les 4 lignées NREJ présentent une résistance à MVMp similaire à celle de leur lignée d'origine NRK.

2. Analyse du cycle viral de MVMp.

Afin de déterminer l'origine d'une telle différence, nous avons étudié plus en détail le déroulement du cycle viral de MVMp dans ces différentes lignées. L'adsorption et l'internalisation du virus sont équivalentes dans les quatre types de cellules NRK, NREJ, FR3T3 et FREJ. Par contre, la différence majeure entre les deux lignées parentales NRK et FR3T3 réside dans la capacité des cellules de souche FR3T3 à amplifier l'ADN viral, et l'absence d'une amplification décelable dans les cellules issues de la lignée NRK. La transformation par l'oncogène c-Ha-*ras* ne stimule pas l'amplification de l'ADN viral, quelle que soit la lignée souche, NRK ou FR3T3 ; cependant, elle favorise une étape postérieure du cycle viral révélée, dans le cas des cellules FR3T3, par la lyse des cellules infectées par MVMp.

Une autre étape du cycle viral, la synthèse de la protéine virale non-structurale NS-1, soupçonnée d'être responsable de la cytotoxicité parvovirale, a été analysée par radiomarquage et immunoprécipitation. Nous avons ainsi montré que l'expression de NS-1 est stimulée, dans les 4 clones FREJ, de 2,5 à 8 fois par rapport à la lignée parentale FR3T3. De plus, ces 4 clones présentent un gradient de sensibilité à MVMp de 64 à 94% allant dans le même sens que leurs capacités respectives à synthétiser NS-1 ($\text{FREJ1} \approx \text{FREJ2} < \text{FREJ3} < \text{FREJ4}$). Ce résultat corrobore l'idée d'une implication de NS-1 comme agent cytotoxique.

Pour un même niveau d'expression de la protéine p21^{ras} exogène, l'augmentation de l'expression de NS-1 dans les clones NREJ est de l'ordre de 6 fois par rapport à NRK, ce qui est à peu près équivalent à la valeur observée dans le système FREJ/FR3T3. Toutefois, le taux basal de synthèse de NS-1 dans les cellules NRK est environ 60 fois inférieur à celui mesuré dans la lignée FR3T3. Cette différence de permissivité à l'expression virale peut être rapprochée de la différence de sensibilité des deux systèmes à MVMp, et confirme l'importance de la protéine NS-1

dans la cytotoxicité induite par MVMp.

3. Conclusion.

1) Des facteurs cellulaires indépendants de la transformation, et spécifiques de la cellule, peuvent intervenir dans la permissivité au déroulement du cycle parvoviral.

2) Au moins deux changements cellulaires associés à la transformation par l'oncogène *c-Ha-ras* ont été révélés par l'utilisation de MVMp, nommément la synthèse accrue de protéine NS-1 et la sensibilisation à l'activité cytotoxique du parvovirus ; ces changements varient en fonction du type cellulaire pour un niveau donné d'expression de l'oncogène transformant.

3) Il existe au moins deux limitations intracellulaires à la production de protéines NS-1 dans des cellules de rat. La première restriction, présente dans la lignée NRK mais levée dans la lignée FR3T3, bloque l'amplification de l'ADN viral et maintient un niveau bas d'expression des protéines non structurales ; cette barrière à la réplication n'est pas levée lors de la transformation par l'oncogène *c-Ha-ras*. La seconde restriction module l'expression des protéines virales NS-1 et est levée par cette même transformation. La transformation par *c-Ha-ras* pourrait donc activer des facteurs de régulation présents dans les cellules FR3T3 mais absents ou sans cible effectrice dans les cellules NRK.

La disparité des sensibilités à MVMp des lignées NRK et FR3T3 transformées par l'oncogène *c-Ha-ras* s'expliquerait donc par la différence de permissivité des cellules parentales au parvovirus. L'obstacle principal à la sensibilisation au parvovirus MVMp des lignées NRK transformées serait l'incapacité de ces lignées à amplifier l'ADN parvoviral en quantités suffisantes et/ou à synthétiser un niveau basal de protéine virale NS-1 suffisant (ces deux fonctions étant par ailleurs liées, puisque NS-1 régule la réplication de l'ADN de MVMp). L'oncogène *c-Ha-ras* ne peut apparemment pas à lui seul surmonter un blocage aussi précoce du déroulement du cycle parvoviral dans ce système cellulaire.

IV. Influence de l'Agent Transformant sur l'Oncolyse Exercée par MVMp.

Résumé de l'Article 3.

1. Obtention et Caractérisation de Lignées Cellulaires Transformées par Différents Oncogènes.

Dans le cadre de l'analyse de l'oncolyse en fonction des étapes de la transformation maligne, nous avons étudié l'effet de l'agent transformant sur la sensibilité des cellules à la lyse par MVMp. Pour cela, nous avons entrepris d'obtenir, à partir de la lignée parentale FR3T3, un spectre de lignées transformées par différents oncogènes choisis pour la spécificité de localisation de leurs produits de traduction. Ainsi, les protéines codées par les oncogènes utilisés dans cette étude sont associés soit au noyau (p57^{v-myc} et l'antigène grand T de SV40 - ou Ag-T -), soit au cytoplasme et à la membrane plasmique (pp60^{v-src} et Ag-T). Les fonctions de ces oncoprotéines ne sont pas encore élucidées, mais seraient impliquées, chacune à leur niveau, dans la croissance et/ou la différenciation cellulaire. Ce système est ainsi propice à la recherche d'une corrélation entre le degré de transformation cellulaire et le niveau de sensibilisation à l'infection parvovirale.

Pour chaque gène transformant, 4 à 6 clones cellulaires ont été analysés pour leur caractères de transformation. Les clones FRSR transformés par l'oncogène v-src répondent positivement à tous les critères étudiés (morphologie transformée, désorganisation du réseau d'actine, capacité à croître en milieu semi-solide et à former des foyers tridimensionnels) ; les clones FRMC transformés par v-myc ne diffèrent pas morphologiquement de leur lignée parentale et seul un clone a acquis la capacité à croître en agar-mou ; les clones FRSV transformés par SV40 présentent des modifications phénotypiques (morphologie modifiée, capacité à croître en milieu semi-solide) dont l'intensité est variable et en bonne corrélation avec le taux correspondant d'expression de l'Ag-T. Nous disposons également de plusieurs lignées FR3T3 transformées par le virus transformant BPV-1. Ces lignées diffèrent par leur degré de transformation établi selon les critères habituellement retenus (clonogénicité en milieu semi-solide, morphologie, désorganisation du cytosquelette) et par leur pouvoir tumorigène.

2. Sensibilité à MVMp des Lignées FR3T3 Transformées Obtenues.

Ces différentes lignées transformées ont alors été analysées pour leur sensibilité au parvovirus MVMp, par la technique de la clonogénicité sur plastique. Les résultats obtenus montrent que la transformation par p57^{v-myc}, pp60^{v-src} et Ag-T entraîne une sensibilisation des cellules à l'action lytique du parvovirus MVMp. Nous n'avons cependant pas pu établir de corrélation stricte entre, d'une part, la morphologie transformée des cellules et leur capacité à croître en milieu semi-solide, et d'autre part, leur sensibilité à l'action cytopathique du parvovirus MVMp. Ainsi, dans le cas de la lignée FR3T3, un état d'hypersensibilité à MVMp accompagne l'apparition de traits variables de la transformation cellulaire induite par des oncogènes appartenant

à différentes classes fonctionnelles et codant pour des protéines différant par leur localisation cellulaire. Il est donc probable que des oncoprotéines contrôlent l'expression ou l'action des facteurs cytotoxiques parvoviraux, mais vraisemblablement d'une manière indirecte puisque des oncogènes dont les fonctions pourraient être fort différentes les unes des autres engendrent le même effet de sensibilisation cellulaire.

Par contre, les clones de cellules FR3T3 transformées par BPV-1 restent aussi résistants à l'action cytotoxique de MVMP que leur parent FR3T3. Toutefois, une sur-transformation par l'oncogène *c-Ha-ras* est capable de les sensibiliser. Ce résultat tend à montrer que les deux agents transformants BPV-1 et *c-Ha-ras* empruntent des voies métaboliques distinctes, ou du moins activent des mécanismes différents, pour engendrer un phénotype transformé. Celles-ci ne sont pas strictement exclusives puisque la sur-transformation par *c-Ha-ras* conduit à des modifications cellulaires mises en évidence par une sensibilité accrue à l'infection parvovirale.

3. Conclusion.

La transformation par BPV-1, contrairement à celle induite par *v-src*, *v-myc*, SV40 et également *c-Ha-ras* (cf article II), n'est pas associée à l'activation de facteurs cellulaires impliqués dans la sensibilisation des cellules FR3T3 au parvovirus MVMP. Le fait que cette résistance soit cependant levée par la sur-transformation induite par l'oncogène *c-Ha-ras* confirme que la susceptibilité cellulaire au parvovirus MVMP ne peut être prise comme un marqueur absolu du phénotype transformé, mais semble plutôt être spécifique du mode d'action de certains oncogènes. Ces données suggèrent que les modifications cellulaires initiées par les oncogènes et nécessaires pour la transformation sont qualitativement et/ou quantitativement différentes de celles entraînant la susceptibilité à l'infection parvovirale.

Cette conclusion est étayée par le fait que les niveaux de transformation observés dans les clones exprimant les oncoprotéines pp60^{v-src}, p57^{v-myc}, Ag-T et p21^{ras} sont variables, alors que le degré de sensibilité et la capacité à amplifier l'ADN viral de ces différents clones sont semblables.

Nous pouvons donc en conclure que des facteurs cellulaires qui ne sont pas liés de façon directe au phénotype transformé, mais qui sont fréquemment activés lors de la transformation, peuvent intervenir dans la permissivité au déroulement du cycle parvoviral.

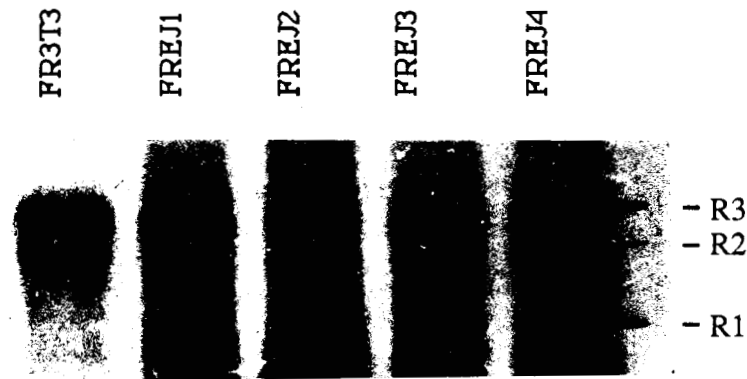


Figure 10. Analyse des ARN de MVMp dans les cellules FR3T3 et FREJ4 (van Hille et al. 1989).

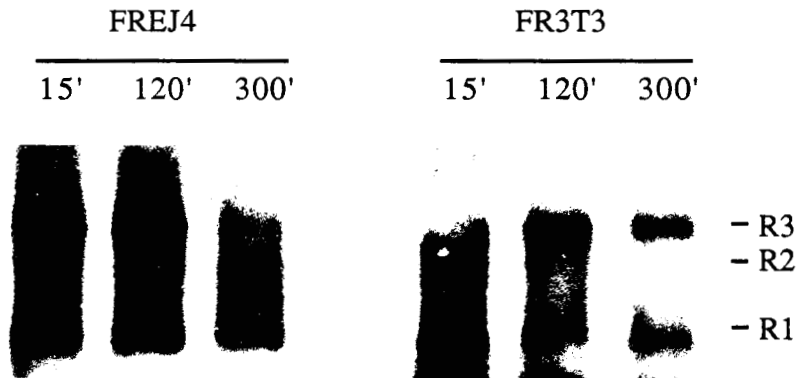


Figure 11. Stabilité des ARN viraux dans les cellules FR3T3 et FREJ4. Des cellules en croissance exponentielle sont traitées, 18 heures après l'infection par l'actinomycine D (8 $\mu\text{g/ml}$). Les ARN totaux sont ensuite extraits 15, 200 et 300 minutes plus tard. Ces ARN sont analysés par la technique du "Northern blotting" (van Hille et al. 1989).

V. La Transformation de la Lignée FR3T3 par l'Oncogène c-Ha-ras Stimule la Transcription des Gènes Viraux Initiés au Niveau du Promoteur P4.

Nous avons recherché les bases moléculaires de la sensibilisation des cellules FREJ4 étudiées dans l'article II. Dans cet article, nous avons montré que la synthèse de la protéine non-structurale NS-1 est stimulée dans la lignée transformée par rapport à la lignée parentale. Cette activation, liée à la transformation induite par l'oncogène c-Ha-ras, peut se situer soit à l'étape de traduction des protéines, soit à un stade antérieur tel que la transcription. Nous nous sommes attachés à éclaircir ce point.

L'abondance des ARN viraux dans les cellules FR3T3 et FREJ4, préalablement infectées par MVMP, a été mesurée par "Northern blotting" (figure 10). Il apparaît que la transformation par l'oncogène c-Ha-ras est associée à une augmentation de la quantité d'ARN viral R1 de l'ordre de 4 à 6 fois, ce qui correspond au taux de stimulation de la synthèse des protéines NS-1 dans ce système cellulaire (cf article II). Ce résultat suggère donc que la stimulation du cycle parvoviral se situerait essentiellement au niveau de la production (initiation, élongation) ou de la stabilité des ARNm viraux.

La mesure du taux de dégradation des ARNm parvoviraux, après une inhibition de la transcription de novo par l'actinomycine D, n'a pas montré de différence significative entre les deux lignées cellulaires parentale et transformée (figure 11). La transformation par l'oncogène c-Ha-ras ne semble donc pas agir sur la stabilité des ARN viraux R1, R2 et R3.

Ce dernier résultat nous a conduit à rechercher si les lignées FR3T3 et FREJ4 se distinguaient par leurs taux d'initiation ou d'élongation des ARNm viraux ? Un phénomène d'atténuation a été mis en évidence dans le processus de transcription des ARNm contrôlés par le promoteur P4 de MVMP (Ben Asher et Aloni 1984) ; l'inactivation d'un tel processus d'atténuation pourrait expliquer l'augmentation de la quantité d'ARN polyadénylés viraux dans les cellules transformées.

Afin de répondre à cette question, nous avons effectué des expériences dites de "run-on" qui consistent en l'élongation d'ARN initiés in vivo, en présence d'uridine radio-marquée, dans des noyaux isolés de cellules infectées par MVMP. Les ARN sont purifiés, hybridés avec des sondes froides d'ADN simple brin préalablement fixées sur une membrane de nitrocellulose, digérés à la RNase, examinés par autoradiographie et comptés par spectrométrie liquide (Schibler et al. 1983). Les quatre sondes d'ADN utilisées (A, B, C et D) sont représentées sur la figure 12. Elles recouvrent le fragment du génome de MVMP codant exclusivement pour les ARN initiés à partir du promoteur P4, c'est-à-dire une zone comprise entre les nucléotides 201 et 1853, afin d'éviter d'éventuelles interférences avec les messagers transcrits à partir du promoteur P38. La sonde d'ADN A a la particularité de correspondre exactement à l'ARN dit "atténué" qu'observent Ben Asher et Aloni (1984). Nous avons en outre vérifié que nous observions une élongation et non une initiation des ARN, en incubant des noyaux en présence d' α -amanitine (qui inhibe l'étape d'élongation de la transcription) et d'héparine (qui inhibe l'étape d'initiation de la transcription).

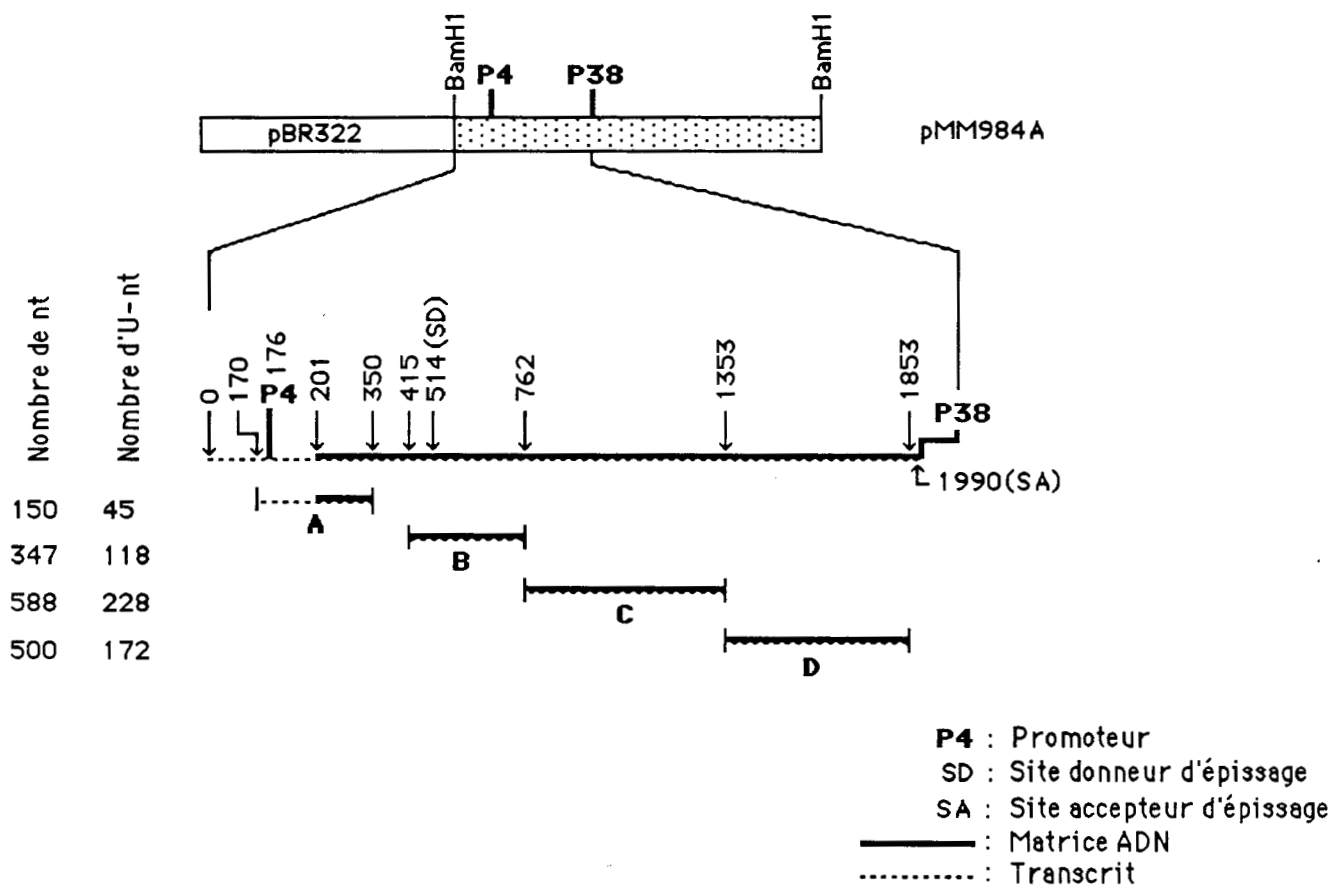


Figure 12 . Sondes ADN réalisées pour les expériences de "run-on".

Les quatre fragments A, B, C, et D d'ADN de MVMp ont été obtenus par digestion du plasmide pMM984A par les enzymes *Dra*I (A), *Pst*I et *Pvu*II (B et C), *Pst*I et *Hinc*II (D). Ces fragments ont été insérés, aux sites adéquats, dans le plasmide pUC18, et après amplification, récupérés par coupure avec les enzymes *Hind*III et *Asp*718.

Tableau 6. Initiation et élongation des ARN viraux dans les cellules FR3T3 et FREJ4.

12x10⁶ noyaux sont incubés en présence de GTP, ATP et CTP (1 mM), et de [³²P]UTP (300 µCi, 800 Ci/mole) pendant 40 minutes à 30°C. Les ARN sont extraits après traitements à la DNase (100µg/ml pendant 5 minutes) et au phénol/chloroforme/ alcool isoamylique (49:49:1), puis précipitation à l'alcool en présence d'acétate d'ammonium 2 M. Les ARN ainsi marqués sont mis en contact, pendant 3 jours à 42°C, avec des dépôts de chacun des 4 fragments d'ADN A, B, C et D préalablement fixés sur une membrane de nitrocellulose. Chaque point représente l'équivalent en molécules de 4 µg de plasmide pUC18. Les membranes sont ensuite traitées à la RNase (10µg/ml) pendant 10 minutes, rincées en présence de NaCl 0.3 M, séchées et examinées par autoradiographies. Le nombre de cpm par point est déterminé à l'aide d'un compteur à scintillation (1214 Rackbeta-LKB) et rapporté au nombre des résidus uridine correspondant aux fragments A, B, C et D utilisés comme sondes (Schibler et al. 1983).

Sonde ADN :		A	B	C	D	Taux d'Attenuation (A/B,C ou D)
Nombre de nt :		150	347	588	500	
Nombre de U-nt :		45	118	228	172	
FR3T3	cpm	480	400	660	550	
	cpm/U-nt	10.7	3.4	2.9	3.2	3.4
FREJ4	cpm	2920	1920	3420	2920	
	cpm/U-nt	64.9	16.3	15.0	17.0	4.0
Rapport FREJ4/FR3T3		6.1	4.8	5.2	5.3	

Les résultats de ces expériences de "run-on" sont présentés dans le tableau 6, sous forme de comptages de radioactivité hybridée rapportés au nombre de résidus uridine correspondant à chacune des sondes ; cette correction permet de comparer quantitativement les taux d'élongation inhérents à chacune des quatre zones étudiées. Trois informations importantes se dégagent de ce tableau :

i) La plus grande abondance des ARNm viraux observés dans les cellules transformées (voir ci-dessus) s'explique quantitativement par une stimulation de l'initiation de la transcription. En l'occurrence, nous observons (ligne inférieure du tableau 6) un taux d'initiation des messagers de l'ordre de 4 à 6 fois supérieur lorsque la lignée cellulaire est transformée.

ii) Nous observons un phénomène d'atténuation de l'ordre de 3 à 4 fois (colonne de droite du tableau 6) ; l'élongation de 75 à 80% des ARN initiés in vivo au niveau du promoteur P4 s'arrêterait au niveau de la zone atténuatrice et se terminerait sur la séquence poly-U au nucléotide 350, conformément aux travaux du groupe d'Aloni.

iii) Ce processus d'atténuation est présent avec la même intensité dans les deux lignées cellulaires normale et transformée.

Ces résultats nous permettent de conclure que l'hypersensibilité des cellules FREJ4, associée à la transformation par l'oncogène *c-Ha-ras*, résulte, au moins en partie, d'une élévation du taux d'initiation de la transcription des gènes viraux à partir du promoteur P4, et non d'une modification du processus d'élongation de ces messagers telle qu'une diminution du degré d'atténuation par exemple.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Dans ce mémoire, nous avons montré que la transformation de cellules de rat par différents oncogènes était associée à une sensibilisation à l'action lytique du parvovirus Minute Virus of Mice. Nos résultats corroborent, étendent et précisent l'observation originale faite par Mousset et Rommelaere en 1982, à savoir que MVMp inhibe la transformation *in vitro* de cellules de souris par SV40. Le mécanisme de la mort cellulaire induite par les parvovirus est encore mal connu. Toutefois, nous avons pu dégager plusieurs conditions nécessaires au déroulement complet du cycle réplcatif de MVMp, et au déclenchement de l'activité lytique de MVMp. Ces conditions concernent d'une part la nature de l'agent transformant et d'autre part le type de cellule considérée.

1. Rôle de l'Oncogène.

L'étude du système FR3T3 a permis de démontrer que la transformation induite par différents oncogènes à cible nucléaire (*v-myc*, Ag-T) et/ou cytoplasmique (*v-src*, c-Ha-*ras*, Ag-T) est accompagnée d'une perte de la résistance à MVMp. Nous avons proposé que cette sensibilisation pouvait être attribuée à la levée de certaines barrières bloquant la réplcation du parvovirus dans les cellules normales, et/ou à un accroissement de la susceptibilité cellulaire à des facteurs parvoviraux cytotoxiques. Par contre, la transformation par BPV-1 qui ne modifie pas la résistance des cellules à MVMp, ce qui semble indiquer que cette voie de transformation - c'est-à-dire la cascade d'événements secondaires postérieure à l'action spécifique des protéines transformantes codées par BPV-1 - diffère de celle induite par les produits de traduction des oncogènes précités. Ces résultats nous conduisent à constater que la sensibilisation cellulaire à MVMp ne peut être prise comme marqueur du phénotype transformé, et semble plutôt être spécifique du mode d'action de certains oncogènes. Ainsi, la stimulation de la réplcation de MVMp résulte d'une des nombreuses activités cellulaires modifiées au cours du processus néoplasique.

2. Rôle du Type Cellulaire.

L'importance de la lignée cellulaire hôte a été mise en évidence dans le cas de la transformation par l'oncogène c-Ha-*ras* humain activé dont l'expression est associée à une sensibilisation des cellules FR3T3 mais non des cellules NRK. Ce résultat a été confirmé par l'analyse de la sensibilité à MVMp de lignées NRK transformées par les oncoprotéines pp60^{v-src}, p57^{v-myc} et l'Ag-T. Ces diverses lignées appelées NRSR, NRMC et NRSV se sont avérées aussi résistantes que leur lignée parentale à une infection par MVMp.

Ces résultats peuvent sembler en contradiction avec ceux présentés dans l'article I concernant la lignée ts339/NRK. Les lignées NRSR (résistante) et ts339/NRK (sensible à température permissive) correspondent en fait à des clones cellulaires sélectionnés à des époques et

dans des conditions de cultures différentes. La lignée cellulaire *ts339/NRK*, dont la longue histoire a commencé en 1973 en dehors de notre laboratoire, a pu évoluer par rapport à la lignée originelle *NRK* et ses dérivés transformés *NRSR*, et est apparemment devenue apte à lever une(des) barrière(s) précoce(s) au déroulement du cycle parvoviral, indépendamment de la présence de la protéine *pp60^{V-src}*. Le déblocage de la barrière tardive est, lui, thermosensible, et serait stimulé, directement ou indirectement, par l'expression sous forme active de la protéine *pp60^{V-src}*, c'est-à-dire par la transformation cellulaire.

Ces résultats ont été confirmés dans d'autres systèmes étudiés entre-temps par nos collègues. Cornelis et al. (1988b) ont observé que des fibroblastes de rat normaux et transformés par le virus de l'érythroblastose aviaire présentent une capacité similaire à amplifier l'ADN parvoviral (MVMp), mais les seconds synthétisent environ 3 fois plus de protéines non-structurales parvovirales que les premiers et sont sensibilisés à l'activité lytique de H-1. Mousset et Rommelaere (1988) ont établi une corrélation entre la transformation de lignées *BALB/c3T3* et *NIH3T3* respectivement, par *SV40* et *c-Ha-ras*, et une cytolysse préférentielle provoquée par MVMp. Chen et al. (1989) ont confirmé, dans des kératinocytes humains transformés par *SV40* ou *c-Ha-ras* que la sensibilisation au parvovirus MVMp n'est pas strictement associée au caractère tumorigène. Faisst et al. (1989) ont conclu que ni l'expression d'oncogènes viraux, ni un phénotype transformé ne suffisent pour sensibiliser des cellules humaines au parvovirus H-1.

3. Relation entre Sensibilisation et Déroulement du Cycle Parvoviral.

Cet ensemble d'observations nous a amené à analyser les effets de la transformation néolasique sur le déroulement des différentes étapes du cycle réplcatif de MVMp dans des cellules de rat. Ces expériences ont fourni les indications suivantes :

i) La transformation cellulaire ne modifie pas significativement l'adsorption - donc probablement le nombre et l'activité des récepteurs membranaires du parvovirus MVMp - ni le processus d'internalisation du virus.

ii) L'amplification de l'ADN viral dépend, directement ou indirectement, de facteurs cellulaires qui ne sont pas modifiés par l'oncogenèse ; la lignée *NRK* présente en effet un blocage précoce à l'amplification de l'ADN parvoviral qui ne peut pas être levé par la transformation cellulaire, que cette dernière soit le fait d'oncogènes à localisation cytoplasmique ou nucléaire. Cette résistance intrinsèque des cellules *NRK* pourrait être reliée à l'incapacité des cellules de la lignée parentale à synthétiser un taux basal de protéine *NS-1*. *NS-1* est une protéine multifonctionnelle, ayant notamment un rôle dans la réplication de l'ADN parvoviral. Le seuil minimal de synthèse de *NS-1* qui permettrait aux cellules *FR3T3* d'initier une réplication efficace de l'ADN viral, ne serait pas atteint dans les cellules *NRK*.

iii) La transformation cellulaire est généralement associée à une augmentation de la quantité intracellulaire de la protéine non-structurale, et probablement cytotoxique, *NS-1*. Cette stimulation s'effectue au niveau de l'initiation de la transcription, le taux de traduction restant apparemment

proportionnel à celui de la transcription.

Cette étude a été effectuée dans des cellules transformées par l'oncogène *c-Ha-ras*. Le produit de traduction de cet oncogène est localisé sur la face interne de la membrane plasmique, mais il peut, indirectement, par l'intermédiaire de la cascade d'événements qu'il induit, engendrer des effets secondaires au sein du noyau, en affectant l'expression de gènes cellulaires. Différentes observations concernant la transformation cellulaire induite par l'oncoprotéine $p21^{ras}$ ont permis d'établir une corrélation entre cette dernière et, d'une part, la production accrue d'une activité pseudo-PDGF (Bowen-Pope et al. 1984) et, d'autre part, l'activation d'un gène apparenté à *v-sis* et d'une famille de gènes appelée VL30 (Owen et Ostrowski 1987). En outre, l'équipe de Wasylyk (1988 et 1989) a montré que la transformation de fibroblastes par *c-Ha-ras* s'accompagne de l'activation des facteurs de transcription PEA1 et PEA3 qui contrôlent notamment l'activité du promoteur du virus du polyome. On ne connaît pas encore le mécanisme inhérent à ces différentes activations, cependant, l'induction de facteurs autocrines, tel qu'un gène apparenté à *v-sis*, suggère que ces derniers pourraient jouer un rôle dans la transformation cellulaire engendrée par l'oncogène *c-Ha-ras*.

Comme le promoteur P4 de MVMp comprend des séquences putatives de reconnaissance par les facteurs PEA1 et PEA3 (Wasylyk et al. 1988 et 1989), nous pouvons émettre l'hypothèse que les changements précités participent à la stimulation de l'expression de ce promoteur parvoviral. Et la traduction en protéine NS-1 de ce nombre accru de messagers permettrait alors d'atteindre une dose suffisante de protéine NS-1 pour entraîner une action cytotoxique efficace.

iv) Fait surprenant, l'analyse de la cellule $\tau s339/NRK$, à température restrictive, a permis de dissocier la production de particules virales matures et la lyse cellulaire. La transformation cellulaire, par l'oncoprotéine $pp60^{V-src}$ dans ce cas, entraînerait le remaniement des structures cytoplasmiques et membranaires qui modifieraient le mode d'excrétion des virions néoformés. Le facteur associé à cet oncogène thermosensible contrôlerait une étape tardive du cycle lytique de MVMp. Cette situation inhabituelle suggère qu'en plus de son effet stimulateur sur la réplication parvovirale, la transformation pourrait exacerber la sensibilité des cellules aux facteurs parvoviraux cytotoxiques.

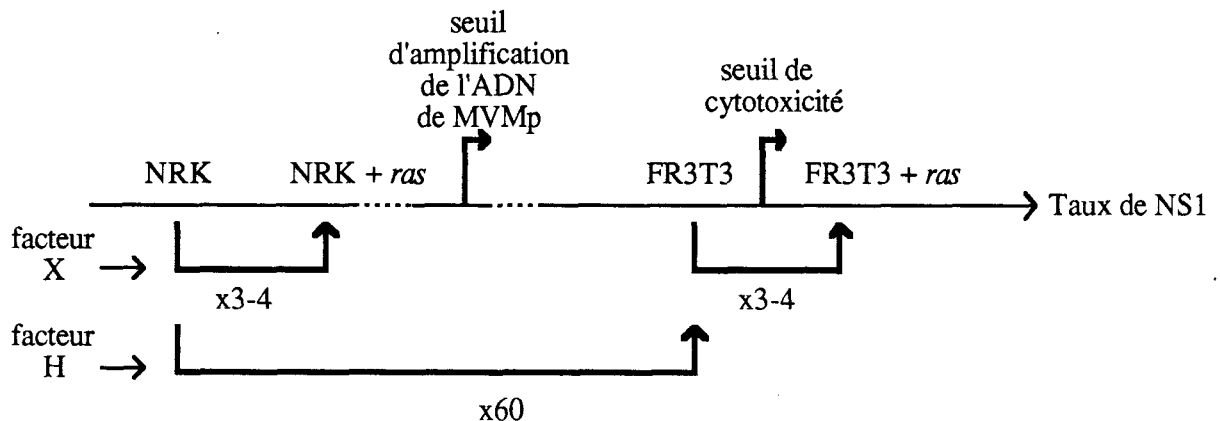
4. Modèle Unificateur.

Ces résultats nous conduisent à proposer qu'un (ou plusieurs) facteur H, spécifique du type cellulaire, agirait directement ou indirectement, sur le taux de transcription du gène viral codant pour NS-1. Ce facteur de transcription H serait présent (ou stimulé) dans la cellule FR3T3 ou absent (ou inhibé) dans la cellule NRK. La protéine NS-1 synthétisée à un taux suffisant dans FR3T3 permettrait alors la réplication, sans entrave, du génome de MVMp, ce qui ne serait pas le cas dans la lignée cellulaire NRK.

Ensuite, dans le cadre de la transformation cellulaire, l'oncoprotéine $p21^{ras}$ stimulerait de manière égale, dans les deux lignées de rat NRK et FR3T3 étudiées, l'activité d'un second facteur cellulaire de stimulation de la transcription noté X. Grâce à ce facteur X, le taux de transcription

serait augmenté de 3 à 4 fois dans les deux types de lignées transformées NREJ et FREJ par rapport à leur lignée parentale non transformée respective. Cependant, dans les cellules NREJ, le taux de base pour assurer l'amplification et la cytotoxicité n'est toujours pas atteint, tandis que dans les cellules FREJ, le niveau de cytotoxicité est dépassé et conduit à la lyse des cellules transformées infectées par MVMp.

Ainsi, non seulement l'amplification de l'ADN parvoviral mais également la lyse cellulaire dépendrait d'un niveau intracellulaire suffisant en protéine NS-1, potentiellement cytotoxique, le niveau de base de cytotoxicité étant plus élevé que celui permettant la réplication de l'ADN parvoviral. Nous pouvons maintenant situer nos lignées parentales et transformées par rapport à ces deux niveaux d'activité de NS-1, comme suit, en indiquant les fonctions des facteurs H et X :



Il est probable que les oncoprotéines pp60^{v-src}, p21^{ras}, p57^{v-myc}, et l'Ag-T de SV40, stimuleraient aussi ce facteur hypothétique X, une activation que serait inopérante dans le cas de la transformation par BPV-1.

Ce modèle a pu trouver un élément de confirmation dans les résultats de nos collègues Caillet-Fauquet et al. (1990, soumis). Ces derniers ont en effet réussi à provoquer la lyse de cellules en les induisant à exprimer les protéines non-structurales NS du parvovirus MVMp au moyen d'un clone moléculaire subgénomique dans lequel les gènes codant pour NS sont placés sous le contrôle d'un promoteur hétérologue inductible.

Cornelis et al. (1990) ont montré que la sensibilisation, au parvovirus H-1, de cellules humaines transformées *in vitro* ou issues de tumeurs, est également associée à une stimulation de la transcription du génome viral. Ces résultats étayaient l'hypothèse selon laquelle des facteurs cellulaires activateurs du cycle réplcatif parvoviral seraient induits au cours du processus de transformation cellulaire.

5. Nature des Facteurs Cellulaires Impliqués.

Les facteurs de transcription H et X sont théoriques et n'ont pas encore d'identité propre. Que peuvent-ils être ?

5.1. Le Facteur H.

Ahn et al. (1989) ont montré la présence effective d'une boîte GC en amont du promoteur P4 de MVMP. Cette séquence, activable par des protéines de type Sp1, assure un niveau basal d'activité de P4 susceptible de correspondre au niveau que nous observons dans les cellules parentales NRK infectées par MVMP. Il a été démontré que la séquence Sp1 située en cis du promoteur P4 de MVMP assure un niveau basal de transcription à partir de ce promoteur (Ahn et al. 1989). D'autre part, Doerig et al. (1990) ont montré que le promoteur P4 est sujet à un auto-contrôle positif assuré par la protéine NS-1 par l'intermédiaire d'une séquence TAR putative. Doerig a en outre montré que NS-1 serait associée à deux protéines cellulaires (Thèse de doctorat, 1988). Le facteur H pourrait dès lors être l'une d'entre-elles et être responsable de l'activité trans-activatrice que NS-1 peut exercer sur son propre promoteur. Ce scénario se déroulerait dans les cellules FR3T3 qui possèderaient un tel facteur H actif et rendrait compte d'une stimulation de l'activité transcriptionnelle au niveau de P4 de l'ordre de 60 fois par rapport à la lignée NRK qui serait dépourvue de ce facteur actif.

5.2. Le Facteur X.

Plusieurs hypothèses se profilent quant à l'activité possible du facteur X :

i) Nous ne pouvons exclure l'existence d'un second processus d'atténuation qui serait situé dans la partie 3' du génome de MVMP. En effet, les expériences de "run on" n'ont été effectuées qu'au moyen de sondes d'ADN situées en amont du promoteur P38, ceci afin d'éviter l'interférence des produits de transcription programmés par ce second promoteur. Dans cette éventualité, le facteur X, facteur inhibiteur de ce second phénomène d'atténuation, diminuerait le rapport ARN atténués/ARN polyadénylé, et conduirait à une augmentation du nombre d'ARN traductibles en protéines NS-1. Cependant, jusqu'à présent, aucune donnée expérimentale ne vient étayer cette possibilité.

ii) D'autres travaux effectués en parallèle par Avalosse et al. (1990) ont permis d'identifier une protéine nucléaire pouvant se lier spécifiquement à un fragment du génome de MVMP comprenant la région promotrice P4, et dont la présence est associée à la résistance à une infection parvovirale. Cette protéine appelée p102 serait, d'une part, un marqueur cellulaire dépendant de la transformation (p102 est uniquement observée dans les cellules normales), et d'autre part, un régulateur négatif potentiel de la réplication des parvovirus. La capacité de liaison à l'ADN, l'inactivation apparente lors de la transformation et l'éventuel effet suppresseur de la protéine p102 rappellent les propriétés des produits d'anti-oncogènes. Ces derniers seraient impliqués dans la

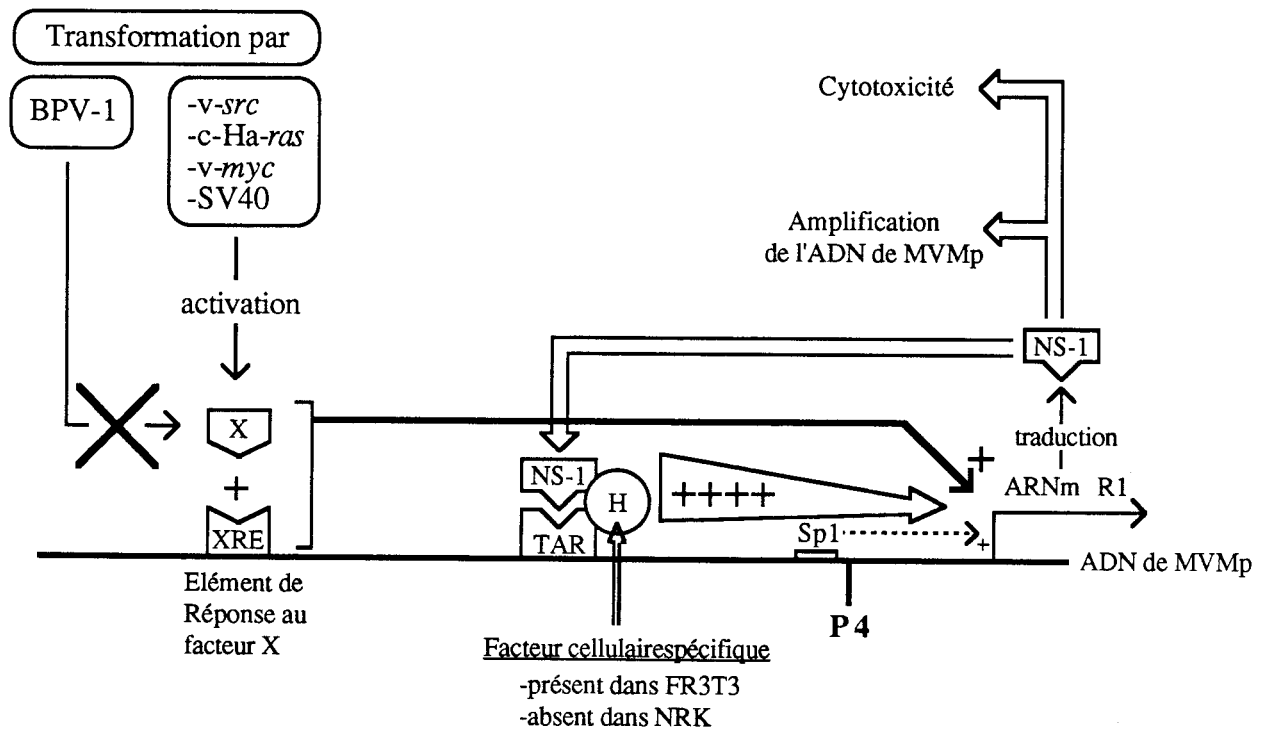


Figure 13. Régulations sous-jacentes à l'oncolyse exercée par le parvovirus MVMp : un modèle minimal qui intègre les nouvelles données apportées par ce mémoire.

modération de la prolifération cellulaire et la contrôle de la différenciation et peuvent effectivement être inactivés au niveau génétique ou épigénétique lors de la transformation néoplasique (Green 1989). Les cibles exactes des produits d'anti-oncogènes sont encore inconnues. Il est toutefois permis d'imaginer que certaines de ces protéines constituent des facteurs inhibiteurs de la transcription d'une série de gènes impliqués dans la progression néoplasique, et que leurs sites de fixation sur l'ADN seraient aussi présents dans l'unité de transcription programmée par le promoteur P4 de MVMp.

iii) Autre possibilité, le facteur X pourrait être un facteur positif de transcription stimulant l'activité du promoteur P4 après la reconnaissance d'une séquence consensus située en *cis* de celui-ci, et que nous appellerons XRE (Elément de Réponse à la protéine X). L'équipe de Wasylyk (Wasylyk et al. 1988, 1989) a montré que différents oncogènes tels que *v-src* et *c-Ha-ras*, mais pas les gènes transformants E2 et E5 de BPV-1, conduisent à une activation des deux facteurs de transcription PEA1 et PEA3. Ces protéines peuvent activer des gènes dont le promoteur possède un site spécifique de liaison à l'ADN reconnu par celles-ci. L'analyse de la séquence de MVMp a effectivement permis de relever la présence de telles séquences consensus dans la région du promoteur P4 de MVMp. Nous pouvons imaginer que ce facteur X induit sélectivement par certains oncogènes, puisse être équivalent à PEA1 ou PEA3. L'activation de ce facteur X doit certainement dépendre de manière très spécifique du système de transformation, car à la différence de BPV-1, le virus de papillome HPV16 sensibilise les cellules humaines qu'il transforme à l'infection par le parvovirus H-1 (Faisst et al. 1990).

Ces différentes hypothèses nous permettent de dresser un modèle moléculaire pour expliquer la cytolysse parvovirale associée à la transformation des cellules de rat (figure 13). Ainsi, selon ce modèle, les deux facteurs X et H pourraient être des protéines impliquées dans le complexe transcriptionnel contrôlant la transcription du message R1 à partir du promoteur P4.

L'activité du facteur X serait une conséquence relativement fréquente du métabolisme des oncogènes, puisque la plupart des oncogènes utilisés stimulent son activité ou sa synthèse. Cette stimulation conduit à une amplification de la synthèse en messages R1, d'où une augmentation du même ordre de l'expression de la protéine non-structurale NS-1. Et cette protéine NS-1 a un rôle majeur dans le déroulement du cycle réplcatif de MVM, certaines de ses fonctions sont en effet très certainement associées à la réplcation de l'ADN viral et à la cytotoxicité induite par l'infection parvovirale dans des cellules permissives.

Le facteur H, lui, serait spécifiquement exprimé par certaines lignées cellulaires, et sa fonction pourrait se situer à deux niveaux différents de la transcription, soit être associé à une auto-transactivation efficace du promoteur P4 par la protéine NS-1, soit amplifier l'activité du complexe de transcription au niveau du promoteur P4.

L'identification des facteurs H et X, et de leurs cibles moléculaires, tant cellulaires que virale, devraient nous permettre d'affiner notre connaissance du processus de l'oncolysse sélective induite par le parvovirus MVMp.

BIBLIOGRAPHIE

- AHN, J.K., GAVIN, B.J., KUMAN, G. and WARD, D.C. (1989). Transcriptional analysis of minute virus of mice P₄ promoter mutants.
J.Virol. 63, 5425-5439.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. and WATSON, J.D. (1983). Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc., New York. 611-668.
- ANDERSON, M.J. and PATTISON, J.R. (1984). The human parvovirus , brief review. Archives of Virology 82, 137-148.
- ANTONIETTI, J.P., SAHLI, R., BEARD, R. and HIRT, B. (1988). Characterization of the cell-type specific determinant in the genome of Minute Virus of Mice.
J.Virol. 62, 552-557.
- ASTELL, C.R., CHOW, M.B. and WARD, D.C. (1985). Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of the Minute Virus of Mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication.
J.Virol. 54, 171-177.
- ASTELL, C.R., GARDINER, E.M. and TATTERSALL, P. (1986). DNA sequence of the lymphotropic variant of Minute Virus of Mice, MVM(i) and comparison with the DNA sequence of the fibrotropic prototype strain.
J.Virol. 57, 656-659.
- ASTELL, C.R., MOL, C.D. and ANDERSON, N.F. (1987). Structural and functional homology of parvovirus and papovavirus polypeptides.
J. Gen. Virol. 68, 885-893.
- ASTELL, C.R., SMITH, M., CHOW, M.B. and WARD, D.C. (1979). Structure of the 3' hairpin termini of four rodent parvovirus genomes : nucleotide sequence homology at origin of DNA replication.
Cell 17, 691-703.
- ASTELL, C.R., THOMSON, M., MERCHLINSKY, M. and WARD, D.C. (1983). The complete DNA sequence of Minute Virus of Mice, an autonomous parvovirus.
Nuc. Acid Research 11, 999-1018.
- AVALOSSE, B.L., BARRIJAL, S., CHEN, Y.Q., CASSIMAN, J.J. and ROMMELAERE, J. (1990). Identification of a transformation-sensitive nuclear protein from normal human fibroblasts, that specifically interacts with minute virus of mice DNA and correlate with cell resistance to the parvovirus.
Molecular Carcinogenesis (sous presse).
- AVERY, L. and HORVITZ, H.R. (1987). A cell that dies during wild-type C. elegans development can function as a neuron in a *ced-3* mutant.
Cell 51, 1071-1078.
- BABISS, L.E. and GINSBERG, H.S. (1984). Adenovirus type 5 early region E1b gene product is required for efficient shut off of host protein synthesis.
J.Virol. 50, 202-212.
- BANTEL-SCHAAL, U. and ZUR HAUSEN, H. (1984). Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site.
Virology 134, 52-63.

- BANTEL-SCHAAL, U. and ZUR HAUSEN, H. (1988). Adeno-associated viruses inhibit SV40 DNA amplification and replication of herpes simplex virus in SV40-transformed hamster cells.
Virology 164, 64-74.
- BARBACID, P. (1987). *ras*-genes.
Ann. Rev. Biochem. 56, 779-827.
- BEN-ASHER, E. and ALONI, Y. (1984). Transcription of minute virus of mice, an autonomous parvovirus may be regulated by attenuation.
J.Virol. 52, 266-276.
- BENCHIMOL, S. PIM, D., CRAWFORD, L.(1982). Radioimmunoassay of the cellular protein p53 in mouse and human cell lines.
EMBO J. 1, 1055-1062.
- BENDER, T.P., THOMPSON, C.B. and KUEHL, W.M. (1987). Differential expression of *c-myb* mRNA in murine B lymphomas by a block to transcription elongation.
Science 237, 1473-1476.
- BENTLEY, D.L. and GROUDINE, M. (1986). A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of *c-myc* in differentiated HL60 cells.
Nature 321, 702-706.
- BERENT, S.L., TORCZYNSKI, R.M. and BOLLON, A.P. (1986). Sendai virus induces high levels of tumor necrosis factor mRNA in human peripheral blood leucocytes.
Nuc. Acid Research 14, 8997-9001.
- BERGS, V.V. (1969). Rat virus-mediated suppression of leukemia induction by Moloney virus in rats.
Cancer Res. 29, 1669-1672.
- BERNARDS, R., SCHRIER, P.I., HOURVELING, A., BOS J.L., van DER EB A.J., ZYLSTRA, M. and MELIEF, C.J.M.(1983). Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity.
Nature 305, 776-779.
- BERNIS, K.I. and BOHENZKY, R.A. (1987). Adeno-associated viruses : an update.
Adv. Virus Res. 32, 243-306.
- BINETRUY, B., MENEGUZZI, G., CERNI, C. and CUZIN, F. (1987). In vivo and in vitro tumoral progression in rodent fibroblasts transfected with bovine papillomavirus type-1 DNA.
Cancer Cells 5, 223-227.
- BISHOP, J.M. (1987). The molecular genetics of cancer.
Science 235, 305-311.
- BLACKLOW, N.R., CUKOR, G., KIBRICK, S. and QUINNAN, G. (1978). Interactions of adeno-associated viruses with cells transformed by herpes simplex virus. In "Replication of Mammalian Parvoviruses" (Ward, D.C. and Tattersall, P., Eds). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 87-98.
- BODNAR, J.W. (1988). Sequence organization in regulatory regions of DNA of minute virus of mice.
Virus Gene 2, 167-182.
- BONNARD, G.D., MANDERS, E.K., CAMPBELL, D.A., HEBERMANN, R.B. and COLLINS, M.J. (1976). Immunosuppressive activity of a subline of the mouse EL-4 lymphoma : evidence for minute virus of mice causing the inhibition.
J.Exp.Med. 143, 187-205.

- BOURGUIGNON, G.J., TATTERSALL, P.J. and WARD, D.C. (1976). DNA of minute virus of mice : self-priming non permuted, single-stranded genome with a 5'-terminal hairpin duplex.
J.Virol. 20, 290-306.
- BOWEN-POPE, D.A., VOGEL, A. and ROSS, R. (1984). Production of platelet-derived growth factor-like molecules and reduced expression of platelet-derived growth factor receptors accompany transformation by a wide range spectrum of agents.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2396-2400.
- BRANDENBURGER, A., LEGENDRE, D., AVALOSSE, B. and ROMMELAERE, J. (1990). NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMP.
Virology, 174, 576-584.
- CARTER, B.J. (1984). Variant and defective interfering parvoviruses.
In "The parvovirus" (Berns, K.I. Ed). Plenum Press, New York and London. 209-258.
- CARTER, B.J., LAUGHLIN, C.A. and MARCUS-SEKURA, C.J. (1984). Parvovirus transcription
In "The parvoviruses" (Berns, K.I. Ed) Plenum Press, New York and London. 153-203.
- CASTO, B.C. and GOODHEART, C.R. (1972). Inhibition of adenovirus transformation *in vitro* by AAV-1.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 72-78.
- CHACKALAPARAMPIL, I. and SHALLOWAY, D. (1988). Altered phosphorylation and activation of pp60^{c-src} during fibroblast mitosis.
Cell 52, 801-810.
- CHEN, Y.Q., DE FORESTA, F., HERTOOGHS F., AVALOSSE, B.L., CORNELIS, J.J. and ROMMELAERE, J. (1986). Selective killing of simian virus 40-transformed fibroblasts by parvovirus H-1.
Cancer Res. 46, 3574-3579.
- CHEN, Y.Q., TUYNDER, M.C., CORNELIS, J., BOUKAMP, P., FUSENIG, N.E. and ROMMELAERE, J. (1989). Sensitization of human keratinocytes to killing by parvovirus H-1 takes place during their malignant transformation but does not require them to be tumorigenic.
Carcinogenesis 10, 163-167.
- CHEN, K.C., TYRON, J.J., LEDERMAN, M., STOUT, E.R. and BATES, R.C. (1989). A kinetic hairpin transfert model for parvoviral DNA replication.
J.Mol.Biol. 208, 283-296.
- CHOW, M., BODNAR J.W., POLVINO-BODNAR, M. and WARD, D.C. (1986). Identification and characterization of a protein bound to DNA of Minute Virus of Mice.
J.Virol 57, 1094-1104.
- CLEMENS, K.E. and PINTEL, D. (1987). Minute virus of mice (MVM) mRNAs predominantly polyadenylate at a single site.
Virology 160, 511-514.
- CLEMENS, M.J. and Mc NURLAN, M.A. (1985). Regulation of cell proliferation by interferons.
Biochem. J. 226, 345-360.
- CLEMENS, K.E. and PINTEL, D.J. (1988). The two transcription units of the autonomous parvovirus minute virus of mice are transcribed in a temporal order.
J.Virol 62, 1448-1451.

- CORNELIS, J.J., BECQUART, P., DUPONCHEL, N., SALOME, N., AVALOSSE, B.L., NAMBA, M. and ROMMELAERE, J. (1988a). Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40, correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and minute virus of mice. *J. Virol.* 62, 1679-1686.
- CORNELIS, J.J., SPRUYT, N., SPEGELAERE, P., GUETTA, E., DARAWSHI, T., COTMORE, S.F. and ROMMELAERE, J. (1988b). Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression. *J. Virol.* 62, 3438-3444.
- CORNELIS, J.J., CHEN, Y.Q., SPRUYT, N., DUPONCHEL, N., COTMORE, S.F., TATTERSALL, P. and ROMMELAERE, J. (1990). Susceptibility of human cells to killing by the parvovirus H-1 and minute virus of mice correlates with viral transcription. *J. Virol.* 64, (sous presse).
- COTMORE, S.F., GUNTHER, M., and TATTERSALL, P. (1989). Evidence for a ligation step in the DNA replication of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* 63, 1002-1006.
- COTMORE, S.F., STURZENBECKER, L.J. and TATTERSALL, P. (1983). The autonomous parvovirus MVM encodes two nonstructural protein in addition to its capsid polypeptides. *Virology* 129, 333-343.
- COTMORE, S.F. and TATTERSALL, P. (1984). Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome. *Science* 226, 1161-1165.
- COTMORE, S.F. and TATTERSALL, P. (1986a). Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus Minute Virus of Mice. *J. Virol.* 58, 724-732.
- COTMORE, S.F. and TATTERSALL, P. (1986b). The NS-1 polypeptide of the autonomous parvovirus MVP is a nuclear phosphoproteine. *Virus Research* 4, 243-250.
- COTMORE, S.F. and TATTERSALL, P. (1987). The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* 33, 91-169.
- COTMORE, S.F. and TATTERSALL, P. (1988). The NS-1 polypeptide of minute virus of mice is covalently attached to the 5' termini of duplex replicative form DNA and progeny single strands. *J. Virol.* 62, 851-860.
- COULIER, F., IMBET, J., AILBERT, J., JEUNET, E., LAWRENCE, J.J., CRAWFORD, L. and BIRG, F. (1985). Permanent expression of p53 in FR 3T3 rat cells but cell cycle-dependent association with large-T antigen in simian virus 40 transformants. *EMBO J.* 4, 3413-3418.
- CRAWFORD, L.V. (1966). A minute virus of mice. *Virology* 29, 605-612.
- CSIZA, C.K., SCOTT, F.W., DE LAHUNTA, A., and GILLESPIE, J. H. (1971). Immune Carrier state of feline panleukopenia virus-infected cats. *Am. J. Vet. Res.* 32, 419-426.

- CUKOR, G., BLACKLOW, N.R., HOGGAN, D. and BERNIS, K.I. (1984). Biology of adeno-associated virus. In "The Parvoviruses". (Bernis, K.I., Ed.). Plenum Press, New York and London, 33-60.
- CUKOR, G., BLACKLOW, N.R., KIBRICK, S. and SWAN, I.C. (1975). Effect of adeno-associated virus on cancer expression by herpes virus-transformed hamster cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 55, 957-959.
- CURRAN, T. and FRANZA, B.R. (1988). Fos and Jun : the AP-1 connection. *Cell* 55, 395-397.
- DENHEZ, F., HEILMANN, B., D'HAURIOL, L., GRAF, T., COQUILLAUD, M., COLL, J., GALIBERT, F., MOELLING, K., STEHELIN, D. and GHYSDAEL, J. (1988). Replacement of lys 622 in the ATP binding domain of p100gag-mil abolishes the *in vitro* autophosphorylation of the phosphorylation of the protein and the biological properties of v-mil oncogene of MH2 virus. *EMBO. J.* 7, 541-456.
- DOERIG, C. (1988). Régulation de l'expression génétique chez les parvovirus autonomes MVMi (murin) et B19 (humain).
Thèse de l'Université de Lausanne (Faculté des Sciences).
- DOERIG, C., ANTONIETTI, J.P., BEARD, P. and HIRT, B. (1990). Nonstructural protein of parvovirus B19 and minute virus of mice controls transcription. *J. Virol.* 64, 387-396.
- DOERIG, C., HIRT, B., BEARD, F. and ANTONIETTI, J.P. (1988). Minute virus of mice non-structural protein NS-1 is necessary and sufficient for *trans*-activation of the viral P39 promoter. *J. Gen. Virol.* 69, 2563-2573.
- DOWNWARD, J., YARDEN, Y., MAYES, E., SCRACE, G., TOTTY N., STOCKWELL, P., ULLRICH, A., SCHLESSINGER, J. and WATERFIELD, M.D. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307, 521-527.
- DUPRESSOIR, T., VANACKER, J.M., CORNELIS, J.J., DUPONCHEL, N. and ROMMELAERE, J. (1989). Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 49, 3203-3208.
- DUVALL, E. and WYLLIE, A.M. (1986). Death and the Cell. *Immunol. Today* 7, 115-119.
- van DER EB, A.J. and BERNARDS, R. (1984). Transformation and oncogenicity by adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 110, 23-25.
- EIDADAH, A.H., NATHANSON, N., SMITH, K.O., SQUIRE, R.A., SANTOS, G.W. and MELBY, E.C. (1967). Viral hemorrhagic encephalopathy of rats. *Science* 156, 392-394.
- ENGERS, H.D., LOUIS, J.A., ZUBLER, R.H. and HIRT, B. (1981). Inhibition of T-cell-mediated functions by MVMi, a parvovirus closely related to the minute virus of mice. *J. Immunol.* 127, 2280-2285.
- FAISST, S., SCHLEHOFER, J.R. and ZUR HAUSEN, H. (1989). Transformation of human cells by oncogenic viruses supports permissiveness for parvovirus H-1 propagation. *J. Virol.* 63, 2152-2158.

- FAUST, E.A. and WARD, D.C. (1979). Incomplete genomes of the parvovirus minute virus of mice : selective conservation of genome termini, including the origin for DNA replication. *J.Virol.* 32, 276-292.
- FINLAY, C.A., HINDS, P.W. and LEVINE, A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083-1093.
- FORT, P., RECH, J., VIE, A., PIECHACZYK, M., BONNIER, A., JEANTEUR, P. and BLANCHARD, J.M. (1987). Regulation of *c-fos* gene expression in hamster fibroblasts : initiation and elongation transcription and mRNA degradation. *Nucleic. Acid Res.* 15, 5657-5667.
- GARDINER, E.M. and TATTERSALL, P. (1988a). Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. *J.Virol.* 62, 2605-2613.
- GARDINER, E.M. and TATTERSALL, P. (1988b). Evidence that developmentally regulated control of gene expression by a parvoviral allotropic determinant is particle-mediated. *J. Virol.* 62, 1713-1722.
- GEORG-FRIS, B., BIEDERLACK, S., WOLF, J. and ZUR HAUSEN, H. (1984). Analysis of proteins, helper dependence and sero-epidemiology of a new human parvovirus. *Virology* 134, 64-71.
- GILMAN, A.G. (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* 36, 577-579.
- GOLSTEIN, P. (1989). Morts cellulaires et système immunitaire. *Médecine/Sciences* 5, 546-553.
- GOUSTIN, A.J., LEOF, E.B., SHIPLEY, G.D. and MOSES, H.L. (1986). Growth factors and cancer. *Cancer Res.* 46, 1015-1019.
- GRAF, T., and FRIIS, R.R. (1973). Differential expression of transformation in rat and chicken cells infected with an avian sarcoma virus *ts* mutant. *Virology* 56, 790-797.
- GREEN, M.R. (1989). When the products of oncogenes and anti-oncogenes meet. *Cell* 56, 1-3.
- GROUDINE, M., and WEINTRAUB, H. (1980). Activation of cellular genes by avian RNA tumor viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 5351-5354.
- GUETTA, E., GRAZIANI, Y. and TAL, J. (1986). Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice. *J. Natl. Cancer Int.* 76, 1177-1180.
- GUNTHER, M. and TATTERSALL, P. (1988). The terminal protein of minute virus of mice is an 83 kilodaltons polypeptide linked to specific form of double-stranded and single-stranded viral DNA. *FEBS Lett.* 242, 22-26.
- HARTLEY, J.W. and ROWE, W.P. (1960). A new mouse virus apparently related to the adenovirus virus group. *Virology* 11, 645-647.

- HAY, N., SKOLNICK-DAVID, H. and ALONI, Y. (1982). Attenuation in the control of SV40 gene expression.
Cell 29, 183-193.
- HEILBRONN, R., SCHLEHOFER, J.M. and ZUR HAUZEN, J. (1984). Selective killing of carcinogen-treated SV40-transformed chinese hamster cells by a defective parvovirus.
Virology 136, 439-441.
- HERRLICH, P. and PONTA, H. (1989). Nuclear oncogenes convert extracellular stimuli into changes in the genetic programme.
Trends in Genetics 5, 112-116.
- HOFFMAN, M. (1989). One Wilm's tumor gene is cloned, are there more ?
Science 246, 1387.
- JONGENEEL, C.V., SAHLI, R., Mc MASTER, G.K. and HIRT, B. (1986). A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus.
J.Virol. 59, 564-573.
- JOVE, R. and HANAFUSA, M. (1987). Cell transformation by the viral *src* oncogene. Am. Rev. Cell. Biol. 3, 31-56.
- KATZ, E. and CARTER, B.J. (1986). Effect of adeno-associated virus on transformation of NIH3T3 by *ras* gene and on tumorigenicity of an NIH3T3 transformed cell line.
Cancer Res. 46, 3023-3026.
- KELLOFF, G.J., PETERS, R.L., DONAHOE, R.M., GHAZZOULI, I., SASS, B., NIMS, R.M. and HEUBNER, R.J. (1976). An approach to C type virus immunoprevention of spontaneously occurring tumors in laboratory mice.
Cancer Res. 36, 622-630.
- KILHAM, L. and OLIVIER, L.J. (1959). A latent virus of rats isolated in tissue culture.
Virology 7, 428-437.
- KIMSEY, P.B., ENGERS, H.D., HIRT, B. and JONGENEEL, C.V. (1986). Pathogenicity of fibroblasts and lymphocyte-specific variants of minute virus of mice.
J.Virol. 59, 8-13.
- KINGSTON, R.E., BALDWIN, Jr.A.S. and SHARP, P.A. (1984). Regulation of heat shock protein 70 gene expression by *c-myc*.
Nature 312, 280-282.
- KIRSCHSTEIN, R.L., SMITH, K.O. and PETERS, E.A. (1968). Inhibition of adenovirus 12 oncogenicity by adenovirus associated virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 670-673.
- KRAUSKOPF, A., RESNEKOV, O., and ALONI, Y. (1989). A *cis* downstream element participates in the regulation of *in vitro* transcription initiation from the p38 promoter of minute virus of mice.
EMBO Parvovirus Workshop, Ma'ale Hachamisha (Israel).
- KRAUSKOPF, A., RESNEKOV, O. and ALONI, Y. (1990). A *cis*-downstream element participates in regulation of *in vitro* transcription initiation from the P38 promoter of minute of mice.
J.Virol. 64, 354-360.
- LABIENEC-PINTEL, L. and PINTEL, D. (1986). The minute virus of mice P39 transcription unit can encode both capsid proteins.
J.Virol. 57, 1163-1167.

- LAND, H., PARADA, L.F. and WEINBERG, R.A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.
- LAUGHLIN, C.A., CARDELLICHIO, C.B. and COON, H.C. (1986). Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2. *J.Virol.* 60, 515-524.
- Leads from the MMWR. (1989). Risks associated with human parvovirus B19 infection. *JAMA* 261, 1406-1408, and *JAMA* 261, 1555-1563.
- LINSER, B., BRUNING, H. and ARMENTROUT, R.W. (1977). Specific binding sites for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells. *J.Virol.* 24, 211-221.
- LIVINGSTON, D.M. and BRADLEY, M.K.(1987). The simian virus 40 large T antigen, a lot packed into a little. *Mol. Biol. Med.* 4, 63-80.
- LORENCE, R.M., ROOD, P.A. and KELLEY, K.W. (1988). Newcastle disease virus as an antineoplastic agent : induction of tumor necrosis factor α and augmentation of its cytotoxicity. *J.Natl. Cancer Int.* 80, 1305-1312.
- McCORMICK, F. (1989). *ras* GTPase activating protein : signal transmitter and signal terminator. *Cell* 56, 5-8.
- McMASTER, G.K., BEARD, P., ENGERS, H.D. and HIRT, B. (1981). Characterization of an immunosuppressive parvovirus related to the minute virus of mice. *J.Virol.* 38, 317-326.
- MARTIN, P., VASS, W.C., SCHILLER, J.T., LOWY, D.R. and VELU, T.J. (1989). The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Cell* 59, 21-32.
- MARX, I. (1989). Many gene changes found in cancer. *Science* 246, 1386-1388.
- MATTHEWS, R.E.F. (1982). Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 17, 72-75.
- MAYOR, H.D., HOULDITCH, G.S. and MUMFORD, D.M. (1973). Influence of adeno-associated satellite virus on adenovirus-induced tumors in hamsters. *Nature New Biol.* 241, 44-46.
- MAYOR, H.D., DRAKE, S., STAHOMANN, J. and MUMFORD, D.M. (1976). *Am. J. Obs. Gyn.* 126, 100.
- DE LA MAZA, L.M. and CARTER, B.J. (1981). Inhibition of adenovirus oncogenicity in hamster by adeno-associated virus DNA. *J.Natl. Cancer Int.* 67, 1323-1326.
- MENGELING, W.L., PAUL, P.S., BUNN, T.O. and RIDPATH, J.F. (1986). Antigenic relationship among autonomous parvoviruses. *J.Gen.Virol.* 67, 2839-2844.

- MERCHLINSKY, M.I., TATTERSALL, P.J., LEARY, J.J., COTMORE, S.F., GARDINER, E.M. and WARD, D.C. (1983). Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* 47, 227-232.
- MOK, M., MADERIOUS, A. and CHEN-KIANG, S. (1984). Premature termination by human RNA polymerase II occurs temporally in the adenovirus major late transcriptional unit. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 2031-2040.
- MORGAN, D.O., KAPLAN, J.M., BISHOP, J.M. and VARMUS H.E. (1989). Mitosis specific phosphorylation of p60^{c-src} by p34^{cdc2}-associated protein kinase. *Cell* 57, 775-786.
- MORGAN, W.R. and WARD, D.C. (1986). Three splicing patterns are used to excise the small intron common to all minute virus of virus RNAs. *J. Virol.* 60, 1170-1174.
- MORINET, F. (1987). Les parvovirus humains. *Annales de Pédiatrie* 34, 547-550.
- MOUSSET, S., CORNELIS, J.J., SPRUYT, N. and ROMMELAERE, J. (1986). Transformation of established murine fibroblasts with an activated cellular Harvey *ras* oncogene or the polyomavirus middle T gene increases cell permissiveness to parvovirus minute of mice. *Biochimie* 68, 951-955.
- MOUSSET, S. and ROMMELAERE, J. (1982). Minute Virus of Mice inhibits cell transformation by simian virus 40. *Nature* 300, 537-539.
- MOUSSET, S. and ROMMELAERE, J. (1988). Susceptibility to parvovirus minute virus of mice as a function of the degree of host cell transformation : little effect of simian virus 40 infection and phorbol ester treatment. *Virus Res.* 2, 107-117.
- MULLER, D.E. and SIEGL, G. (1983). Maturation of parvovirus LUIII in a subcellular system. I. Optimal condition for *in vitro* synthesis and encapsidation of viral DNA. *J. Gen. Virol.* 64, 1043-1054.
- MURRAY, M.J., CUNNINGHAM, J.M., PARADA, L.F., DAUTRY, F., LEOVITZ, P. and WEINBERG, R.A. (1983). The HL-60 transforming sequence : A *ras* oncogene coexisting with altered *myc* gene in hematopoietic tumors. *Cell* 33, 749-757.
- OSTROVE, J.M., DUCKWORTH, D.H. and BERNS, K.I. (1981). Inhibition of adenovirus-transformed cell oncogenicity by adeno-associated virus. *Virology* 113, 521-533.
- OWEN, R.D. and OSTROWSKI, M.C. (1987). Rapid and selective alterations in the expression of cellular genes accompany conditional transcription of Ha-v-*ras* in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2512-2520.
- PATTISON, J.R. (1989). The medical significance of human parvoviruses. EMBO Parvovirus Workshop, Ma'ale Hachamisha (Israël).
- PARKER, J.C., COLLINS, Jr.M.J., CROSS, S.S. and ROWE, W.P. (1970). Minute virus of mice. II. Prevalence, epidemiology and occurrence as a contaminant of transplanted tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 45, 305-310.

- PAYNE, F.E., SHALLABERGER, C.J. and SCHMIDT, R.W. (1963). A virus of mammary tissue of rats treated with X-rays or methylcholanthrene. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 4, 51-54.
- PINTEL, D., DADACHANJI, D., ASTELL, C.R., and WARD, D.C. (1983). The genome of minute virus of mice, an autonomous parvovirus, encodes two overlapping transcription units. *Nucleic Acid Res.* 11, 1019-1038.
- RESNEKOV, O. and ALONI, Y. (1989). RNA polymerase II is capable of pausing and prematurely terminating transcription at a precise location *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 12-16.
- RHODE, S.F.III (1985). Transactivation of parvovirus P38 promoter by the 76 K non capsid protein. *J. Virol.* 55, 886-889.
- RHODE, S.L.III (1987). Construction of a genetic switch for inducible *trans*-activation of gene expression in eucaryotic cells. *J. Virol.* 61, 1448-1456.
- RHODE, S.L.III and RICHARDS, S.M. (1987). Characterization of the *trans*-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J. Virol.* 61, 2807-2815.
- RICHARDS, R. and ARMENTROUT, R.W. (1979). Early events in parvovirus replication : lack of integration by minute virus of mice into host cell DNA. *J. Virol.* 30, 397-399.
- RICHARDS, R., LINSER, P. and ARMENTROUT, R.W. (1977). Kinetics of assembly of a parvovirus, minute virus of mice, in synchronized rat brain cells. *J. Virol.* 22, 778-793.
- ROBEY, R.E., WOODMAN, D.R. and HETRICK F.M. (1968). Studies on the natural infection of rats with the Kilham rat virus. *Am. J. Epidemiol.* 88, 139-143.
- ROBINSON, G.W., NATHANSON, N. and HODOUS, J. (1971). Seroepidemiological study of rat virus infection in a closed laboratory colony. *Am. J. Epidemiol.* 94, 91-100.
- RON, D. and TAL, J. (1986). Spontaneous curing of Minute Virus of Mice carrier state by selection of cells with an intracellular block of viral replication. *J. Virol.* 58, 26-30.
- RON, D., TATTERSALL, P. and TAL, J. (1984). Formation of a host range mutant of the lymphotropic strain of minute virus of mice during persistent infection in mouse L cells. *J. Virol.* 52, 63-69.
- ROSE, J.A. (1974). Parvovirus Reproduction. In : "Comprehensive Virology", Vol 1 (H.Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner Eds.), New York, Plenum Press, New York. 1-61.
- ROSENBERG, M. and COURT, D. (1979). Regulation sequences involved in the promotion and the termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genet.* 13, 319-353.
- ROWE, D.I., BRANTON, P.E. and GRAHAM, F.L. (1984). The kinetics of synthesis of early viral proteins in KB cells infected with wild type and transformation defective host-range mutants of human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 65, 585-597.

- SARNOW, P., HO, Y.S., WILLIAMS, J. and LEVINE, A.J. (1982). Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells.
Cell 28, 387-394.
- SAULE, S. (1988). Rétrovirus Aviaires. In "Rétrovirus et Oncogènes" (Michel Crépin Ed). INSERM. 17-58.
- SCHIBLER, U., HAGENBUCHLE, C., WELLAUER, P.K. and PITTET, A. (1983). Two promoters of different strength control the transcription of the mouse alpha-amylase gene *Ami-1^a* in the parotid gland and the liver.
Cell 33, 501-508.
- SCHIMKE, R.T. (1984). Gene amplification in cultured animal cells.
Cell 37, 705-713.
- SCHLEHOFER, J.R., EHRBAR, M. and ZUR HAUSEN, H. (1986). Vaccinia virus, Herpes simplex virus and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helper dependent parvovirus.
Virology 152, 110-117.
- SCHRIER, P.I., BERNARDS, R., VAESSEN, R.T.M.J., HOUWELING, A. and van der EB, A.J. (1983). Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells.
Nature 305, 771-775.
- SELLINS, K.S. and COHEN, J.J. (1987). Gene induction by γ -irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes.
J. Immunol. 139, 3199-3206.
- SIEGL, G. (1984). Biology and Pathogenicity of autonomous parvoviruses.
In "Parvoviruses" (Berns K.I. Ed), Plenum Press, New York and London. 297-362.
- SIEGL, G., BATES, R.C., BERNIS, K.I., CARTER, B.J., KELLY, D.D., KUZTAK, E., and TATTERSALL, P. (1985). Characteristics and taxonomy of parvoviridae.
Intervirology 23, 61-73.
- SINGER, I.I. and RHODE, S.L. III (1978). Electron microscopy and cytochemistry of H-1 Parvovirus intracellular morphogenesis. In "Replication of mammalian parvoviruses". Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 479-504.
- SPALHOLZ, B.A. and TATTERSALL, P. (1983). Interaction of Minute virus of mice with differentiated cells : strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors.
J.Virol. 46, 937-943.
- SPRECHER-GOLDBERGER, S., DEKEGEL, D., OTTEN, J. and THIRY, L. (1970). Incidence of antibodies to adenovirus-associated viruses in patients with tumors or other diseases.
Arch. Gesamte Virusforsch. 30, 16-21.
- STEHELIN, D., VARMUS, H.E., BISHOP, J.M. and VOGT, P.K. (1976). DNA related to the transforming gene (s) of avian sarcoma virus is present in normal avian DNA.
Nature 260, 170-173.
- TALMAGE, D.A. FREUND, R., YOUNG, A.T., DAHL, J., DAWE, C.J. and BENJAMIN, T.L. (1989). Phosphorylation of middle T by pp60^{c-src} : a switch for binding of phosphatidylinositol 3-kinase and optimal tumorigenesis.
Cell 59, 55-65.

- TATTERSALL, P. (1972). Replication of the parvovirus MVM. I. Dependence of virus multiplication and plaque formation on cell growth. *J.Virol.* 10, 586-590.
- TATTERSALL, P. (1978). Susceptibility to minute virus of mice as a function of host cell differentiation, in "Replication of Mammalian Parvoviruses" (Ward, D.C. and Tattersall, P., Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 131-150.
- TATTERSALL, P. and BRATTON, J. (1983). Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strain of Minute Virus of Mice. *J. Virol.* 46, 944-955.
- TATTERSALL, P. and WARD, D. (1978). The Parvoviruses - An Introduction. In "Replication of Mammalian Parvoviruses". (D.C. Ward and P. Tattersall Eds.) Cold Spring Harbour Lab. New York. 3-12.
- TATTERSALL, P., SHATKIN, A.J. and WARD, D.C. (1977). Sequence homology between the structural polypeptides of minute virus of mice. *J.Mol.Biol.* 111, 375-394.
- TOOLAN H.W. (1960). Experimental production of mongoloïd hamsters. *Science* 131, 1446-1449.
- TOOLAN, H.W. (1961). Studies on a viral agent associated with human tumors. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 3, 273.
- TOOLAN, H.W. (1967). Lack of oncogenic effect of the H-virus. *Nature (London)* 214, 1036.
- TOOLAN, H.W. and LEDINKO, N. (1968). Growth and cytopathogenicity of H-1 viruses on human and simian cell cultures. *Nature (London)* 208, 812-813.
- TOOLAN, H.W., RHODE, S.L.III and GIERTHY, J.F. (1982). Inhibition of 7,12-dimethylbenz [a] anthracen -induced tumors in Syrian hamster by prior infection with H-1 parvovirus. *Cancer Res.* 42, 2252-2555.
- TOOLAN, H.W., SAUNDERS, E.L., SOUTHAM, C.M., MORE, A.E. and LEVIN, A.G.(1965). H-1 virus viremia in the human. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 179, 711-715.
- TOOZE, J. (1973). The Molecular Biology of Tumor Viruses (Tooze Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 350-501.
- TULLIS, G.E., LABIENEC-PINTEL, L., CLEMENS, K.E. and PINTEL, D. (1988). Generation and characterization of a temperature-sensitive mutation in the NS-1 gene of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* 62, 2736-2744.
- WALTZ, C. and SCHLEHOFER, J.R. (1989). Stable integration of AAV DNA induces growth retardation and enhanced sensitivity to mutagenes in Hela cells. IIIrd EMBO Workshop, Ma'ale Hachamisha (Israël).
- WARD, D.C. and TATTERSALL, P.J. (1982). Minute Virus of Mice. In "The mouse in Biomedical Research" Vol 2 (H.L. Foster, J.D. Small and J.G. Fox Eds.) Academic Press. 313-334.

- WAZYLYK, C., FLORES, P., GUTMAN, A. and WAZYLYK, B. (1989). PEA3 is a nuclear target for transcription activation by non-nuclear oncogenes. *EMBO J.* 8, 3371-3378.
- WAZYLYK, C., IMLER, J.L. and WAZYLYK, B. (1988). Transforming but not immortalizing oncogenes activate the transcription factor PEA1. *The EMBO J.* 7, 2475-2483.
- WEINBERG, R.A. (1988). Les anti-oncogènes. *Pour la Science* 133, 72-79.
- WEISLOW, D.S., ALLEN, R.T., SHEPERD, R.E., TWARDZIK, D.R., FOWLER, A.K. and HELLMAN, A. (1978). Protection against 7,12 dimethylbenz (a) anthracene-induced rat mammary carcinoma by injection with mouse xenotropic type C virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, 61, 123-129.
- WILLIAM, L.T., TREMBLE, P.M., DANIEL, T.O., COUGHLIN, S.R., GIELS, G. and WANG, J.Y.J. (1985). Platelet-derived growth factor receptors in normal and transformed cells. *Cancer Cells* 3, 175-182.
- WINOCOUR, E., CALLAHAM, M.F. and HUBERNAM, E. (1988). Perturbation of the cell cycle by adeno-associated virus. *Virology* 167, 393-399.
- YANG, T.J. (1987). Parvoviral-induced regression of canine transmissible venereal sarcoma. *Am. J. Vet. Res.* 48, 799-800.

ANNEXE

ARTICLE I

Partial Reversion of Conditional Transformation Correlates with a Decrease in the Sensitivity of Rat Cells to Killing by the Parvovirus Minute Virus of Mice but Not in Their Capacity for Virus Production: Effect of a Temperature-Sensitive *v-src* Oncogene

NATHALIE SALOME,^{1*} BENOIT VAN HILLE,¹ MAURICE GEUSKENS,² AND JEAN ROMMELAERE^{1,2}

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U186 and Centre National de la Recherche Scientifique URA 0156, Institut Pasteur de Lille, BP 245, 59019 Lille Cedex, France,¹ and Department of Molecular Biology, Université Libre de Bruxelles, B 1640 Rhode-St-Genèse, Belgium²

Received 7 March 1989/Accepted 18 July 1989

The cytolytic effect of the autonomous parvovirus minute virus of mice, prototype strain (MVMp), was studied in cultures of *ts* 339/NRK rat cells that display a temperature-sensitive transformed phenotype as a result of their transformation with a Rous sarcoma virus strain mutated in the *v-src* oncogene. A shift from restrictive (39.5°C) to permissive (34.5°C) temperature was associated with a marked sensitization of these cells to killing by MVMp. In contrast, *ts* 339/NRK cell derivatives supertransformed with a wild-type *src* oncogene were sensitive to MVMp at both temperatures, suggesting that the expression of a functional oncogene product may determine, at least in part, the extent of the parvoviral cytopathic effect. Although *ts* 339/NRK cells were quite resistant to parvoviral attack at 39.5°C, they were similarly proficient in MVMp uptake, viral DNA and protein synthesis, and infectious particle production at both permissive and restrictive temperatures. Consistently, electron microscopic examination of infected *ts* 339/NRK cultures incubated at 39.5°C revealed the presence, in the majority of the cells, of numerous full and empty virions that were predominantly located in autophagic-type vacuoles. Thus, in this system, the reversion of transformed and MVMp-sensitive phenotypes appears to correlate with the setting up of a noncytotoxic mode of parvovirus production. These results raise the possibility that the physiological state of host cells may affect their susceptibility to parvoviruses by modulating not only their capacity for virus replication but also cellular processes controlling the cytopathic effect of viral products.

Parvoviridae constitute a family of single-stranded DNA-containing viruses that infect a wide variety of animal species, including humans (1, 35). Members of this viral family can be classified according to the degree of dependence of their replication on coinfection with a helper virus (2, 47). Thus, the so-called autonomous parvoviruses are able to replicate efficiently without the aid of a helper virus in a range of permissive cells (9, 47). Interest in these viruses arises from their small size and low genetic complexity that render them especially dependent on their host cells. In particular, parvoviral replication appears to rely on cellular functions, some of which are restricted to proliferating cells (S-phase factors) in appropriate differentiation states (20, 37, 38, 46). Such strong requirements are interesting from a fundamental point of view because they reflect interactions between highly regulated cellular functions and viral determinants (9). Moreover, the requirements of parvoviruses towards host cells also are major factors influencing the tissue tropism and the pathogenicity of these viruses (39).

Another intriguing property of parvoviruses that may be a reflection of the foregoing is the potent ability of these viruses to suppress spontaneous, virally or chemically induced, and implanted tumors in laboratory animals (10, 15, 35, 42). This oncosuppressive activity is still poorly understood. Interestingly, recent observations showed that a number of *in vitro* cultures of transformed cells constitute a preferential target for lytic replication of autonomous parvoviruses. Thus, a series of human and murine fibroblasts and

epithelial cells transformed by various oncogenic treatments, including radiation, a chemical carcinogen, and viral or cellular oncogenes, are found to be more sensitive to the killing action of parvovirus H-1 or minute virus of mice (prototype strain, MVMp) than corresponding normal cells (3, 7, 8, 21, 22, 23). However, no absolute correlation between hypersensitivity to parvoviruses and transformation can be drawn, since transiently and a few stably transformed cells tested prove to resist the killing action of these viruses (23). Previous work indicated that the enhanced killing of transformed cells coincides with their greater capacity for supporting the parvoviral life cycle, although infection is not necessarily productive (7). Viral DNA is amplified to a greater extent in some but not all transformed cells, compared with their normal parents (7, 8, 21, 23). Moreover, in all cases studied so far, parvovirus-sensitive transformed cells accumulate greater amounts of viral nonstructural proteins than do corresponding normal cultures (8, 44a). Since parvoviral nonstructural proteins are suspected of being cytotoxic (25, 30), the up-modulation of their expression may constitute one factor that enhances the viral cytopathic effect (44a). However, no perfect correlation has been found between the relative sensitivities of various transformed cell lines and their proficiency in viral DNA or protein synthesis (7, 8, 21, 23), suggesting that cellular factors other than those involved in virus replication may contribute to the overall cellular susceptibility to parvoviral attack.

The dependence of parvovirus replication on cell proliferation and differentiation (see above) suggests that the mod-

* Corresponding author.

ulation of cellular functions involved in these processes, as induced by malignant transformation (24), may account for the frequent cosegregation of parvovirus-sensitive and transformed phenotypes. However, it cannot be ruled out that transformation preferentially affects a minor fraction of preexisting parvovirus-sensitive cells. In order to distinguish between causal and consequential interrelations of transformation and susceptibility to parvoviral attack, there is a need for a conditional transformation system allowing the modulation of the transformed phenotype of a given cell strain. This rationale prompted us to analyze the susceptibility of normal rat kidney (NRK) cells that contain an integrated Rous sarcoma virus (RSV) mutant conferring a temperature-sensitive transformed phenotype to MVMP.

The transforming potential of RSV can be ascribed to the *v-src* oncogene that encodes a 60-kilodalton phosphoprotein, pp60^{v-src} (16, 34, 50). This protein is associated with the internal surface of the plasmic membrane as well as with the cytoskeleton and possesses a tyrosine-specific protein kinase activity (5, 16, 17, 27). Although a number of potential cellular substrates of this enzyme have been identified and a series of RSV mutants has contributed to delineate *v-src* functions (6, 16, 48, 50), the exact mode of transformation by pp60^{v-src} still remains elusive. In this study, we used the *ts* 339/NRK cell line that is transformed with a temperature-sensitive RSV mutant, allowing the reversion of several transformation parameters (e.g., morphological changes, efficient growth in agar suspension, high hexose uptake, and lectin agglutinability) when cultures are shifted from permissive to restrictive temperature (14).

Results presented in this report show that the expression of a functional *v-src* protein correlates with an increase in the susceptibility of rat cells to the killing effect of MVMP, suggesting that changes induced by the *src* oncogene may affect determinants of parvoviral cytopathogenicity. Surprisingly, the greater MVMP resistance of cells grown at restrictive temperature is not accompanied by a detectable decrease of their ability to sustain a productive parvovirus infection and may rather be due to a modulation of their responsiveness to viral cytotoxic factors.

MATERIALS AND METHODS

Cells and virus. *ts* 339/NRK was derived from the NRK cell line (11) by transformation with a temperature-sensitive (*ts*) mutant of RSV strain B77 (14) and was kindly provided by T. Graf (Heidelberg, Federal Republic of Germany). NRK and *ts* 339/NRK cells, as well as the *ts* 339-*wt* SRA/NRK derivative described in this report, were grown as monolayers in Dulbecco modified Eagle minimal essential medium supplemented with 10% calf serum (GIBCO Ltd., Renfrewshire, Scotland) and 1% sodium pyruvate. A9, a line of mouse fibroblasts, was grown in Eagle minimum essential medium supplemented with 5% fetal calf serum (GIBCO).

MVMP parvovirus was propagated in A9 cells and purified as described by Tattersall et al. (40). ³H-labeled virus was produced by incubating infected cells with [³H]thymidine (25 Ci/mmol; C.E.A.-Saclay, Saclay, France) as described by Rhode (29). Conditions for cell infection and virus harvesting have been described previously (21), except that incubation of virus-infected cells took place at 34.5 or 39.5°C. MVMP was titrated by plaque assay on A9 cells as described by Rommelaere et al. (33). Virus titers were expressed as PFU per ml. The multiplicity of infection (MOI) defines the number of PFU inoculated per cell.

Transformation with a wild-type *v-src* oncogene. *M-src* is a murine retrovirus constructed by inserting the *v-src* onco-

gene from the Rous sarcoma virus strain Schmidt-Ruppin subgroup A (SRA) into the retroviral vector pMV-4, thus facilitating integration and expression of the *v-src* gene in mammalian cells (45). A cell line producing this recombinant virus was kindly provided by B. Vennström (Stockholm, Sweden). *ts* 339/NRK cells, grown at 39.5°C, were infected with *M-src* in the presence of 0.8 µg of polybrene per ml and were seeded at low densities into 100-mm culture dishes. After 1 to 2 weeks of incubation at 39.5°C, cell clones exhibiting a morphologically transformed appearance were isolated with cloning cylinders and further amplified. These transformed clones were denoted *ts* 339-*wt* SRA/NRK.

pp60^{src} immunoprecipitation, kinase assay, and gel electrophoresis. Cells (2.5 × 10⁶ per 100-mm dish) were metabolically labeled for 3.5 h in 2 ml of methionine-free Dulbecco modified Eagle minimal essential medium supplemented with 5% dialyzed calf serum and 200 µCi of [³⁵S]methionine (800 Ci/mmol; Amersham Corp., Amersham, England). Cells were lysed in 20 mM Tris (pH 7.5)–150 mM NaCl–1 mM EDTA–1% Nonidet P-40–1% Aprotinin, in the presence of 0.2 mM Na₃VO₄ to prevent tyrosine-specific phosphatases (12). After clarification by centrifugation at 120,000 × g for 1 h, lysate fractions containing equal amounts of trichloroacetic acid-precipitable radioactivity (2.5 × 10⁷ cpm) were supplemented with 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), immunoprecipitated by using an excess of a specific anti-*src* monoclonal antibody (MAb 327) (Oncogene Science Inc., Manhasset, N.Y.), fractionated on 10% SDS-polyacrylamide gels, and processed for fluorography as described by Martin et al. (18).

Kinase activity was determined by using enolase as an exogenous substrate for phosphorylation. Equal amounts of pp60^{src}, as determined by densitometric scanning of autoradiograms, were immunoprecipitated as described above, except that sodium deoxycholate and SDS were both omitted to prevent denaturation of kinase activity (13). Immunoprecipitates were suspended in kinase buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 5 mM MnCl₂) containing 4 µg of acid-denatured (26) rabbit muscle enolase (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) and 5 µCi of [γ-³²P]ATP (3,000 Ci/mmol, Amersham Corp.). The mixtures were incubated at either 34.5 or 39.5°C for 10 min, fractionated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and examined by autoradiography by using a Lightning-plus enhancing screen with two sheets of aluminum foil between the dried gel and the X-ray film to block ³⁵S radiation.

Measurement of cell growth and cell cloning ability on plastic. For the measurement of cell growth, cultures (10⁵ cells) were infected with MVMP at various MOIs. At intervals postinfection (p.i.), living cells in the cultures were identified by the trypan blue exclusion method and counted with a hemacytometer.

To determine the ability of cells to clone on plastic, cultures were trypsinized 4 h p.i. and replated at low densities onto 60-mm dishes. After 10 to 15 days of incubation, colonies were fixed in ethanol-acetic acid (3:1 [vol/vol]), stained with Giemsa blue, and counted. Plating efficiencies of the uninfected cells studied were greater than 80%.

Parvoviral life cycle parameters. (i) Virus uptake. Cells (2 × 10⁵ cells per 60-mm dish) were infected by ³H-labeled MVMP (MOI ≈ 2.5 PFU per cell, 4,000 to 8,000 cpm per dish) and incubated for 1 h at 34.5 or 39.5°C. The inoculum was removed, and the cultures were further incubated for 1 h in complete medium. After removal of the medium, the cultures were rinsed with phosphate-buffered saline, incu-

bated for 5 min in 10^{-3} M EDTA, and harvested by trypsinization. The radioactivity recovered at each step was measured in a liquid scintillation counter. Cell-associated radioactivity prior to and after EDTA rinsing was taken as a measurement of virus binding and uptake, respectively.

(ii) **Total viral DNA production.** Total intracellular viral DNA was measured in whole-cell lysates by dispersed cell assays (49). Briefly, cultures (5×10^5 cells per 60-mm dish) were infected by MVMP at various MOIs, incubated for 2 or 30 h, harvested by trypsinization, and trapped by filtration onto nitrocellulose membranes. Filters were denatured with alkali and neutralized, and viral DNA was quantitated by hybridization to ^{32}P -labeled MVM DNA. The probe was the recombinant plasmid pMM984A containing the entire MVMP genome (19) and was kindly given by D. C. Ward (Yale University, New Haven, Conn.). The probe was labeled with $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ by nick translation (32). Hybridized radioactivity was quantitated by liquid scintillation spectrometry.

(iii) **Viral capsid protein synthesis.** Cells grown on cover slips were fixed as described above. Viral capsid proteins were stained by indirect fluorescence (27) by using first a 1:50 dilution of rabbit serum raised against empty MVMP capsids and then a 1:400 dilution of fluorescein isothiocyanate-conjugated sheep serum raised against rabbit immunoglobulins (Biosys, Compiègne, France). The anti-viral capsid protein serum was a generous gift from P. Tattersall (Yale University).

(iv) **Production of infectious virus and infectious centers.** Cultures (10^5 cells) were infected at MOIs ranging from 10^{-2} to 10 PFU per cell. For the determination of infectious virus production, cultures were frozen at intervals p.i. and subjected to three freeze-thaw cycles. The suspensions were diluted in minimal essential medium supplemented with 5% fetal calf serum, and the released particles were titrated by plaque assay by the method of Rommelaere et al. (33).

For the determination of infectious centers, appropriate numbers of virus-infected cells were harvested at 3 to 4 h p.i. and seeded on top of 3×10^5 A9 indicator cells in 60-mm dishes. At 3 to 4 h after seeding, the cultures were processed as for plaque assays. The proportion of productively infected cells was determined from the fraction of seeded cells giving rise to plaques.

Electron microscopy. Cells were accumulated at the beginning of the S phase by incubation with an excess of thymidine (7.5 mM; Calbiochem-Behring, La Jolla, Calif.) during 18 to 20 h. Immediately after release from this thymidine block, cells were infected with MVMP (MOI = 10) or mock treated and transferred to Dulbecco modified Eagle minimal essential medium supplemented with 10% calf serum and 1% sodium pyruvate. At various times after MVM or mock infection, with or without subcultures, cells were washed and fixed with 3% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 2.5 h at room temperature and processed for electron microscopy by the method of Richards et al. (31), with slight modifications. Briefly, after extensive washes in cacodylate buffer, cells were postfixed for 1 h with 2% OsO_4 in the same buffer at room temperature, dehydrated in ethanol, and embedded in situ in Epon. Ultrathin sections of the cell monolayers, cut parallel to the growth plane, were stained with uranyl acetate and then with lead citrate. Electron micrographs were taken in an AE1 EM6B electron microscope at a 60-kV acceleration voltage.

RESULTS

Transformed phenotypes of *ts* 339/NRK and *ts* 339-*wt* SRA/NRK cells. *ts* 339/NRK cells were transformed by a temperature-sensitive avian sarcoma virus mutant and, as originally described by Graf and Friis (14), they reverted to a morphologically normal phenotype after a temperature shift from 34.5 to 39.5°C for 2 to 3 days. In contrast, the *ts* 339-*wt* SRA/NRK clonal derivative, which was isolated in this study after infection of *ts* 339/NRK cells with a wild-type *src*-containing murine retrovirus, was selected on the basis of the maintenance of a transformed morphology at 39.5°C (data not shown).

The expression of *src* oncogenes was determined in the NRK cell line and its v-*src*-containing derivatives by immunoprecipitation with a specific antiserum after *in vivo* labeling with $[\text{S}^{35}]\text{methionine}$. As shown in Fig. 1A, untransformed NRK cells sustained only a low extent of pp60^{src} production that may be due to the activity of the endogenous cellular oncogene. On the other hand, *ts* 339/NRK and *ts* 339-*wt* SRA/NRK cells showed high levels of pp60^{src} synthesis at both 34.5 and 39.5°C. It is noteworthy that *ts* 339/NRK cultures accumulated a three- to fivefold greater amount of pp60^{src} at 34.5°C compared with the same cell line at 39.5°C or with the *ts* 339-*wt* SRA/NRK clone at either temperature.

pp60^{src} from the NRK cell line and its transformed derivatives was tested for its ability to phosphorylate enolase. *In vitro* kinase assays were performed on *src* proteins immunoprecipitated from cell lysates with MA b 327. No significant kinase activity was observed from parental NRK cells. For equivalent amounts of *src* protein, pp60^{src} from *ts* 339/NRK cells had a threefold higher kinase activity at 34.5 than at 39.5°C. On the other hand, the protein kinase activity of *ts* 339-*wt* SRA/NRK cells was 10- to 20-fold greater than that of *ts* 339/NRK cells at 34.5°C (Fig. 1B).

It follows that the related cell lines used in this study display graded *src* protein kinase activities, ranging from insignificant to low, intermediate, and high levels in NRK cells, *ts* 339/NRK cells at 39.5°C, *ts* 339/NRK cells at 34.5°C, and *ts* 339-*wt* SRA/NRK cells at either temperature, respectively. This result may be put together with the facts that (i) *ts* 339/NRK cells grown at 39.5°C were not completely normalized and showed, in particular, a greater saturation density and anchorage independence than did parental NRK cells, and (ii) the phenotype of *ts* 339-*wt* SRA/NRK cells was hypertransformed compared with that of *ts* 339/NRK cells at 34.5°C (data not shown).

Cell sensitivity to the killing effect of MVMP. Previous studies showed that untransformed NRK cells resist infection with parvovirus MVMP (44a). Therefore it was of interest to determine whether temperature modulation of the transformed phenotype of the *ts* 339/NRK derivative would affect its susceptibility to the parvoviral killing action. The cytopathic effect of MVMP was assessed by measuring either the growth of infected cultures at intervals p.i. or the residual ability of infected cells to form colonies on plastic.

As shown in Fig. 2A, the growth of MVMP-infected *ts* 339/NRK cultures (MOI = 1 PFU per cell) was only slightly inhibited at 39.5°C but was virtually suppressed at 34.5°C. Similar results were obtained after cell infection with MVMP at an MOI of 10 PFU per cell (data not shown). The reduced or arrested growth of MVM-infected *ts* 339/NRK cultures may result from the ability of MVMP to kill a fraction of the cells, the size of which would depend on culture conditions. This possibility was tested by measuring the efficiency of

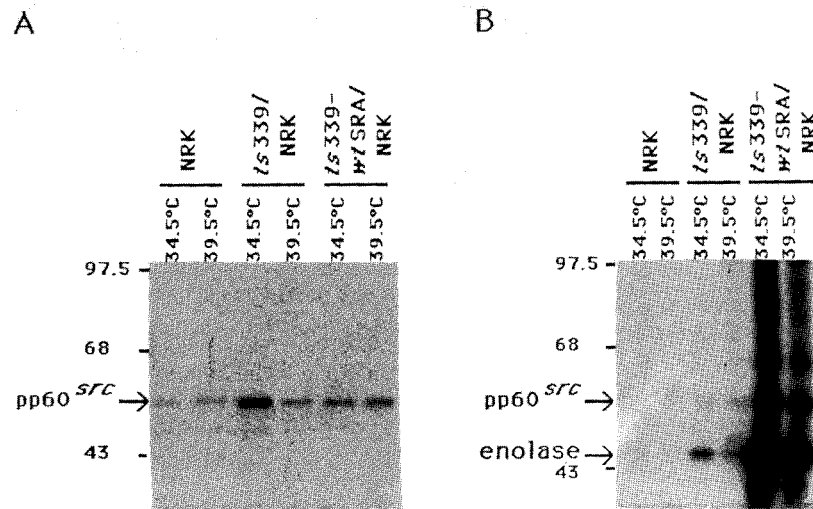


FIG. 1. Immunoprecipitation and protein kinase assay of $pp60^{src}$ from transformed and untransformed NRK cells. (A) Autoradiograph of a 10% SDS-polyacrylamide gel showing proteins immunoprecipitated with anti- $pp60^{src}$ monoclonal antibodies from cell lysates labeled with [35 S]methionine. Equal amounts of trichloroacetic acid-insoluble radioactivity were used for all immunoprecipitations. Exposure time, 6 days. (B) Autoradiograph of a 10% SDS-polyacrylamide gel showing $pp60^{src}$ and enolase phosphorylations from cell lysates incubated with acid-treated enolase and [γ - 32 P]ATP. Equivalent amounts of labeled $pp60^{src}$ were used for ts 339 and ts 339-wt SRA immunoprecipitations. Exposure time, 6 h. Cultures were maintained at 34.5 or 39.5°C, as mentioned on top of lanes. Size markers (in kilodaltons), are on the left.

infected cells in forming colonies on plastic. As shown in Fig. 3, MVMP caused only a slight reduction in the survival of ts 339/NRK cells at 39.5°C, consistent with their almost unaffected growth (Fig. 2A). In contrast, MVMP infection proved to be lethal for a large fraction of ts 339/NRK cells grown at 34°C. The cytotoxic effect of MVMP, as measured by this assay, results only from the primary infection; indeed, similar cell survivals were obtained in the absence or presence of antiserum directed against MVM capsid proteins, i.e., under conditions allowing or not allowing secondary infections (data not shown). Thus, both cell growth and survival curves show that ts 339/NRK cultures are more susceptible to the lytic effect of MVMP at 34.5 than at 39.5°C, i.e., under conditions allowing full expression of the transformed phenotype.

These results raise the question of whether the temperature sensitivity of the v - src oncogene product is responsible for such a modulation of the susceptibility of ts 339/NRK cells to MVMP as a function of temperature. The role of the oncogene was determined by testing whether the introduction of a wild-type src oncogene in these cells would render their sensitivity to MVMP less dependent on temperature. Indeed, the supertransformed ts 339-wt SRA/NRK strain was prevented from growing in vitro at both 34.5 and 39.5°C upon infection with MVMP at an MOI of 1 (Fig. 2B) or 10 (data not shown) PFU per cell. Moreover, MVMP drastically reduced the colony-forming ability of ts 339-wt SRA/NRK cells grown at either temperature (Fig. 3). The toxic effect of MVMP on supertransformed cells was still somewhat greater at 34.5 than at 39.5°C, a fact that may be the result of a low

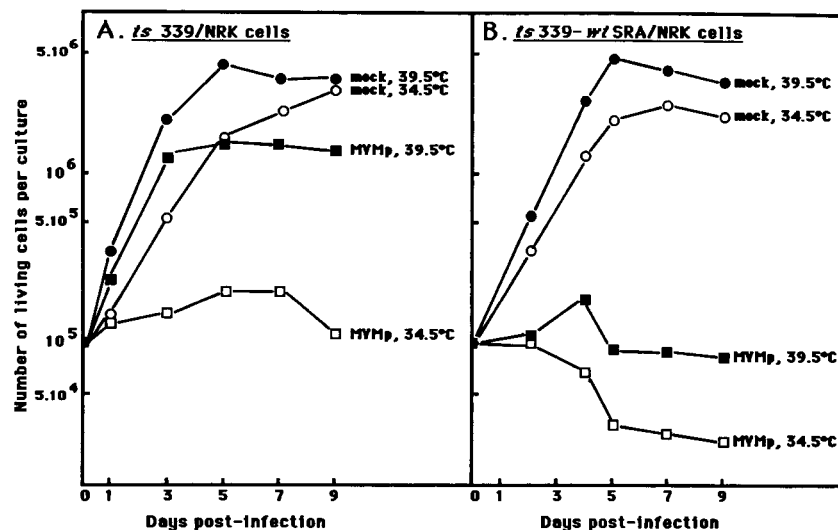


FIG. 2. Effect of parvovirus MVMP on the growth of ts 339/NRK (A) and ts 339-wt SRA/NRK (B) cultures. Mock- or MVMP-treated cells (MOI = 1 PFU per cell) were incubated at 34.5 or 39.5°C and counted at intervals p.i.

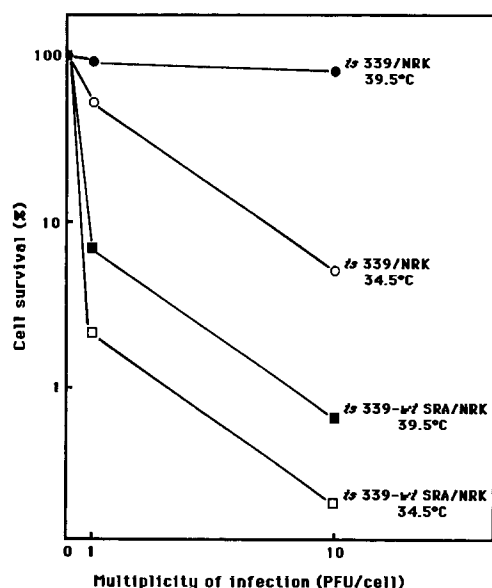


FIG. 3. Susceptibility of *ts* 339/NRK and *ts* 339-wt SRA/NRK cells to the killing effect of MVMP. Cells were infected with MVMP (MOI = 1 or 10 PFU per cell), and their survival was determined by measuring their residual colony-forming ability on plastic compared with that of mock-treated cells.

extent of intrinsic temperature sensitivity of the parvoviral life cycle (44), the contribution of the *ts* 339 *src* oncogene, or both. However, the resistance accompanying the transition from 34.5 to 39.5°C was less for *ts* 339-wt SRA/NRK than for *ts* 339/NRK cells, suggesting that the temperature sensitivity on the *v-src* oncogene in the latter cells plays a major role in the modulation of their susceptibility to MVMP by temperature.

Taken together, these data strongly suggest that the expression of a functional *v-src* oncogene correlates with the sensitivity of the rat cells studied to the cytopathic effect of MVMP. Thus, pp60^{src} may induce qualitative or quantitative modifications of cellular or viral determinants of MVMP cytotoxicity. Whether such modifications are directly involved in the transformed phenotype or are merely coincidental remains to be determined. In any case, the differential MVMP sensitivity of *ts* 339/NRK cells grown at 34.5 versus 39.5°C can be related more particularly to a subset of *src*-induced transformation parameters, namely, those which are reversed at 39.5°C and include the cytoskeletal organization and the ensuing cell morphology (see above).

Cell susceptibility to the MVMP replicative cycle. We have tested whether the differential MVMP sensitivity of *ts* 339/NRK cells grown at 34.5 or 39.5°C is related to their capacity for supporting parvovirus replication at either temperature.

(i) Ongoing parvoviral life cycle. MVMP was adsorbed and internalized to similar extents by *ts* 339/NRK cells, irrespective of whether cultures were incubated at 34.5 or 39.5°C (Table 1). Therefore, the hypersensitivity of these cells to the killing effect of MVMP at 34.5°C is unlikely to result from their greater proficiency in viral uptake at this temperature. This conclusion was confirmed by showing that cells grown at either temperature had similar intracellular MVMP DNA contents at 2 h p.i., as measured by hybridization against dispersed cell lysates (data not shown). By using this technique, it was also found that *ts* 339/NRK cells sustained high levels of MVMP DNA amplification at both 34.5 and 39.5°C

TABLE 1. Effect of temperature on the ability of *ts* 339/NRK cells to replicate MVMP^a

Temperature (°C)	Virus uptake ^b (%)	Viral DNA amplification ^c	Capsid protein synthesis ^d (%)	Infectious virus production ^e (PFU/culture)	Infectious center efficiency ^f (%)
34.5	19	470	48	5×10^5	54
39.5	17	1200	73	41×10^5	52

^a Data shown are from a typical experiment. Similar relative values were obtained in two to three independent experiments.

^b Percentage of inoculated virus which becomes internalized.

^c Ratio of viral DNA contents per culture at 30 h versus 2 h p.i. (MOI = 1).

^d Percentage of immunofluorescence-positive cells 36 h p.i. (MOI = 1).

^e Infectious virus recovered from cultures 120 h p.i. of 10^5 cells (MOI = 1).

^f Percentage of infected cells (MOI = 1) initiating plaque formation.

(Table 1). Moreover, a large fraction of infected cells produced viral structural proteins at both temperatures, as detected by immunofluorescence staining (Table 1).

Taken together, these data indicate that the resistance to MVMP, as acquired by *ts* 339/NRK cultures upon incubation at 39.5°C, does not coincide with a decrease in their ability to support the above-mentioned viral replicative steps. This feature contrasts with the reported failure of parental untransformed NRK cells to amplify and express MVMP DNA (44a). Thus, *ts* 339/NRK cultures maintained at 39.5°C, although quite resistant to MVMP (Fig. 3), are not equivalent to untransformed NRK cells with respect to their permissiveness to virus replication.

(ii) Production of infectious MVMP particles. MVMP was inoculated in the *ts* 339/NRK cultures maintained at 34.5 or 39.5°C, and virus titers were measured at intervals p.i. As shown in Fig. 4, a production of infectious virus took place at both temperatures. For each time point considered, greater amounts of progeny virions were recovered from cultures incubated at 39.5 than from those kept at 34.5°C (Fig. 4), consistent with the higher extent of parvovirus replication achieved at the former temperature for a given interval p.i. (Table 1). The fact that yields of virions and viral products were greater at 39.5 than at 34.5°C, when measured at the same time after infection, can probably be ascribed to the faster progression of the parvoviral life cycle (28) and also to the continued growth of the cultures at the former temperature (Fig. 2A). On the other hand, it came as a surprise that such an efficient production of infectious MVMP virions at 39.5°C was compatible with the proliferation of infected cultures, as analyzed concomitantly (Fig. 2A). The proportion of productively infected cells was determined by measuring the ability of inoculated cells to initiate plaque formation in indicator cultures (infectious center assay). As shown in Table 1, about half of the primarily infected cells (MOI = 1 PFU per cell) gave rise to infectious centers, irrespective of temperature. This proportion is similar to the fraction of cells that were killed by MVMP at 34.5°C (about 50% for an MOI of 1; see Fig. 3). In contrast, at 39.5°C, the fraction of killed cells was significantly lower than that of infectious centers (10 and 52%, respectively, for an MOI of 1; see Fig. 3 and Table 1). This discrepancy raises the unexpected possibility that at least part of the MVMP resistance acquired by *ts* 339/NRK cultures at 39.5°C may result from the ability of a majority of infected cells to release the virus without being killed.

(iii) Ultrastructural analysis of *ts* 339/NRK cells grown at 39.5°C. It is expected that virions, including full particles, will become detectable in the majority of MVMP-infected *ts* 339/NRK cells grown at 39.5°C, in spite of the fact that these

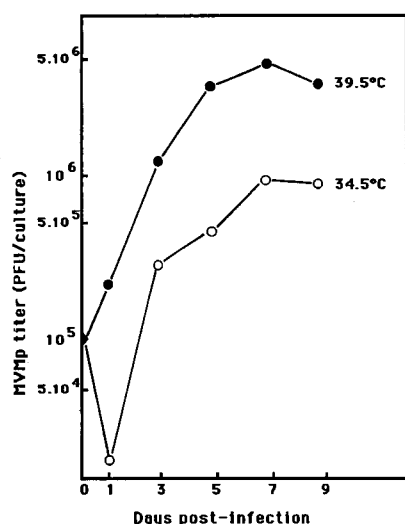


FIG. 4. MVMP production in *ts* 339/NRK cells at 34.5 or 39.5°C. Cultures were infected with MVMP (MOI = 1 PFU per cell) and, in parallel to the determination of their growth (see Fig. 3), were analyzed at intervals p.i. for the production of infectious virus.

cells survive and proliferate. This prediction was tested by electron microscopic examination of MVMP- or mock-infected *ts* 339/NRK cultures incubated at 39.5°C.

Mock-treated *ts* 339/NRK cells often displayed micronuclei that may result from lobulation, followed by fragmentation of interphase nuclei. Numerous vesicles containing several individual masses of flocculent and membranous materials were present in the cytoplasm of these cells and became included inside large autophagic vacuoles. In fact, greater autophagic activity distinguished *ts* 339/NRK cells grown at 39.5°C (Fig. 5A) from those maintained at 34.5°C (data not shown).

ts 339/NRK cells, incubated at 39.5°C, were also analyzed at intervals after infection with MVMP, in order to detect viral particles and virus-induced alterations of cellular ultrastructures. Numerous spherical particles having the size of parvoviruses (about 25 nm in diameter) became clearly visible in numerous cytoplasmic vesicles present in all the cells observed (from about 100 to 500) from 24 h p.i. onwards and appeared as a lining on the inner membrane surface of these vesicles (Fig. 5B). As expected of parvoviral bursts, only a fraction of the viral particles appeared to be full (Fig. 5B and E). Infected cells maintained at 39.5°C continued to proliferate (Fig. 2A). Consistently, occasional mitotic figures were observed, showing a more or less even distribution of

virus-containing vesicles between daughter cells (Fig. 5C). Virion-containing vesicles progressively became encumbered with membrane whorls and coalesced into larger vesicles comprising heterogeneous internal material, especially myelinlike structures (Fig. 5D and E). Such vesicles were often trapped within larger autophagic vacuoles (Fig. 5D, E, and F), which may also contain other cellular material, such as mitochondria, ergastoplasmic sacs, and lipid droplets. Some of these vacuoles appeared to be in the process of excreting their content outside the cell (Fig. 5D). Moreover, such vesicles were present in similar amounts in subcultured cells analyzed at 9 days p.i. (Fig. 5F) or as late as 13 days p.i., suggesting that infection may become persistent at 39.5°C.

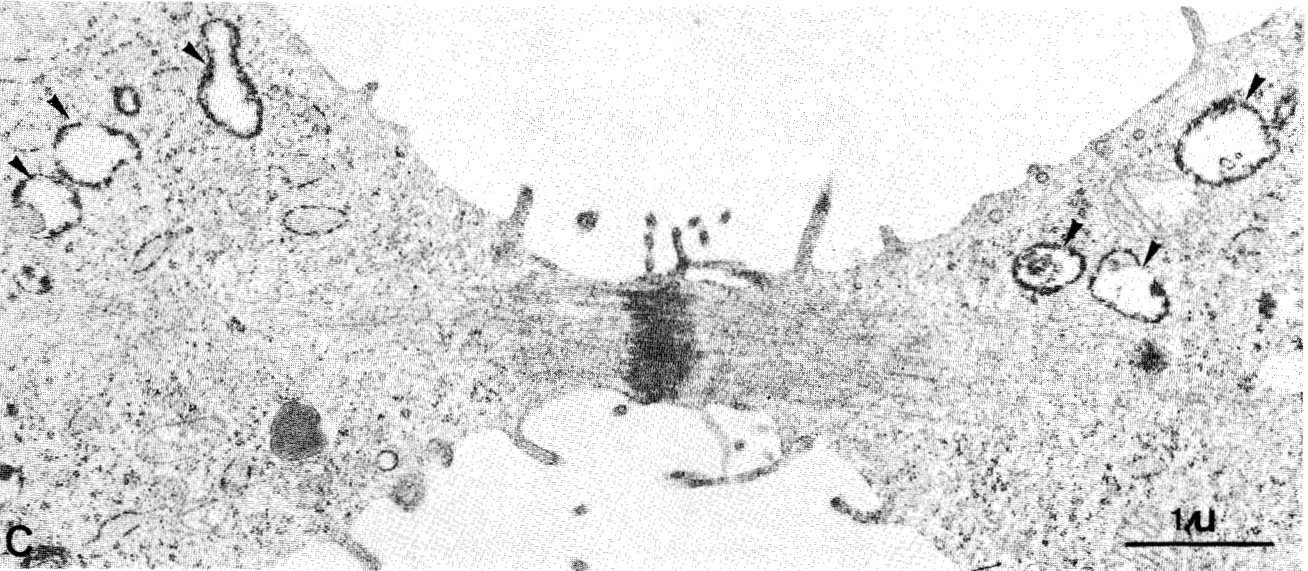
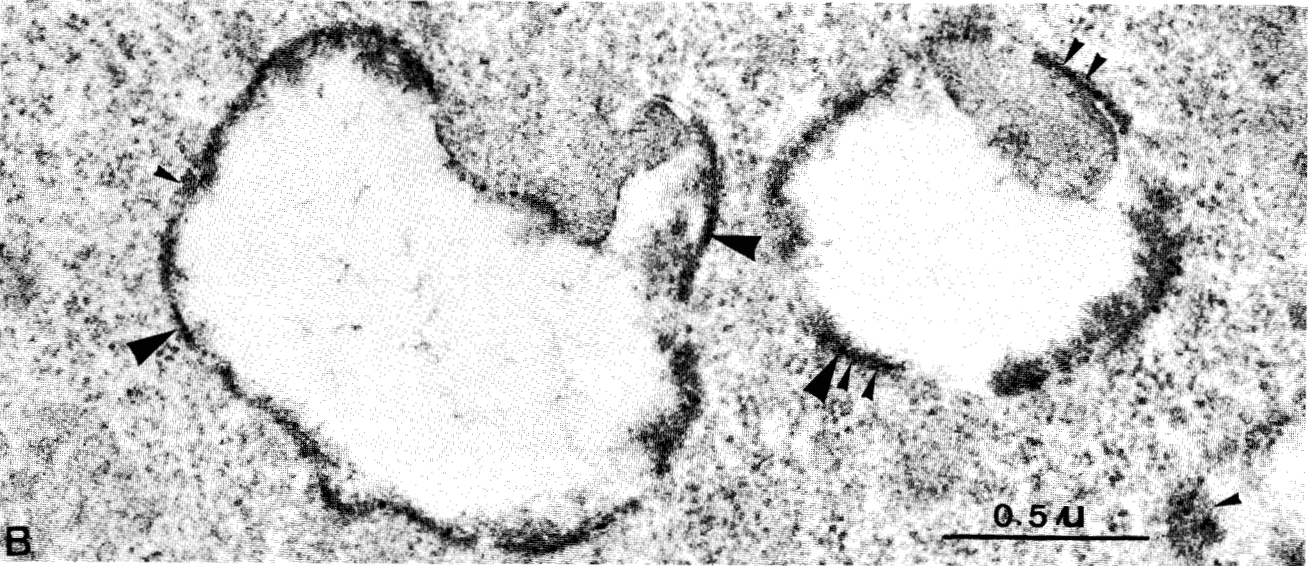
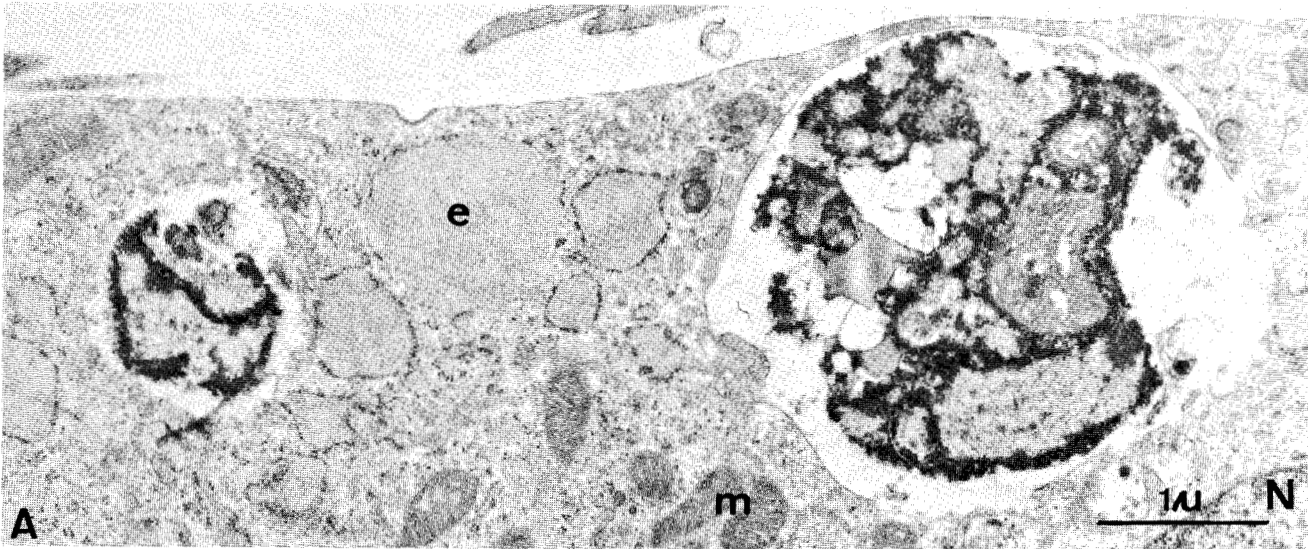
Taken together, these observations indicate that the proliferation of infected *ts* 339/NRK cultures at 39.5°C is compatible with the accumulation of large amounts of MVMP virions, including full particles, in practically all the cells, consistent with the putative noncytotoxic mode of virus production inferred above.

DISCUSSION

Modulation of the cytolytic action of MVMP by host cell transformation. In the present work, functional expression of a *v-src* oncogene was found to correlate with an increase in the sensitivity of rat cells to the killing effect of MVMP. On the one hand, *ts* 339/NRK cells that are conditionally transformed by a temperature-sensitive mutant of RSV resisted MVMP infection to a much greater extent under conditions reducing the protein kinase activity of pp60^{src} and causing a reversion of the morphological transformation (incubation at 39.5 versus 34.5°C). On the other hand, supertransformation of the *ts* 339/NRK cells with a wild-type *v-src* oncogene led to a concomitant increase in pp60^{src} activity and in the levels of both cell transformation and sensitivity to MVMP, irrespective of whether cells were grown at 34.5 or 39.5°C. These results are in agreement with previous reports (3, 7, 8, 21, 22, 23, 41) showing that a series of in vitro-transformed human and murine cells are more susceptible to the attack of MVMP or H-1 parvovirus than are corresponding normal cells. Such a hypersensitivity is demonstrated for cells transformed by a variety of agents, including several viral or cellular oncogenes (8, 21, 23). In addition to extending these observations to another oncogene, *v-src*, the present study points to the parallel variation of the parvoviral cytopathic effect and the expression of the transformed phenotype in one and the same cell strain, strongly suggesting that the former may be modulated by the latter.

Similar to other mutants of the *v-src* oncogene (16, 48, 50),

FIG. 5. Ultrastructure of mock- and MVMP-infected *ts* 339/NRK cells grown at 39.5°C. Electron micrographs of mock-treated cells (A) or MVMP-infected cells (MOI = 10 PFU per cell) (B to F) incubated at 39.5°C. Parasynchronous cultures were examined at 24 h (B), 36 h (C), 72 h (D), 150 h (A and E), and 9 days (after one subculture [F]) after mock or MVMP infection. N, Nucleus; e, dilated rough endoplasmic reticulum cisternae; m, mitochondria. (A) Two large vacuoles containing cellular debris are observed in the cytoplasm. Magnification, $\times 22,500$. (B) Vesicles containing empty and full viral particles, as indicated by small and large arrowheads, respectively, are observed in the cytoplasm. Magnification, $\times 55,000$. (C) Mitotic cell division. Virus-containing vesicles (arrowheads) are distributed between the two daughter cells connected by the midbody. Magnification, $\times 20,000$. (D) Cell in the process of excreting undigested material into the medium, including virus-containing vesicles (arrowheads) coming from a large vacuole (large arrow) whose limiting membrane has fused with the plasma membrane. On the right side, two vacuoles (autolysosomes) (small arrows) contain virus at their periphery and myelinic figures. Magnification, $\times 13,000$. (E) Cytoplasm on the left side, near the cell surface, contains a large vacuole filled with heterogeneous material and many virions, including empty and full particles (small and large arrowheads, respectively). On the right side, more vacuoles, whose limiting membrane appears interrupted in places, contain myelinic figures and viral particles. Magnification, $\times 39,000$. (F) Lysosomal vacuoles containing myelinic figures and viral material (arrowheads) are observed in the cytoplasm near dilated rough endoplasmic reticulum cisternae (e). Magnification, $\times 39,000$. Figure 5D through F continues on the following page.



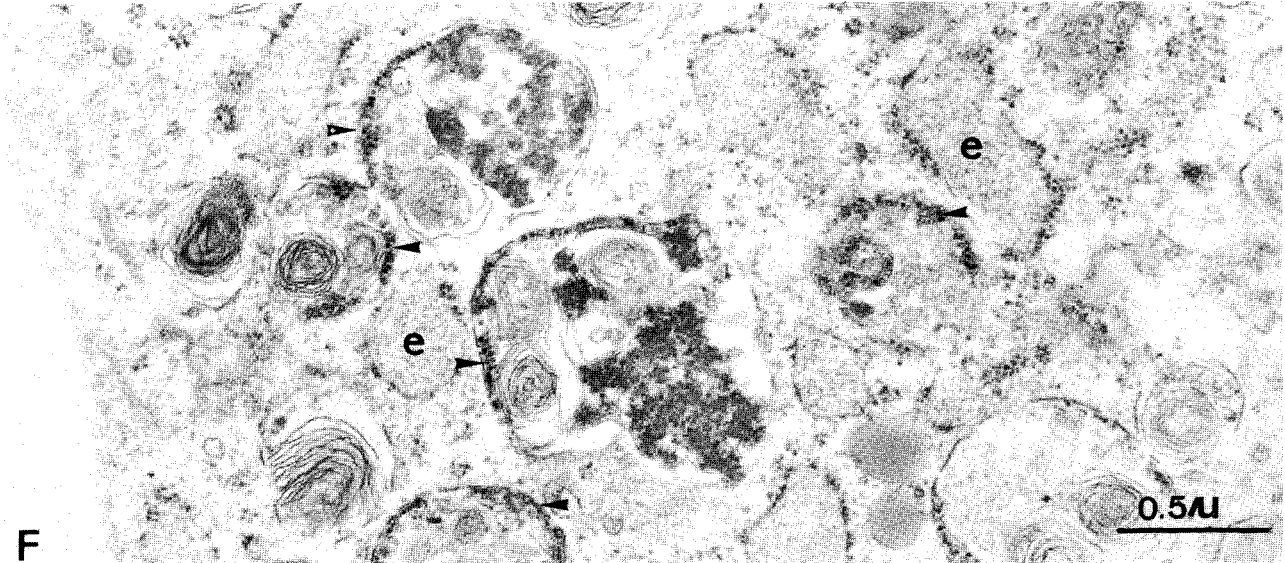
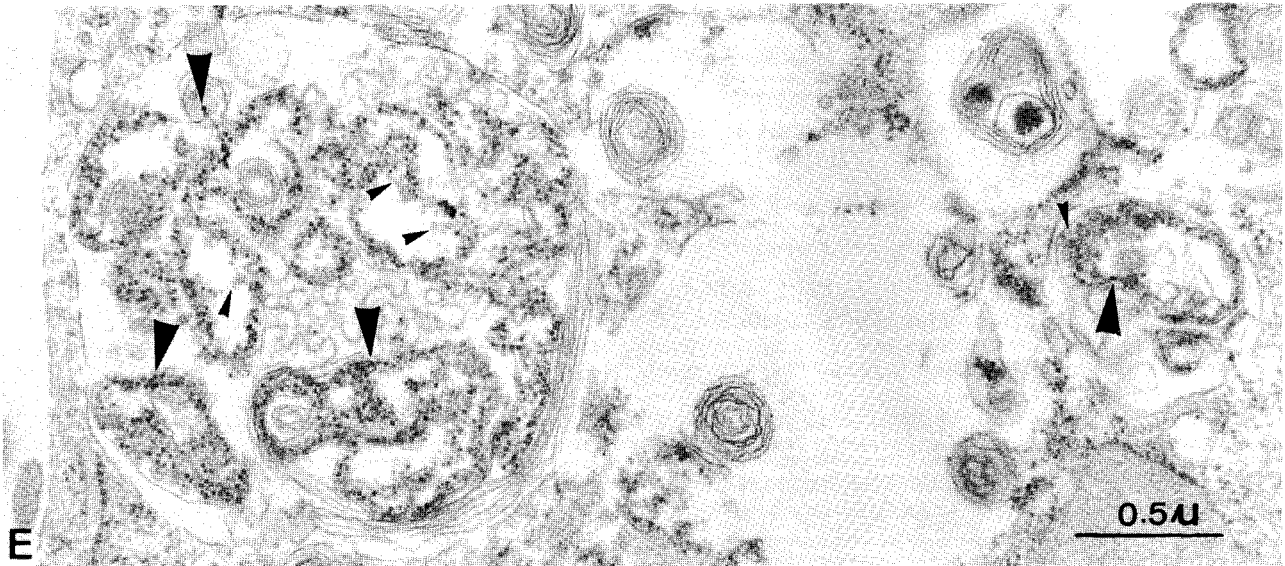
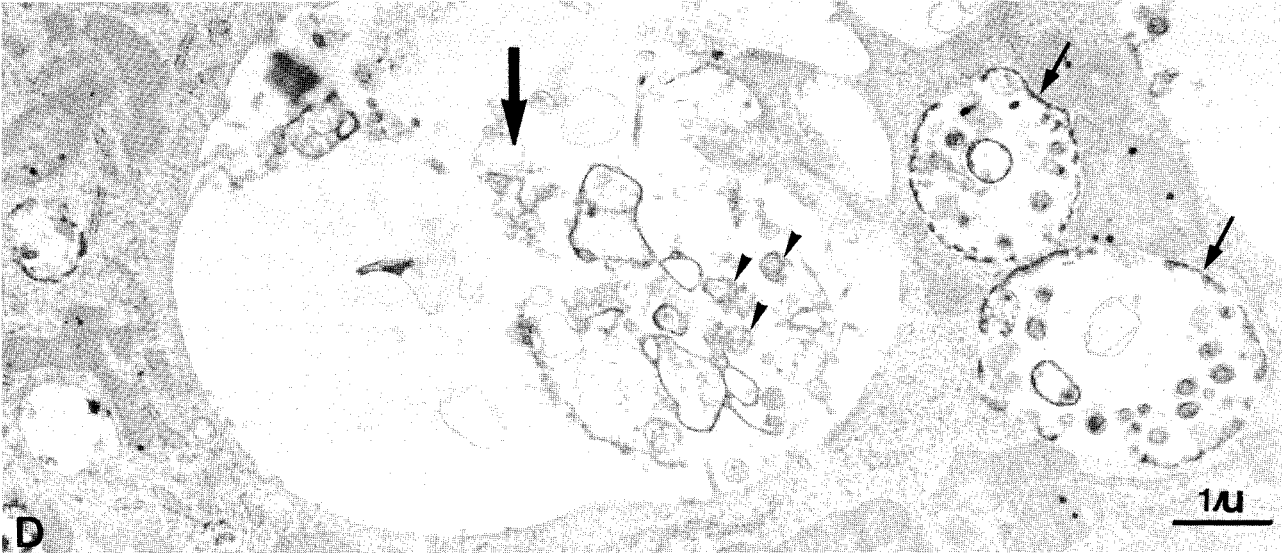


FIG. 5—Continued

the *ts* 339 strain involved in this study is characterized by a reduced tyrosine kinase activity in vitro and a defect in the induction of morphological transformation at 39.5 versus 34.5°C. The mechanism by which the pp60^{v-src} protein may potentiate the killing action of MVMp is not known. The pp60^{v-src} protein is mainly located at the inner face of the plasma membrane (particularly at regions of cell-to-cell contact and adhesion plaques) but is also associated with intracellular membranes and with the cytoskeleton (6, 16, 27). It remains to be elucidated whether such an intracellular location of pp60^{v-src} accounts for the greater autophagic activity occurring at 39.5 than at 34.5°C. Although several substrates of the tyrosine kinase activity of pp60^{v-src} have been identified (6, 16, 50), the targets whose phosphorylation is temperature sensitive and which may contribute to morphological transformation and susceptibility to MVMp remain to be determined.

Dissociation of MVMp production from cell killing. The reason for the greater resistance of *ts* 339/NRK cells to MVMp upon temperature shift to 39.5°C is a matter of speculation. Previous work showed that transformed cells which are sensitized to parvoviral infection have a greater capacity for replicating (3, 7, 8, 21) and expressing (7, 8, 21) viral DNA, although progeny virions are not necessarily produced. This feature strongly suggests that the enhancement of the parvoviral lethal action on transformed cells may be due, at least in part, to their ability to synthesize higher amounts of specific viral products, such as the nonstructural protein(s) suspected of being cytotoxic (25, 30). Results presented in this report suggest that the up-modulation of the viral life cycle may not be the only reason for the sensitization of transformed cells to parvoviral attack. Indeed, the greater resistance of *ts* 339/NRK cells to MVMp at 39.5°C does not coincide with a reduction in the efficiency of any of the steps of virus replication measured, including the production of infectious particles. Therefore, the reversion of transformation in this system uncovered an apparent dissociation of permissiveness from cytopathogenicity. If this dissociation is confirmed by further analyses of parvovirus replication, the possibility would arise that transformation-modulated cellular determinants of the killing effect of MVMp may be involved not only in virus replication but also in cell responsiveness to viral cytotoxic products.

It is worth noting that the resistance of *ts* 339/NRK cultures to MVMp at 39.5°C is compatible not only with virus replication but also with the release of a burst of infectious progeny virions. Different hypotheses may be put forward to reconcile the much reduced cytopathic effect of MVMp at 39.5 versus 34.5°C with the maintenance of a level of virus production that is similar or even higher at the former temperature. On the one hand, productively infected cells may only represent a very minor fraction of the cultures. This possibility is not supported by the fact that the proportion of infectious centers is similar at 39.5 and 34.5°C and much higher than the fraction of cells killed at the former temperature. On the other hand, a noncytotoxic mode of virus production may take place in *ts* 339/NRK cells grown at 39.5°C. Such an unconventional release mechanism may normally be masked or suppressed by a cytotoxic process that is no longer active in the partial revertants. This hypothesis is consistent with our electron microscopic observations showing that at 39.5°C, all *ts* 339/NRK cells observed become filled with cytoplasmic inclusions comprising empty and full particles, while cultures continue to proliferate. It is worth noting that virions accumulated into cytoplasmic vesicles are often enclosed in larger autophagic

vacuoles and are occasionally seen to be released from the cells. It should also be stated that such a subcellular confinement of the virus may account for the characteristic punctuated immunofluorescence staining of the cytoplasm for viral structural proteins in *ts* 339/NRK cells grown at 39.5°C, in contrast with the diffuse staining observed for cultures incubated at 34.5°C (data not shown). Parvovirus trapping in cellular vesicles has been described previously in relation to the uptake of parental particles, although its role in virus transfer to the nucleus is unclear (9, 31). Virus-containing organelles in *ts* 339/NRK cells grown at 39.5°C are much more complex than the endocytotic vesicles thought to be involved in virus uptake. However, entry of secondarily infecting virions has to be considered as a possible contribution to the intracellular accumulation of viral particles seen by electron microscopy, at least for late times after inoculation. Alternatively, virus transit in a subcellular secretory autophagic compartment may constitute a potential step of a noncytotoxic mechanism for the production of progeny particles. This issue is particularly intriguing, since parvovirus release is usually considered to result from generalized cell degeneration leading to the disruption of the plasmic membrane (9, 31, 36). On the other hand, noncytotoxic virus shedding takes place in cells infected with certain enveloped viruses, such as retroviruses that bud at the cell surface (43). However, as expected for nonenveloped viruses, no budding of parvovirus particles has been observed in infected *ts* 339/NRK cells grown at 39.5°C. Taken together, our results raise the possibility of an alternative noncytotoxic release mechanism related to virus sequestration and exocytosis. Work to test the latter possibility is presently in progress in our laboratory.

The permissiveness of normalized *ts* 339/NRK cultures at 39.5°C contrasts with the failure of the original NRK cell line to support the MVMp life cycle (44a). The present work does not allow one to identify the distinctive feature(s) of the former cells that accounts for their permissiveness in the absence of cytopathic effect at 39.5°C. The proficiency of *ts* 339/NRK cells in parvovirus replication at 39.5°C may be related, at least in part, to the residual pp60^{v-src} activity that is shown to exist under these conditions. An alternative, nonexclusive possibility would be that the *ts* 339/NRK clonal derivative undergoes an additional unspecified change stimulating the parvoviral life cycle, irrespective of temperature. Consistently, a BALB/c 3T3 variant cell line has been isolated which appears to have a similar MVM-resistant phenotype, in that resistance is modulated by transformation and that the untransformed cells produce and export progeny virus without concomitant cell lysis (R. Moir and P. Tattersall, personal communication). It follows that the concurrence of full permissiveness to MVMp and resistance to virus-induced killing is not unique to the *ts* transformant used in this study, even though parvovirus replication proves to be lytic in most permissive cellular systems analyzed so far. Similarly, release of simian virus 40 virions from epithelial cells has been recently reported to occur without cell lysis (4). Taken together, these observations indicate that cell disruption is not the obligatory outcome of a productive infection by nonenveloped viruses.

ACKNOWLEDGMENTS

We are greatly indebted to T. Graf for his generous gift of the *ts* 339/NRK cell line. We thank P. Tattersall for anti-MVM capsid protein serum and B. Vennström for M-src producing cells. We also thank J. J. Cornelis, P. Tattersall, and S. Cotmore for stimulating discussions; K. E. Boulukos for her critical reading of the manu-

script; and N. Duponchel for technical assistance. We are grateful of N. Devassine, M. C. Bouchez, and S. Redjem for taking care of the manuscript.

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Association pour la Recherche sur le Cancer, and Institut Pasteur de Lille (France), the Caisse Générale d'Epargne et de Retraite (Belgium), and the Commission of the European Communities. N.S. and B.v.H. were supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer and Centre National de la Recherche Scientifique, respectively. M.G. is a senior research associate of the Belgian National Fund for Scientific Research.

LITERATURE CITED

- Anderson, M. J., and J. R. Pattison. 1984. The human parvovirus. *Arch. Virol.* **82**:137-148.
- Berns, K. I., and R. A. Bohnenky. 1987. Adeno-associated viruses: an update. *Adv. Virus Res.* **32**:243-306.
- Chen, Y. Q., F. de Foresta, J. Hertoghs, B. L. Avalosse, J. J. Cornelis, and J. Rommelaere. 1986. Selective killing of simian virus 40-transformed human fibroblasts by parvovirus H-1. *Cancer Res.* **46**:3574-3579.
- Clayson, E. T., L. V. Jones Brando, and R. W. Compans. 1989. Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *J. Virol.* **63**:2278-2288.
- Collett, M. S., A. F. Purchio, and R. L. Erikson. 1980. Avian sarcoma virus transforming protein, pp60^{src}, shows protein kinase activity specific for tyrosine. *Nature (London)* **285**:167-169.
- Cooper, J. A., and T. Hunter. 1983. Regulation of cell growth and transformation by tyrosine-specific protein kinases: the search for important cellular substrate proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **107**:125-161.
- Cornelis, J. J., P. Becquart, N. Duponchel, N. Salomé, B. L. Avalosse, M. Namba, and J. Rommelaere. 1988. Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and minute virus of mice. *J. Virol.* **62**:1679-1686.
- Cornelis, J. J., N. Spruyt, P. Spegelaere, E. Guetta, T. Darawshi, S. F. Cotmore, J. Tal, and J. Rommelaere. 1988. Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression. *J. Virol.* **62**:3438-3444.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* **33**:91-174.
- Cukor, G., N. R. Blacklow, D. Hoggan, and K. I. Berns. 1984. Biology of adeno-associated virus, p. 33-60. In K. I. Berns (ed.), *The parvoviruses*. Plenum Publishing Corp., New York.
- Duc-Nguyen, H., E. N. Rosenblum, and R. F. Zeigel. 1966. Persistent infection of a rat kidney cell line with Rauscher murine leukemia virus. *J. Bacteriol.* **92**:1133-1140.
- Foulkes, J. G., E. Erikson, and R. L. Erikson. 1983. Separation of multiple phosphotyrosyl- and phosphoserine-protein phosphatases from chicken brain. *J. Biol. Chem.* **258**:431-438.
- Garber, E. A., T. Hanafusa, and H. Hanafusa. 1985. Membrane association of the transforming protein of avian sarcoma virus UR2 and mutants temperature-sensitive for cellular transformation and protein kinase activity. *J. Virol.* **56**:790-797.
- Graf, T., and R. R. Friis. 1973. Differential expression of transformation in rat and chicken cells infected with an avian sarcoma virus *ts* mutant. *Virology* **56**:369-374.
- Guetta, E., D. Ron, and J. Tal. 1986. Developmental-dependent replication of minute virus of mice in differentiated mouse testicular cell lines. *J. Gen. Virol.* **67**:2549-2554.
- Jove, R., and H. Hanafusa. 1987. Cell transformation by the viral *src* oncogene. *Annu. Rev. Cell Biol.* **3**:31-56.
- Levinson, A. D., H. Oppermann, H. E. Varmus, and J. M. Bishop. 1980. The purified product of the transforming gene of avian sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *J. Biol. Chem.* **255**:11973-11980.
- Martin, P., C. Henry, F. Ferré, M. Dutertre-Coquillaud, C. Lagrou, J. Ghysdael, B. Debuire, D. Stéhelin, and S. Saule. 1986. Transformation of quail embryo fibroblasts by a retrovirus carrying a normal human *c-myc* gene. *EMBO J.* **5**:1529-1533.
- Merchinsky, M. J., P. J. Tattersall, J. J. Leary, S. F. Cotmore, E. M. Gardiner, and D. C. Ward. 1983. Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **47**:227-232.
- Miller, R. A., D. C. Ward, and F. H. Ruddle. 1977. Embryonal carcinoma cells (and their somatic cell hybrids) are resistant to infection by the murine parvovirus MVM, which does infect other teratocarcinoma-derived cell lines. *J. Cell. Physiol.* **91**:393-402.
- Mousset, S., J. Cornelis, N. Spruyt, and J. Rommelaere. 1986. Transformation of established murine fibroblasts with an activated cellular *Harvey-ras* oncogene or the polyoma virus middle T gene increases cell permissiveness to parvovirus minute virus of mice. *Biochimie* **68**:951-955.
- Mousset, S., and J. Rommelaere. 1982. Minute virus of mice inhibits cell transformation by simian virus 40. *Nature (London)* **300**:537-539.
- Mousset, S., and J. Rommelaere. 1988. Susceptibility to parvovirus minute virus of mice as a function of the degree of host cell transformation: little effect of simian virus 40 infection and phorbol ester treatment. *Virus Res.* **9**:107-117.
- Nicolson, G. L. 1987. Tumor cell instability, diversification and progression to the metastatic phenotype: from oncogene to oncofetal expression. *Cancer Res.* **47**:1473-1487.
- Ozawa, K., J. Ayub, S. Kayigaya, T. Shimada, and N. Young. 1988. The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells. *J. Virol.* **62**:2884-2889.
- Piwica-Worms, H., K. B. Saunders, J. M. Roberts, A. E. Smith, and S. H. Cheng. 1987. Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60^{c-src}. *Cell* **49**:75-82.
- Resh, M. D., and R. L. Erikson. 1985. Highly specific antibody to Rous sarcoma virus *src* gene product recognizes a novel population of pp60^{v-src} and pp60^{c-src} molecules. *J. Cell Biol.* **100**:409-417.
- Rhode, S. L., III. 1976. Replication process of the parvovirus H-1. V. Isolation and characterization of temperature-sensitive H-1 mutants defective in progeny DNA synthesis. *J. Virol.* **17**:659-667.
- Rhode, S. L., III. 1978. H-1 DNA synthesis, p. 279-296. In D. C. Ward and P. Tattersall (ed.), *Replication of mammalian parvoviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Rhode, S. L., III. 1987. Construction of a genetic switch for inducible *trans*-activation of gene expression in eucaryotic cells. *J. Virol.* **61**:1448-1456.
- Richards, R., P. Linser, and R. W. Armentrout. 1977. The kinetics of assembly of a parvovirus, minute virus of mice, in synchronized rat brain cells. *J. Virol.* **22**:778-793.
- Rigby, P. W. J., M. Dieckmann, C. Rhodes, and P. Berg. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**:237-251.
- Rommelaere, J., J. M. Vos, J. J. Cornelis, and D. C. Ward. 1981. U.V.-enhanced reactivation of minute virus of mice: stimulation of a late step in the viral life cycle. *Photochem. Photobiol.* **33**:845-854.
- Sefton, B. M., T. Hunter, K. Beemon, and W. Eckhart. 1980. Evidence that the phosphorylation of tyrosine is essential for cellular transformation by Rous sarcoma virus. *Cell* **20**:807-816.
- Siegl, G. 1984. Biology and pathogenicity of autonomous parvoviruses, p. 297-362. In K. I. Berns (ed.), *The parvoviruses*. Plenum Publishing Corp., New York.
- Singer, I. I., and S. L. Rhode III. 1978. Electron microscopy and cytochemistry of H-1 parvovirus intracellular morphogenesis. In D. C. Ward and P. Tattersall (ed.), *Replication of mammalian parvoviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Spalholz, B. A., and P. Tattersall. 1983. Interaction of minute

- virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J. Virol.* **46**:937-943.
38. **Tattersall, P.** 1978. Susceptibility to minute virus of mice as a function of host cell differentiation, p. 131-149. *In* D. C. Ward and P. Tattersall (ed.), *Replication of mammalian parvoviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
39. **Tattersall, P., and J. Bratton.** 1983. Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *J. Virol.* **46**:944-955.
40. **Tattersall, P., P. J. Cawte, A. J. Shatkin, and D. C. Ward.** 1976. Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a parvovirus. *J. Virol.* **20**:273-289.
41. **Toolan, H. W., and N. Ledinko.** 1965. Growth and cytopathogenicity of H-viruses in human and simian cell cultures. *Nature (London)* **208**:812-813.
42. **Toolan, H. W., S. L. Rhode III, and J. F. Gierthy.** 1982. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced tumors in Syrian hamsters by prior infection with H-1 parvovirus. *Cancer Res.* **42**:2552-2555.
43. **Tooze, J.** 1973. *The molecular biology of tumor viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
44. **Tullis, G. E., L. Labieniec-Pintel, K. E. Clemens, and D. Pintel.** 1988. Generation and characterization of a temperature-sensitive mutation in the NS-1 gene of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **62**:2736-2744.
- 44a. **van Hille, B., N. Duponchel, N. Salomé, N. Spruyt, S. F. Cotmore, P. Tattersall, J. J. Cornelis, and J. Rommelaere.** 1989. Limitations to the expression of parvoviral nonstructural proteins may determine the extent of sensitization of EJ-*ras*-transformed cells to minute virus of mice. *Virology* **171**:89-97.
45. **Vennström, B., P. Kahn, B. Adkins, P. Enrietto, M. J. Hayman, T. Graf, and P. Luciw.** 1984. Transformation of mammalian fibroblasts and macrophages in vitro by a murine retrovirus encoding an avian *v-myc* oncogene. *EMBO J.* **3**:3223-3229.
46. **Walter, S., R. Richards, and R. W. Armentrout.** 1980. Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute virus of mice, a parvovirus. *Biochim. Biophys. Acta* **607**:420-431.
47. **Ward, D. C., and P. Tattersall (ed.).** 1978. *Replication of mammalian parvoviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
48. **Welham, M. J., and J. A. Wyke.** 1988. A single point mutation has pleiotropic effects on pp60^{v-src} function. *J. Virol.* **62**:1898-1906.
49. **Winocour, E., and I. Keshet.** 1980. Indiscriminate recombination in simian virus 40-infected monkey cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:4861-4865.
50. **Wyke, J. A., and A. W. Stoker.** 1987. Genetic analysis of the form and the function of the viral *src* oncogene product. *Biochim. Biophys. Acta* **907**:47-69.

ARTICLE II

Limitations to the Expression of Parvoviral Nonstructural Proteins May Determine the Extent of Sensitization of EJ-*ras*-Transformed Rat Cells to Minute Virus of Mice

BENOÎT VAN HILLE,* NADINE DUPONCHEL,* NATHALIE SALOMÉ,* NATHALIE SPRUYT,* SUE F. COTMORE,† PETER TATTERSALL,† JAN J. CORNELIS,* AND JEAN ROMMELAERE*‡¹

*Laboratory of Molecular Oncology, INSERM U186 and CNRS UA 04 1160, Institut Pasteur de Lille BP 245, 59019 Lille cedex, France;

†Departments of Laboratory Medicine and Human Genetics, Yale University School of Medicine, 333 Cedar Street, New Haven, Connecticut 06510; and ‡Laboratory of Biophysics and Radiobiology, Université Libre de Bruxelles, Rhode-St-Genève, Belgium

Received November 28, 1988; accepted February 15, 1989

The FR3T3 and NRK rat cell lines and their human EJ Ha-*ras*-1 oncogene-transformed derivatives, termed FREJ and NREJ, were compared for their susceptibility to the parvovirus MVMp. For a similar production of p21^{ras} protein, FREJ clones are markedly sensitized to killing by MVMp, whereas the NREJ cells are not. Such a contrasting effect of *ras* transformation on the sensitivity of cells of different origins to MVMp can be traced back to their respective abilities to support the parvoviral life cycle. The FR3T3 line produces a substantial amount of viral DNA whose expression in the form of the nonstructural protein NS-1 is stimulated in its transformed derivatives. Conversely, NRK cells offer an early block to parvoviral DNA replication and expression that appears to persist in the *ras*-transformed clones. Thus, at least two intracellular restrictions can protect normal rat cells against MVMp infection, and transformation by *ras* relieves one of them at the level of parvoviral gene expression. A fair correlation was also found between the degree of sensitivity of the various lines to MVMp-induced killing and their capacity to synthesize the nonstructural viral proteins, suggesting a possible role of parvoviral nonstructural proteins in cytotoxicity. © 1989 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

Parvoviruses are small nuclear-replicating DNA viruses that lyse susceptible cells and are often isolated from tumor material (Siegl, 1984). The association of parvoviruses with tumors does not imply that these viruses are oncogenic; on the contrary, parvoviruses exhibit an intriguing oncosuppressive activity (Toolan *et al.*, 1982; Guetta *et al.*, 1986; Cukor *et al.*, 1984; Siegl, 1984; Rommelaere and Tattersall, 1988). It rather seems that the "oncotropism" and possibly also part of the oncosuppressive action of parvoviruses result from opportunistic infections, i.e., malignant transformation generates a cellular environment especially suitable for virus replication (Mousset and Rommelaere, 1982). This possibility is consistent with the known predilection of parvoviruses for proliferating cells at immature stages of differentiation (Tattersall, 1978). Moreover, it was recently shown that *in vitro* transformation of a number of human or rodent fibroblasts and epithelial cells correlates with an increase in their susceptibility to both the replication and lytic effect of parvoviruses H-1 and MVMp. Transforming treatments that proved able to sensitize cells to parvoviral attack included γ -radiation and a chemical carcinogen (Cornelis *et al.*, 1988a), DNA and RNA tumor viruses (Chen *et al.*, 1986, 1989; Mousset *et al.*, 1986;

Cornelis *et al.*, 1988b), and isolated oncogenes (Mousset *et al.*, 1986). It follows that parameters of parvoviral replication may be used as indicators to reveal direct or indirect effects of oncogenes. The present study is based on this rationale and makes use of the prototype strain of minute virus of mice (MVMp), an autonomous parvovirus (Cotmore and Tattersall, 1987), to characterize the transformed state of rat cells transfected by the activated human oncogene EJ Ha-*ras*-1 (Barbacid, 1987).

Parvoviruses have a low genetic complexity and therefore rely on multiple cellular functions for their replication (Cotmore and Tattersall, 1987). Thus, nonpermissive cells can be deficient in various factors required for the completion of the parvoviral life cycle, at both surface and intracellular levels. Although many of the transformed rat cells tested were found to be sensitive to the parvovirus MVMp, we came across *in vitro* transformed or tumor-derived lines that were resistant to the virus. Therefore, it is clear that transformation does not overcome all possible limitations offered by normal cells to parvovirus replication. The outcome of the transformation of cells with respect to their interaction with parvoviruses may depend on the tissue origin, differentiation stage, and/or oncogenes involved. The analysis of the specificity of the interrelation between cell transformation and the ongoing parvoviral life cycle is interesting in at least two respects. First, it may set

¹ To whom requests for reprints should be addressed.

limits to the range of transformed cell types which can be killed by parvoviruses. Second, it may contribute to the understanding of the mode of action of oncogenes by pointing out defined molecular events of parvovirus replication that are triggered by the oncogene product or by cellular factors activated in the presence of the latter.

These considerations prompted us to compare two rat cell lines of different origins, FR3T3 and NRK, for their susceptibility to parvovirus MVMp upon transformation with a Ha-*ras*-1 oncogene that was derived from the human bladder carcinoma EJ (Tabin *et al.*, 1982) and that induces distinct facets of transformation *in vitro* (Barbacid, 1987). Untransformed FR3T3 and NRK cells are both highly resistant to MVMp-induced killing but differ in their restriction to parvovirus replication. NRK cells fail to complete an early intracellular step of the MVMp life cycle that is required for the onset of viral DNA replication and expression, while FR3T3 cells replicate MVMp DNA and express substantial amounts of viral proteins. It was therefore of interest to determine the proneness of both systems to sensitization to MVMp after transformation with the EJ *ras* oncogene.

This report shows that a given level of expression of the *ras*-encoded p21 protein is indeed accompanied by a differential effect on the susceptibility of FR3T3 and NRK cells to MVMp, indicating a specific up-modulation of viral nonstructural gene expression in transformed cells and suggesting a role for nonstructural viral proteins in cytotoxicity.

MATERIALS AND METHODS

Cells and virus

The established lines of Fisher rat cells FR3T3 (Seif and Cuzin, 1977) and normal rat kidney cells NRK (Duc-Nguyen *et al.*, 1966), as well as the *ras*-transformants described in this report, were grown in Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) supplemented with 10% aseptic calf serum (GIBCO) and 1% sodium pyruvate. The mouse fibroblast cell line A9 was cultivated in Eagle's minimum essential medium supplemented with 5% fetal calf serum. MVMp was propagated in A9 cells and purified according to Tattersall *et al.* (1976). Conditions for cell infection have been described previously (Mousset *et al.*, 1986). MVMp was titrated by plaque assays on A9 indicator cells as described by Tattersall *et al.* (1976).

Plasmid and transfection

pSVneoEJ is a plasmid constructed by inserting a 6.6-kb *Bam*HI fragment containing the human Ha-*ras*-1

oncogene from the human bladder carcinoma cell EJ into the *Bam*HI site of the G418-resistance plasmid pSV2neo (Southern and Berg, 1982). It was a kind gift of Ch. Marshall (London, UK). Cultures of $2-5 \times 10^5$ cells/100 mm plate were transfected with 20 γ g DNA according to van der Eb and Graham (1980). After 1–2 weeks incubation in medium containing 500 γ g/ml geneticin (GIBCO), resistant colonies were isolated with cloning cylinders and further amplified.

Immunoprecipitation and sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE)

Cultures (10^6 cells) were metabolically labeled by incubation in 2 ml methionine-free DMEM medium supplemented with 200 μ Ci [35 S]methionine (800 Ci/mmol; Amersham) for a period of 1 (for the NS-1 protein of MVMp) to 18 hr (for the p21^{ras} protein). Cells were lysed in RIPA buffer (Tris–HCl 10 mM, pH 7.4; EDTA 1 mM; NaCl 150 mM; Triton X-100 1%; sodium deoxycholate 0.5%; aprotinin 1%) and centrifuged at $10^5 g$ for 1 hr. Lysates were immunoprecipitated with specific antisera, fractionated by SDS–PAGE, and processed for fluorography (Martin *et al.*, 1986). The *ras* product p21 was immunoprecipitated with the monoclonal antibody Y13-259 (Oncogene Science, Inc). The MVMp nonstructural protein NS-1 was precipitated with a monospecific rabbit serum directed against a bacterial fusion protein containing an amino acid sequence from the highly conserved part of the NS-1 protein (Cotmore and Tattersall, 1986).

Fluorescence studies

Cells grown on coverslips were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed for 20 min at 4° in 3.7% paraformaldehyde, washed extensively with PBS, permeabilized for 1.5 min in 0.5 M PHEM buffer (PIPES 60 mM; HEPES 25 mM; ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid 10 mM; MgCl₂ 2 mM, pH 7.0) containing 0.15% Triton X-100, and treated with ethanolamine 0.1% for 20 min. Actin filaments were stained by direct fluorescence using NBD-phalloidin (Molecular Probes, Inc) which recognizes actin molecules (Barak *et al.*, 1980).

mRNA extraction and northern blots

Total cell RNA was purified by the guanidinium isothiocyanate method, denatured with formamide, fractionated by electrophoresis in agarose gels, and transferred to nitrocellulose sheets (Davis *et al.*, 1986). Blots were hybridized to the 32 P-labeled internal 2.9-kb *Sac*I fragment from the pSVneoEJ plasmid and exposed to X-OMAT S films (Kodak) at -70° for autoradiography.

Clonal growth assays

The cell capacity for anchorage-independent growth was determined in DMEM containing 10% fetal calf serum and 0.33% bacto-agar (Difco). Colonies of more than 50 cells were counted 2–4 weeks after plating.

The ability of virus-infected cells to form colonies on plastic petri dishes was determined as follows. Four hours postinfection, the cells were trypsinized, plated at low densities onto 60-mm petri dishes, and incubated until sizable colonies (1–2 mm in diameter) had emerged (between 8 and 12 days). Colonies were fixed in ethanol:acetic acid (3:1, v/v), stained with Giemsa, and counted.

Parvoviral life cycle parameters

Virus uptake and internalization were measured according to Chen *et al.* (1986), using ^3H -labeled MVMP.

Total viral DNA synthesis during the first virus cycle was determined by dispersed cell assays as described previously (Cornelis *et al.*, 1988a). Shortly, cultures consisting of 5×10^5 MVMP-infected cells were trypsinized, trapped onto nitrocellulose filters, denatured with alkali, and hybridized against a ^{32}P -labeled nick-translated cloned MVM-DNA probe from the plasmid pMM984A (Merchliński *et al.*, 1983). MVMP DNA amplification was expressed as the ratio of viral DNA contents at 30 hr versus 2 hr (input) postinfection for a multiplicity of infection (m.o.i.) of 10 plaque-forming units (PFU) per cell.

For the detection of the nonstructural viral protein NS-1, cultures were infected at a m.o.i. of 1 PFU/cell. Eighteen hours later, cells were labeled for 1 hr with [^{35}S]methionine and processed for SDS-PAGE and fluorography as described above. The autoradiograms were analyzed with a densitometer (CDS-200; Beckman).

RESULTS

Characterization of the EJ-*ras*-transfectants

FR3T3 and NRK cells were transfected with the plasmid pSVneoEJ which contains the human Ha-*ras*-1 oncogene from EJ bladder carcinoma cells together with the bacterial neomycin phosphotransferase gene conferring resistance to the drug geneticin (G418). After 10 days in selective medium, approximately 80–100 colonies with altered morphology were found per 100-mm dish. No colonies were observed in mock-transfected cultures treated with geneticin. Four G418-resistant colonies from each of the FR3T3 and NRK cultures were isolated, recloned, and designated FREJ-1 to 4 and NREJ-1 to 4, respectively. All transfectants displayed a typical transformed morphology and con-

sisted of small fusiform cells showing a criss-cross organization (Fig. 1A). The selected clones were able to grow at higher cell densities than their respective parental line (Table 1). Moreover, all the transfectants had lost contact inhibition, as they piled up at confluency. The generation time of the various transfectants was also shorter than that of the respective parental cells (Table 1).

Anchorage-independent growth usually constitutes a reliable marker of *in vitro* transformation of murine cells. Consistently, the FREJ and NREJ series were both able to form large colonies at a high rate when suspended in semisolid medium. In contrast, the respective parental populations had a low capacity for growth in soft agar (Table 1). The cytoskeleton of murine cells has been reported to be disorganized upon transformation with murine sarcoma viruses (Devouge *et al.*, 1982). When examined by fluorescence microscopy, FR3T3 and NRK parental cell lines both displayed organized bundles of actin filaments (Fig. 1B). In contrast, no actin cables were observed in the EJ-*ras*-transformed derivatives of these lines; instead, fluorescence staining was diffuse and confined to certain edges of the cells. Thus, transformation by EJ-*ras* disturbed the cytoskeleton organization of the immortalized rat cell lines studied. To ascertain that the transfected *ras* oncogene is responsible for the transformed phenotypes, the expression of the *ras*-encoded protein p21 was assessed by immunoprecipitation of [^{35}S]methionine-labeled cell lysates with specific monoclonal antibodies, followed by separation of cellular proteins on SDS-polyacrylamide gels and fluorography. The four FREJ transfectants and the NREJ-3 clone produced approximately the same levels of p21 proteins, as illustrated in Fig. 2 for FREJ-3 and NREJ-3 cells. The three other NREJ transformants expressed p21 *ras* at a somewhat lower level than NREJ-3 cells (data not shown). Although recognized by the antibodies used, endogenous p21 proteins from the protooncogene *ras* were hardly detectable in the two normal cell lines (Fig. 2). Moreover, Northern blot analysis of the FR3T3 line and its transformed derivative FREJ-3 showed much higher 1.2-kb *ras* mRNA levels in the latter (Fig. 2). Thus, the transfected EJ-*ras* oncogene is likely to be responsible for the overexpression of p21 proteins and for the ensuing transformation of the NREJ and FREJ clones.

Sensitization of transformed cells to the cytotoxic action of MVMP

The susceptibility of the parental lines and transformed clones to the cytotoxic action of MVMP was assessed by measuring their ability to form colonies on plastic as a function of the multiplicity of infection

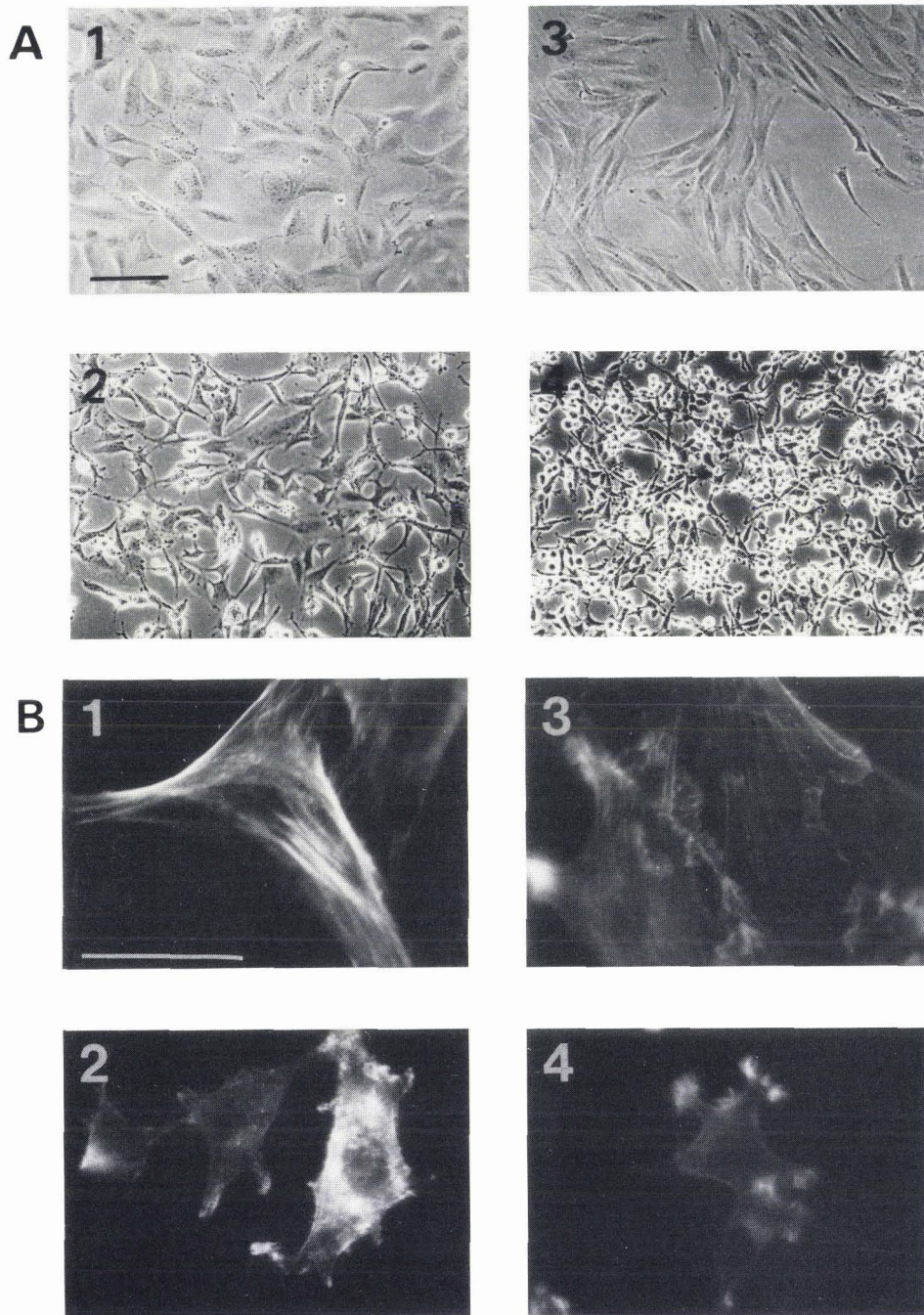


FIG. 1. Morphological appearance of normal and *ras*-transformed cells. (A) Phase-contrast microscopy of cells in culture. Scale bar = 200 μm . (B) Direct fluorescent staining of actin filaments with NBD-phalloidin. Scale bar = 50 μm . (1) NRK; (2) NREJ-4; (3) FR3T3; (4) FREJ-4.

(m.o.i.). The A9 mouse cell line, which is sensitive to MVMp and currently used to produce and titer this virus, was included as a positive control in the survival assays. As shown in Fig. 3, the normal rat cell lines tested were both quite refractory to the killing action of MVMp, although the resistance of FR3T3 cells was slightly lower than that of NRK cells. EJ-*ras*-induced transformation had a differential effect on the suscepti-

bility of these lines to MVMp. All FREJ clones were more readily killed by MVMp than the parental FR3T3 cells (Fig. 3B). Yet, the various derivatives differed greatly in their susceptibility to the virus. Like for other cellular systems studied so far in this respect, clear cytolytic effects were seen from about 35 hr p.i. onward, which were more pronounced in the transformed than in the normal cell cultures. Moreover, the residual colo-

TABLE 1

PARAMETERS OF CELL TRANSFORMATION AND PARVOVIRAL REPLICATION IN NORMAL AND *ras*-TRANSFORMED LINES

Cell lines	Cellular parameters			Viral parameters	
	Saturation density ^a (cells × 10 ⁶)	Generation time ^b (hr)	Clonogenicity in soft agar (%)	Uptake (% input)	DNA amplification ^c
NRK	4	27	0.02	25	2.8
NREJ-1	12	19	15	28	2.4
NREJ-2	13	18	23	20	4.4
NREJ-3	12	24	17	27	11.3
NREJ-4	13	14	18	23	1.8
FR3T3	4	28	0.4	25	207
FREJ-1	18	13	40	25	203
FREJ-2	17	11	48	28	158
FREJ-3	22	12	50	28	288
FREJ-4	31	13	45	26	279
A9	10	24	14	29	143

^a Measured at confluency on 100-mm plates.^b Duration of a single complete cell cycle measured as the time for a population in log-phase growth to double in size.^c Ratio of viral DNA contents at 30 hr versus 2 hr postinfection (m.o.i. = 1) as determined by dispersed cell assays.

nies from infected cultures had average sizes similar to those of mock-infected control plates. Thus, a virus-induced killing rather than growth retardation was responsible for the reduced plating efficiency of the FREJ clones compared with the FR3T3 cells. In contrast, the 4 NREJ clones tested achieved a level of resistance to MVM not significantly different from that of their parental line (Fig. 3A), in agreement with the limited cyto-

pathic effects observed in these cultures. These results stress the influence of the type of host cells on their proneness to sensitization to parvovirus as a result of their transformation by a given oncogene.

Capacity of normal and EJ-transformed cells for MVMp replication

In previous studies, it was demonstrated that cell sensitization to the killing effect of parvovirus H-1 or MVMp correlates with an increased virus replication (Mousset *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1986; Cornelis *et al.*, 1988a). This prompted us to investigate whether the discrepancy between the sensitizing effects of *ras*-transformation on NRK and FR3T3 cells may be related to differences in the ability of these lines to sustain MVMp replication. To this end, several steps of the parvoviral life cycle were analyzed in the normal cells and their transformed derivatives.

(i) First, it was ascertained that NRK, FR3T3, and the transformed clones were equally proficient in the binding and internalization of inoculated MVMp. Like in several other cell systems tested for this property (Mousset *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1986; Cornelis *et al.*, 1988a), virus uptake was similar for all cell lines and ranged from 20 to 30% of radiolabeled input MVMp, as measured 2 hr postinfection (Table 1).

(ii) As shown in Table 1, the NRK line and its EJ-derivatives displayed a limited amplification of the MVMp DNA input (2- to 11-fold within 30 hr postinfection). In contrast, in the FR3T3 system, normal and EJ deriva-

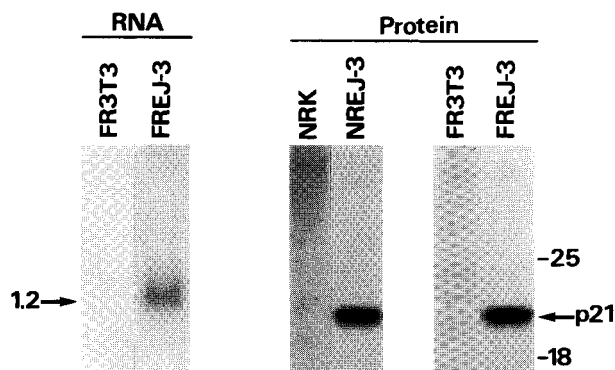


FIG. 2. Expression of *ras* (proto) oncogene in normal and *ras*-transformed cells. *ras* transcripts in normal FR3T3 and its transfected derivative FREJ-3 were analyzed by Northern blotting using a ³²P-labeled specific probe. The autoradiogram of the blot is shown. Exposure time: 41 hr. Molecular size marker is shown in kilobases. For p21^{ras} protein expression in both NRK and FR3T3 systems, 3 × 10⁷ cpm of [³⁵S]methionine-labeled cell extracts were immunoprecipitated with anti-p21^{ras} antibodies, fractionated on a 15% SDS-polyacrylamide gel, and examined by fluorography. The autoradiogram was exposed for 50 hr. Molecular size markers are shown in kilodaltons.

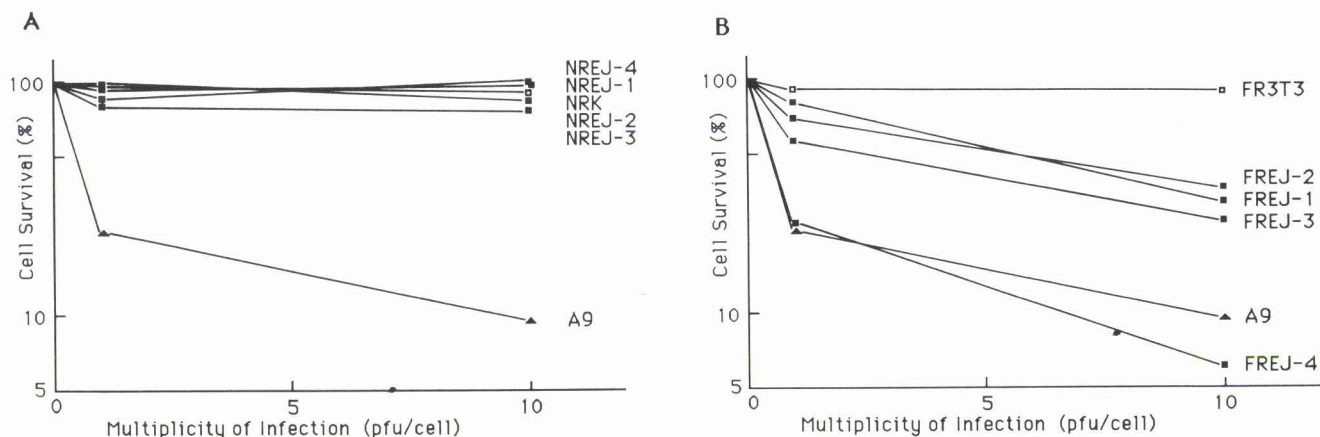


Fig. 3. Cell susceptibility to the killing effect of MVMp. Survival of MVMp-infected cells was measured as residual colony forming ability on plastic dishes, relatively to mock-treated cells. The multiplicity of infection is expressed in plaque-forming units (PFU) per cell. The data are the average of two to three determinations. (Standard deviation was less than 15%.) (A) NRK and its transformed derivatives, NREJ-1 to 4; (B) FR3T3 and its transformed derivatives, FREJ-1 to 4.

tives sustained a high level of MVMp DNA amplification up to 160- to 290-fold the input value within 30 hr post-infection (Table 1). It is noteworthy that the great extent of MVMp DNA amplification achieved by normal FR3T3 cells was not related to a massive cell killing.

(iii) The NS-1 nonstructural protein of autonomous parvoviruses is a multifunctional phosphoprotein (Cotmore and Tattersall, 1987) whose expression has been associated with cell killing (Rhode, 1987; Ozawa *et al.*, 1988). Thus, the expression of NS-1 might constitute at least one of the determinants of parvovirus-induced cytotoxicity. It is apparent from Fig. 4, where both phosphorylated and nonphosphorylated forms of the NS-1 protein are clearly visible on the gel, that all four *ras*-transformed FR3T3 clones accumulated much

greater amounts of NS-1 proteins than their parental line. Densitometric quantifications revealed that NS-1 expression was respectively 2.7, 2.6, 4.7, and 7.9 times higher in FREJ-1, FREJ-2, FREJ-3, and FREJ-4 cells than in the FR3T3 parental line. A 6.3-fold stimulation of NS-1 protein expression was also observed in the NREJ-3 clone compared to the NRK line (Fig. 4). Yet, it has to be stressed that autoradiographic exposures necessary to detect the NS-1 proteins were much longer for NRK and NREJ-3 than for FR3T3 and FREJ cells. Densitometric scanning of the appropriate bands revealed a 60 times greater NS-1 protein production in the FR3T3 than in the NRK system. As total incorporation of [³⁵S]methionine was similar in FR3T3 and NRK parental cells and their derivatives, we assume that the different intensities of the NS-1 bands from the various cells are meaningful.

Thus, despite the fact that FREJ-3 and NREJ-3 cells express similar levels of mutated *ras* proteins and are able to synthesize five to six times more NS-1 proteins than their respective nontransformed parental lines, only the former is significantly killed by parvovirus MVMp.

DISCUSSION

Susceptibility of parental cells to MVMp

Although they are both quite resistant to the killing effect of MVMp, parental NRK and FR3T3 cell lines differ in their capacity for sustaining the viral life cycle. Normal NRK cells appear to be inefficient in the completion of an early step of the viral life cycle that is subsequent to MVMp uptake and is required for the onset

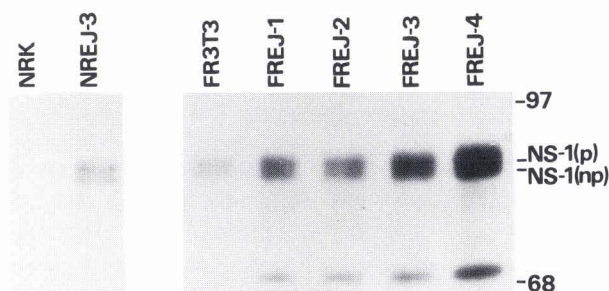


Fig. 4. Expression of the NS-1 protein of MVMp by normal- and *ras*-transformed cells. [³⁵S]Methionine-labeled cell extracts (5×10^6 cpm) were immunoprecipitated with anti-NS-1 serum and analyzed by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by fluorography. The autoradiogram was exposed for 100 hr (NRK and NREJ-3) and 15 hr (FR3T3 and FREJ series). NS-1 (p) and NS-1 (np) refer to the phosphorylated and the not or poorly phosphorylated NS-1 species. Molecular size markers are shown in kilodaltons.

of viral DNA replication and expression. Such a case is reminiscent of the blockage of MVMP DNA replication or transcription in T lymphocytes (Antonietti *et al.*, 1988; Gardiner and Tattersall, 1988). A cell type specificity determinant has been mapped on the viral genome and has been hypothesized to interact directly or through the proteins it codes for, with a cell-specific factor(s). NRK cells may be deficient for such a cellular factor(s) triggering the parvoviral life cycle. In contrast, untransformed FR3T3 cells, although relatively resistant to MVMP, amplify viral DNA to a great extent and sustain a significant production of viral proteins, in particular the nonstructural polypeptide NS-1. Since NS proteins are involved in parvoviral DNA replication (Cotmore and Tattersall, 1987; Tullis *et al.*, 1988), the 60-fold greater proficiency of FR3T3 than NRK cells in NS-1 protein production may contribute to the differential capacity of these cell lines for MVMP DNA amplification. The cause of the resistance of most FR3T3 cells to MVMP-induced killing is unknown. One possible reason may lie in the inability of these cells to accumulate high enough concentrations of parvoviral cytotoxic factors, due to a cellular limitation that is qualitatively or quantitatively different from that present in NRK cells.

Enhanced expression of MVMP in *ras*-transformed derivatives

Transformation of both FR3T3 and NRK cells with the human EJ-*ras* oncogene coincides with a marked increase in their rate of synthesis of MVMP nonstructural (NS) proteins. Thus, FREJ-3 and NREJ-3, two transformed clones representative of each system and expressing similar levels of p21^{ras} proteins (Fig. 2), both achieved a 5- to 6-fold greater production of NS proteins than the corresponding parental cells (Fig. 4). It is worth noting that NREJ-3 cells sustain a 60-fold lower production of NS proteins than FREJ-3 cells expressing the same level of p21^{ras} protein (see Figs. 2 and 4); this reduction of NS protein synthesis also distinguishes parental NRK from FR3T3 lines (see previous section) and is therefore unlikely to result from a lower activity of p21^{ras} protein in the NRK system. Conversely, *ras* transformation does not seem to be associated with a stimulation of MVMP DNA amplification, suggesting that the up-modulation of NS proteins takes place mostly at the level of viral gene expression. These data extend to a defined human oncogene, EJ-*Ha-ras*-1, effects that were recently observed in related rat cell systems transformed by avian erythroblastosis (Cornelis *et al.*, 1988b) or polyoma (Guetta *et al.*, in preparation) tumor viruses. The mechanism responsible for the enhancement of MVMP nonstructural gene expression

in *ras*-transformed rat cells is not known. A process recently put forward for the activation of transcription by the p21^{ras} protein (Imler *et al.*, 1988) is unlikely to directly operate on the viral genome since none of the MVMP promoters (Astell *et al.*, 1983) constitutes the consensus sequence thought to participate in the latter regulation.

Altogether, our data are consistent with the occurrence of at least two intracellular limitations to MVMP nonstructural protein production in normal rat cells. One restriction is much more severe in NRK than in FR3T3 cultures, preventing the onset of viral DNA amplification and nonstructural viral gene expression in the former line, and appears to persist in the *ras*-transformed derivatives tested. Another restriction modulates the level of viral gene expression and is relieved as a result of cell transformation with the EJ-*ras* oncogene. Thus, *ras*-transformation may activate a cellular regulatory factor(s) that is lacking or whose target is not available in the majority of NRK, contrary to FR3T3 cells.

Sensitization of *ras*-transformed derivatives to the killing effect of MVMP

Transformation of FR3T3 cells with the EJ-*ras* oncogene is accompanied by a striking reduction of their plating efficiency upon MVMP infection. In all cell systems studied so far, the inhibition of cell clonogenicity by MVMP and also by the closely related parvovirus H-1 was associated with both a cytolytic activity and at least some extent of replication of the parvovirus (Chen *et al.*, 1986; Cornelis *et al.*, 1988a). In contrast, the adeno-associated virus may exert a cytostatic action in cells that does not necessitate viral replication or expression (Katz and Carter, 1986; Winocour *et al.*, 1988). As discussed in the previous section, FREJ clones are also most proficient in the production of parvoviral NS proteins. As a whole, a fair correlation was found between the degree of sensitivity of the various rat cell lines analyzed to the cytopathic effect of MVMP and their capacity for NS protein synthesis. Similarly, cell killing by MVMP was also accompanied by the expression of NS-1 proteins in other systems (Cornelis *et al.*, 1988b; Chen *et al.*, 1989). On the one hand, the NRK line and its *ras*-transformed NREJ-3 clone as well as the parental FR3T3 line that produced little or modest amounts of NS proteins were hardly sensitive to MVMP. On the other hand, FREJ clones, which synthesized greater NS protein levels, were sensitized to the virus to various extents in the same order as their increasing capacity for viral proteins (FREJ-1 $\approx$ FREJ2 < FREJ-3 < FREJ-4). Recent failures to obtain stable cell transformants upon cell transfection with molecu-

lar clones of the autonomous parvoviruses H-1 and B19 expressing NS proteins have been ascribed to a possible cytotoxicity of the latter protein (Rhode, 1987; Ozawa *et al.*, 1988). Assuming that such is the case, our results strongly suggest that at least one reason for the hypersensitivity of FREJ clones to MVMp lies in the up-modulation of viral gene expression in transformed cells. Furthermore, no consistent correlation was found between the sensitivity to MVMp of the FR3T3 line and its derivatives and their ability to support viral DNA amplification which makes it unlikely that viral DNA structures are cytotoxic. Neither could the expression of structural viral proteins be associated with cell killing in this and other murine cell systems (unpublished data; Pintel *et al.*, 1984; Cornelis *et al.*, 1988b). It should be stated, however, that FREJ-3 cells, although slightly more sensitive than FREJ-1 and FREJ-2 to MVMp-induced killing, express almost twofold higher levels of NS-1 proteins than the latter clones. This indicates that NS-1 expression is unlikely to be the only factor of cellular cytotoxicity. Cell mortality is certainly due to a complex process. Thus, besides the expression of NS-1, other viral and/or cellular factors will undoubtedly co-determine whether the outcome of a parvovirus infection will be lytic or not. In all cell systems studied so far in this respect, the extents of the cytolytic effects observed in H-1 or MVMp-infected cultures were inversely related to the levels of the cellular plating efficiencies on dishes (Chen *et al.*, 1986; Cornelis *et al.*, 1988a,b). Thus, the cell-killing potential of these autonomous parvoviruses correlates with their replication ability.

The greater vulnerability of *ras*-transformed FREJ cells to the killing effect of MVMp, compared with the FR3T3 parental line, is consistent with previous reports showing that transformation of rodent and human cells with various oncogenes, radiation, or a chemical carcinogen correlates with an increase in their sensitivity to parvoviruses MVMp and H-1 (Chen *et al.*, 1986; Mousset *et al.*, 1986; Cornelis *et al.*, 1988a,b). Yet, the relationship between cell transformation and susceptibility to parvoviruses is intricate, as stressed by the refractoriness of the NRK system to *ras*-associated sensitization to MVMp under the conditions used in the present study. Thus, the NREJ-3 clone that expresses a transformed phenotype and synthesizes similar amounts of p21^{ras} protein as FREJ clones is hardly sensitive to the lytic action of MVMp. This resistance to MVMp may be put together with the severe limitation to NS protein production that distinguishes the NRK from FR3T3 cells and appears to be retained by the *ras*-transformed derivative tested (see previous section). This restriction may protect the NREJ-3 clone from the

killing effect of MVMp by maintaining the level of NS proteins below a cytotoxic threshold.

In conclusion, this report shows that two cellular changes associated with *EJ-ras* transformation and revealed by means of MVMp, namely enrichment with viral nonstructural proteins and sensitization to virus-induced killing, vary concomitantly as a function of the cell type, for a given level of expression of the oncogene. It follows that the use of susceptibility to parvoviruses as an indicator of transformation, as proposed on the basis of the frequent association of both phenotypes (Mousset *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1987; Cornelis *et al.*, 1988a,b; Guetta *et al.*, in preparation), is conditional on the origin of the cells considered. Certain types of cells appear to offer a limitation(s) to the ongoing parvoviral life cycle, such that sensitization of transformed derivatives is masked or may possibly require a higher degree of transformation than for less restrictive cells.

In this work, a cell system was established which may enable us to analyze the molecular mechanism underlying the differential cell susceptibility to parvoviruses. In particular, we intend to test the hypothesis that the expression of NS-1 proteins is cytotoxic by using a strategy which allows one to modulate experimentally NS levels in the cells described.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Recherche Médicale et de la Santé, the Association pour la Recherche sur le Cancer (France), the Commission of the European Communities, the Caisse Générale d'Epargne et de Retraite (Belgium), and the Institut Pasteur de Lille. B. van Hille is supported by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique. N. Salomé is supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer. S. F. Cotmore is supported by the Public Health Service Grant CA 16038 from the National Cancer Institute. We are grateful of N. Devassine and V. Dufresnoy for typing the manuscript.

REFERENCES

- ANTONIETTI, J. P., SAHLI, R., BEARD, P., and HIRT, B. (1988). Characterization of the cell type-specific determinant in the genome of minute virus of mice. *J. Virol.* **62**, 552–557.
- ASTELL, C. R., THOMSON, M., MERCHLINSKY, M., and WARD, D. C. (1983). The complete DNA sequence of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *Nucleic Acids Res.* **11**, 999–1018.
- BARAK, L. S., YOCUM, R. R., NOTHNAGEL, E. A., and WEBB, W. W. (1980). Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-phalloidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 980–984.
- BARBACID, M. (1987). *ras* genes. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 779–827.
- CHEN, Y. Q., DE FORESTA, F., HERTOOGHS, F., AVALOSSE, B. L., CORNELIS, J. J., and ROMMELAERE, J. (1986). Selective killing of simian virus 40-transformed fibroblasts by parvovirus H-1. *Cancer Res.* **46**, 3574–3579.

- CHEN, Y. Q., TUYNDER, M. C., CORNELIS, J. J., BOUKAMP, P., FUSENIG, N. E., and ROMMELAERE, J. (1989). Sensitization of human keratinocytes to killing by parvovirus H-1 takes place during their malignant transformation but does not require them to be tumorigenic. *Carcinogenesis* **10**, 163–167.
- CORNELIS, J. J., BECQUART, P., DUPONCHEL, N., SALOMÉ, N., AVALOSSE, B. L., NAMBA, M., and ROMMELAERE, J. (1988a). Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen or simian virus 40 correlates with an increase in their susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and minute virus of mice. *J. Virol.* **62**, 1679–1686.
- CORNELIS, J. J., SPRUYT, N., SPEGELAERE, P., GUETTA, E., DARAWSHI, T., COTMORE, S. F., TAL, J., and ROMMELAERE, J. (1988b). Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus MVM correlates with an increase in viral gene expression. *J. Virol.* **62**, 3438–3444.
- COTMORE, S. F., and TATTERSALL, P. (1986). Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **58**, 724–732.
- COTMORE, S. F., and TATTERSALL, P. (1987). The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Cancer Res.* **33**, 91–169.
- CUKOR, G., BLACKLOW, N. R., HOGGAN, D., and BERNIS, K. I. (1984). Biology of adeno-associated virus. In "The Parvoviruses" (K. I. Bernis, Ed.), pp. 33–60. Plenum, New York/London.
- DAVIS, L. G., DIBNER, M. D., and BATTEY, J. F. (1986). Basic methods. In "Molecular Biology," pp. 130–137. Elsevier, New York/Amsterdam/London.
- DEVOUGE, M. W., MUKHERJEE, B. B., and PENA, D. J. (1982). Kirsten murine virus-coded p21^{ras} may act on multiple targets to effect pleiotropic changes in transformed cells. *Virology* **121**, 327–344.
- DUC-NGUYEN, H., ROSENBLUM, E. N., and ZEIGEL, R. F. (1966). Persistent infection of a rat kidney cell line with Rausher murine leukemia virus. *J. Bacteriol.* **92**, 1133–1140.
- VAN DER EB, A. J., and GRAHAM, F. L. (1980). Assay of transforming activity of tumor virus DNA. In "Methods in Enzymology" (L. Grossman and K. Moldave, Eds.), Vol. 65, pp. 826–839. Academic Press, New York.
- GARDINER, E. M., and TATTERSALL, P. (1988). Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **62**, 2605–2613.
- GUETTA, E., GRAZIANI, Y., and TAL, J. (1986). Suppression of ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **76**, 1177–1180.
- IMLER, J. L., SCHATZ, C., WASYLYK, C., CHATTON, B., and WASYLYK, B. (1988). A Harvey-ras responsive element is also responsive to a tumour-promoter and to serum. *Nature (London)* **332**, 275–278.
- KATZ, E., and CARTER, B. J., (1986). Effect of adeno-associated virus on transformation of NIH3T3 by ras gene and on tumorigenesis of an NIH3T3 transformed cell line. *Cancer Res.* **46**, 3023–3026.
- MARTIN, P., HENRY, C., FERRÉ, F., DUTERQUE-COQUILLAUD, M., LAGROU, C., GHYSDAEL, J., DEBUIRE, B., STÉHELIN, D., and SAULE, S. (1986). Transformation of quail embryo fibroblasts by a retrovirus carrying a normal human *c-myc* gene. *EMBO J.* **5**, 1529–1533.
- MERCHLINSKY, M. J., TATTERSALL, P. J., LEARY, J. J., COTMORE, S. F., GARDINER, E. M., and WARD, D. C. (1983). Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **47**, 227–232.
- MOUSSET, S., CORNELIS, J., SPRUYT, N., and ROMMELAERE, J. (1986). Transformation of established murine fibroblasts with an activated cellular *Harvey-ras* oncogene or polyoma virus middle T gene increases cell permissiveness to parvovirus minute-virus-of-mice. *Biochimie* **68**, 951–955.
- MOUSSET, S., and ROMMELAERE, J. (1982). Minute virus of mice inhibits cell transformation by simian virus 40. *Nature (London)* **300**, 537–539.
- OZAWA, K., AYUB, J., KAJIGAYA, S., SHIMADA, T., and YOUNG, N. (1988). The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells. *J. Virol.* **62**, 2884–2889.
- PINTEL, D., MERCHLINSKI, M. L., and WARD, D. C. (1984). Expression of minute virus of mice structural proteins in murine cell lines transformed by bovine papillomavirus-minute virus of mice plasmid chimera. *J. Virol.* **52**, 320–327.
- RHODE, S. L., III (1987). Construction of a genetic switch for inducible *trans*-activation of gene expression in eucaryotic cells. *J. Virol.* **61**, 1448–1456.
- ROMMELAERE, J., and TATTERSALL, P. (1988). Oncosuppression by parvoviruses. In "Handbook of Parvoviruses" (P. Tijssen, Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, in press.
- SEIF, R., and CUZIN, F. (1977). Temperature-sensitive growth regulation in one type of transformed rat cells induced by the *tsa* mutant of polyoma virus. *J. Virol.* **24**, 721–728.
- SIEGL, G. (1984). Biology of pathogenicity of autonomous parvoviruses. In "The Parvoviruses" (K. I. Bernis, Ed.), pp. 297–348. Plenum, New York/London.
- SOUTHERN, P. J., and BERG, P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 327–341.
- TABIN, C. J., BRADLEY, S. M., BARGMANN, C. I., WEINBERG, R. A., PAPA-GEORGE, A. G., SCOLNICK, E. M., DHAR, R., LOWY, D. R., and CHANG, E. H. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature (London)* **300**, 143–149.
- TATTERSALL, P. (1978). Susceptibility to minute virus of mice as a function of host-cell differentiation. In "Replication of Mammalian Parvoviruses" (D. C. Ward and P. Tattersall, Eds.), pp. 131–150. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- TATTERSALL, P., CAWTE, P. J., SHATKIN, A. J., and WARD, D. C. (1976). Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a parvovirus. *J. Virol.* **20**, 273–289.
- TOOLAN, H. W., RHODE, S. L., III, and GIERTHY, J. F. (1982). Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a] anthracene-induced tumors in Syrian hamsters by prior infection with H-1 parvovirus. *Cancer Res.* **42**, 2552–2555.
- TULLIS, G. E., LABIENIEC-PINTEL, L., CLEMENS, K. E., and PINTEL, D. (1988). Generation and characterization of a temperature-sensitive mutation in the NS-1 gene of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **62**, 2736–2744.
- WINOCOUR, E., CALLAHAM, M. F., and HUBERMAN, E. (1988). Perturbation of the cell cycle by adeno-associated virus. *Virology* **167**, 393–399.

ARTICLE III

Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMp is restricted to specific oncogenes



Nathalie Salomé¹, Benoît van Hille¹, Nadine Duponchel¹, Guerrino Meneguzzi², François Cuzin², Jean Rommelaere^{1,3} & Jan J. Cornelis¹

¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, INSERM U 186 and CNRS URA 0156, Institut Pasteur de Lille BP 245, 59019 Lille Cedex, France; ²INSERM U 273, Centre de Biochimie, Université de Nice, 06034 Nice, France; ³Département de Biologie Moléculaire, Université Libre de Bruxelles, B 1640 Rhode St Genèse, Belgium

The rat cell line FR3T3 was transformed with the retroviral oncogenes *v-myc* or *v-src*, with the DNA tumor viruses SV40 or bovine papilloma virus strain 1 (BPV-1) or with the 69% transforming region of BPV-1. The transformants were compared with the uncloned parental line for their susceptibility to the lytic effect and to the replication of MVMp, an autonomous parvovirus. Expression of *v-myc* and *v-src* proteins and of SV40 large T antigen correlated with a greater cell susceptibility to MVMp-induced killing. Thus, the expression of both cytoplasmic and nuclear oncogene products may sensitize rat fibroblasts to MVMp. In contrast, cell lines transformed by BPV-1, including highly tumorigenic and tumor-derived clones, were on the average as resistant as the parental cell line to MVMp infection. A similar resistance to MVMp-induced killing was displayed by BPV-1-transformed NIH3T3 cells. However, supertransformation of one of the BPV-1-transformants by the human EJ-Harvey *ras-1* oncogene, known to sensitize FR3T3 and NIH3T3 cells, correlated with an increase in susceptibility to MVMp. Therefore, the failure of BPV-1 transformation to sensitize murine cells to parvoviral attack may be ascribed to the tumor virus rather than to the cells undergoing transformation. Hence, cell sensitization to MVMp appears to be oncogene-specific and cannot be taken as an absolute correlative with neoplastic transformation.

Introduction

Viruses belonging to the Parvoviridae family are small nuclear-replicating DNA viruses that parasitize birds, arthropods and mammals including humans (Bando *et al.*, 1987; Anderson, 1987; Siegl, 1983; Cukor *et al.*, 1983). Three genera have been distinguished: the autonomous parvoviruses, the helper-dependent or adeno-associated viruses and the densoviruses (Tattersall & Ward, 1978). The autonomous parvoviruses, henceforth called parvoviruses, are lytic viruses, i.e., their replication usually leads to destruction of permissive host cells. How parvoviruses exert their cytotoxic effect is presently unknown. A toxic effect may tentatively be assigned to the nonstructural viral proteins, as suggested by the failure to establish cell lines that constitutively express high amounts of these products (Rhode, 1987; Cotmore & Tattersall, 1987; Ozawa *et al.*, 1988) and by the apparent correlation between their level of

expression and the killing effect of parvoviruses H-1 or MVMp on a series of related cell lines (Chen *et al.*, 1989; van Hille *et al.*, 1989).

The replication of murine autonomous parvoviruses in human and murine cells can be upmodulated by oncogenic transformation. Indeed, *in vitro* transformation of normal fibroblastic or epithelial human cells and established murine fibroblasts correlates with an increase in their ability to replicate incoming H-1 and MVMp viruses and to undergo their destructive action (Mousset & Rommelaere, 1982; Chen *et al.*, 1986, 1989; Cornelis *et al.*, 1988a, b; Mousset *et al.*, 1986; van Hille *et al.*, 1989; Guetta *et al.*, 1989). Similarly, parvovirus H-1 is able to replicate in a series of permanent human tumor-derived cell lines but not in primary cultures (Toolan & Ledinko, 1965; Faisst *et al.*, 1989). It is tempting to speculate that such a stimulation of parvovirus replication in transformed cells may contribute to the oncosuppressive activity that parvoviruses exert on spontaneous and induced tumors in laboratory animals (Guetta *et al.*, 1986; Dupressoir *et al.*, 1989; Rommelaere & Tattersall, 1989).

One of our main goals is to unravel the role of neoplastic transformation in cell sensitization to parvoviruses. Cloned viral and cellular oncogenes and tumor viruses are potentially useful for that purpose since they may induce different spectra of cellular changes related more specifically to immortalization or morphological and behavioral transformation, depending on the function and location of their products (Land *et al.*, 1983; Mougneau *et al.*, 1984; Weinberg, 1985; Bishop, 1985). In the present study, the susceptibility of rat FR3T3 fibroblasts to MVMp was assessed as a function of their transformation with oncogenes that are primarily immortalizing (*myc*), or both immortalizing and transforming (*src*) and whose products are nuclear (*myc*) or associated with the plasma membrane (*src*) (Bishop, 1985). On the other hand, tumor viruses that are able to bring murine cells into a tumorigenic state, simian virus 40 (SV40) and bovine papilloma virus 1 (BPV-1), were included for comparison, owing to their respectively high and poor capacity for inducing morphological transformation (Grisoni *et al.*, 1984; Jat *et al.*, 1986; Binétruy *et al.*, 1987).

We report here that *v-src*-, *v-myc*- and SV40-transformed FR3T3 cells were sensitive to MVMp infection whereas the untransformed parental cell line was resistant. In contrast, the transforming region of BPV-1 fails to confer a greater susceptibility to killing by MVMp upon FR3T3 and NIH3T3 cells. Our observations with a series of BPV-1 transformed cell lines with increasing transformation and tumorigenic potential

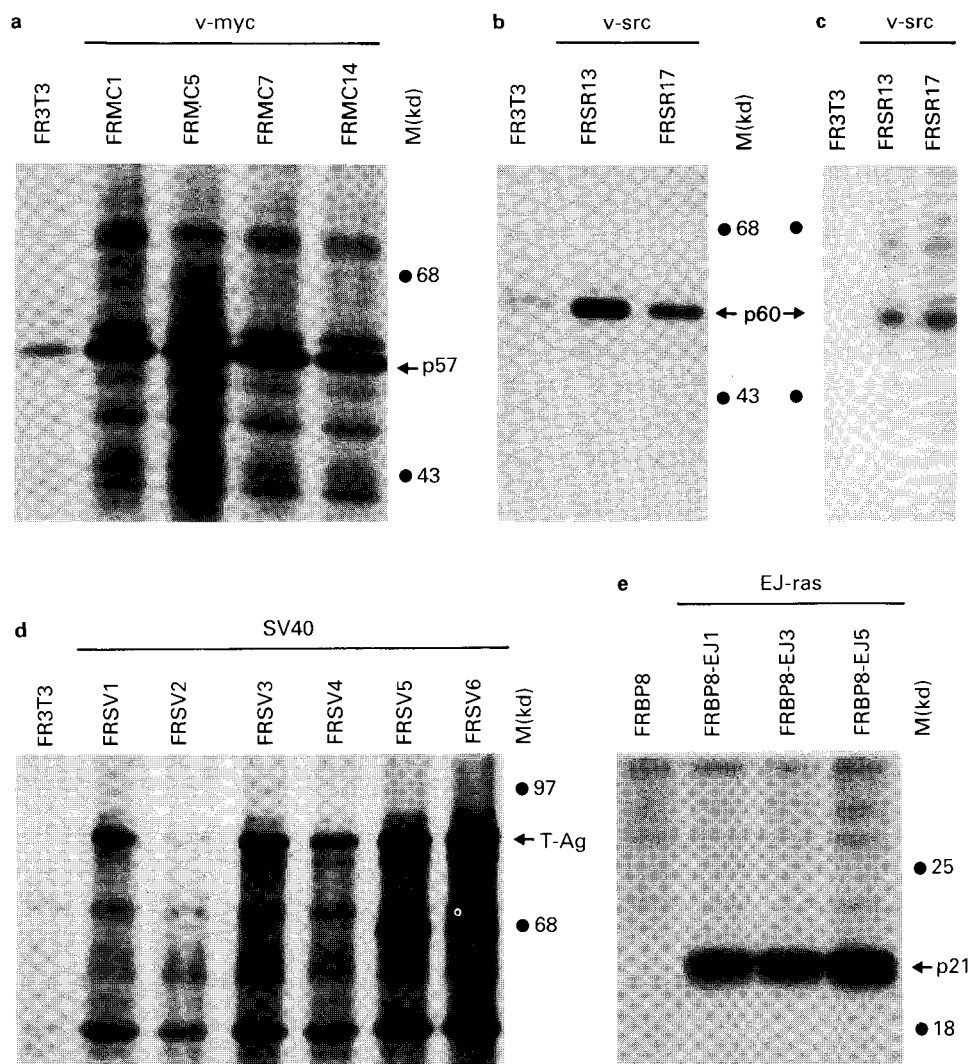


Figure 1 Expression of oncoproteins. 10% (a–d) or 15% (e) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of [³⁵S]methionine labelled proteins from FR3T3 cells and clonal derivatives transformed by indicated oncogenes. (a, b, d and e): fluorograms of immunoprecipitates from extracts containing equivalent amounts of total proteins. (c): autoradiogram of phosphorylated products from equivalent amounts of immunoprecipitated pp60^{src} incubated in the presence of [γ -³²P]ATP. M, proteins used as size markers (in kDa)

suggest that neither cell transformation nor tumorigenicity are in themselves sufficient to enhance cell sensitivity to the lytic effect of MVMp. The type of transforming gene or its mode of action rather appears to be decisive; i.e., sensitization of transformed cells to autonomous parvoviruses is oncogene specific.

Results

A correlation was sought between the transformation of FR3T3 cells with various oncogenes and their degree of susceptibility to MVMp infection. Since the transformants studied were clonal derivatives, the parental line was also subcloned in order to assess its heterogeneity with respect to the sensitivity of individual cells to MVMp. At least five independent clones, either normal or transformed by a given oncogene, were thus compared with the aim of detecting transformation-associated changes in MVMp-sensitivity that cannot merely be ascribed to the random isolation of pre-existing cell variants.

Sensitivity to MVMp of cells transformed by v-myc, v-src or SV40

All tested cell strains that were isolated from FR3T3 cultures transfected with the SV40-bearing vector or infected with oncogene-carrying retroviruses, expressed the expected oncogene product (Figure 1). The variation of the level of oncogene protein synthesis within each series of clones analysed was minor for p57^{myc} and p60^{src}, as shown for two representative clones in the latter case (Figure 1a and 1b) and major for SV40 90 kDa large T antigen (Figure 1d). Kinase activity of pp60^{src} was similar in all tested clonal cultures (Figure 1c and data not shown). The parental FR3T3 cells sustained a low level of p57^{myc} and pp60^{src} protein synthesis that may be ascribed to the expression of endogenous cellular proto-oncogenes (Figures 1a and 1b).

Morphological transformation, displayed by *myc*-, SV40- and *src*-transformed lines, was ranged from a low to a moderate and a high extent, respectively. Moreover, the varying degree of morphological transformation of the sublines tested correlated well with the state of disorganization of their actin network (Table 1). On

Table 1 Effects of MVMp on the FR3T3 cell line and its oncogene-transformed derivatives

Cell strains	Transforming agents	Morphology	Transformation parameters			Susceptibility to MVMp	
			Cytoskeletal network*	Cell density** ($\times 10^6$)	Cloning efficiency in agar (%)	MVMp DNA amplification†	Survival of infected cells†† (%)
FR3T3	—	flat	O	4	<0.1	79	76
FRMC1	v-myc	flat	O	15	<0.1	32	25
FRMC5		flat	O	6.5	1	22	27
FRMC7		flat	O	6	60	39	16
FRMC14		flat	O	6	1	94	21
FRMC16		flat	O	8	1	56	31.5
FRSR13	v-src	rounded	D	13	36	44	1.5
FRSR17		rounded	D	18	55	76	7.5
FRSR23		rounded	D	11	36	63	10
FRSR27		rounded	D	15	27	40	8
FRSR32		rounded	D	17	38	21	8
FRSV1	SV40	criss-cross	D	6	<0.1	53	37
FRSV2		criss-cross	D	9	<0.1	106	33
FRSV3		criss-cross	D	12	1	91	40
FRSV4		criss-cross	D	6	<0.1	80	16.5
FRSV5		criss-cross	D	19	30	74	20
FRSV6		criss-cross	D	13	65	43	14.5
FRBP8	BPV-1	flat	O	15	10	54	95
FRBP8-EJ1	BPV-1 + EJ-ras	rounded	D	†	36	71	11
FRBP8-EJ2		rounded	D	†	40	53	18
FRBP8-EJ3		rounded	D	†	48	53	78
FRBP8-EJ4		rounded	D	†	24	22	47
FRBP8-EJ5		rounded	D	†	46	25	34
FRBP8-EJ6		rounded	D	†	35	19	ND
A9‡‡				10	14	72	6

* O, organized; D, disorganized

** Measured at confluency of FR3T3 cells

† Ratio of intracellular MVMp DNA contents at 30 h over 2 h p.i. (MOI = 10)

†† Residual colony forming ability of infected (MOI = 20) versus mock-treated cells

‡ Cells pile up and detach prior to confluency

‡‡ Established line of mouse fibroblasts used as a reference

ND, not done

the other hand, all transformed cultures grew up to a higher density than the parental FR3T3 cell line (Table 1). In addition, the capacity for anchorage-independent growth was acquired by all v-src transformants studied, and by a fraction of v-myc- and SV40-transformed clones (Table 1). Whereas the SV40 transformants that cloned most efficiently in soft agar also produced the highest amounts of large T antigen, no obvious correlation was observed between anchorage-independent growth ability and the levels of v-myc protein expression (Table 1 and Figures 1a and 1d).

Clonal growth assays were performed in order to determine whether expression of the v-src, v-myc and SV40-derived oncogenes conferred on FR3T3 cells a greater cell sensitivity to MVMp-induced killing. Indeed, cell cloning efficiencies correlated inversely with the cytolytic effects induced by MVMp infection. As shown in Figures 2a-c, v-src-, v-myc- and SV40-transformed cell clones were all more sensitive to MVMp than the parental FR3T3 cell line. On the other hand, a series of subclones of normal FR3T3 cells, selected or not in the presence of the drug G418 upon transfection with the neo gene, all proved to be very resistant to MVMp like the original cell line (Figure 2f). There was no overlap between the range of survivals of infected normal and transformed clones, making it likely—though not proving—that the hypersensitivity of

the latter strains resulted from their transformation rather than from the selection of sensitive cells preexisting in the polyclonal FR3T3 population. It is worth noting the lack of obvious correlation between the extent of expression of transformation traits measured and the degree of cell sensitivity to MVMp (Table 1).

Sensitivity to MVMp of cells transformed by BPV-1 or BPV-1 plus EJ-Ha-ras-1

A series of previously isolated cell strains obtained by transfection of FR3T3 cells with the entire genome of BPV-1 or its 69% transforming region cloned in a pBR322-derived plasmid (Meneguzzi *et al.*, 1984) was also included in the present study. Four stages of oncogenic transformation have been distinguished in this system (Binétruy *et al.*, 1987), whose main characteristics are summarized in Table 2.

In contrast with the transformants described in the previous section, none of the BPV-1 transformed clones significantly differed from the parental FR3T3 cell line with respect to their resistance to MVMp infection (Table 2). Survival data from 2–3 different clones were averaged for each stage of transformation and compared to those from a series of normal FR3T3 strains. As illustrated by Figures 2e and 2f, the range of survival of infected BPV-1 transformants was similar to that of

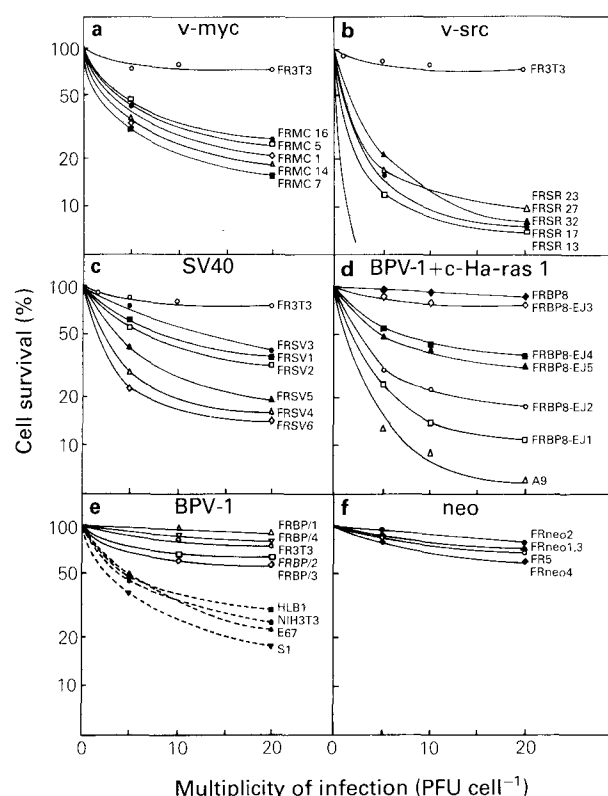


Figure 2 Susceptibilities of the FR3T3 and NIH3T3 cell lines, their subclones and oncogene-transformed derivatives to killing by MVMP. Survival was determined as residual colony formation ability of MVMP-infected versus mock-treated cells. Indicated values are the average of 2 or more determinations. Standard deviations were less than 25%. (a–c): FR3T3 cell line and clonal derivatives respectively transformed by *v-myc*, *v-src* or SV40 derived oncogenes. (d): FRBP8 cell strain (a stage 2 BPV-1-transformant from FR3T3) and subclones transformed by EJ-Ha-*ras*-1; the survival of A9 mouse fibroblasts, a standard MVMP-permissive line, is given for comparison. (e): Solid lines: FR3T3 and BPV-1 transformed clonal derivatives from stage 1 (FRBP/1), 2 (FRBP/2), 3 (FRBP/3) or 4 (FRBP/4). Data shown are the average values from 2 (stages 1 and 2) or 3 (stages 3 and 4) independent clones. Dotted lines: NIH3T3 and transformed derivatives. (f): Clones of FR3T3 cells after (FRneo1–4) or without (FR5) *neo* gene transfection and selection for resistance to G418

parental subclones. Therefore, transformation of FR3T3 cells with BPV-1 does not appear to exacerbate their susceptibility to the cytopathic effect of MVMP, irrespective of the transformation stage considered.

In order to verify whether the latter finding had more general significance, a series of three NIH3T3 cell clones transformed by the entire transforming region of BPV-1 or either expressing the E2 plus E5 or the E6 plus E7 transforming genes (Schiller *et al.*, 1984) were analysed (Figure 2e). Although the susceptibility of the NIH3T3 parental cell line to MVMP was greater than that of FR3T3, the cellular sensitivities to MVMP of its transformed derivatives were not significantly exacerbated by expression of BPV-1 transforming genes. Similarly, a series of BPV-1 transformed mouse C127 cells were not more sensitive to MVMP than the untransformed parental cell line (data not shown). However, as the latter cells were already very sensitive to the parvovirus (less than 5% colony forming ability at a MOI of 20), these results may not be meaningful.

Recent studies have shown that BPV-1 encodes negative regulators of viral transcription (Lambert *et al.*, 1987; Haugen *et al.*, 1988). It is therefore conceivable that some BPV-1 gene products negatively regulate MVMP replication and render in this way transformants refractory to the synthesis of parvoviral cytotoxic factors. Alternatively, BPV-1 transformation may preferentially affect cell variants that are intrinsically resistant to MVMP. In order to test these possibilities, the stage 2 cell strain FRBP8 was super-transformed with the Ha-*ras*-1 oncogene from the human bladder carcinoma cell line EJ. From our previous work, it was known that transformation of FR3T3 cells by the EJ-*ras* oncogene correlated with their sensitization to the lytic effect of MVMP (van Hille *et al.*, 1989). The level of p21^{ras} protein synthesis in all six FRBP8-EJ super-transformants tested was about 20 fold greater than the endogenous production detected in parental FRBP8 cells, as illustrated by Figure 1e for three representative clones. Moreover, FRBP8-EJ clones could be readily distinguished from their FRBP8 parent by their typical transformed morphology, piling up into poorly adherent foci even prior to full confluency of the cul-

Table 2 Infection of BPV-1-transformed FR3T3 cell lines with parvovirus MVMP

Cell strains	Stage	Transformation parameters*					Susceptibility to MVMP	
		Colony size in soft agar	Morphology	Cytoskeletal network**	Tumorigenicity†	MVMP uptake (%)	MVMP DNA amplification††	Survival of MVMP-infected cells‡ (%)
FR3T3		—	flat	O	—	24.5	53	83
RV 695B	1	—	flat	O	±	20	62	58
RV691C	1	—	flat	O	±	16.5	100	72.5
RVLC54	2	+	flat	O	+	24.5	102	89
FRBP8	2	+	flat	O	+	23	54	98
RVLC54-TD8	3	++	flat	O	++	22	105	48
RVLC54-TD2	3	++	flat	O	++	13.5	76	73
BPV8-TD1	3	++	flat	O	++	13	89	60
64D	4	++	transf.	D	+++	ND	150	99
RV691-TD1	4	++	transf.	D	+++	25	205	78
RV695-TD2	4	++	transf.	D	+++	ND	65	70

* From Binétruy *et al.* (1987)

** O, organized; D, disorganized

† Not tumorigenic (—); tumorigenic with latency periods of 3–6 months (±); highly tumorigenic with latency periods of 3–6 weeks (+), <3 weeks (++)

†† Ratio of viral DNA contents at 30 h versus 2 h post-infection (MOI = 10) from dispersed cell assays. Average values from 2–3 experiments. SD less than 25%

‡ Residual colony-forming abilities of cells infected at a MOI of 10. Average values from 2–3 experiments. SD less than 15%

ND: not done

tures, disorganized actin cytoskeleton and greater ability to grow in semi-solid medium (Table 1). As shown in Figure 2d, MVMP had a more severe killing effect on all five FRBP8-EJ super-transformants tested than on the FRBP8 original strain. However, the level of sensitization associated with *ras* transformation varied greatly between the different super-transformed clones, from poorly significant (FRBP8-EJ3) to much pronounced (FRBP8-EJ1) (Figure 2d). A similar interclonal variability was observed for *ras*-transformed FR3T3 cell strains (van Hille *et al.*, 1989). Taken together, these data confirm the sensitizing potential of *ras* transformation (Mousset *et al.*, 1986; van Hille *et al.*, 1989) and suggest that the cell susceptibility is neither amplified nor reduced by BPV-1 transformation. Thus, no experimental support was found for an interpretation of the MVMP-resistance of BPV-1 single transformants in terms of BPV-1-induced or unconditional cellular barriers to MVMP replication. It should also be stated that the varying sensitivities of FRBP8-EJ clones to MVMP were not correlated either with their relative proficiencies in anchorage-independent growth or with their morphological transformation and cytoskeletal network (Table 1), as noticed above for other oncogenes.

MVMP replication in normal and transformed FR3T3 cells

As already shown for other systems (Mousset *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1986, 1989; van Hille *et al.*, 1989), no major differences were detected between the various normal and transformed cell strains in their capacity for adsorption and internalization of input virus (Table 2 and data not shown). Hence, the oncogene modulation of cell susceptibility to the lytic effect of MVMP is unlikely to occur at the level of membrane receptors for parvovirus binding.

The accumulation of viral DNA was determined by dispersed cell assays performed 2 and 30 h after infection at various MOIs. Intracellular MVMP DNA contents at 2 h post-infection were similar for all strains and increased linearly within a MOI range of 0.1 to 10 (data not shown), corroborating the proficiency of the cells studied in parvovirus uptake. MVMP DNA amplification data are given for the MOI of 10 (Tables 1 and 2). The capacities of both untransformed and transformed FR3T3 cells for accumulating viral DNA were considerable when compared with that of the highly permissive mouse fibroblast cell line A9 that is currently used to produce MVMP. It is worth noting that the results did not reveal inhibitory or activating effects of BPV-1 transformation on MVM DNA replication. Moreover, no apparent relationship was found between the DNA amplification levels achieved by the various FR3T3 cell lines and their susceptibility to killing by MVMP.

Discussion

Sensitization of oncogene-transformed cells to killing by MVMP

The expression of *v-myc*, *v-src* and SV40 oncogenes in FR3T3 cells and of EJ-*ras* oncogene in FRBP8 cells is reported to correlate with an increase in the cytoskeletal

effect of incoming MVMP. Although the original FR3T3 cell line was slightly heterogeneous with respect to its susceptibility to MVMP, the interclonal distribution of the survivals of infected cells was clearly shifted to lower values (i.e. enhanced killing) for transformed versus parental strains. It therefore appears that a state of hypersensitivity to MVMP accompanies transformation by a variety of oncogenes that belong to different functional classes and encode products differing in their cellular location. These observations raise the possibility that corresponding oncoproteins may regulate the expression or functioning of parvoviral cytotoxic factors. Such a modulation of parvoviral cytopathogenicity is likely to be indirect since in some systems, in particular EJ *ras*-transformed derivatives of FRBP8, cells expressing similar amounts of the oncoprotein turned out to be sensitized to varying extents to the killing effect of MVMP. Noteworthy, the effects of infection by the autonomous parvoviruses MVMP or H-1 on *ras*- or adenovirus transformed cells (van Hille *et al.*, 1989; unpublished data) contrast sharply with those exerted by the closely related helper-dependent parvoviruses (Ostrove *et al.*, 1981; Katz & Carter, 1986). Indeed, whereas infection by the former viruses cause massive cell lysis associated with virus replication, cyto-static rather than cytolytic effects without detectable processing of the virus were observed in those transformed cells infected with helper-dependent viruses.

The mechanism of parvovirus-induced cell death is still poorly understood. Parental, MVMP-resistant FR3T3 cells took up input virus as efficiently as their transformed derivatives. Thus, as for other cellular systems studied so far in this respect (Chen *et al.*, 1986; Cornelis *et al.*, 1988a), transformation was not associated with an up-modulation of virus penetration. On the other hand, sensitization of transformed strains did not coincide with a consistent stimulation of MVMP DNA amplification that was already high in the parental resistant FR3T3 cells. This feature was also observed in other rat fibroblastic systems (Mousset *et al.*, 1986; Cornelis *et al.*, 1988b), but contrasts with the case of human fibroblasts and keratinocytes that normally sustain very little MVMP DNA amplification unless previously transformed (Chen *et al.*, 1986, 1989; Cornelis *et al.*, 1988a). It therefore appears that the mere accumulation of MVMP DNA is insufficient to kill FR3T3 cells. The nature of parvoviral cytopathic effectors remains presently elusive, although a possible toxic effect of nonstructural proteins has been inferred from the failure to constitutively express these products (Rhode, 1987; Ozawa *et al.*, 1988). Consistently, transformation of rat fibroblasts was reported to be associated with a concomitant increase in their capacity for expressing MVMP nonstructural proteins (Cornelis *et al.*, 1988b; van Hille *et al.*, 1989). The molecular basis of this up-modulation of parvoviral gene expression is likely to take place at the transcriptional level (Cornelis *et al.*, manuscript in preparation). It is tempting to speculate that such an effect may be ascribed to inducible cellular transcription factors such as PEA1/AP1 which is activated by a series of oncogenes (Wasylyk *et al.*, 1988; Piette *et al.*, 1988). It remains to be determined however, whether this or other modulable transcription factors are involved in the greater parvoviral gene expression that is found in transformed versus normal cells (Cornelis *et al.*, 1988b).

Dissociation of transformed from MVMp-sensitive phenotypes

In contrast with the sensitizing effects of above-mentioned oncogenes, the entire or part of the transforming region of BPV-1 failed to confer a MVMp-sensitive phenotype onto established murine cells, despite the tumorigenic potential of many BPV-1 transformants (Binétruy *et al.*, 1987; Babiss & Fisher, 1986). This discrepancy might conceivably be due to the fact that some BPV-1 encoded protein(s) inhibit the replication and/or expression of MVMp DNA. Indeed, suppressive factors were shown to be encoded by both the E1 and E2 open reading frames (ORF) of BPV-1 (Berg *et al.*, 1986; Lambert *et al.*, 1987; Haugen *et al.*, 1988). The negative regulator mapped to the 5' portion of E1 ORF is thought to limit BPV-1 DNA replication (Thorner *et al.*, 1988) but does not appear to down-modulate MVMp DNA synthesis that took place at a similar or even higher level in the BPV-1 transformants compared with the parental FR3T3 cell line. On the other hand, the possibility that the transcriptional suppressor protein encoded by the 3' domain of E2 counteracts MVMp expression seems unlikely, as the consensus sequence of the responsive element is absent from both promoter regions of the MVMp genome (Astell *et al.*, 1983). Another negative interference of BPV-1 with MVMp may involve the 3' portion of E1 ORF that encodes product(s) sharing homology with both the large T antigens of other papovaviruses and the nonstructural parvoviral proteins in a putative ATP/GTP-binding domain (Astell *et al.*, 1987). Such BPV-1 products may act as competitors and inhibit cytotoxic (Rhode, 1987) or replicational (Merchinskii *et al.*, 1984; Tullis *et al.*, 1988) activities of MVMp non-structural proteins in BPV-1 transformants. However, this hypothesis cannot be readily reconciled with the stimulation of parvoviral lytic replication detected in rodent (this report and Mousset *et al.*, 1986) and human (Chen *et al.*, 1986; Cornelis *et al.*, 1988a) cells transformed with the papovavirus SV40. Taken together, these observations lead one to consider, as an alternative, that the mode of BPV-1 transformation (Howley & Schlegel, 1987; Bergman *et al.*, 1988) can be distinguished by its failure to bring about positive factors promoting the destruction of murine cells by MVMp. The latter possibility would be consistent with our finding that BPV-1 did not impede the sensitization of FRBP8 cells to MVMp upon super-transformation with the EJ-*ras* oncogene. The resistance of BPV-1 transformants to MVMp points to the fact that cell sensitization to parvoviruses cannot be taken as a marker of the transformed phenotype itself but rather appears to be specific for the mode of action of defined oncogenes. This conclusion is supported by the lack of a correlation between the degree of sensitization to MVMp and the level of expression of *myc*-, *src*-, *ras*- or SV40-induced transformation traits measured in this study. For instance, some *myc*- or SV40-transformed derivatives became sensitive to MVMp although they kept the very low anchorage-independent growth ability of the parental cells. Conversely, the FRBP8-EJ derivative that achieved the highest cloning efficiency in soft agar was the least MVMp-sensitive clone among the *ras* transformants analysed. Taken together, the data presented in this report strongly suggest that the cellular

changes, brought about by oncogenes, that we have analysed are qualitatively and/or quantitatively different from those responsible for conferring susceptibility to parvoviral infection.

Materials and methods

Cells, virus and plasmids

Cells were grown in Dulbecco modified Eagle medium with 10% calf serum (aseptic serum, GIBCO). Cultures of RV695B and RV691C cells were propagated in the presence of G418 (Geneticin, GIBCO; 200 µg ml⁻¹). A9 mouse fibroblasts were cultivated in Eagle minimal essential medium supplemented with 5% fetal bovine serum. The mouse cell line NIH3T3 and its BPV-1 transformed derivatives were kindly provided by D.R. Lowy (Bethesda, USA). The strain S1 contains the full length BPV-1 transforming region, whereas HLB1 and E67 represent transformants carrying the BPV-1 ORFs E2 plus E5, and E6 plus E7, respectively (Schiller *et al.*, 1984).

The prototype (fibrotropic) strain of MVM (Minute Virus of Mice, MVMp), was grown in A9 cells and purified on CsCl gradients. MVMp was titered by plaque assays on A9 indicator cells.

Plasmids were propagated in the HB101 strain of *Escherichia coli* and purified by banding in ethidium bromide-CsCl gradients.

Cytotoxicity assay

Parvovirus-induced cell killing was determined by clonal growth assays (Cornelis *et al.*, 1988a). Briefly, infected or mock-infected cells were seeded onto 60 mm culture dishes. After 8–12 days in culture, the colonies were fixed, stained with Giemsa and counted. Cell survival was calculated from the number of colonies formed by MVM-infected cells and expressed as a percentage of those that were formed by mock-treated cells.

Parameters of the parvovirus life cycle

Virus adsorption and internalization was performed as outlined previously using [³H]thymidine-labelled virions (Chen *et al.*, 1986). Total viral DNA amplification was determined by dispersed cell assays (Cornelis *et al.*, 1988a).

Cell transformation

Cell transformation by SV40 was performed by transfection with the plasmid pZIP-NeoSV40. The latter plasmid was obtained by cloning the entire genome of SV40, opened at the unique BamHI site, into a similar site of the retroviral vector pZIP-NeoSV(X)1 (Cepko *et al.*, 1984) and screening for the correct orientation of the inserted DNA by restriction enzyme analysis. Transformation with the *v-myc* or *v-src* oncogenes was performed by infection with the murine retroviruses MMCV-*neo* (carrying both the avian *v-myc*^{OK10} oncogene and the *neo* gene), or M-*src*, (expressing the *v-src* oncogene), respectively (Vennström *et al.*, 1984). Super-transformation of FRBP8 cells was performed by transfection with the plasmid pSV*neo*EJ that carries the 6.6 kbp human *ras*-1 oncogene from the bladder carcinoma cell line EJ (McKay *et al.*, 1986). pSV*neo*-EJ was a kind gift of C. Marshall (London, England). Neomycin-transformed subclones of FR3T3 cells (FR*neo* cells) were obtained by transfection with pZIP-NeoSV(X)1.

Transfections were carried out by the calcium phosphate precipitation technique described by van der Eb and Graham (1980). Virus infection was facilitated by the addition of polybrene (0.8 µg ml⁻¹) to the FR3T3 cells. Cells expressing the SV40 transforming region, the *v-myc* or the EJ-*ras* oncogenes

were selected on the basis of their resistance to the drug G418 ($400 \mu\text{g ml}^{-1}$ culture medium) beginning the day following transfection. *v-src*-transformed cells were selected by the distinct transformed morphology of colonies that appeared readily after infection of FR3T3 cell cultures with M-*src*. Cell colonies were isolated with cloning cylinders, expanded and established as cell lines. All experiments with the FR3T3 cells and its transformed derivatives were done within a narrow range of subcultures.

Detection of oncogene products

Cells were labelled for 30 min (*v-myc*), 2 h (*v-src* and SV40 large T antigen) or 18 h (EJ-*ras*-1) with [^{35}S]methionine ($200\text{--}500 \mu\text{Ci}$ per 10^6 cells; 800 Ci mmol^{-1} , NEN Research Products) and lysed according to Martin *et al.* (1986). Supernatants containing equal amounts (6×10^6 or 3×10^7 cpm) of trichloroacetic acid-precipitable counts were immunoprecipitated with specific antisera, and analysed by 10–15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by fluorography as described by Martin *et al.* (1986). The p21^{ras} product was detected with the monoclonal antibody Y13-259 (Oncogene Science, Inc). The *v-src* encoded oncogene product pp60^{src} was immunoprecipitated with the monoclonal antibody 327 (Oncogene Science, Inc). The 57 kDa avian *myc* protein was detected with a specific anti-*myc* serum obtained by immunizing rabbits with a bacterially expressed polypeptide corresponding to the product of the 5' part of exon 3 from the human MYC gene (Martin *et al.*, 1986). SV40 large T antigen was immunoprecipitated by a serum from a tumor bearing hamster (Chen *et al.*, 1986).

For autophosphorylation of pp60^{src}, equal amounts of *src* protein, as determined by densitometric scanning of autoradiograms, were immunoprecipitated in lysing buffer devoid of sodium deoxycholate and SDS. Immunoprecipitates were suspended in kinase buffer (20 mM Tris, pH 7.5; 5 mM MnCl_2) containing $5 \mu\text{Ci}$ of [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP ($3000 \text{ Ci mmol}^{-1}$, Amersham

Corp.). The mixtures were incubated at 37°C for 10 min, fractionated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and processed for autoradiography using a Lightning-plus enhancing screen with two sheets of aluminium foil between the dried gel and the X-ray film to block [^{35}S]radiation.

Assay for anchorage independent growth

The cell capacity for anchorage independent growth was determined as described by Mousset *et al.* (1986).

Actin organization

The organization of the actin cytoskeleton was studied by fluorescence after staining of cell cultures with NBD-phalloidin (Molecular probes, Inc.) as described previously (van Hille *et al.*, 1989).

Acknowledgements

We thank B. Vennström and C. Marshall for their gifts of transforming retroviruses and plasmid pSVneoEJ, respectively. We are also indebted to D. Lowy for his kind gift of NIH3T3 and BPV-transformed NIH3T3 cell lines. The authors are grateful to N. Devassine, M.C. Bouchez and S. Redjem for care taken in preparing the manuscript.

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Association pour la Recherche sur le Cancer and Institut Pasteur de Lille (France), by the Caisse Générale d'Epargne et de Retraite, Ministère de la Politique Scientifique and Fonds National de la Recherche Scientifique (Belgium), and by the Commission of the European Communities.

N.S. and B.v.H. are supported by fellowships from the Association pour la Recherche sur le Cancer and the Centre National de la Recherche Scientifique, respectively.

References

- Anderson, M.J. (1987). *Prog. Med. Virol.*, **34**, 55–69.
- Astell, C.R., Thompson, M., Merchlinski, M. & Ward, D.C. (1983). *Nucleic Acids Res.*, **11**, 999–1018.
- Astell, C.R., Mol, C.D. & Anderson, W.F. (1987). *J. Gen. Virol.*, **68**, 885–893.
- Babiss, L.E. & Fisher, P.B. (1986). *Virology*, **154**, 180–194.
- Bando, H., Kusuda, J., Gojobori, T., Maruyama, T. & Kawase, S. (1987). *J. Virol.*, **61**, 553–560.
- Berg, L., Lusky, M., Stenlund, A. & Botchan, M.R. (1986). *Cell*, **46**, 753–762.
- Bergman, P., Ustav, M., Sedman, J., Moreno-López, J., Vennström, B. & Pettersson, U. (1988). *Oncogene*, **2**, 453–459.
- Binétruy, B., Meneguzzi, G., Cerni, C. & Cuzin, F. (1987). *Cancer Cells 5: Papillomaviruses*. Steinberg, B.M., Brand-sma, J.L. & Taichman, L.B. (eds). Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, pp. 223–227.
- Bishop, J.M. (1985). *Cell*, **42**, 23–38.
- Cepko, C.L., Roberts, B.E. & Mulligan, R.C. (1984). *Cell*, **37**, 1053–1062.
- Chen, Y.Q., de Foresta, F., Hertoghs, J., Avalosse, B.L., Cornelis, J.J. & Rommelaere, J. (1986). *Cancer Res.*, **46**, 3574–3579.
- Chen, Y.Q., Tuynder, M.C., Cornelis, J.J., Boukamp, P., Fusenig, N.E. & Rommelaere, J. (1989). *Carcinogenesis*, **10**, 163–167.
- Cornelis, J.J., Becquart, P., Duponchel, N., Salomé, N., Avalosse, B.L., Namba, M. & Rommelaere, J. (1988a). *J. Virol.*, **62**, 1679–1686.
- Cornelis, J.J., Spruyt, N., Spegelaere, P., Guetta, E., Darawshi, T., Cotmore, S.F., Tal, J. & Rommelaere, J. (1988b). *J. Virol.*, **62**, 3438–3444.
- Cotmore, S.F. & Tattersall, P. (1987). *Adv. Virus Res.*, **33**, 91–174.
- Cukor, G., Blacklow, N.R., Hoggan, D. & Berns, K.I. (1983). *Biology of Adeno-Associated Virus: The Paroviruses*. Berns, K.I. (ed.). Plenum Publishing Corp.: New York, pp. 33–36.
- Dupressoir, T., Vanacker, J.-M., Duponchel, N., Cornelis, J.J. & Rommelaere, J. (1989). *Cancer Res.*, **49**, 3203–3208.
- Faisst, S., Schlehofer, J.R. & zur Hausen, H. (1989). *J. Virol.*, **63**, 2152–2158.
- Grisoni, M., Meneguzzi, G., de Lapeyrière, O., Binétruy, B., Rassoulzadegan, M. & Cuzin, F. (1984). *Virology*, **135**, 406–416.
- Guetta, E., Graziani, Y. & Tal, J. (1986). *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**, 1177–1180.
- Guetta, E., Minberg, M., Mousset, S., Bertinchamps, C., Rommelaere, J. & Tal, J. (1989). *J. Virol.*, (in press).
- Haugen, T.H., Turek, L.P., Mercurio, F.M., Cripe, T.P., Olson, B.J., Anderson, R.D., Seidl, D., Karin, M. & Schiller, J. (1988). *EMBO J.*, **7**, 4245–4253.
- Howley, P.M. & Schlegel, R. (1987). *Papillomavirus Transformation: The Papovaviridae*. Salzman, N.P. & Howley, P.M. (eds). Plenum Press: New York. Vol. 2, pp 141–166.
- Jat, P.S., Cepko, C.L., Mulligan, R.C. & Sharp, P.A. (1986). *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 1204–1217.
- Katz, E. & Carter, B.J. (1986). *Cancer Res.*, **46**, 3023–3026.
- Lambert, P.F., Spalholz, B.A. & Howley, P.M. (1987). *Cell*, **50**, 69–79.
- Land, H., Parada, L.F. & Weinberg, R.A. (1983). *Nature*, **304**, 596–602.
- Martin, P., Henry, C., Ferré, F., Duterque-Coquillaud, M., Lagrou, C., Ghysdael, J., Debuire, B., Stéhelin, D. & Saule,

- S. (1986). *EMBO J.*, **5**, 1529–1533.
- McKay, I.A., Malone, P., Marshall, C.J. & Hall, A. (1986). *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3382–3387.
- Meneguzzi, G., Binétruy, B., Grisoni, M. & Cuzin, F. (1984). *EMBO J.*, **3**, 365–371.
- Merchlinski, M.J., Tattersall, P.J., Leary, J.J., Cotmore, S.F., Gardiner, E.M. & Ward, D.C. (1983). *J. Virol.*, **47**, 227–232.
- Mougneau, E., Lemieux, L., Rassoulzadegan, M. & Cuzin, F. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5758–5762.
- Mousset, S. & Rommelaere, J. (1982). *Nature*, **300**, 537–539.
- Mousset, S., Cornelis, J., Spruyt, N. & Rommelaere, J. (1986). *Biochimie*, **68**, 951–955.
- Ostrove, J.M., Duckworth, D.H. & Berns, K.I. (1981). *Virology*, **113**, 521–533.
- Ozawa, K., Ayub, J., Kajigaya, S., Shimada, T. & Young, N. (1988). *J. Virol.*, **62**, 2884–2889.
- Piette, J., Hirai, S.-I. & Yaniv, M. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3401–3405.
- Rhode, S.L. III. (1987). *J. Virol.*, **61**, 1448–1456.
- Rommelaere, J. & Tattersall, P. (1989). *Oncosuppression by Parvoviruses: Handbook of Parvoviruses*. Tijssen, P. (ed.). CRC Press: Boca Raton. (in press).
- Schiller, J.T., Vass, W.C. & Lowy, D.R. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7880–7884.
- Siegl, G. (1983). *Biology of Pathogenicity of Autonomous Parvoviruses: The Parvoviruses*. Berns, K.I. (ed.). Plenum Publishing Corp.: New York, pp 297–362.
- Tattersall, P. & Ward, D.C. (1978). *The Parvoviruses—An Introduction: Replication of Mammalian Parvoviruses*. Ward, D.C. & Tattersall, P. (eds). Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, pp 3–12.
- Thorner, L., Bucay, N., Choe, J. & Botchan, M.R. (1988). *J. Virol.*, **62**, 2474–2482.
- Toolan, H. & Ledinko, N. (1965). *Nature*, **208**, 812–813.
- Tullis, G.E., Labieniec-Pintel, L., Clemens, K.E. & Pintel, D. (1988). *J. Virol.*, **62**, 2736–2744.
- van der Eb, A.J. & Graham, F.L. (1980). *Meth. Enzym.*, **65**, 826–839.
- van Hille, B., Duponchel, N., Salomé, N., Spruyt, N., Cotmore, S.F., Tattersall, P., Cornelis, J.J. & Rommelaere, J. (1989). *Virology*, **170**, (in press).
- Vennström, B., Kahn, P., Adkins, B., Enrietto, P., Hayman, M.J., Graf, T. & Luciw, P. (1984). *EMBO J.*, **3**, 3223–3229.
- Wasylyk, C., Imler, J.L. & Wasylyk, B. (1988). *EMBO J.*, **7**, 2475–2483.
- Weinberg, R.A. (1985). *Science*, **230**, 770–776.



RESUME

Les parvovirus sont de petits virus à ADN simple brin qui effectuent leur cycle lytique dans les cellules de nombreuses espèces animales, y compris l'homme. La permissivité des cellules à l'infection parvovirale dépend de leur état de prolifération et de différenciation. Les parvovirus ont souvent été isolés à partir de tissus tumoraux. Cette association n'implique cependant pas qu'ils soient oncogènes. Bien au contraire, certains parvovirus présentent une inhabituelle activité oncosuppressive.

Diverses expériences ont montré que certains parvovirus inhibaient l'apparition spontanée ou induite de tumeurs chez des animaux de laboratoire, tandis que in vitro ces virus interféraient avec la transformation cellulaire. Les mécanismes de cette antinéoplasie sont encore inconnus, mais une série de résultats a conduit à formuler l'hypothèse d'une lyse préférentielle des cellules transformées - ou oncolyse - par les parvovirus. Dans ce mémoire, nous avons précisé les bases cellulaires et moléculaires de cette hypothèse.

Pour cela, nous avons d'abord construit un système cellulaire constitué de deux lignées de cellules de rat, FR3T3 et NRK, dont nous avons obtenu des dérivés transformés par différents oncogènes, (*v-src*, *c-Ha-ras*, *v-myc*, région transformante des virus SV40 et BPV-1). Ensuite, ces différentes lignées ont été analysées pour leur aptitude à répliquer le parvovirus Minute Virus of Mice (MVMp) et à subir son action cytopathique. Les principales conclusions peuvent se résumer comme suit :

i) en présence de facteurs cellulaires dépendant de l'origine des cellules, la transformation par la plupart des oncogènes étudiés peut rendre lytique une infection parvovirale normalement abortive. Cependant, la sensibilité à MVMp ne peut être prise comme un marqueur absolu du phénotype transformé, mais apparaît plutôt être spécifique du mode d'action de certains oncogènes : en effet, les lignées transformées par BPV-1, tout en présentant un phénotype transformé, restent résistantes à la lyse parvovirale.

ii) La transformation néoplasique dérégule certain(s) facteur(s) qui contrôle(nt) la transcription du gène codant pour la protéine virale cytotoxique NS-1.

iii) Le taux de synthèse de la protéine NS-1 constitue un facteur limitant pour la réplication de l'ADN et la cytotoxicité de MVMp.

Ces résultats nous permettent de proposer un modèle selon lequel le phénomène d'oncolyse parvovirale reposerait sur la dérégulation, consécutive à la transformation néoplasique, de l'expression ou de l'activité de facteurs cellulaires, entraînant une surproduction et/ou exacerbant l'effet cytopathique de protéines parvovirales non-structurales.