

50376
1993
199

50376
1993
199

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES ARTOIS

Numéro d'ordre 1111

A RETOURNÉ
THESE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

par
Jean-Marc VANACKER

MECANISMES DE L'ONCOLYSE PARVOVIRALE



Soutenu le 24 MAI 1993

devant la commission d'examen

Président : Pr. André VERBERT

Rapporteurs : Dr. Béatrice DESVERGNE
Dr. Jörg SCHLEHOFER

Examineurs : Pr. Dominique STEHELIN
Pr. Jean ROMMELAERE

Nous, qui sommes si modernes, serons des Anciens dans quelques siècles

*Jean de La Bruyère
Discours sur Théophraste*

*Ha! très grand arbre du langage peuplé d'oracles, de maximes et murmurant murmure
d'aveugle-né dans les quinconces du savoir...*

*Saint-John Perse
Vents, I, 1*

Ga bu zo meu

Alphabet Shaddock

REMERCIEMENTS

Quoiqu'il en soit du résultat acquis (on ne me trouvera pas faussement modeste de le qualifier de modeste et ceux qui savent de quoi je parle comprendront ce que je veux dire !), un certain nombre de personnes ont contribué à ce qu'il en soit ainsi. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma gratitude :

Dominique Stéhelin pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour le plaisir qu'il y a à y travailler.

Jean Rommelaere pour m'avoir intégré dans son équipe et a surtout eu la patience de me faire confiance.

Vincent Laudet pour une collaboration scientifico-musicale prolifique (échange *c-erbA-1* contre MVM et Gustav Mahler contre François Couperin).

Thierry Dupressoir qui m'a supporté (?!?) comme DEA, pour l'humour, la grandiloquence et le goût des mots disparus du vocabulaire depuis des siècles.

Ce que je sais de la culture cellulaire, je le dois à Nadine Duponchel. Ce que je sais des clonages, je le dois à Agnès Bègue. Merci à elles deux.

Il y a beaucoup de personnes que je voudrais remercier dans le laboratoire, pour ce qu'elles m'ont apporté, pour l'ambiance qu'elles contribuent à y faire régner. Entre autres et sans ordre de priorité : Jean Coll pour sa disponibilité et son sens de la critique ; Nini et Marie-Christine (je sais, mes frais de mission !) pour leur gentillesse ; Christian "Papy" Lagrou pour les conseils de culture cellulaire ; Catherine Koering qui a le courage de partager ma paillasse depuis un moment ; Paul Becquart qui a partagé mon bureau (et qui est parti !) ; Serge Plaza qui lui a succédé (et qui a changé de groupe !!) et qui m'a initié aux arcanes du gel-shift ; Zoulika Kherrouche (j'sais pas, moi !) pour son sourire, sa gentillesse, les Marlboro Light et le nombre d'ampoules de cellules décongelées ; l'inventeur du café quel qu'il soit (je doute qu'il soit au labo, mais il fait œuvre utile) ; Dominique Guittard (MAB) ; Anne-Claire Flourens (bien qu'elle m'ait rayé de sa liste) ; Kay McLeod (kination before fill-in). J'aimerais également saluer mes collègues (je n'ose pas dire "camarades") thésards anciens et nouveaux (à qui je souhaite bien du plaisir), entre autres : Christophe Quéva (bon vent à Seattle) ; Nathalie Turque (pas de pantoufles !) ; Olivier Albagli (c'est publié où ?) ; Stéphane Ansieau (pour le promoteur *c-mil*) ; Manos Perros (Elsinore) ; Guillaume Adelmant (qui a presque un meilleur accent du Nord que moi) ; Philippe Dhordain (qui a un meilleur accent du Nord que moi) ; Romuald Corbeau (Jean-Marc, j'ai fait une bêtise !) qui est parti mais qui reviendra ; Anne Hautefeuille (tu peux parler plus fort ?).

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| RESUME | 4 |
| ABBREVIATIONS | 5 |
| PRESENTATION GENERALE | 6 |
| <u>I. INTRODUCTION</u> | 8 |
| 1ère PARTIE : DES PARVOVIRUS | 9 |
| I. DONNEES VIROLOGIQUES | 9 |
| 1. Isolement | 9 |
| 2. Taxonomie | 10 |
| 3. Structure et propriétés générales | 10 |
| 4. Spectre d'hôte | 11 |
| 5. Cycle viral | 11 |
| 6. Pathogénicité | 12 |
| II. DONNEES MOLECULAIRES | 14 |
| 1. Structure du génome | 14 |
| 2. Réplication de l'ADN | 15 |
| a) Modèle | 15 |
| b) Régulation | 16 |
| 3. Organisation génomique et transcription | 16 |
| a) A ma gauche : les protéines non structurales | 16 |
| b) A ma droite : les protéines de capsid | 18 |
| 4. Fonctions des protéines | 18 |
| 5. Régulation de la transcription | 19 |
| a) Facteurs généraux | 19 |
| b) Régulation du promoteur P4 | 20 |
| c) Régulation du promoteur P38 | 22 |
| III. ONCOSUPPRESSION | 24 |
| 1. Considérations générales | 24 |
| 2. Approche <i>in vitro</i> | 26 |

| | |
|--|----|
| IV. MECANISMES D'ANTITRANSFORMATION | 28 |
| 1. Considérations sur les AAV | 28 |
| 2. Le pourquoi de l'oncolyse | 29 |
| 3. Le comment de l'oncolyse | 31 |
| 4. Application des parvovirus : perspectives et réalités | 33 |
| a) Les parvovirus comme vecteurs | 33 |
| b) Vers une thérapie virale ? | 34 |
| | |
| V. EN GUISE DE CONCLUSION PROVISoire | 34 |
| | |
| 2ème PARTIE : <i>ERB A</i>, SA VIE, SON ŒUVRE | 36 |
| | |
| I. UN PEU D'HISTOIRE | 36 |
| 1. Aux origines : le rétrovirus AEV | 36 |
| 2. Du <i>v-onc</i> au <i>c-onc</i> | 37 |
| | |
| II. VISITE DE FAMILLE | 38 |
| 1. Généralités | 38 |
| 2. Dissection moléculaire et fonctionnelle des récepteurs nucléaires | 39 |
| a) Fixation à l'ADN | 39 |
| b) Multifonctionnalité du domaine E | 40 |
| c) Régulation de la transcription | 42 |
| 3. Eléments de réponse sur l'ADN | 42 |
| 4. De la dimérisation, considérée comme un art de vivre | 44 |
| 5. Interaction avec d'autres facteurs de transcription | 45 |
| | |
| III. LE CAS <i>ERB A</i> | 46 |
| 1. Domaines fonctionnels | 46 |
| 2. Expression de <i>c-erbA-1</i> et sa régulation | 47 |
| 3. Mécanismes d'action de <i>v-erbA</i> | 48 |
| | |
| IV. DEUXIEME CONCLUSION TOUJOURS AUSsi PROVISoire | 51 |

| | |
|---|----|
| <u>II. RESULTATS ET DISCUSSION</u> | 52 |
| ARTICLE I | 53 |
| I. RESUME | 53 |
| II. COMMENTAIRE | 60 |
| ARTICLE II | 63 |
| I. RESUME | 63 |
| II. COMMENTAIRE | 72 |
| ARTICLE III | 74 |
| I. RESUME | 74 |
| II. COMMENTAIRE | 86 |
| <u>III. CONCLUSION</u> | 91 |
| <u>IV. REFERENCES</u> | 94 |

RESUME

Un des aspects attractifs majeurs des parvovirus autonomes est leur oncotropisme. Ces virus ayant un cycle lytique, cette propriété s'accompagne d'effets oncosuppresseurs *in vivo* mis en parallèle avec l'oncolyse constatée *in vitro*. L'étude des mécanismes de cette dernière, outre son intérêt *per se*, peut amener à des conclusions sur les différences entre cellules normales (résistantes au virus) et cellules transformées (sensibles à l'attaque virale).

Les protéines non structurales (NS) du virus MVMp sont responsables des effets lytiques exercés par ce virus. Les propriétés cytopathiques de la protéine NS1 n'ont pu, jusqu'à présent, être physiquement dissociées de ses activités transcriptionnelles. Nous avons donc choisi d'étudier ces dernières en déterminant la réponse de différents promoteurs à NS1. Il s'avère que la plupart de ceux-ci (LTR de RSV, promoteur précoce de SV40, P4 de MVMp, promoteur du gène *c-mil* de poulet) sont inhibés en présence de NS1 et ce, indépendamment de la présence d'une boîte TATA dans leur séquence. Ceci suggérerait qu'un des mécanismes de l'action cytopathique de NS1 peut comporter l'inhibition de l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire.

Outre le promoteur tardif P38 de MVMp, seul le promoteur du gène (*c-erbA-1*) du récepteur des hormones thyroïdiennes (THR) de type alpha humain est activé par NS1. Dans une paire de cellules fibroblastiques de rat, l'infection parvovirale provoque une augmentation du taux d'ARN correspondant au gène *c-erbA-1*. Dans ces conditions, les cellules FREJ4 (sensibles au virus) expriment la forme $\alpha 1$ (fixatrice d'hormone) du gène, alors que les cellules FR3T3 (résistantes au virus) ne produisent que la forme $\alpha 2$. Nous montrons également que, en culture, le ligand naturel de THR (l'hormone thyroïdienne : T3), influe sur le taux de sensibilité des cellules FREJ4 au parvovirus MVMp. Sachant que T3 ne module pas les étapes du cycle viral cruciales pour la lyse, nous suggérons l'intervention du complexe THR-T3 dans l'effet lytique du parvovirus MVMp.

L'action cytopathique parvovirale pourrait être exercée par au moins deux mécanismes : l'inhibition de l'expression de gènes clef pour la prolifération et l'émergence d'un programme de différenciation / antiprolifération par l'intermédiaire de la stimulation de *c-erbA-1*.

ABBREVIATIONS

| | |
|------------------|--|
| AAV | Adéno-associated viruses ou Dependovirus |
| AEV | Avian Erythroblastosis Virus |
| ATF/CREB | C-AMP Responsive Element Binding protein |
| BPV | Bovine Papilloma Virus |
| COUP-TF | Chicken Ovalbumin Upstream Promoter - Transcription Factor |
| DM | Domaine de dimérisation des récepteurs nucléaires |
| DR | Direct Repeat du motif de reconnaissance AGGTCA |
| ER | Récepteur des œstrogènes |
| ERE | Éléments de réponse aux œstrogènes |
| GR | Récepteur des glucocorticoïdes |
| GRE | Éléments de réponse aux glucocorticoïdes |
| HIV | Virus de l'immunodéficience humaine |
| HLH | Domaine Helix-loop-helix de certains facteurs de transcription |
| HRE | Éléments de réponse aux hormones |
| HSV | Herpes Simplex Virus |
| LTR | Long Terminal Repeat, promoteur des Rétrovirus |
| MMTV | Mouse Mammary Tumor Virus |
| MoMuLV | Moloney Murine Leukemia Virus |
| MVM | Minute Virus of Mice |
| PPAR | Peroxisome Proliferator-Activated Receptor |
| RAR | Récepteur de l'acide rétinoïque |
| RARE | Éléments de réponse à l'acide rétinoïque |
| RSV | Rous Sarcoma Virus |
| RXR | Récepteur de l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque |
| RXRE | Élément de réponse aux RXR |
| T3 | 3,5,3'-L-triiodothyronine |
| TAF | Domaine transactivateur |
| THR ou TR | Récepteur des hormones thyroïdiennes |
| Ti | Domaine responsable de l'inhibition de la transactivation |
| tk | Thymidine kinase |
| TRAP | Thyroid hormone Receptor Auxiliary Protein |
| TRE | Élément de réponse aux hormones thyroïdiennes |
| USF/MLTF | Upstream Stimulatory Factor / Major Late Transcription Factor |
| u.g. | unité génomique |
| VDR | Récepteur de la vitamine D |
| VDRE | Élément de réponse à la vitamine D |

PRESENTATION GENERALE

Découverts initialement comme contaminants de tissus tumoraux ou de stocks de virus transformants, les parvovirus ont toujours été associés au cancer. A la notion d'oncotropisme a succédé celle d'oncosuppression *in vivo* mise en relation avec l'oncolyse observée *in vitro*. Les mécanismes présidant à ces propriétés d'antitransformation sont encore peu caractérisés. Néanmoins, l'association de celles-ci avec les protéines non structurales (NS) et particulièrement la protéine NS1 semble clairement établie. Ainsi, l'introduction d'un clone moléculaire codant cette protéine est capable de mimer les effets tueurs du virus complet, pour peu que la cellule considérée soit transformée. D'autre part, les cellules qui obitent suite à l'infection parvovirale, produisent une plus grande quantité de protéines non structurales (par une plus grande activité du promoteur dirigeant leur synthèse) comparativement aux cellules qui résistent. Des différentes activités qui ont été attribuées à ces protéines, seule l'aptitude à inhiber l'expression de divers promoteurs n'a pu être physiquement séparée des propriétés cytopathiques.

Dans ce mémoire, nous avons tâché de présenter les parvovirus en examinant d'abord leurs caractéristiques virologiques, puis les données moléculaires de la régulation de leur cycle. Ceci nous ensuite amené à une étude de leurs propriétés antitransformantes (oncosuppression et oncolyse) et de ce qu'on connaît des mécanismes de celles-ci. Nous terminerons cette partie par quelques considérations sur les applications (futurs ou actuelles) des parvovirus. La famille des *Parvoviridae* est divisée en trois genres. Nous n'avons pratiquement pas parlé d'un de ceux-ci, *Densovirus*, spécifique des Arthropodes et dont les membres sont encore peu caractérisés. Les deux autres genres, *Parvovirus* et *Dependovirus*, infectent les Vertébrés et ont pu être isolés chez différentes espèces animales. Pour plusieurs des membres de chacun des deux groupes, des propriétés antitumorales ont été démontrées. Au cours de notre exposé, nous n'avons pas cherché l'exhaustivité mais pris des exemples illustrant notre propos dans les deux genres, mettant l'accent tantôt sur les similitudes, tantôt sur les divergences. Nous discuterons cependant essentiellement du parvovirus MVMP, tant parce qu'il est notre objet d'étude que parce qu'il est peut-être le plus travaillé des parvovirus autonomes.

Nos travaux ont mis en évidence une implication de l'hormone thyroïdienne et de l'un de ses récepteurs (THRA, codé par le gène *c-erbA-1*) dans la cytolyse exercée par les parvovirus. Il nous a donc paru nécessaire de présenter ce gène et son produit (seconde partie de l'introduction). *c-erbA-1* appartient à la famille des récepteurs nucléaires. Certaines de ses

propriétés ont été déduites de celles mises en évidence pour d'autres membres de la famille ou originellement découvertes chez ceux-ci. Nous effectuerons donc une visite de famille chez les récepteurs nucléaires en dégagant là encore les convergences ou divergences existant entre les membres de la famille. Le récepteur des hormones thyroïdiennes sera ensuite examiné plus en détail, en insistant sur ses propriétés originales et sur ses rapports avec son homologue viral (*v-erbA*) grâce auquel il a été découvert.

Le but de notre travail a été de déterminer plus avant les mécanismes de la cytopathogénie parvovirale et donc des activités lytiques des protéines NS. Nous nous sommes donc intéressés au comportement de différents promoteurs en présence des protéines non structurales du parvovirus MVMp. Ayant montré une activité négative de NS1 sur certains promoteurs, nous en avons comparé les structures primaires et mis en évidence une séquence qui pourrait servir de cible moléculaire à l'inhibition par NS1. Tous les promoteurs hétérologues ne sont cependant pas réprimés par NS1. Ainsi, l'activité du promoteur du gène *c-erbA-1* (dont nous décrivons par ailleurs la caractérisation) est, elle, augmentée par la protéine NS1. Nous avons examiné les conséquences physiologiques de cette activation et montré que l'effet cytopathique exercé par le virus MVMp sur les cellules FREJ4 dépend de la présence d'hormone thyroïdienne (T3 : ligand naturel du produit du gène *c-erbA-1*) dans le milieu de culture. Nous avons également examiné quelques hypothèses pour expliquer la relation entre le récepteur des hormones thyroïdiennes et la lyse exercée par les parvovirus. Nous montrerons ainsi l'indépendance du cycle parvoviral de l'hormone T3. Par ailleurs, celle-ci ne semble pas impliquée dans le bon déroulement de certains paramètres du cycle cellulaire (vitesse de croissance, distribution des cellules dans les différentes phases du cycle), cruciaux pour les parvovirus. Nous concluerons en présentant un modèle d'interaction entre le récepteur des hormones thyroïdiennes et les parvovirus, modèle qui pourra nous servir d'hypothèse de travail pour des analyses futures.

INTRODUCTION

VIRUS

ACRONYME

MEMBRES ACCEPTES :

| | |
|--|-------|
| Kilham Rat Virus | KRV |
| H-1 (hôte : rat) | H-1 |
| Virus RT | RT |
| TVX (hôte inconnu, isolé d'une tumeur humaine) | TVX |
| Minute Virus of Mice | MVM |
| deux souches : MVMp (fibrotrope) | |
| MVMi (lymphotrope) | |
| LuIII (hôte : homme ?) | LuIII |
| B19 (hôte : homme) | B19 |
| Porcine Parvovirus | PPV |
| Bovine Parvovirus | BPV |
| Feline Parvovirus | FPV |
| variants d'hôte : | |
| Mink Enteritis Virus | MEV |
| Canine Parvovirus | CPV |
| Raccoon Parvovirus | RPV |
| Lapine Parvovirus | LPV |
| Aleutian Disease Virus (hôte : vison) | ADV |
| Goose Parvovirus | GPV |

MEMBRES POSSIBLES :

| | |
|---------------------------|------|
| Minute Virus of Canines | MVC |
| Virus HB (hôte : homme ?) | HB |
| Virus RA-1 (hôte : homme) | RA-1 |

Tableau I : Les Parvovirus autonomes

(d'après Cotmore et Tattersall, 1987)

DES PARVOVIRUS

I. DONNEES VIROLOGIQUES

1. Isolement

Si certains parvovirus ont été identifiés à la suite d'une recherche de l'agent causatif d'une maladie infectieuse bien précise, l'isolement de beaucoup de ces virus est le fruit du hasard. A la fin des années 50, Kilham et Olivier recherchaient dans des tumeurs de rat ce qu'ils soupçonnaient être un papovavirus. Ayant inoculé des homogénats de ces tissus à une culture de cellules embryonnaires, ils observèrent la réplication d'un petit virus (qu'ils baptisèrent Rat Virus [RV], devenu plus tard Kilham Rat Virus) ayant pour caractéristiques son extrême stabilité et son pouvoir agglutinant (Kilham et Olivier, 1959). Dans les années suivantes, plusieurs virus apparentés ont été isolés de tissus de rats porteurs de tumeurs ou ayant été traités par des agents carcinogènes ou immunodéprimants (Lum et Schreiner, 1963 ; El Dadah et al., 1967).

A l'opposé et à la même époque, le groupe d'Helen Toolan a remarqué le développement, chez les hamsters nouveaux-nés, d'un syndrome complexe (nanisme, microencéphalie, fragilité osseuse, malformations dentaires) suite à l'inoculation de fractions de tumeurs humaines (Toolan et al., 1960). Le virus causatif (dénommé H-1 d'après la tumeur dont il provenait) a certaines caractéristiques communes avec le virus RV mais en est sérologiquement distinct. D'autres virus apparentés ont été isolés, en utilisant un protocole similaire dans les années qui suivirent (Dalldorf, 1960 ; Siegl, 1984). Les cultures primaires de tissus de différents animaux (homme compris) semblent être une source quasi-inépuisable de types parvoviraux (Siegl, 1984). On sait maintenant, en effet, que les parvovirus peuvent persister chez leur hôte naturel (dans beaucoup de cas, sans pathologie associée) en dépit de la présence d'un système immunitaire fonctionnel. L'étude des fécès d'animaux apparemment sains a ainsi permis l'isolement de différents parvovirus (Matsunaga et al., 1977).

Il est néanmoins important de noter dès à présent la relation intime entre parvovirus et tumeurs. D'autres exemples illustrant cet état de fait résident dans l'isolement, en tant que contaminant de stocks d'Adenovirus prétendument purs, d'une part, des virus du genre Dépendovirus (pour cette raison, ces virus ont également l'appellation d'AAV pour Adeno-associated viruses ; Berns et Bohenzky, 1987), d'autre part, de la première souche de Minute

| | AAV | Parvovirus autonomes |
|-----------------------------------|---|--|
| Pathogénicité | Non détectée | Restreinte |
| Exigence | Virus aidant (Adenovirus, HSV, Vaccine) | Phase S du cycle |
| Cycle | Latent Intégration dans le génome hôte | Lytique Pas d'intégration dans le génome |
| Brin encapsidé | + et - | Généralement - |
| Promoteurs | 3 dont 2 précoces | 2 dont 1 précoce |
| Séquences terminales | Identiques | Différentes en 3' et 5' Formes "flip" et "flop" en 3' |
| Protéines non structurales | 4 | 2 |
| Oncosuppression | Par interaction avec le virus aidant ou différenciation | Par lyse des cellules transformées |

Tableau II : Comparaison des propriétés des parvovirus autonomes et adéno-associés

Virus of Mice (MVM) (Crawford, 1966). Un variant de ce dernier virus possédant des propriétés immunosuppressives (et appelé MVMi par opposition au MVMp [prototype]) a été ensuite isolé, cette fois d'un lymphome murin transplantable (Bonnard et al., 1976). On se reportera au tableau I pour une compilation des types parvoviraux autonomes décrits à ce jour.

2. Taxonomie

La famille des Parvoviridae a été divisée en trois genres sur la base de propriétés biologiques et structurales (Siegl et al., 1985) : le genre *Densovirus* comprend des virus encore peu caractérisés qui infectent spécifiquement les Arthropodes (Tijssen et al., 1990) et qui ne peuvent que depuis récemment être propagés en culture cellulaire ce qui explique le faible degré de connaissance qu'on en a. Les deux autres genres sont des agents infectieux des Vertébrés :

- les virus du genre *Dépendovirus* (ou AAV) ont été caractérisés comme ne pouvant normalement se répliquer qu'en présence d'un virus aidant (Buller et al., 1981).

- les *Parvovirus* (parfois qualifiés d'"autonomes") n'exigent pas la présence d'un autre virus pour une répllication efficace.

Ces deux derniers groupes de virus présentent d'autres divergences (tableau II) : le génome des *Dépendovirus* est capable de s'intégrer dans l'ADN de la cellule hôte en des sites spécifiques (Kotin et al., 1990 ; Samulski et al., 1991 ; Walz et Schlehofer, 1992). La structure du génome de ces deux groupes de virus diffère également, tant du point de vue de la séquence des extrémités que de l'organisation transcriptionnelle (ceci sera discuté plus loin).

On sait maintenant que la dépendance des AAV à l'égard d'un virus aidant n'est cependant pas absolue, pour peu que des conditions de culture bien particulières pallient la défection de leur compère (Yakobson et al., 1987). D'autre part, des virus appartenant à des genres différents possèdent des caractéristiques structurales communes. Pour rendre compte de ces données, K.I. Berns (1990) a suggéré la reconsidération de la classification parvovirale et proposé la division de la famille en 5 ou 6 genres, mais rien n'est encore officiel.

3. Structure et propriétés générales

Tous les membres de la famille des Parvoviridae possèdent certaines propriétés communes. Ils font partie des plus petits virus animaux (en latin, *parvus* = petit), leur capsidie icosaédrique mesurant entre 20 et 35 nm de diamètre. Il a été noté très tôt que cette capsidie non enveloppée est extrêmement résistante à toutes sortes de traitements (température, pH extrêmes, solvants organiques, certaines enzymes protéolytiques ; Siegl, 1984) en relation probable avec

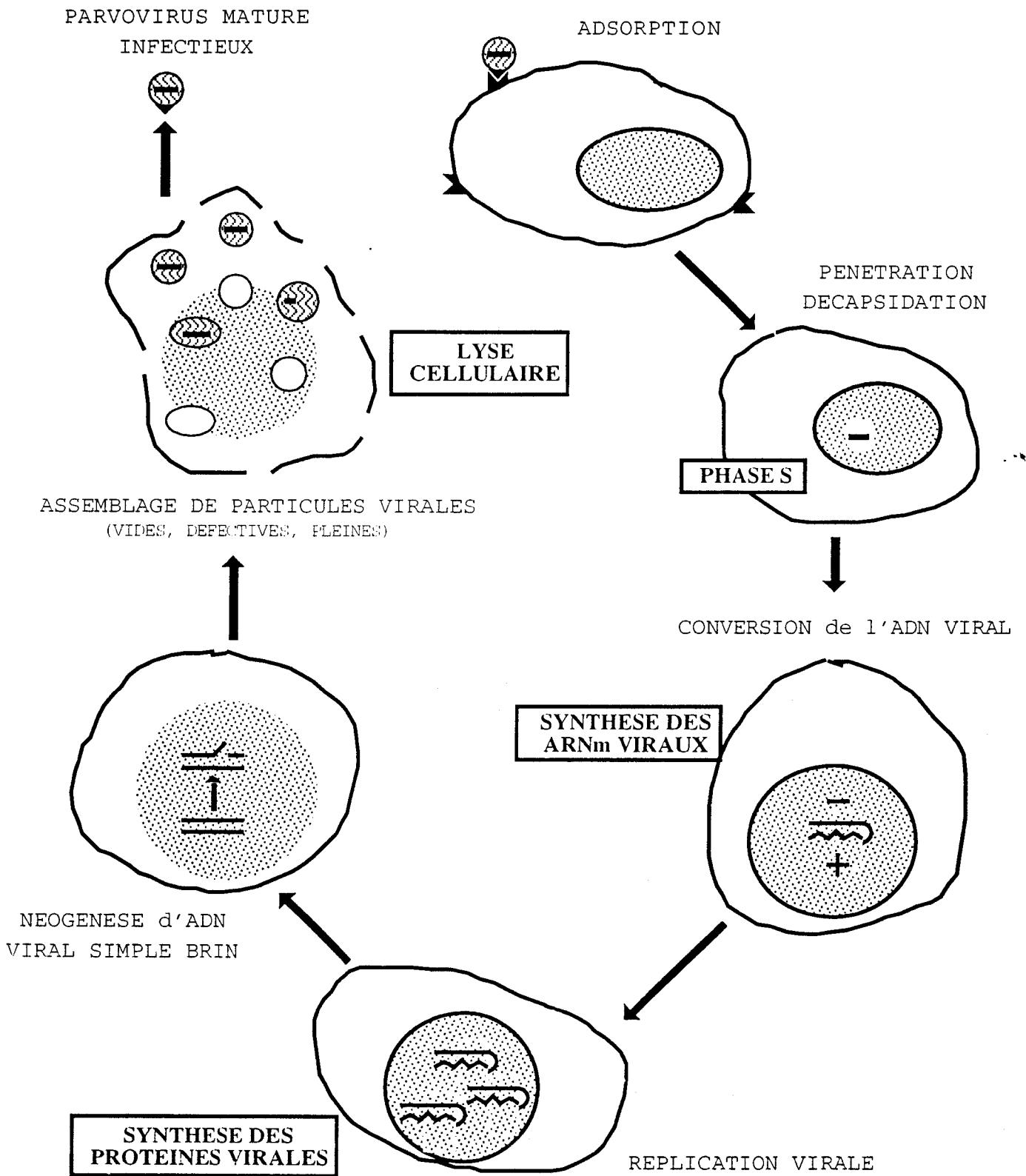


Figure 1 : Cycle lytique de MVM

sa grande simplicité. Le génome des parvovirus est composé d'une molécule d'ADN linéaire, simple-brin, d'environ 5 000 nucléotides qui se réplique dans le noyau de la cellule-hôte.

A quelques exceptions près, les parvovirus autonomes (à l'opposé des Dépendovirus) sont capables d'agglutiner les hématies d'au moins une espèce animale. Cette propriété est couramment utilisée à des fins de titration des particules virales. Néanmoins, la capsid virale étant responsable de cette activité, le dosage par hémagglutination ne permet pas de distinguer les virions infectieux matures des capsides vides ou virions défectifs produits en grand nombre lors d'une infection (y compris en culture cellulaire).

4. Spectre d'hôte

Des parvovirus ont pu être isolés chez un grand nombre d'espèces animales. Si la majorité des isolats provient des Mammifères (où les parvovirus peuvent représenter une menace économique sur les élevages), des virus comme GPV (Goose Parvovirus, responsable de divers syndrômes différemment caractérisés suivant les pays d'étude ; Siegl, 1984) ou AAV (Avian AAV, un Dépendovirus infectant la dinde) témoignent de la présence de parvovirus chez l'Oiseau.

Individuellement, les Parvovirus ont un spectre d'hôte assez restreint et n'infectent généralement qu'une seule espèce animale. Néanmoins, un certain flou subsiste quant à savoir qui, du rat ou de l'homme, est l'hôte naturel du parvovirus H-1 (bien que la séropositivité humaine pour H-1 soit faible, de l'ordre de 3% pour une population standard). D'autre part, des changements d'hôte ont été mis en évidence : les virus CPV (Canine Parvovirus, provoquant des myocardites et des entérites sévères chez le chien) et MEV (Mink Enteritis Virus, une des menaces majeures planant sur les élevages de visons) représentent en fait des variants du FPV (Feline Parvovirus).

En culture, les parvovirus ne se multiplient généralement de manière efficace que dans des cellules provenant de leur hôte d'origine bien qu'il soit possible d'adapter un parvovirus donné à la propagation sur une espèce cellulaire différente : le PPV (Porcine Parvovirus) a ainsi pu être cultivé sur des cellules humaines.

5. Cycle viral

Il faut d'abord noter que les infections parvovirales productives sont lytiques (voir figure 1), seules de rares exceptions semblent exister (Salomé et al., 1989). Toutefois, il peut y avoir lyse sans production virale. Une infection productive commence par l'adsorption du virus sur des récepteurs cellulaires spécifiques dont on sait fort peu de choses sinon que leur présence

semble être régulée par des phénomènes liés à la différenciation. Après endocytose, les virions intacts sont transportés au noyau où l'ADN est décapsidé. La première étape de réplication est la conversion de l'ADN en molécule double-brin qui précède toute synthèse d'ARN. Il semble que transcription et réplication de l'ADN aient ensuite lieu concomitamment. Une fois les produits viraux accumulés, les protéines de structure sont transportées du cytoplasme vers le noyau pour être assemblées en capsides avec éventuellement une molécule d'ADN simple-brin fille.

Différents niveaux de blocage du cycle ont été mis en évidence suivant les types cellulaires : absence de récepteur, blocage des étapes précoces (pénétration et transport vers le noyau), blocage de la transcription (Cotmore et Tattersall, 1987). Certains de ces niveaux de blocage seront plus abondamment discutés ultérieurement, en particulier, ceux relatifs à l'état de transformation de cellule hôte.

Le cycle viral des AAV est différent de celui des parvovirus autonomes : il n'est pas (ou peu) lytique et peut présenter une phase de latence (voir tableau II pour une comparaison de ces deux types viraux). En l'absence de virus aidant, plusieurs copies du génome des AAV s'intègrent en tandem dans l'ADN de la cellule hôte (pour revue, voir Berns et Bohenzky, 1987), en des sites spécifiques dont la localisation est encore sujette à discussion : le chromosome humain 19 pour certains (Kotin et al., 1990 ; Samulski et al., 1991), le chromosome 17 pour d'autres (Walz et Schlehofer, 1992). La surinfection par un virus aidant "réveille" le cycle viral. Les extrémités du génome semblent requises pour ce phénomène ainsi que certaines protéines non structurales pour la spécificité d'intégration (Berns, 1990). Il est ainsi possible d'établir des lignées cellulaires portant le génome d'AAV intégré (Berns et al., 1975), ce qui peut présenter un intérêt applicable au transfert de gènes dans la cellule eucaryote (Tratschin et al., 1984, 1985, 1986 ; Lebkowski et al., 1988). Toutes les tentatives pour démontrer l'intégration du génome des parvovirus autonomes dans l'ADN de la cellule hôte ont échoué.

6. Pathogénicité

Qui dit virus, dit infection et par là même, pathogénicité. Les parvovirus sont généralement hautement contagieux. Ainsi, MVM est largement présent à l'état endémique chez la souris, son hôte naturel, tant dans la nature que chez l'animal de laboratoire où on en est à considérer qu'un animal est infecté tant que la preuve du contraire n'a pas été établie (Ward et Tattersall, 1982). Chez l'homme, la séropositivité pour le virus AAV2 est estimée à 80%.

Le spectre de pathogénicité exhibé par les parvovirus est assez restreint et reflète les exigences du virus quant à l'état de différenciation et de prolifération de la cellule hôte. En effet, les parvovirus ne peuvent se répliquer que dans des cellules à haute activité mitotique et sont, à

l'opposé d'autres virus à ADN, incapables d'induire la mitose dans la cellule qu'ils infectent. Ainsi, seront majoritairement touchées et détruites les populations cellulaires se multipliant rapidement au cours des développements embryonnaire et néo-natal. Ceci explique le pouvoir tératogène des parvovirus. L'inoculation intracrânienne de parvovirus chez l'animal nouveau-né (en particulier le hamster) provoque des lésions craniofaciales et périodontales conduisant à un faciès caractéristique baptisé "mongoloid-like" par H. Toolan (1963). Ces difformités paraissent liées à une attaque virale sélective des tissus squelettiques et dentaires en développement. Ce type d'infection expérimentale peut également conduire à une hypoplasie cérébelleuse par destruction du cortex granulaire du cervelet (Siegl, 1984).

Les parvovirus traversent la barrière placentaire et infectent l'embryon. Inoculés à une période précoce de la gestation, ils peuvent amener à une résorption ou à une momification foetale par lyse des tissus mésodermiques. Une infection plus tardive dans le développement embryonnaire pourra permettre la survie de l'animal, au prix de l'hypoplasie cérébelleuse décrite plus haut, éventuellement accompagnée d'encéphalopathie hémorragique et/ou d'hépatite et d'entérite.

Les tissus touchés lors du développement embryonnaire étant généralement résistants (car peu prolifératifs) chez l'adulte, les désordres cliniques associés à l'infection parvovirale chez celui-ci sont plus rares. Néanmoins, il est possible de réactiver, chez l'animal, une sensibilité au parvovirus disparue lors du passage à l'état adulte en induisant, dans certains tissus, un comportement prolifératif anormal. Ainsi, une hépatectomie partielle suivie d'une infection par le parvovirus H-1 provoque, chez le rat, une hépatite due à l'attaque virale sur les parties du foie en régénération. De même, des souches de parvovirus à tropisme ostéolytique peuvent infecter les fractures en cours de réduction et perturber la formation du callus. Enfin, les parvovirus interfèrent avec, et éventuellement suppriment, un autre type de prolifération anormale, à savoir les néoplasies (Rommelaere, 1990).

En résumé, les parvovirus constituent une menace réelle pour l'embryon ou le nouveau-né. En revanche, chez l'adulte, ce sont des virus "opportunistes", attendant, pour se propager, la résurgence contingente d'un programme de prolifération normalement inactif.

La multiplication cellulaire est donc une exigence absolue des parvovirus à l'égard de leur hôte. On pourrait donc s'attendre à ce que tout tissu en activité mitotique puisse subir l'attaque virale. Pourtant, beaucoup de tissus adultes proliférant rapidement comme ceux formant le système hématopoïétique ne sont généralement pas infectés par la majorité des souches parvovirales. Il existe néanmoins des exceptions notables. Le parvovirus B19 ne s'attaque, en effet, qu'à une sous-population spécifique de progéniteurs érythroïdes de la moelle osseuse humaine (v. pour revue : Morinet et Tchernia, 1991) pouvant provoquer, chez les individus atteints d'anémie hémolytique, une crise d'aplasie par destruction des cellules de la moelle. De même, les cellules embryonnaires murines très précoces et les cellules souches (indifférenciées) de tératocarcinome ne sont pas détruites par les parvovirus. En se

différenciant, ces dernières donnent naissance (entre autres) à des cellules ressemblant à des fibroblastes qui sont sujettes à l'attaque parvovirale (Cotmore et Tattersall, 1987).

Il existe donc également des facteurs liés à la différenciation intervenant de manière déterminante dans la préférence des parvovirus à l'égard de leurs cibles cellulaires.

II. DONNEES MOLECULAIRES

1. Structure du génome

L'étude de la génétique des parvovirus est facilitée par la petite taille du génome et par le fait que celui-ci, cloné sous forme d'ADN double-brin est infectieux par transfection dans des cellules permissives. D'autre part, la séquence de plusieurs génomes parvoviraux est désormais connue, ce qui permet des comparaisons de séquences et des études par mutagénèse.

Le génome des parvovirus est une molécule d'ADN simple-brin. Les AAV, les Densovirus et le virus B19 encapsident une proportion égale de brin d'ADN + (séquence colinéaire à l'ARN messager) et - (complémentaire à l'ARNm) (Siegl et al., 1985). A l'opposé, chez les parvovirus autonomes (à l'exception de Lu III ; Difffoot et al., 1989), c'est le brin - qui est majoritairement présent dans la capsid.

Toutes les ADN polymérases ont besoin d'une amorce pour exercer leur activité princeps. Les parvovirus ont ainsi mis en place, à leurs extrémités génomiques, des séquences palindromiques double-brin permettant l'initiation de la réplication. Ce point de vue, certes téléonomique, permet d'expliquer la haute conservation de ces séquences terminales chez tous les parvovirus. Chez les AAV (Srivastava et al., 1983), les Densovirus (Nakagi et Kawase, 1980) et le virus B19 (Astell et Blundell, 1989), les mêmes séquences sont présentes aux deux extrémités (sous forme inversée, d'où leur nom d'ITR pour Inverted Terminal Repeat). Les autres parvovirus possèdent des séquences distinctes en 3' et 5' (respectivement 115 et 207 nt pour MVM ; Astell et al., 1984 ; voir figure 2). Si la signification de cette divergence n'est pas vraiment claire, cette dernière implique néanmoins des mécanismes de réplication légèrement différents pour ces deux groupes de virus (v. plus loin). Les palindromes possèdent également des séquences internes complémentaires entre elles, ce qui leur permet d'adopter des structures secondaires plus complexes (en "oreille de lapin" pour le 3', "cruciforme" pour le 5' ; Cotmore et Tattersall, 1987).

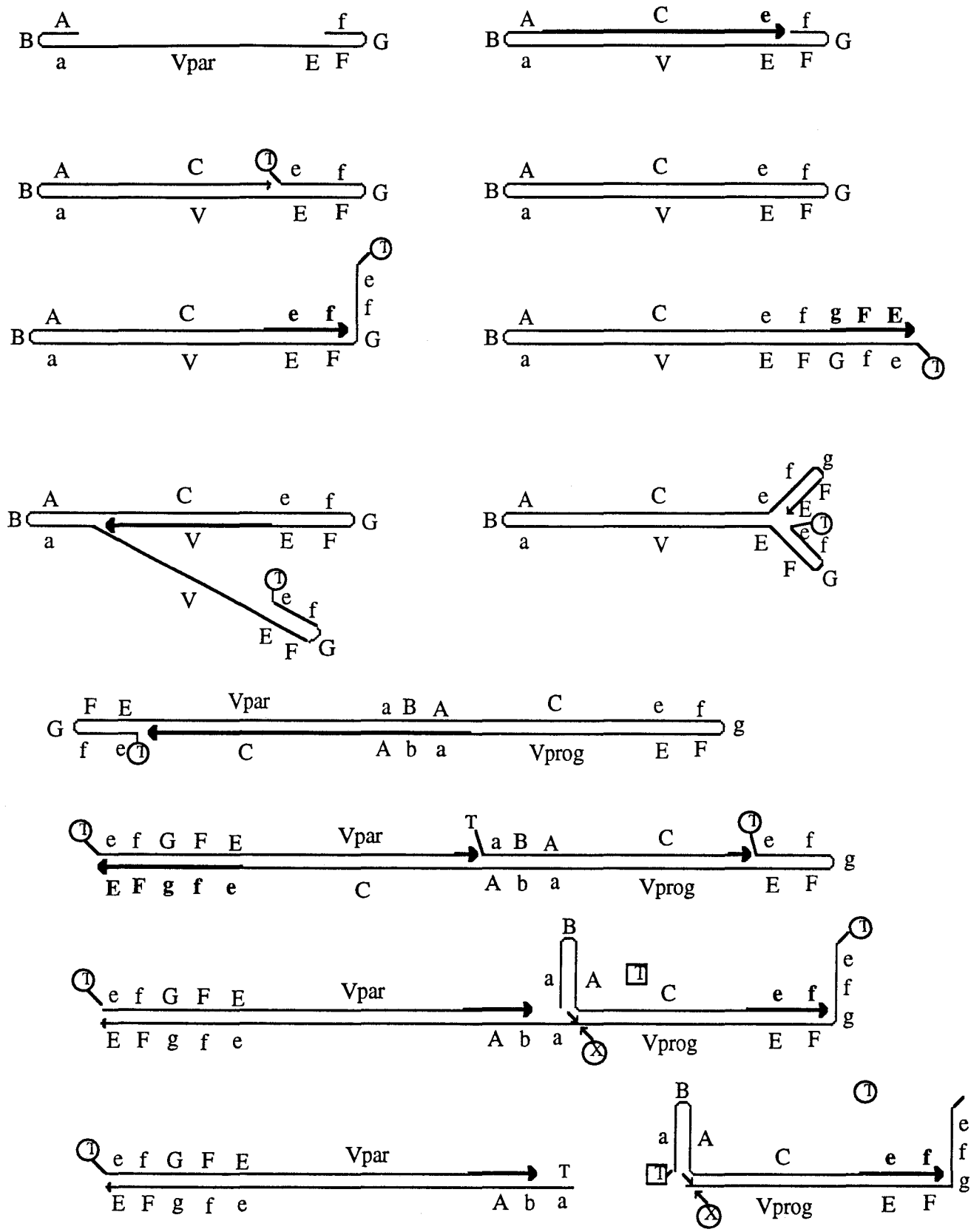


Figure 3 : Réplication de l'ADN parvoviral

Vpar : brin d'ADN viral parental
 Vprog : brin d'ADN fils

2. Réplication de l'ADN

L'étude de la réplication de l'ADN parvoviral ne présente pas que des intérêts *per se*. En effet, un modèle réplcatif parvoviral, en tant que conçu à partir d'un génome linéaire, peut permettre de spéculer sur la réplication des chromosomes eucaryotes et particulièrement d'imaginer comment leurs extrémités (les télomères) sont conservées et non perdues comme l'impliqueraient les modèles classiques basés sur l'existence des fragments d'Okazaki.

a) Modèle

Astell et al. (1985) ont proposé un modèle faisant intervenir un "modified rolling hairpin" qu'on peut allègrement traduire par "déplacement d'épingle à cheveux modifié" (figure 3). Ce modèle rend compte des différentes formes assumées par l'ADN viral au cours de sa réplication, ainsi que de l'hétérogénéité des séquences terminales du génome des parvovirus autonomes (figure 2). En effet, les palindromes ne forment pas une structure parfaite. Les quelques bases non appariées du palindrome 5' peuvent coexister, d'un exemplaire du génome à un autre, en tant que deux séquences (les palindromes sont dits "flip" et "flop"), complémentaires l'une de l'autre. Cette divergence n'existe pas pour le palindrome 3', dont la séquence est constante malgré l'existence, ici aussi, de zones non appariées. La situation est singulièrement plus simple chez les AAV : les deux palindromes coexistent sous forme flip et flop.

L'extrémité 3' du génome viral sert d'amorce à la polymérase et l'ADN est d'abord converti en une forme double-brin. Les extrémités 3' et 5' sont ensuite jointes. 18 bp en amont de cette ligature a lieu un clivage de la molécule, probablement effectué par la protéine virale NS1 qui se fixe subséquentement sur l'extrémité 5' créée par la coupure (Cotmore et Tattersall, 1988). Les soupçons sur l'activité "nickase" de NS1 sont renforcés par le fait qu'une préparation partiellement purifiée de la protéine virale rep68 d'AAV2 (en bien des points comparable à NS1) est capable de cliver l'ADN d'AAV (Snyder et al., 1990). Néanmoins, pour ces virus, le site de coupure est situé en un point opposé à l'extrémité 3'OH originale (Im et Muzyczka, 1990). En plus d'être endonucléase ATP-dépendante, rep68 possède une activité ADN hélicase et là peut se poursuivre l'analogie avec NS1. En effet, l'étape suivante de la réplication fait intervenir un changement de conformation du palindrome 5' qui passe sous forme étendue et sert de matrice à la polymérase. Un nouveau changement de structure secondaire permet aux deux palindromes (celui du brin parental et le néo-formé) d'être réarrangés en épingle à cheveux. La réplication se poursuit par déplacement de brin pour donner naissance à des formes concatémériques. Ces intermédiaires sont ensuite clivés ("résolus") pour engendrer la descendance virale (Cotmore et Tattersall, 1992) qui possède toujours 18 nucléotides supplémentaires et la protéine NS1 en 5'. Lorsque l'ADN est encapsidé, ces

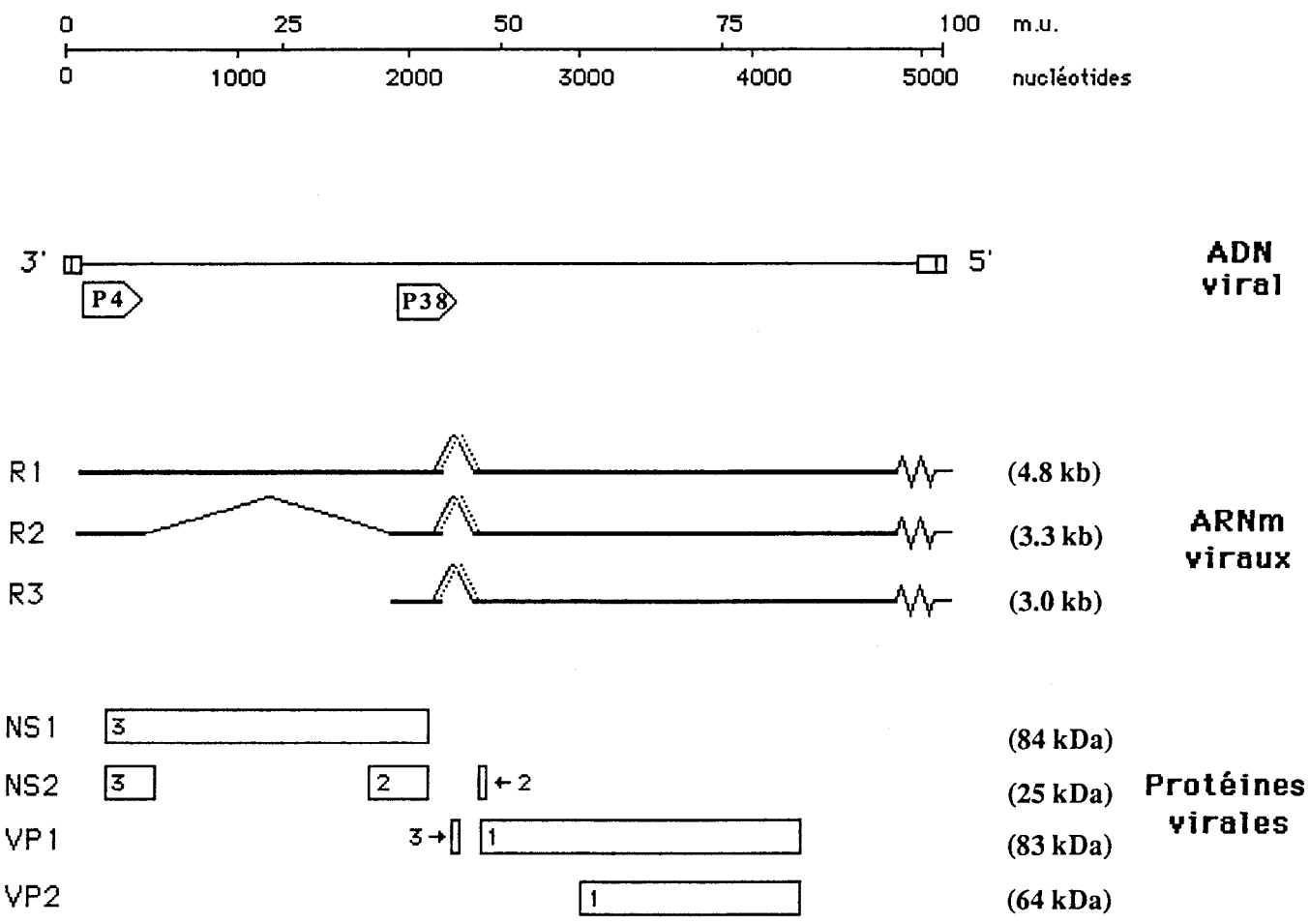


Figure 4 : Organisation génomique du parvovirus MVM

- : Palindrome
- ◀ : Séquence promotrice
- : ARNm
- △ : Séquence intronique
- ⚡ : Séquence polyadénylée
- 1,2,3 : Phase de lecture

éléments surnuméraires (dont on pense qu'ils ont un rôle à jouer dans l'empaquetage du génome) restent à l'extérieur de la coque protéique (Cotmore et Tattersall, 1989 ; Faust et al., 1989), d'où ils ne seront éliminés que plus tard, probablement au cours d'un cycle d'infection ultérieure (il est, en effet, possible d'immuniser un animal contre la protéine NS1 avec une simple infection parvovirale alors que cette protéine n'est pas censée sortir seule de la cellule).

b) Régulation

L'identification d'effecteurs viraux nécessaires à la réplication provient originalement d'études sur les AAV pour lesquels des systèmes de réplication *in vitro* ont été développés de manière plus précoce. Les palindromes sont requis et particulièrement les 55 pb terminales (Hong et al., 1992). Ils servent d'origine de réplication et constituent le site de fixation de complexes comportant les protéines rep 78/68 (Im et Muzyczka, 1989) et des facteurs cellulaires non encore identifiés (Ashktorab et Srivastava, 1989). Ces complexes reconnaissent non seulement la séquence primaire du palindrome mais également sa conformation en épingle à cheveux. A côté de ces séquences agissant en *cis*, les protéines non structurales, rep 78/68 pour les AAV et NS1 pour les parvovirus autonomes (Rhode et Paradiso, 1989 ; Rhode, 1989) sont indispensables. En particulier, il existe, dans ces protéines, une séquence très conservée parmi tous les parvovirus capable de fixer les nucléotides purines. Des mutations de ce domaine dans rep 78/68 inhibent la réplication de manière dominante en *trans* (Owens et al., 1991 ; Owens et Carter, 1992). La protéine se fixe toujours sur les palindromes mais n'a plus d'activité enzymatique dépendante de l'ATP. L'importance de cette séquence a été également montrée pour la NS1 de H-1 (Li et Rhode, 1990) et MVM (Skiadopoulos et al., 1992). Les autres protéines non structurales d'AAV, rep 50/42 ne semblent être requises que pour les étapes ultérieures de la réplication car leur absence inhibe l'accumulation d'ADN simple-brin fils (Chejanovsky et Carter, 1989).

Il semble qu'au point de vue cellulaire, l'ADN polymérase α soit la maîtresse d'oeuvre de la réplication parvovirale (Kolleck et al., 1982). Néanmoins, les études ayant amené à cette conclusion sont basées sur l'utilisation de l'Aphidocoline qui bloque également l'action de l'ADN polymérase δ . Il n'est donc pas exclu que cette dernière soit un élément essentiel dans la production de l'ADN viral.

3. Organisation génomique et transcription

a) A ma gauche : les protéines non structurales !

A l'exception de certains Densovirus et du parvovirus B19 (Bando et al., 1987 ; Ozawa et al., 1987), les parvovirus présentent une organisation génomique bien conservée (Cotmore et

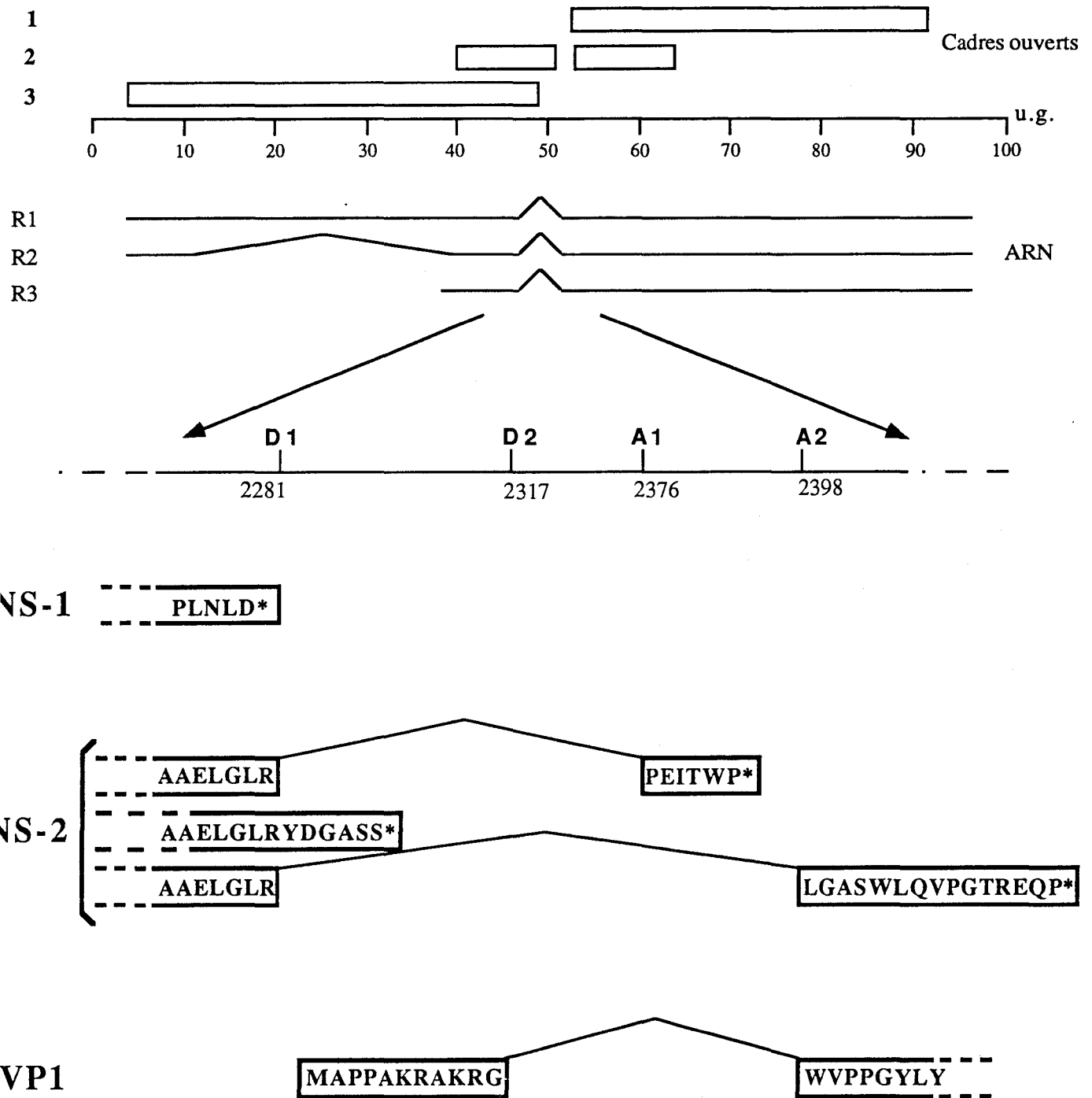


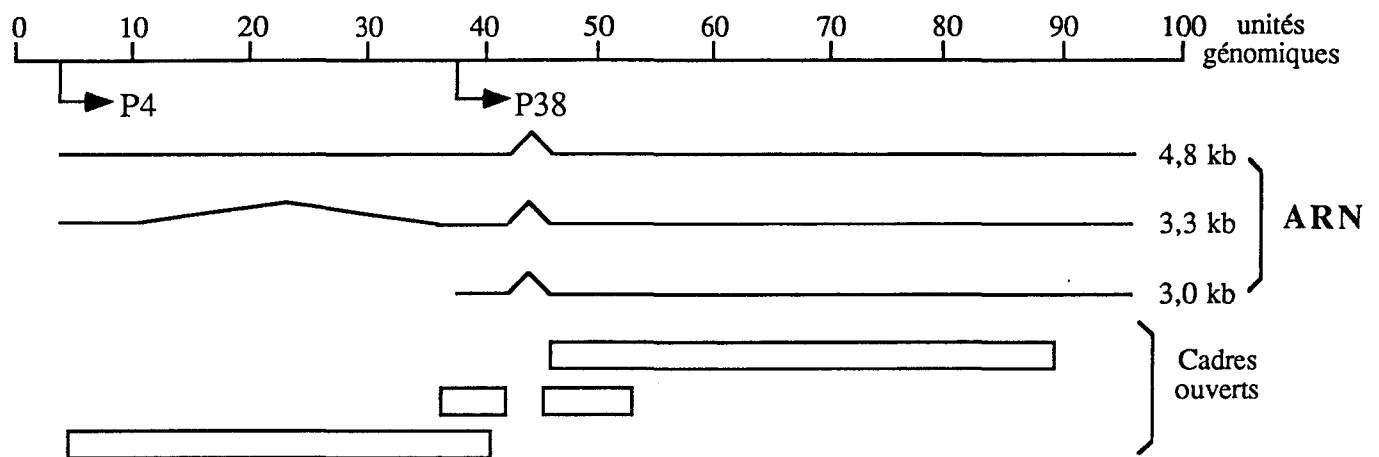
Figure 5 : Le petit intron de MVM et les isoformes de NS2 qui en résultent

Tattersall, 1987). La moitié "gauche" du génome (par convention : l'extrémité 3'OH du brin viral) porte des séquences codant des protéines régulatrices de différentes étapes du cycle viral (figure 4). Chez les Parvovirus autonomes, un seul promoteur situé entre 4 et 6 unités génomiques (u. g. : pourcentage de la longueur totale) contrôle la transcription d'un ARN génomique et qui est rapidement épissé en deux ARNm (R1 et R2, d'une longueur de 4,8 et 3,3 kb, respectivement). R1 porte les séquences codant la protéine NS1 (pour non structurale) d'un poids moléculaire apparent de 83 kDa. L'épissage du grand intron (entre les nucléotides 515 et 1991 chez MVM) produit l'ARN R2 à partir duquel est traduite la protéine NS2 (25 kDa). Celle-ci possède 84 aa N-terminaux en commun avec NS1. L'ARN R2 est présent en quantité plus importante que R1 (Schoborg and Pintel, 1991). Ces deux ARN étant issus du même promoteur, il doit donc exister un système de régulation favorisant l'épissage du grand intron dont on sait fort peu de choses. Les protéines présentent des quantités relatives inverses par rapport à celles de leur ARN progéniteurs. Bien qu'il semble que dans certains cas (6h après l'infection) la synthèse de NS2 soit plus importante que celle de NS1 (Cotmore et Tattersall, 1990), plus tard dans l'infection, NS1 est le produit non structural majeur. Ceci peut être expliqué par une plus grande stabilité de la protéine NS1.

Une certaine hétérogénéité existe au niveau de l'épissage du petit intron (figure 5). Deux sites donneur (pour MVM, les nucléotides 2280 et 2317) et deux sites accepteur (nucléotides 2377 et 2399) ont été identifiés (Astell et al., 1984 ; Pintel et al., 1983). Parmi les quatre combinaisons théoriquement possibles, seules trois ont été mises en évidence dans les ARNm (Morgan et Ward, 1986), en des proportions variées. Il convient néanmoins de préciser que ces expériences n'ont pas été faites par la technique de PCR qui, par sa plus grande sensibilité, pourrait modifier les résultats. Pour expliquer l'absence expérimentale de la quatrième combinaison, ces auteurs ont invoqué la petitesse de l'intron qui en résulterait, impossible à épisser. Si ces phénomènes n'ont guère d'importance pour la protéine NS1 (son cadre de lecture se termine avant le site d'épissage), NS2 représente en fait une famille de protéines légèrement différentes (de 6 à 15 aa) en leur extrémité C-terminale. Les conséquences physiologiques de cette hétérogénéité sont encore floues. L'existence d'une NS2 dans la famille des virus CPV et FPV n'est pas démontrée.

La situation est plus complexe chez les AAV (voir la figure 6 pour une comparaison des organisations génomiques des deux types viraux), où quatre protéines non structurales appelées "rep" existent (des mutations dans leur séquence affectant la réplication de l'ADN viral sont à l'origine de leur nom ; Hermonat et al., 1984). rep 78 et rep 68 sont produites à partir d'ARNm initiés au promoteur P5. Un autre promoteur a également été identifié à 19 u. g. (Lusby et Berns, 1982) dirigeant la synthèse de deux ARNm traduits en protéines rep 50 et rep 42. Un phénomène d'épissage facultatif distingue, ici aussi, les deux ARN de chaque paire.

Minute Virus of Mice



AAV 2

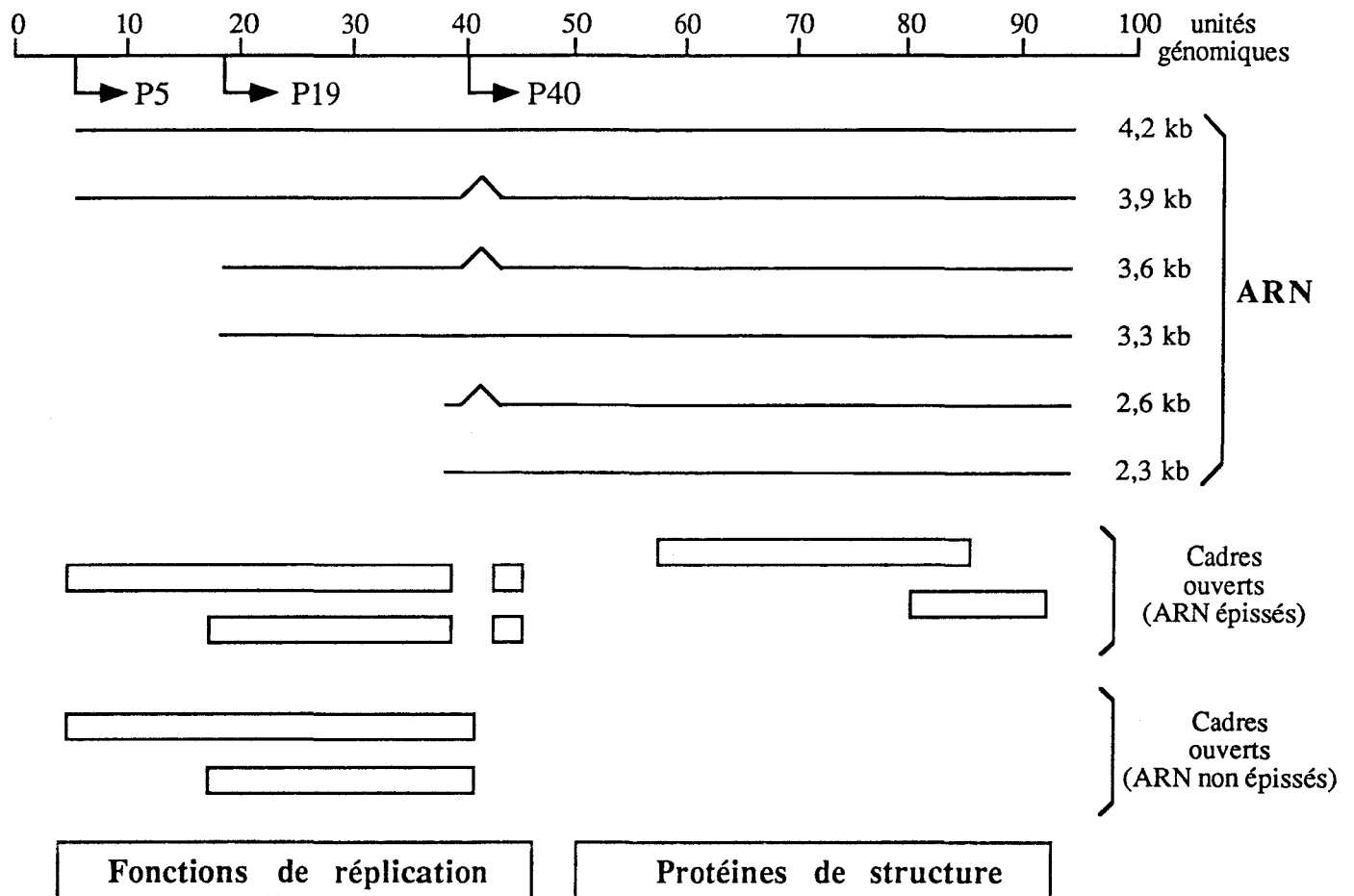


Figure 6 : Organisation génomique comparée des parvovirus autonomes et Adéno-associés

b) A ma droite : les protéines de capsid !

La moitié "droite" du génome (5'P) contient les zones codantes des protéines de structure (Cotmore et Tattersall, 1987). Un promoteur présent vers 38 à 40 u. g. (P38 chez MVM) dirige la synthèse de l'ARNm R3 (3,0 kb). Là encore, chez les parvovirus autonomes, l'épissage du petit intron est hétérogène (voir figure 3). Suivant le type d'épissage utilisé, un site d'initiation de traduction situé en position 2286 (donc entre les deux sites donneurs d'épissage) sera présent ou absent. Cet AUG est utilisé pour la protéine VP1 (83 kDa). A partir des ARN ne contenant pas l'AUG 2286, un codon d'initiation (situé au nucléotide 2794) est utilisé pour traduire la protéine VP2 (67 kDa). Le cadre de lecture de ces deux protéines de structure est néanmoins commun (VP2 est donc entièrement contenue dans VP1) et leur rapport quantitatif (5 VP2 pour 1 VP1) est proportionnel au rapport de leur ARNm respectif (Clemens et Pintel, 1988). La protéine VP3 est produite par clivage protéolytique de VP2 (Johnson, 1983) alors que chez les AAV, elle résulte d'une initiation de la traduction en aval (Becerra et al., 1985). L'existence d'un second promoteur chez le parvovirus B19 est controversée. Certains travaux font état d'une activité promotrice localisée à 44 u.g. (Doerig et al., 1990), d'autres considèrent que tous les messagers viraux sont initiés au promoteur P6 (Blundell et al., 1987 ; Ozawa et al., 1987 ; Liu et al., 1992). B19 semble posséder de ce fait une organisation transcriptionnelle différente des autres parvovirus.

Les signaux de polyadénylation sont localisés entre 94 et 96 u. g. (Srivastava et al., 1983 ; Astell et al., 1984) et sont utilisés pour tous les types d'ARN précédemment décrits. B19 (dont on finit par se demander s'il n'aurait usurpé sa place chez les parvoviridae) fait encore exception (cette fois en compagnie de l'ADV [Aleutian Disease Virus]) puisqu'un signal de polyadénylation à 40 u. g. a été démontré comme étant également fonctionnel (Ozawa et al., 1987 ; Alexandersen et al., 1988 ; Liu et al., 1992).

4. Fonctions des protéines

La protéine NS1 est la protéine non structurale majeure et a une localisation nucléaire (Cotmore et Tattersall, 1986). La seule modification post-traductionnelle décrite est l'existence de phosphorylation sur des résidus Ser (Paradiso, 1984). Des alignements de séquences (Iversen et Rhode, 1990) ont pu montrer l'existence, dans NS1, d'une zone d'homologie avec un domaine des protéines précoces de papovavirus (l'antigène T de SV40 par exemple) responsable de leur activité ATPasique. Chez les parvovirus, des mutations de ce domaine affectent différentes activités de la protéine (Li et Rhode, 1990 ; Skiadopoulos et al., 1992 ; Legendre et Rommelaere, 1992). Celle-ci intervient non seulement dans la régulation de la réplication de l'ADN parvoviral mais également dans la régulation de l'activité de différents

promoteurs tant parvoviraux qu'hétérologues (Rhode, 1985 ; Rhode et Richard, 1987 ; Doerig et al., 1990).

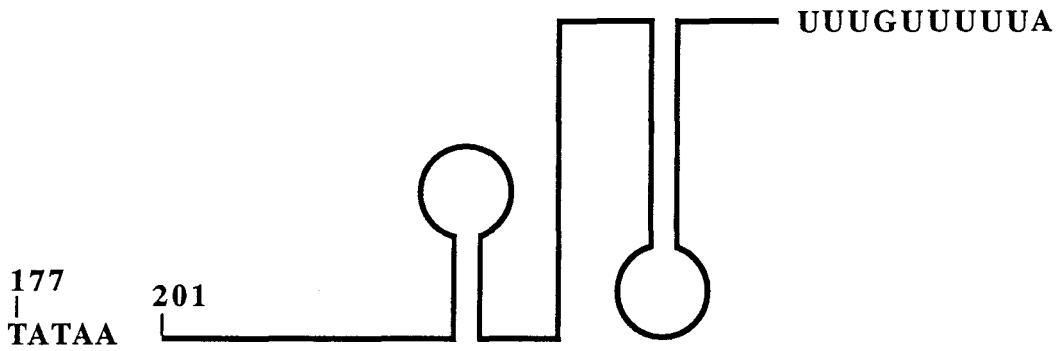
NS2 peut être localisée dans le cytoplasme et dans le noyau de la cellule infectée. Elle est décrite comme existant sous diverses formes, en raison non seulement de son hétérogénéité C-terminale, mais également d'un taux de phosphorylation variable. Elle semble être une protéine multifonctionnelle, intervenant dans la synthèse de l'ADN et des protéines viraux (Li et Rhode, 1991) avec, bien entendu, des répercussions sur la production des particules virales (Brownstein et al., 1992). Néanmoins, ce type d'effet semble exhiber une certaine spécificité d'espèce, NS2 n'étant requise que dans les cellules de l'hôte naturel du virus (Naeger et al., 1990 ; Cater et Pintel, 1992).

Outre leur rôle dans la constitution de la capsid virale, les protéines VP interviennent dans certaines étapes précoces du cycle viral. Nous avons vu qu'il existe deux souches de MVM : MVMp se multiplie efficacement dans les fibroblastes alors que MVMi a pour cible les lymphocytes T (Bonnard et al., 1976). Par deux approches différentes (la construction de chimères génomiques MVMp-MVMi [Gardiner et Tattersall, 1988a], et la comparaison des productions d'ARN dans les cas d'infection ou de transfection de ces génomes [Gardiner et Tattersall, 1988b]), il a pu être montré que la différence essentielle entre ces deux souches de virus réside dans la zone codante des protéines de capsid. Ces mutations semblent avoir des répercussions sur l'activité du promoteur P4. Des résultats voisins ont été obtenus par Parrish et Carmichael (1986) qui ont sélectionné un mutant "host-range" (changement d'hôte) du CPV se répliquant dans les cellules d'origine féline et non plus canine. Là encore, les mutations cruciales sont localisées dans la zone codant les protéines de capsid.

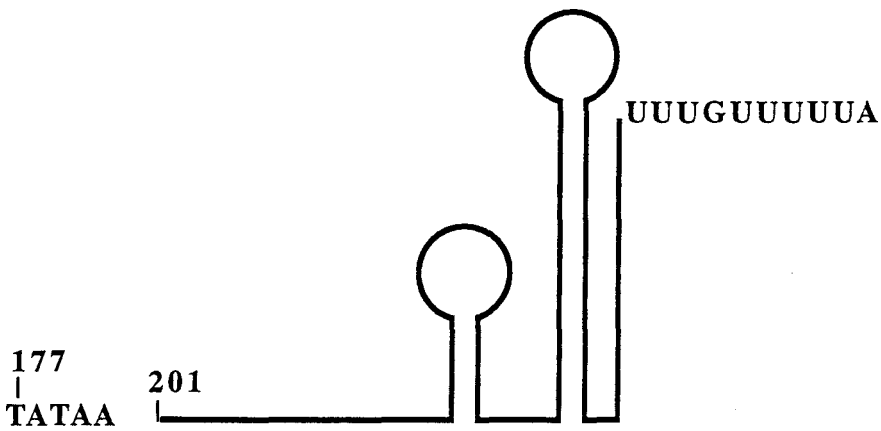
5. Régulation de la transcription.

a. Facteurs généraux

De nombreux auteurs ont montré l'intime dépendance de la réplication parvovirale à l'égard de facteurs cellulaires et notamment de certains d'entre eux transitoirement exprimés durant la phase S du cycle cellulaire (voir pour revue Cotmore et Tattersall, 1987 ; Rommelaere et Tattersall, 1990 ; Rommelaere et Cornelis, 1991). La conversion, en phase S, de l'ADN viral d'une forme simple-brin en une forme bicaténaire semble nécessaire mais non suffisante à déclencher la transcription comme en témoigne le blocage du cycle des variants MVMp et MVMi dans des cellules A9. Il y a, pour ces deux virus, amplification de l'ADN mais pas transcription (Spalholz et Tattersall, 1983) du génome de MVMi. Les mécanismes de la dépendance des parvovirus à l'égard de la phase S seront étudiés ultérieurement. Il semble que



Configuration atténuante : arrêt de synthèse



Configuration "readthrough" : extension

Figure 7 : Deux structures secondaires de l'extrémité 5' des ARN R1/R2

les facteurs liés à la différenciation cellulaire pouvant déterminer la sensibilité des cellules à l'attaque parvovirale (v. plus haut) jouent au niveau de la transcription.

En travaillant sur des cellules synchronisées, Clemens et Pintel (1988) ont pu démontrer qu'il existe, chez MVM, un ordre temporel d'expression des promoteurs, P4 étant actif avant P38. Ce type de régulation séquentielle est d'ailleurs présent chez de nombreux types de virus à ADN, papovavirus (Keller et Alwine, 1984), adénovirus (Nevins, 1981) ou herpesvirus (Post et al., 1981) pour lesquels il existe, comme chez nos virus, des unités de transcription dites précoces codant des protéines régulatrices et d'autres dites tardives comprenant des protéines de structure. Ces résultats sont cohérents avec le phénomène bien décrit de transactivation par les protéines non structurales parvovirales du promoteur P38 (Rhode, 1985).

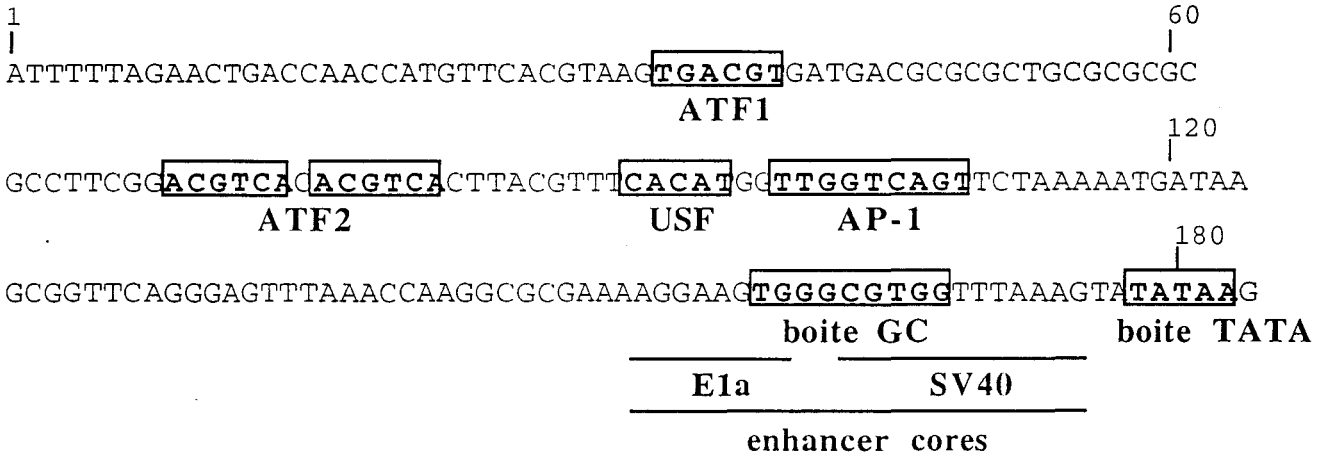
b) Régulation du promoteur P4

Le transcription à partir du promoteur P4 peut être régulée par atténuation (Ben-Asher et Aloni, 1984) avec terminaison prématurée de l'élongation des pré-messagers vers 142-147 nucléotides après le site d'initiation (figure 7). Le début de la séquence transcrite est en effet palindromique et peut adopter une conformation favorisant cette terminaison anticipée. Des ARN courts correspondant à des transcrits atténués ont été détectés à des phases tardives de l'infection (Resnekov et Aloni, 1989). L'atténuation a été également suggérée comme un mode possible de régulation du taux des différents messagers du parvovirus B19 (Liu et al., 1992).

Plusieurs auteurs s'accordent pour dire que le promoteur P4 est un promoteur fort, constitutif (du moins dans les cellules où il est actif). Des comparaisons de séquences ont permis de mettre en évidence, d'une part, des régions d'homologie avec les enhancers de différents virus à ADN (SV40, Polyome, Adénovirus) suggérant que les mêmes facteurs cellulaires peuvent contrôler la transcription de ces virus et des parvovirus, d'autre part, des sites putatifs de fixation de facteurs de transcription déjà décrits (Bodnar, 1988 ; illustré sur la figure 8). Ceci semble indiquer une régulation complexe, à plusieurs niveaux par des éléments concentrés sur une courte séquence d'ADN constituant le promoteur P4.

Les études sur l'implication de ces divers éléments dans la régulation du P4 n'en sont qu'à leurs débuts. Le groupe de David Ward ne reconnaît d'importance fonctionnelle qu'aux boîtes TATA et GC qui seules seraient capables de conférer une forte activité transcriptionnelle au promoteur précoce (Ahn et al., 1989 ; Pitluk et Ward, 1991). On sait, certes, qu'une homologie de séquence ne signifie que peu de choses (et particulièrement pour les sites de fixation de facteurs de transcription où les séquences étudiées sont courtes). En dépit du caractère subversif de cet argument finaliste, on n'imagine que difficilement un rôle purement décoratif pour ces séquences putatives. Dans ce sens, des expériences de footprinting réalisées dans notre laboratoire ont révélé la présence, dans le promoteur P4, de nombreuses régions

Promoteur P4



Promoteur P38

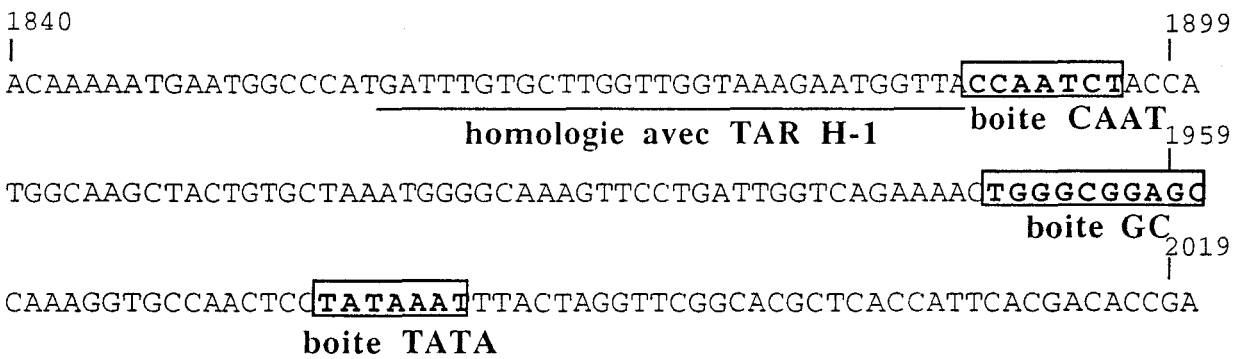


Figure 8 : Les promoteurs de MVMp et leurs séquences putativement importantes

fixant des protéines cellulaires (Faisst et al., en préparation) : les boîtes TATA et GC déjà identifiées, mais aussi des sites putatifs ATF, E-box... Des expériences de retard sur gel réalisées sur les deux sites ATF montrent que ces séquences sont effectivement capables de fixer des complexes protéiques possédant certaines caractéristiques des facteurs ATF/CREB. Nous cherchons actuellement à déterminer si ces séquences activent *in cis* un promoteur minimal (tk de HSV) et ce d'une manière dépendante de l'AMP cyclique.

L'existence d'une E-box laissait supposer la fixation de facteurs de transcription appartenant à la même classe que MyoD et caractérisés par une région basique (b) intervenant dans la fixation à l'ADN et un domaine helix-loop-helix (HLH) favorisant l'homo- ou l'hétérodimérisation avec des protéines HLH. En aval de la boîte E existe une séquence consensus dégénérée susceptible de fixer le complexe AP1. Celui-ci est généralement un hétérodimère d'une protéine de la famille de *c-fos* et d'une de la famille de *c-jun* (bien que des homodimères *jun-jun* aient été mis en évidence) (Jones, 1990). C'est un domaine leu-zipper (zip) qui régit l'interaction entre les constituants du dimère. L'étude de cette région du promoteur P4 a permis de démontrer l'existence de complexe constitué de *c-fos* (ou d'une protéine très proche structurellement) et de la protéine USF (Upstream Stimulatory Factor) (Plaza et al., en préparation). Cette dernière protéine, d'expression assez ubiquitaire, a été initialement identifiée comme se fixant sur et activant le promoteur tardif des Adenovirus d'où son appellation de MLTF (Major Late Transcription Factor). Elle fait partie d'une sous-classe de protéine possédant, outre les régions bHLH, un domaine zip pouvant servir de second site d'interaction avec des facteurs de transcription. La séquence E semble importante puisque des mutations inhibant la fixation d'USF diminuent le taux de transcription du P4. Là encore, nous tentons actuellement de déterminer si la séquence E confère une activation *in cis* à un promoteur minimal.

Ainsi, l'étude du promoteur P4 a permis de mettre en évidence un des rares cas d'association de facteurs de transcription appartenant à des classes différentes, même si l'interaction entre *c-fos* et un nouveau facteur apparenté à USF (appelé FIP pour Fos-Interacting Protein) a déjà été démontrée (Blonar et Rutter, 1992).

Il est à noter qu'un site de fixation pour MLTF a été identifié dans l'un des promoteurs précoces (P5) du virus AAV2 (Chang et al., 1989). Néanmoins, ce site semble contribuer négativement au taux d'expression basale du promoteur et être impliqué dans l'activation du P5 par les produits du gène E1A des Adenovirus.

Les protéines NS (et particulièrement NS1) interviennent dans le contrôle de l'activité du promoteur P4. Il existe néanmoins une controverse sur le sens de cette intervention. Rhode et Richard (1987) ont mis en évidence une régulation négative du P4 du virus H-1 par son propre produit, tandis que Doerig et al. (1990) suggèrent un effet de transactivation du P4 de MVM et B19 par la protéine NS1. Il est à noter que chez les AAV, les promoteurs précoces sont

réprimés par leurs produits (Beaton et al., 1989). Ce schéma semble typique des virus à ADN comme en témoignent, par exemple, les cas de SV40 (Reed et al., 1976) ou HSV (Preston, 1979).

L'explication de ces divergences peut résider dans les différents virus et cellules utilisés. Alternativement, le promoteur précoce étant un promoteur fort, la transfection transitoire d'une grande quantité d'ADN possédant ce promoteur pourrait masquer un effet positif de NS1 : on ne peut stimuler ce qui est déjà en expression maximale. Au demeurant, rien n'interdit d'imaginer une régulation du P4 par NS1 en deux étapes : positive au début du cycle viral puis négative lors des phases ultérieures quand NS1 est requise pour la transactivation. Une hypothèse d'interférence transcriptionnelle (squenching) peut également être proposée comme pour GAL4 ou VP16 : un excès de transactivateur pouvant conduire à une répression par séquestration de cofacteurs dans le nucléoplasme (Ptashne, 1988).

Nous verrons ultérieurement que la régulation du P4 peut et doit être considérée dans le cadre des mécanismes de l'oncosuppression.

c) Régulation du promoteur P38

Le promoteur P38 est constitutivement très faible et nécessite, pour une activité optimale, la présence de la protéine NS1. D'un point de vue finaliste, ce type de régulation (également présent, par exemple, chez SV40) est évidemment intéressant : il n'y a synthèse des protéines structurales qu'en bout de course, quand les fonctions de réplication de l'ADN sont remplies ou, du moins, bien engagées. Il semblerait que seule NS1 soit impliquée (NS2 semble inactive) dans la transactivation (Doerig et al., 1988, 1990 ; Legendre et Rommelaere, 1992) réalisée par des mécanismes encore mal connus. On ne sait si NS1 agit directement ou indirectement mais cette protéine n'ayant jamais pu être montrée comme se fixant à l'ADN (du moins au sens d'un facteur de transcription, contactant l'ADN de manière transitoire), on peut en déduire l'existence de cofacteur(s) probablement d'origine cellulaire. Ce(s) cofacteur(s) pourrai(en)t être un (des) activateur(s) de transcription régulé(s) de manière positive ou un(des) répresseur(s) inhibé(s) par NS1.

Plusieurs groupes ont essayé de définir la région du P38 impliquée dans la transactivation par NS1. Krauskopf et al. (1990) ont fait état de l'existence d'un élément fondamental situé en aval du site d'initiation de la transcription. Néanmoins, les travaux d'autres groupes travaillant sur la transactivation semblent confiner cette région à un rôle mineur (si tant est qu'elle en ait un). En effet, des constructions du P38 dépourvues de cette zone peuvent toujours être transactivées à un taux identique par rapport au promoteur de type sauvage.

Le groupe de Rhode est parvenu, par des expériences utilisant des mutants de délétion en 5' du promoteur P38 du parvovirus H-1, à identifier une région baptisée tar (transactivating region, Rhode and Richard, 1987 ; voir figure 8), dont l'absence réduit la transactivabilité du promoteur par la protéine NS1 (Gu et al., 1992). Cette région, située entre -137 et -116 par rapport au site d'initiation de la transcription, semble posséder certaines propriétés des enhancers puisqu'elle est capable, en présence de NS1, d'activer en *cis* le P38 quelle que soit son orientation. Néanmoins, elle est inefficace lorsqu'elle est clonée en aval du promoteur. Ce même groupe a récemment montré (Gu et Rhode, 1992) la fixation de plusieurs complexes protéiques sur un oligonucléotide de synthèse dont la séquence correspond à la région tar. Le taux d'un de ces complexes, semble-t-il formé d'une protéine de 75 kDa encore non identifiée mais d'origine cellulaire (elle n'est, en effet, pas reconnue par un antisérum dirigé contre la protéine NS1), est augmenté par l'infection par le parvovirus H-1. Un autre complexe, formé cette fois d'une protéine de 83 kDa et qui représente le complexe majeur de fixation sur l'oligonucléotide tar, voit son taux diminuer avec la présence de H-1. Deux critiques peuvent être émises à propos de l'identification de cette région. D'une part, elle semble être inactive à l'égard d'un promoteur hétérologue (i.e. : clonée en amont du promoteur précoce de SV40, elle ne confère aucune transactivabilité par NS1). D'autre part, les mutations dans cette séquence ne réduisent le pouvoir transactivant de NS1 que d'un maximum de 60% sans effet de synergie entre elles (y compris dans le cas d'une combinaison de quatre mutations). Les auteurs en ont tiré des conclusions concernant, respectivement, la spécificité de la région tar à l'égard du P38 et l'existence d'une autre région impliquée dans la transactivation.

Le groupe de David Ward a d'abord reconnu l'existence de la région tar chez le parvovirus MVM (Gavin et Ward, 1990). Des comparaisons d'efficacité de transcription *in vivo* et *in vitro* ont amené la conclusion que cette région serait à la fois responsable de la répression de l'expression du promoteur dans les cellules non infectées et d'un effet positif dans les cellules infectées (ce qui est cohérent avec l'existence d'au moins deux complexes protéiques se fixant sur cette région, Gu et Rhode, 1992). Néanmoins, des expériences plus récentes de linker-scanning mutants (insertion de fragment d'ADN à divers endroits du promoteur P38) semblent indiquer que l'interruption de la séquence tar n'a aucun effet (Ahn et al., 1992). Seules les boîtes GC et TATA seraient impliquées dans la transactivation par NS1 (voir la figure 8). Les expériences de footprint à la DNase I n'ont, de plus, révélé la fixation de complexes protéiques que sur ces deux seules zones.

Ces deux derniers groupes sont néanmoins d'accord sur le caractère indirect de l'effet de NS1. Ahn et al. (1992) ont suggéré pour NS1 un rôle d'adaptateur, intermédiaire entre les facteurs fixant les boîtes GC et TATA, par analogie à celui proposé pour les protéines Sp1 (Pugh et Tjian, 1990) et E1a de l'adénovirus (Schöler et al., 1991). D'autres mécanismes, par ailleurs non nécessairement exclusif de celui décrit précédemment, peuvent inclure la modification, par NS1, des protéines se fixant sur les régions tar, GC et/ou TATA. Le taux de

phosphorylation des protéines se fixant sur la région tar ne semble néanmoins pas être impliqué (Gu et Rhode, 1992).

Chez les AAV, le promoteur P40 est également stimulé par les protéines rep 78/68 (Labow et al, 1986). Les séquences requises en *cis* pour la transactivation semblent être réparties à divers endroits du génome, non seulement en amont du promoteur P40 mais également en amont des promoteurs P5 et P19 sans qu'il faille nécessairement que ceux-ci soient actifs (McCarty et al., 1991).

III. ONCOSUPPRESSION

1. Considérations générales

Le fait que les parvovirus ont été isolés à partir de tumeurs a d'abord conduit à supposer que ces virus pourraient être des agents causatifs de cancers. Aucune observation expérimentale n'étant venue ultérieurement étayer cette hypothèse, il apparaît donc que la relation parvovirus-tumeurs est dûe à la nature opportuniste de ces virus (Rommelaere and Tattersall, 1990). Nous avons en effet vu plus haut que les parvovirus ne peuvent se répliquer que dans des cellules à haute activité mitotique. Les tumeurs chez l'animal fourniraient donc aux parvovirus un substrat idéal dans lequel se répliquer. Comme le virus est doté de propriétés lytiques, il semble donc que les parvovirus pourraient interférer négativement avec le développement des tumeurs chez l'animal, la constatation d'oncotropisme viral amenant à l'hypothèse d'oncosuppression.

Les premières données justifiant cette hypothèse remontent aux années 60 où Helen Toolan a montré que des hamsters ayant survécu à une infection néo-natale par le parvovirus H-1 développent 5 à 25 moins de tumeurs spontanées que leurs congénères non infectés. De plus, les tumeurs se développant dans un animal infecté présentent souvent un délai d'apparition et une taille réduite. Cette protection parvovirale est capable de s'exercer à l'égard de tumeurs induites par différents moyens expérimentaux : carcinogènes chimiques (Toolan et al., 1982), virus oncogènes comme les Adenovirus, SV40, le rétrovirus MoMuLV (Rommelaere, 1990 ; Rommelaere et Tattersall, 1990 ; Rommelaere et Cornelis, 1991). L'infection parvovirale inhibe également chez l'animal, le développement de tumeurs à partir de cellules tumorigènes (Guetta et al., 1986). L'inhibition de la tumorigénicité virale ou cellulaire est également exercée par les AAV (De la Maza et Carter, 1981 ; Ostrove et al., 1981) mais de manière plus restreinte et semble être principalement efficace dans les cas impliquant les virus assistant des AAV. Ceci suggère donc que l'oncosuppression exercée par les AAV serait un reflet des relations AAV-virus auxiliaire. A l'opposé, le caractère général de l'effet

oncosuppresseur des parvovirus autonomes pourrait indiquer que les fonctions de complémentation du cycle viral peuvent être fournies par la cellule hôte. La surveillance parvovirale est fonction du type d'inoculation et de la quantité relative de particules virales et de cellules transformées. Comme il a pu être démontré dans notre laboratoire, le parvovirus H-1 a non seulement des vertus protectrices mais également curatives (bien que dans une moindre mesure) à l'égard de la tumorigénicité de cellules épithéliales mammaires humaines (Dupressoir et al., 1989). Si 80% de la population humaine est ou a été infectée par les AAV, des études épidémiologiques ont permis de montrer une corrélation inverse entre séropositivité à l'égard de différentes souches de ces virus et incidence de certains types de cancers comme les carcinomes de la prostate et du col utérin (là encore, remarquons, d'une part, l'association entre ces tumeurs et le virus HSV2, d'autre part, le fait que ce dernier est un virus assistant des AAV).

Il peut paraître paradoxal de parler d'oncosuppression par les parvovirus tout en constatant qu'ils ont été majoritairement isolés à partir de tissus tumoraux et à quel point ils sont largement répandus dans la population : s'ils étaient si efficaces, le problème du cancer ne se serait-il pas résolu de manière "naturelle" ? La réponse à cette apparente contradiction peut résider dans la vitesse de croissance d'une tumeur qui peut être supérieure à la réplication du virus *in vivo*, saturant ainsi ce dernier. D'autres arguments peuvent être invoqués : type de tumeur (tous les tissus tumoraux ne sont pas sensibles à l'attaque parvovirale) ou élimination du virus par le système immunitaire...

On pourrait attribuer l'effet oncosuppresseur du parvovirus à une action positive de celui-ci sur un système de surveillance antitumorale de l'animal. Néanmoins, il semble qu'une interaction directe entre parvovirus et tumeurs soit à l'origine de la régression de celles-ci. En effet, des empreintes virales (ADN, protéines) ont été détectées dans les cellules implantées sur l'animal. De plus, ces expériences sont reproductibles dans des souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) qui sont dépourvues d'immunité humorale et aucune invasion de la tumeur par des cellules du système immunitaire de l'animal n'a pu être mise en évidence par analyse anatomo-pathologique (T. Dupressoir, communication personnelle). Il apparaît donc que l'oncosuppression parvovirale est due à un effet lytique direct du virus sur les cellules tumorales.

Le développement d'une tumeur *in vivo* est un processus complexe faisant intervenir de multiples paramètres. L'étude de l'inhibition de ce développement par un virus ajoute un degré de complexité supplémentaire. Il est donc très tôt apparu nécessaire de déterminer si l'effet oncosuppresseur peut être reproduit sur des cellules en culture et, si oui, par quels mécanismes. Ces deux approches (*in vivo* et *in vitro*) sont complémentaires l'une de l'autre et peuvent fournir d'utiles renseignements non seulement d'ordre virologique mais aussi sur la cancérisation et le développement des tumeurs. Les parvovirus peuvent donc être également considérés comme des "sondes" de l'état transformé. Les différents effets des parvovirus sur les paramètres de la vie cellulaire sont résumés sur le tableau III.

| Perturbation cellulaire | Effecteurs parvoviraux | Références |
|---|--|--|
| Inhibition de l'amplification d'ADN | Séquences terminales Protéines non structurales (AAV) | Bantel-Schaal et zur Hausen, 1988 Heilbronn et al., 1990 |
| Inhibition de l'expression de promoteurs hétérologues | Protéines non structurales Rep/NS (AAV2, H-1, MVM) | Labow et al., 1987 Rhode et Richard, 1987 Brandenburger et al., 1990 Legendre et Rommelaere, 1992 |
| Inhibition de la transformation stable | Protéines non structurales Rep/NS (AAV2, H-1, B19, MVM) | Labow et al., 1987 Rhode, 1987 Ozawa et al., 1988 Brandenburger et al., 1990 |
| Inhibition de la transformation oncogène <i>in vitro</i> | Protéines non structurales Rep (AAV2) | Hermonat, 1989 |
| Effet cytostatique | Composants du virion (AAV2) | Winocour et al., 1988 |
| Effet lytique | Protéines non structurales NS (MVM) | Caillet-Fauquet et al., 1990 Legendre et al., 1992 |

Tableau III : Effets des parvovirus sur la vie cellulaire

d'après Rommelaere, 1990

2. Approche in vitro

L'effet oncosuppresseur des parvovirus sur des cellules en culture a été étudié par différentes approches. Mousset et Rommelaere (1982) ont sélectionné des cellules Balb/c pour leur résistance au parvovirus MVM. La transformation de ces cellules par SV40 (mesurée par leur capacité à former des colonies en agar mou) est inhibée par l'infection par le parvovirus MVM. L'effet antinéoplasique des parvovirus est donc reproductible in vitro et peut être dû à une toxicité de ceux-ci à l'égard des cellules malignes ou de leurs précurseurs. Ces travaux indiquent également que la transformation par SV40 sensibilise au parvovirus des cellules *a priori* résistantes.

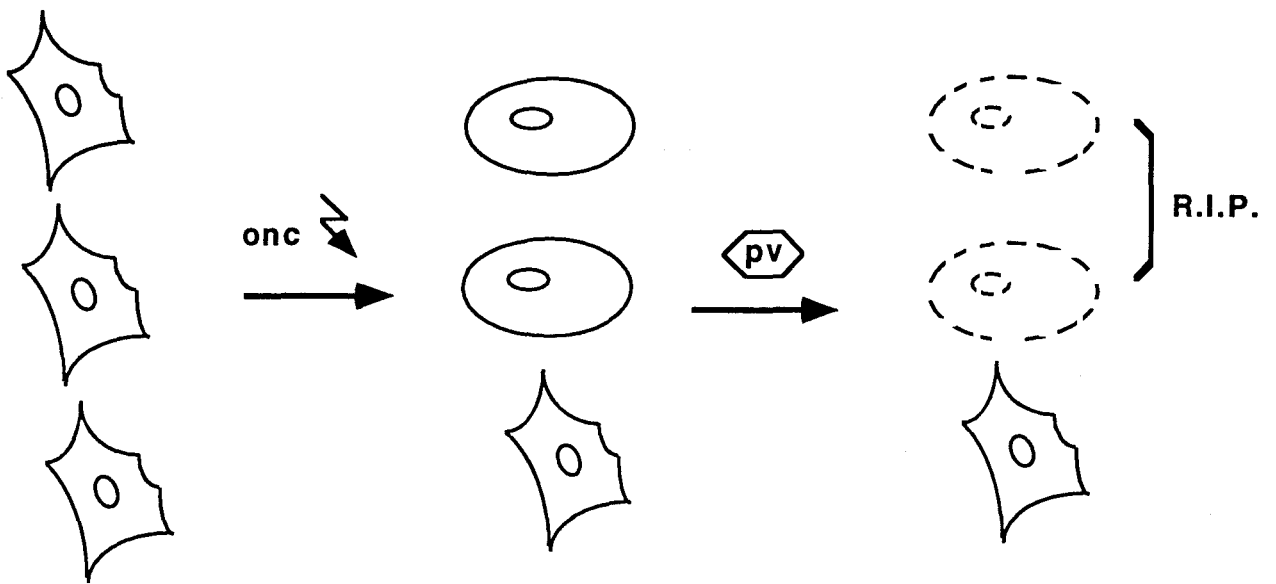
Divers travaux ont confirmé l'activité antitransformante des parvovirus sur d'autres systèmes cellulaires. La transformation par SV40 augmente les capacités lytiques des parvovirus MVM et H-1 à l'égard des cellules NIH 3T3, des fibroblastes humains (Chen et al., 1986), des kératinocytes (Chen et al., 1989) et des cellules épithéliales mammaires humaines (Dupressoir et al., 1989). D'autre part, cette sensibilisation n'est pas limitée à SV40, différents agents carcinogènes étant dotés de cette propriété : l'antigène moyen T du virus du polyome (Mousset et al., 1986), des agents physiques ou chimiques (Cornelis et al., 1988a), des oncogènes viraux ou cellulaires activés comme *v-myc*, *v-src* ou *c-Ha-ras* (Salomé et al., 1990). Néanmoins, il convient de ne pas tomber dans un modèle de tout ou rien. La nature de l'oncogène et du type cellulaire étudié semblent avoir une importance : les cellules FR3T3 transformées par l'oncogène humain activé *c-Ha-ras* voient leur sensibilité à MVM augmenter, alors que la transformation par BPV semble inefficace à l'égard de ce paramètre (Salomé et al., 1990). Inversement, la transformation par *ras* n'élève pas la sensibilité des cellules NRK ou de la lignée établie de kératinocytes humain HaCaT (Chen et al., 1989 ; van Hille et al., 1989).

Il est quand même possible de généraliser en notant que la cytopathogénicité des parvovirus augmente avec la transformation. Nous avons vu que les parvovirus possèdent une organisation génomique simple avec une faible capacité codante. Ce fait sert à expliquer leur extrême dépendance à l'égard des facteurs de la cellule hôte, en particulier ceux exprimés transitoirement durant la phase S. On pourrait donc imaginer que la sensibilité n'est fonction que de l'état prolifératif de la cellule hôte. Plusieurs faisceaux de résultats convergent vers une conclusion opposée. Un système cellulaire formé de cellules NRK transformé par l'oncogène *v-src* thermosensible pour son activité est à cet égard très informatif : alors qu'il n'y a aucune variation du cycle ou de l'immortalisation des cellules en fonction de la température de culture, seules les cellules exprimant l'oncogène *src* fonctionnel (cultivées à température permissive et donc transformées) sont touchées par le virus MVM (Salomé et al., 1989). Similairement, des fibroblastes humains transformés avant et après la crise sont plus sensibles à l'infection par le

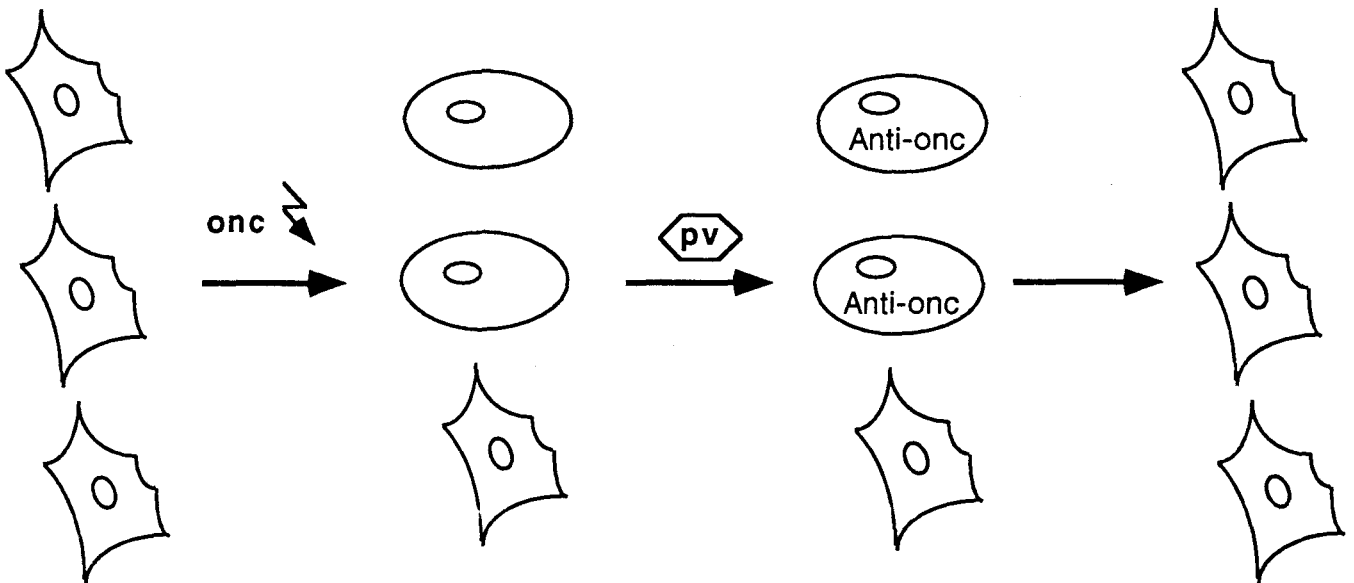
parvovirus H-1 que les cellules parentales normales ayant un même taux de prolifération (Chen et al., 1986 ; Cornelis et al., 1988a ; Rhode et Paradiso, 1989). D'autre part, une transformation abortive obtenue par infection par le virus SV40 ou le traitement avec un promoteur de tumeur comme le 12-O-tétradécanoyl phorbol 13 acétate (TPA) semble insuffisante à sensibiliser les cellules aux virus MVM et H-1 (Mousset et Rommelaere, 1988 ; Faisst et al., 1989). Il apparaît donc que la transformation doit être stable. Inversement, il n'y a pas de corrélation entre taux de sensibilité acquise et degré de transformation (Chen et al., 1989) indiquant que les étapes précoces de la transformation sont non seulement nécessaires mais aussi suffisantes. Une conséquence prévisible et applicable est la sélection de cellules normales (révertantes) au sein d'une population transformée par infection parvovirale massive, ce qui a été obtenu *in vitro* (Su et al., 1988).

A côté de leurs activités antitumorigènes *in vivo*, les virus AAV possèdent également des propriétés antitransformantes *in vitro*. Ils sont, en effet, capables d'inhiber la transformation par l'oncogène *ras* (Katz et Carter, 1986), différents gènes cellulaires (Labow et al., 1987), le virus BPV (Hermonat, 1989). Les virus AAV2 et AAV5 empêchent la croissance de cellules tumorales humaines fraîchement mises en culture (Bantel-Schaal, 1990). Notons néanmoins que les AAV induisent ici un phénomène de cytotase plutôt que de cytolysse. Cependant, l'effet cytotatique semble peu spécifique de la transformation (Winocour et al., 1988). Ces virus sont dotés d'une autre propriété intéressante. Bien qu'ils aient été longtemps considérés comme ne pouvant se répliquer qu'en présence d'un virus aidant, on sait maintenant qu'ils possèdent certaines qualités de multiplication autonome pour peu qu'un stress génotoxique leur vienne en aide (Yakobson et al., 1987). Cette répllication autonome interfère avec le métabolisme cellulaire. Une des conséquences est la chute de l'amplification de séquences d'ADN chromosomique, tandis que celle du génome d'AAV augmente (Yalkinoglu et al., 1988). On assiste donc à un renforcement du pouvoir génotoxique des substances utilisées aux dépens de leur effet mutagène et/ou inducteur de résistance à des drogues anticancéreuses (Yalkinoglu et al., 1990 ; Walz et Schlehofer, 1992). L'amplification d'ADN de virus transformants induite par des agents génotoxiques ou inversement l'amplification d'ADN induite par le virus HSV est également inhibée par les AAV (Schlehofer et al., 1983 ; Schmitt et al., 1989 ; Heilbronn et al., 1990). La présence de ces agents génotoxiques ou du virus aidant confère en retour à la cellule la capacité de répliquer les AAV et avec, dans certains cas, acquisition par ceux-ci d'un cycle lytique (Heilbronn et al., 1984 ; Schlehofer et al., 1986).

Au concept d'oncotropisme a donc succédé celui d'oncosuppression *in vivo* qui nous a amené à l'oncolyse *in vitro*. Il convient maintenant d'examiner les données relevant des mécanismes possibles de l'oncolyse.



**Lyse des cellules transformées
Sélection des cellules normales ou révertantes**



**Activation d'antioncogènes ou de facteurs de différenciation
Induction des cellules révertantes**

Figure 9 : Deux modes d'action antitransformante

IV. MECANISMES D'ANTITRANSFORMATION

Les études sur ces mécanismes possibles procèdent des études réalisées soit sur les parvovirus autonomes, soit sur les AAV. Deux types d'approches sont possibles : i) étudier ce qui différencie une cellule normale d'une cellule transformée au regard des parvovirus, c'est en quelque sorte le "pourquoi ?" de l'oncolyse, ii) déterminer quel est l'effecteur viral de la lyse, c'est la partie "comment ?". Nous verrons que ces deux approches peuvent se recouper. Néanmoins, il convient de remarquer que deux types de mécanismes peuvent être invoqués, soit une lyse des cellules transformées, soit une réversion du phénotype transformé (figure 9). Dans le premier cas, on tue les cellules transformées et on sélectionne des révertants naturels (Su et al., 1988), dans le second, on induit la réversion. Bien que certains des effets observés soient aspécifiques, c'est ce dernier phénomène qui semble être le cas le plus général pour les AAV et que nous traiterons à part dans un premier temps.

1. Considérations sur les AAV

Nous avons vu que les AAV sont parfois dotés de propriétés cytostatiques s'exerçant en l'absence de toute réplication virale (Winocour et al., 1988 ; Bantel-Schaal, 1990). Cet effet pourrait être rendre compte d'une antitransformation mais il s'exerce aussi bien sur des cellules normales que sur leurs dérivés transformés.

Les activités antitransformantes au sens strict exercées par les AAV sont bien documentées : ils inhibent la transformation par *myc*, *ras* (Labow et al., 1987), les virus SV40 (Bantel-Schaal et zur Hausen, 1988), Adénovirus (Ostrove et al., 1981)... Il semblerait que ces effets soient dûs à la capacité qu'ont les AAV à réprimer l'amplification d'ADN et/ou la transcription des gènes transformants. En effet, d'une part, AAV2 inhibe l'apparition de clones résistants à la G418 lorsque le gène *neo* est placé sous le contrôle des promoteurs précoces de SV40 (certes, ce promoteur intervient dans la transformation par SV40), du gène *tk* de HSV2 et de la métallothionéine (Bantel-Schaal et zur Hausen, 1988). Ceci indique un effet en *trans* des AAV sur l'expression dirigée par des promoteurs hétérologues de manière non nécessairement reliée à la transformation. D'autre part, l'antitransformation exercée par AAV2 à l'égard des Adenovirus s'accompagne d'une chute dramatique du taux de la protéine de 58 kDa codée par le gène E1b (Ostrove et al., 1981). Cette répression semble se produire au niveau post-transcriptionnel.

Diverses modifications phénotypiques sont associées à la présence de l'ADN d'AAV2 dans le génome de la cellule HeLa : ralentissement de croissance, augmentation de la sensibilité à des agents génotoxiques (MNNG, choc thermique, TNF α), inhibition de la capacité de

| Cellules | Réplication de l'ADN parvoviral | Expression des gènes parvoviraux | Production virale | Lyse | Références |
|---|---------------------------------|----------------------------------|-------------------|------------|--|
| Majorité des lignées transformées fibroblastiques, épithéliales humaines ou murines | Oui ou non | Oui | Oui ou non | Oui | Mousset et Rommelaere, 1982 Mousset et al., 1986 Guetta et al., 1986, 1990 Chen et al., 1986, 1989 Cornelis et al., 1988a et b van Hille et al., 1989 Salomé et al., 1989, 1990 Dupressoir et al., 1989 |
| Fibroblastes de rat FR3T3 transformé par BPV-1 | Non | Non | Non | Non | Salomé et al., 1990 |
| Fibroblastes de rat FR3T3 transformés par <i>c-Ha-ras</i> | Non | Oui | Oui | Oui | Salomé et al., 1990 |
| Cellules NRK transformées par <i>c-Ha-ras</i> | Non | Non | Non | Non | van Hille et al., 1989 |

Tableau IV : Réponses des cellules transformées à l'infection par H-1 ou MVMp

d'après Rommelaere, 1990

clonage en agar mou (Walz et Schlehofer, 1992). Le sens dans lequel évoluent ces paramètres fait évidemment penser à une "détransformation" des cellules HeLa et il est significatif que la présence d'AAV2 s'accompagne d'une décroissance de la sensibilité au parvovirus H-1, bien connu pour sa prédilection fatale pour les cellules transformées.

Il est courant d'opposer prolifération et différenciation cellulaire. Dans ce sens, des travaux ont examiné le statut de la différenciation cellulaire après infection parvovirale. Ainsi AAV2 induit des antigènes associés à la différenciation dans la lignée leucémique HL60, dans les kératinocytes humains (Klein-Bauernschmitt et al., 1992) ainsi que dans les cellules embryonnaires murines (ES : Embryonic Stem) ou humaines (F9 : cellules de tératocarcinomes très peu différenciés) (Klein-Bauernschmitt et al., 1991). Cette apparition de paramètres de différenciation s'accompagne de modulations transitoires de l'expression de différents protooncogènes (*c-myb*, *c-myc*, *c-fos*) ou antioncogènes (p53, Rb) en conformité avec celles décrites pour la différenciation des cellules HL60 induite par d'autres facteurs comme le DMSO ou l'acide rétinoïque (Kirsch et al., 1986 ; Pedrazzoli et al., 1989). Ces phénomènes reliés à la différenciation se produisent non seulement en l'absence de réplication virale mais semblent être dûs à l'adsorption du virus sur ces récepteurs. Une cascade de signaux serait alors déclenchée, conduisant à l'expression de ces différents marqueurs. Nous verrons (dans la partie résultats personnels) qu'un rapprochement entre parvovirus autonomes et différenciation est possible.

2. Le pourquoi de l'oncolyse

Les résultats montrant les rapports privilégiés entretenus par les parvovirus avec les cellules transformées ont d'abord conduit à poser l'hypothèse d'oncolyse sélective qui prédit que la transformation cellulaire maligne augmente la permissivité des cellules aux parvovirus. Si on entend par permissivité la possibilité d'une réplication virale, ce modèle n'a été que partiellement vérifié. En effet, s'il est vrai que (dans la plupart des cas) la transformation sensibilise les cellules à la lyse parvovirale, celle-ci n'est pas nécessairement accompagnée d'une production virale (Cornelis et al., 1988a ; Guetta et al., 1990). En d'autres termes, il peut y avoir lyse sans multiplication virale (dans certains cas limites, l'inverse est même vrai ; Salomé et al., 1989). Diverses études ont donc été entreprises afin d'identifier un blocage d'une étape du cycle viral dans les cellules normales, blocage qui serait levé par la transformation (il est clair que plusieurs étapes peuvent être bloquées éventuellement suivant le système cellulaire étudié). Des comparaisons du cycle viral dans des paires de cellules normales (résistantes au virus) et transformées (généralement dérivées isogéniques des premières, sensibles au virus) ont permis d'arriver à différentes conclusions (tableau IV). L'adsorption du virus sur ses récepteurs ainsi que son internalisation ne semblent pas varier dans ces couples de cellules normales-transformées (bien qu'on ait pas étudié l'impact de la transformation dans les cas où

le virus n'entre pas dans une cellule normale). Au nombre des paramètres qui semblent affectés par la transformation est l'amplification de l'ADN parvoviral (Cornelis et al., 1988a). Un modèle a été imaginé qui prévoit que les parvovirus détourneraient à leur profit des facteurs cellulaires indispensables à la réplication de l'ADN et inhiberaient celle-ci, en quelque sorte, par saturation de substrat exogène. La réplication de l'ADN étant sous le contrôle des ADN polymérases, on peut imputer au moins une partie de la dépendance des parvovirus à l'égard de la phase S à l'activité probablement transitoire de ces enzymes. Ceci ne règle néanmoins que le problème du cycle, pas celui de la transformation. D'autre part, certains systèmes cellulaires font exception : les cellules FR3T3 (95 % de survie à MVM) et leurs dérivés transformés par *c-Ha-ras* activé (en particulier le clone FREJ4, 10 % de survie à MVM) présentent des taux d'amplification d'ADN parvoviral similaires. En outre, certaines lignées cellulaires amplifient peu l'ADN viral et sont néanmoins très sensibles à l'infection parvovirale.

Le seul paramètre du cycle viral dont la variation en fonction de la transformation semble général est la transcription : la sensibilisation des cellules aux parvovirus est corrélée avec une expression plus importante des gènes viraux, en particulier ceux codant pour les protéines non structurales (Cornelis et al., 1988b ; Cornelis et al., 1990 ; Guetta et al., 1990). Ceci a pu être vérifié au niveau des ARN aussi bien que des protéines. La protéine NS1 étant capable de transactiver le promoteur P38, une quantité accrue d'ARN codant pour les protéines structurales (dont la synthèse est sous le contrôle de ce dernier promoteur) pourrait n'être que la conséquence de l'augmentation du taux de NS1. Une remarque s'impose au vu de ces résultats. Si, comme nous l'avons vu, la plupart des cellules sensibles au virus amplifient plus l'ADN parvoviral, il s'ensuivrait que les ARN polymérase cellulaires disposeraient d'une plus grande quantité de substrat à transcrire. L'augmentation du taux de messagers viraux ne serait donc que le reflet de la plus grande réplication de l'ADN viral dans les cellules transformées. Un argument qui contrarie ce raisonnement vient des cellules FR3T3-FREJ4 où (nous l'avons vu) le taux d'amplification d'ADN est identique mais où, là aussi, les messagers viraux sont en plus grande quantité dans les cellules transformées sensibles FREJ4. C'est pour l'instant, l'unique système cellulaire où seul le taux d'ARN viral est altéré par la transformation, encore que l'amplitude de la variation soit relativement faible (4 à 6 fois). Il convient de noter que dans les paires de cellules où l'amplification de l'ADN viral varie très fort avec la transformation, les taux d'ARN présentent de grandes différences, ce qui tendrait à confirmer que, somme toute, une présence accrue d'ADN viral joue sur la transcription. La paire de cellules FR3T3-FREJ4 représente néanmoins un outil déterminant pour l'étude des causes de la sensibilité aux parvovirus. L'augmentation du taux d'ARN a été originalement mesurée par la technique de Northern blot et ne visualise de ce fait qu'une quantité de matériel à un instant donné. La question qui s'est donc posée a été de savoir s'il faut incriminer une augmentation de l'initiation de la transcription, en particulier du promoteur P4. Ceci ne peut être mesuré que d'une manière indirecte en montrant que la stabilité des ARN n'est pas affectée par la transformation (les ARN

de MVMP sont, au demeurant, fort stables même dans les cellules normales). D'autre part, le promoteur P4 cloné en amont du gène rapporteur CAT (Chloramphenicol Acetyl Transferase) est plus actif dans les cellules transformées que dans les cellules normales (Spegelaere et al., 1991). Nous avons vu que ce promoteur peut être régulé par atténuation (Ben-Asher et Aloni, 1984). La région atténuatrice ne semble pas intervenir dans les différences de taux d'ARN constatées (Spegelaere et al., 1991). En conséquence, l'augmentation de la quantité de messagers viraux semble résulter d'une initiation de transcription accrue dans les cellules transformées, toutes choses égales par ailleurs. L'analyse du promoteur P4 (dirigeant la synthèse des ARN précoces) a été entreprise avec pour but d'identifier un ou plusieurs facteurs de transcription (via ses sites de fixation) dont l'activité serait augmentée avec la transformation. Une des stratégies choisies a consisté en l'étude des empreintes protéiques (footprint) sur le promoteur P4. Ces expériences ont révélé plusieurs caractéristiques. D'une part, une plus grande quantité de protéines se fixe, dans les cellules FREJ4 par rapport aux cellules FR3T3, sur le site putatif Sp1 (le groupe de David Ward avait montré la grande importance de ce site, Ahn et al., 1989 ; Pitluk et Ward, 1991). D'autre part, les sites putatifs ATF semblent différemment protégés entre ces deux cellules (Faisst et al., en préparation). Des expériences préliminaires de retard sur gel semblent montrer que, si les mêmes protéines de la famille CREB (cAMP Responsive Element Binding) se fixent sur les sites ATF dans les deux types cellulaires, la proportion des différents complexes varie entre les cellules FR3T3 et FREJ4 (Manos Perros, communication personnelle). Ces complexes pourraient être reliés entre eux par des taux de phosphorylation divergents, ce qui pourrait influencer sur leur activité transcriptionnelle (voir pour revue Hunter et Karin, 1992 ; Jackson, 1992).

En conclusion, il apparaît que la transformation agit en modulant l'activité de facteurs de transcription. Ceux-ci sont ainsi capables d'activer le promoteur précoce de MVM. La transformation peut également modifier l'activité d'autres facteurs non nécessairement liés à des activités transcriptionnelles. Ainsi, la fixation de la nucléoline à l'extrémité 3' du génome parvoviral est sensible à la transformation et est corrélée à la résistance cellulaire à MVM (Avalosse et al., 1989 ; Barrijal et al., 1992). Il nous reste à examiner les rapports entre l'activation différentielle du promoteur P4 et l'activité lytique des parvovirus ou, en d'autres termes, les conséquences d'une plus forte production de protéines NS par les cellules sensibles au virus.

3. Le comment de l'oncolyse

Le fait que les parvovirus ont une activité lytique a fait rechercher quelles sont les séquences de ces virus indispensables à la bonne marche de ces phénomènes. Si certaines données ont fait soupçonner l'intervention des séquences terminales du génome parvoviral,

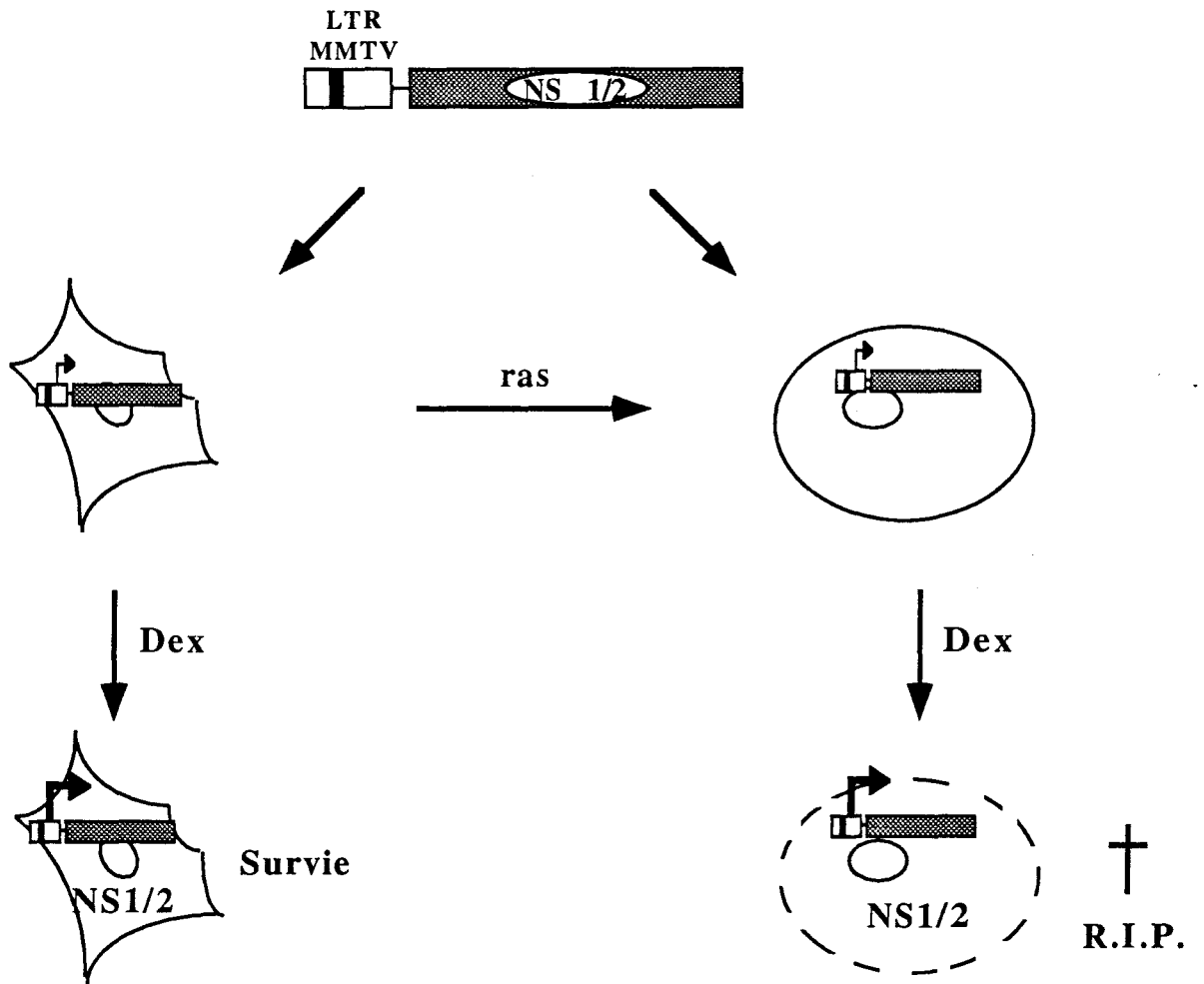


Figure 10 : Toxicité des protéines NS

plusieurs groupes ont souligné l'importance des gènes codant pour les protéines non structurales et ce, par différentes approches. On peut, bien évidemment, y penser d'un point de vue théorique en constatant que la production de ces protéines est supérieure dans les cellules lysées par le virus par rapport aux cellules résistantes. La transformation pourrait agir en élevant le taux de ces protéines jusqu'à un seuil au-delà duquel la lyse est possible (nous verrons néanmoins que cette hypothèse est, au moins partiellement, injustifiée). D'autre part, on ne peut établir de lignées cellulaires transfectées de manière stable par les gènes codant pour les protéines non structurales sous le contrôle d'un promoteur constitutif (cela est possible si le promoteur est inductible et bien sûr en l'absence d'inducteur). Cela montre qu'il y a incompatibilité entre survie cellulaire et expression des protéines non structurales (et pas seulement présence des gènes). Un dernier type d'approche plus concrète a permis de montrer le caractère directement agressif des protéines non structurales. La transfection cellulaire par les gènes qui les codent est, en soi, létale qu'on s'intéresse aux protéines NS des parvovirus MVMp ou B19 (Ozawa et al., 1988 ; Brandenburger et al., 1990). D'autre part, l'activation d'un promoteur inductible (en l'occurrence le LTR du virus MMTV) dirigeant la synthèse des protéines non structurales du parvovirus MVM diminue la capacité de clonage des cellules transformées (Caillet-Fauquet et al., 1990). Cet effet cytopathique des protéines non structurales est spécifique des cellules transformées puisque les cellules FR3T3 transfectées par la même construction ne sont affectées par l'induction du promoteur de MMTV que dans le cas d'une transformation maligne préalable (S. Mousset, communication personnelle ; illustré sur la figure 10). On remarquera, à ce propos, que les protéines non structurales ne sont pas lytiques *per se*, puisque dans le cas de ces expériences, leur taux d'expression n'est pas forcément corrélé à la sensibilité différentielle des cellules FR3T3 et de leurs dérivés transformés par *c-Ha-ras*. En résumé, si, dans le cas d'une infection, la transformation active le promoteur précoce des parvovirus, produisant ainsi une quantité accrue de protéines non structurales, effectrices virales de la lyse, il n'en est pas moins vrai qu'un cofacteur cellulaire est indispensable à ces effets cytopathiques. Tout porte à croire que la transformation intervient également en modulant la présence et/ou l'activité de ce cofacteur, du moins à l'égard de la lyse induite par les parvovirus. Notons également que, chez les AAV, l'équivalent des protéines NS, la protéine rep78, est capable d'inhiber la transformation cellulaire par le BPV (Hermonat, 1989).

La question est maintenant de savoir comment les protéines NS lysent les cellules. Différentes activités avaient déjà été attribuées à ces protéines : modulation de la réplication de l'ADN parvoviral et de l'expression du promoteur précoce P4, transactivation du promoteur P38, répression de promoteurs hétérologues. Il s'agit de déterminer laquelle de ces fonctions est responsable de la cytolyse. Une stratégie adoptable est la dissection moléculaire de leur gène pour déterminer quel domaine de ces protéines est indispensable à chacune de ces activités (figure 11). Ceci peut permettre de montrer s'il peut y avoir séparation physique entre une

| | | Inhibition du LTR de RSV | Activation de P38 | Amplification de l'ADN parvoviral | Toxicité |
|-----------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------|---|----------|
| NS-1 sauvage | | + | + | + | + |
| | G→V (404) | - | - | - | - |
| | (391) K→I R→I (392) | + | + | - | + |
| | 470 V 471 | + | + | - | + |
| | Stop | - | +/- | +/- | +/- |
| | 254 313 Délétion | + | - | - | + |

Figure 11 : Dissection moléculaire des fonctions de NS-1 de MVM
d'après Legendre et Rommelaere, 1992

activité biochimique donnée et la lyse cellulaire. Diverses études (Legendre et Rommelaere, 1992 ; Skiadopoulos et al., 1992) convergent pour montrer que :

i) NS1 semble être suffisante pour induire la cytotoxicité bien que NS2 puisse agir en synergie (Brandenburger et al., 1990)

ii) activités lytique et transcriptionnelle sont moléculairement indissociables

iii) les domaines indispensables à la lyse semblent être, d'une part, l'extrémité C-terminale, d'autre part, la zone plus centrale impliquée dans la fixation de nucléotides.

Il semblerait donc que NS1 agisse à l'égard de la cytotoxicité par l'intermédiaire de ses fonctions transcriptionnelles.

4. Application des parvovirus : perspectives et réalités

a) Les parvovirus comme vecteurs

Les parvovirus présentent un certain nombre d'avantages permettant de les concevoir comme vecteurs de transfert de gènes, à la fois *in vitro* mais également *in vivo*. Le génome a une faible capacité codante et sa séquence est connue, la régulation de l'expression des gènes est relativement simple. Les protéines de capsidie n'étant pas indispensables à l'expression, il est possible de cloner un fragment d'ADN à leur place. Pour peu qu'on respecte l'intégrité des séquences terminales et des protéines non-structurales, ces génomes recombinants peuvent être répliqués par la machinerie cellulaire et (en présence des protéines de capsidie apportées en *trans*) engendrer une production de virus recombinants.

En termes d'application *in vivo*, les deux genres de parvovirus de Vertébrés présentent chacun des caractéristiques propres, leur conférant des types d'applications potentiellement différentes. Les AAV n'ont jamais été associés à aucune pathologie, ce qui permettrait d'éviter tout effet secondaire indésirable. Quant aux parvovirus autonomes, c'est leur spécificité d'expression dans les cellules transformées qui les rend d'autant plus attrayants à cet égard. Un des grands problèmes des traitements anticancéreux est, en effet, la sélectivité des tissus touchés. Le promoteur P4 étant actif essentiellement dans les cellules transformées, les protéines non structurales qui résultent de cette expression ne pourront transactiver le promoteur P38 que dans ce type cellulaire. Si l'activation du P38 se traduit par une production d'un facteur anticancéreux, on aura affaire à un virus dont les potentialités antitumorales seront doublées (compte tenu du pouvoir oncolytique intrinsèque des protéines NS). C'est dans cette optique qu'ont été construits des recombinants où les séquences codant pour les protéines de capsidie du virus MVMP ont été substituées par un ADNc correspondant à l'IL-2 ou à l'IL-4 (Russell et al., 1992), connues pour leur activité antitumorale indirecte (Tepper et al., 1989 ; Fearon et al., 1990). Un premier but est atteint : *in vitro*, la production de ces deux protéines exogènes est

plus importante dans les cellules FREJ4 (transformées) que dans les cellules FR3T3 (normales) (Russell et al., 1992).

b. Vers une thérapie virale ?

Nous avons donc affaire à des virus peu pathogènes et ayant des propriétés antitransformantes et oncosuppressives. Nous avons, en effet, vu que le virus H-1 est capable, chez l'animal, d'inhiber la formation de tumeurs spontanées, induites ou transplantées (voir pour revue Rommelaere, 1990) et dans certains cas de faire régresser des tumeurs préexistantes (Dupressoir et al., 1989). On pense, bien évidemment, à une application chez l'homme. Peut-on imaginer un traitement anticancéreux à base de parvovirus ? Un certain nombre de questions se posent bien sûr avant d'envisager ce type d'expériences : problème éthico-scientifique d'une injection virale à haut titre, dose à employer, type de cancers à étudier, type de réponses mesurables ... Malgré ceci, le virus H-1 (peut-être le plus travaillé sur les tumeurs animales *in vivo*) semble porteur d'espoirs pour un protocole de test initié depuis peu en collaboration avec le centre anticancéreux de Villejuif. La réponse risque d'être longue à attendre mais l'expérience vaut d'être tentée.

V. EN GUISE DE CONCLUSION PROVISOIRE

Depuis le début de leur carrière, les parvovirus ont donc été associés au cancer. D'une manière négative dans un premier temps, où ils furent ignominieusement soupçonnés d'en être une des origines, positivement ensuite quand leurs aptitudes antitumorales ont été reconnues. Il est difficile de progresser dans la connaissance de l'aspect *in vivo* (l'oncosuppression) de ces propriétés, par saturation des paramètres à prendre en considération. L'oncosuppression semble résulter d'une lyse directe des cellules tumorales et non d'une activation de systèmes de défense de l'organisme. En vertu de ce fait, les modèles développés *in vitro* (où on observe également une cytolyse) apparaissent adéquats pour l'étude des mécanismes de l'oncotropisme (comment le virus reconnaît-il une cellule transformée d'une cellule normale ?) et de l'oncolyse (comment s'y prend-il pour la tuer ?). Solacions-nous du caractère nécessairement réductionniste de cette approche, en constatant que les parvovirus peuvent également nous servir de sonde de l'état transformé. En effet, l'ingratitude matricide de ces virus à l'égard des cellules qui les hébergent n'a pas que des aspects de tragédie grecque (Eschyle, 458 av. J.-C.) mais peut nous induire à des conclusions concernant le comportement des cellules malignes *per se*.

Nous avons donc vu que les protéines non-structurales peuvent être considérées comme les effecteurs de la cytotoxicité parvovirale et que cette propriété est physiquement indissociable des propriétés transcriptionnelles des protéines NS. Ceci nous a poussé à examiner de plus près ces dernières activités en déterminant, dans un premier temps, la réponse de différents promoteurs à la présence de la protéine NS1. Les promoteurs suivants ont montré une régulation négative par NS1 : LTR de RSV, *tk* minimum de HSV, précoce de SV40, P4 de MVM, promoteur du gène *c-mil* de poulet. A titre de contrôle, le promoteur P38 est, dans nos conditions, effectivement activé par NS1.

Partant de toutes autres préoccupations, Vincent Laudet a déterminé, dans le laboratoire, l'organisation génomique du locus *c-erbA-1* (Laudet et al., 1991). La suite logique de ce travail a été la recherche et la caractérisation du promoteur dirigeant la transcription de ce gène, auxquelles nous avons collaboré. Nous n'avons pas résisté à l'envie de déterminer l'effet des protéines NS du parvovirus MVMp sur ce promoteur et ce, pour différentes raisons. Les promoteurs généralement utilisés pour analyser l'action négative de NS1 sont d'origine virale et sont des promoteurs "TATA". Le promoteur de *c-erbA-1* (tout comme celui de *c-mil*) est d'origine cellulaire et dépourvu de TATA box. Ceci permettait de savoir si la TATA box est un élément indispensable à la régulation négative par NS1. D'autre part, le produit du gène *c-erbA-1* est impliqué dans différentes activités antiprolifératives et/ou reliées à la différenciation (Zenke et al., 1990 ; Weinberg, 1991 ; Schröder et al., 1992a et b ; Carnac et al., 1992). Ayant constaté l'activation de l'expression du promoteur de *c-erbA-1* par la protéine NS-1, nous avons examiné, dans un second temps, ce que pouvait impliquer (physiologiquement) cette réponse positive.

Il est néanmoins nécessaire de présenter *c-erbA-1* avant d'aborder les résultats obtenus.

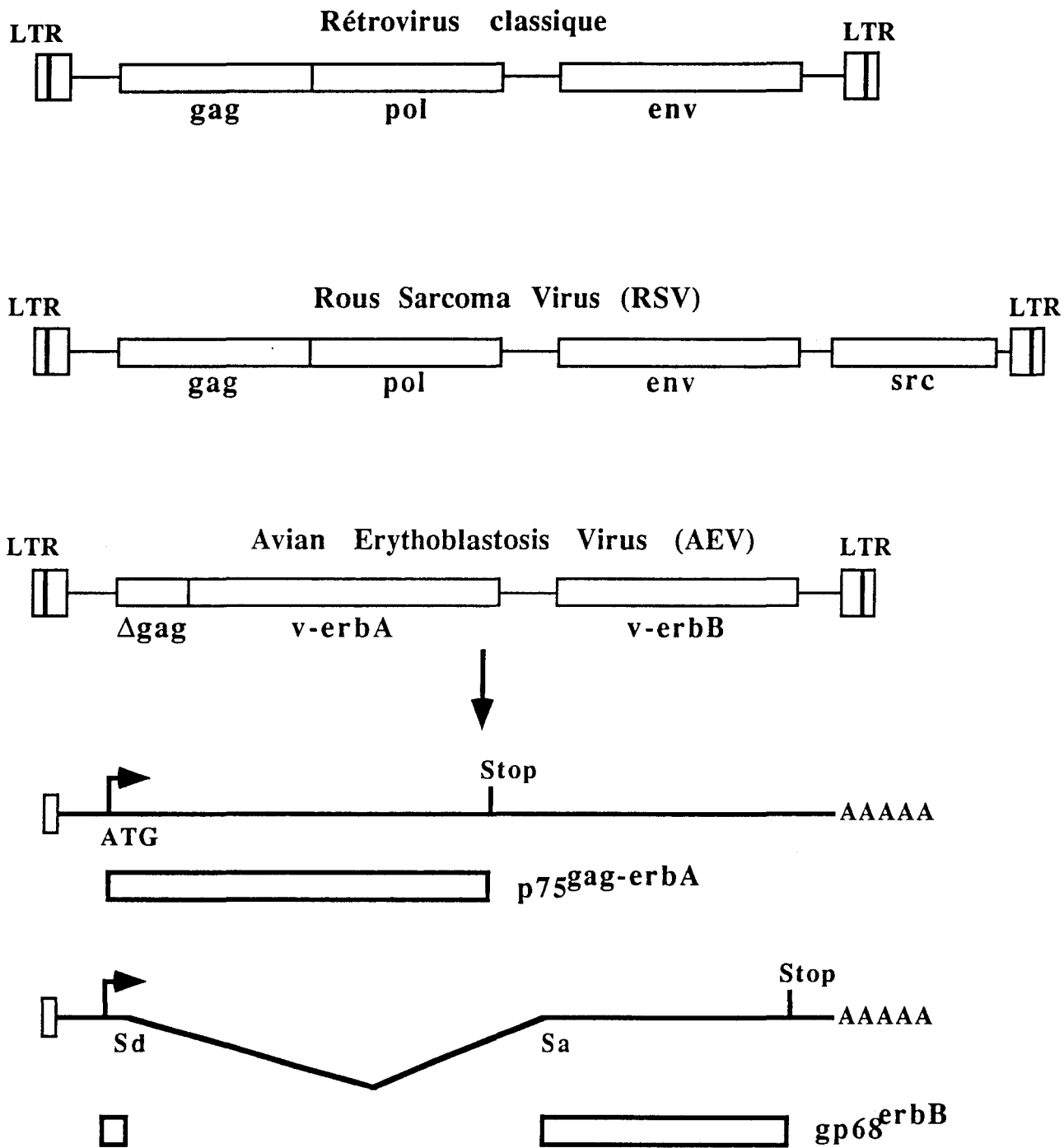


Figure 12 : Structure des rétrovirus RSV, AEV

ERB A, SA VIE, SON ŒUVRE

I. UN PEU D'HISTOIRE

1. Aux origines : le rétrovirus AEV

Après la reconnaissance de l'origine cellulaire de l'oncogène *v-src* présent dans le Rous Sarcoma Virus (Stéhelin et al., 1976), les rétrovirus transformants (et particulièrement ceux touchant le poulet) sont apparus comme un outil de choix pour l'identification de séquences potentiellement cancérigènes. Parmi ces virus, certains ont été montrés comme ayant transduits non pas une mais deux séquences d'origine cellulaire. Si on peut, d'un point de vue finaliste, supputer que la présence de deux oncogènes apporte un avantage sélectif à ces virus, les mécanismes de la coopération entre ces deux gènes (en bref, l'intérêt d'un double kidnapping) ne sont pas toujours parfaitement élucidés comme en témoigne le cas du virus E26 (Mc Leod et al., 1992). Néanmoins, ces virus apparaissent comme un outil permettant la dissection physiologique et moléculaire des fonctions normales et transformantes de chacun des deux oncogènes.

Le virus AEV (Avian Erythroblastosis Virus, un rétrovirus leucémogène) qui nous intéresse ici, contient deux oncogènes appelés *v-erbA* et *v-erbB* (Roussel et al., 1979 ; Saule et al., 1981 ; illustré sur la figure 12). Le gène *v-erbB* s'exprime sous forme d'une protéine membranaire glycosylée (gp68^{v-erbB}) qui code une version tronquée et activée du récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Khazaie et al., 1988 ; Beug et Vennström, 1991). *Per se*, il est capable de transformer les fibroblastes et des précurseurs hématopoïétiques (Frykberg et al., 1983) et représente ainsi l'élément le plus transformant du virus.

Le gène *v-erbA* s'exprime sous forme d'une protéine de fusion avec des éléments peptidiques du gène rétroviral de structure *gag*. La protéine p75^{gag-v-erbA} résultante a une localisation majoritairement nucléaire. Les potentialités transformantes de ce gène sont plus faibles. Seul, il ne cause pas de tumeurs chez le poulet (Frikberg et al., 1983) et son effet sur les cellules érythroïdes est discuté. Il est néanmoins capable de stimuler la prolifération de fibroblastes et de les rendre tumorigènes dans des conditions bien particulières (Gandrillon et al., 1987). En association avec *v-erbB*, *v-src* ou *v-Ha-ras*, il bloque la différenciation des précurseurs érythroïdes et stimule leur croissance dans des conditions de culture moins strictes

Protéine de 410 aa
Fixe l'hormone T3
Activateur de transcription

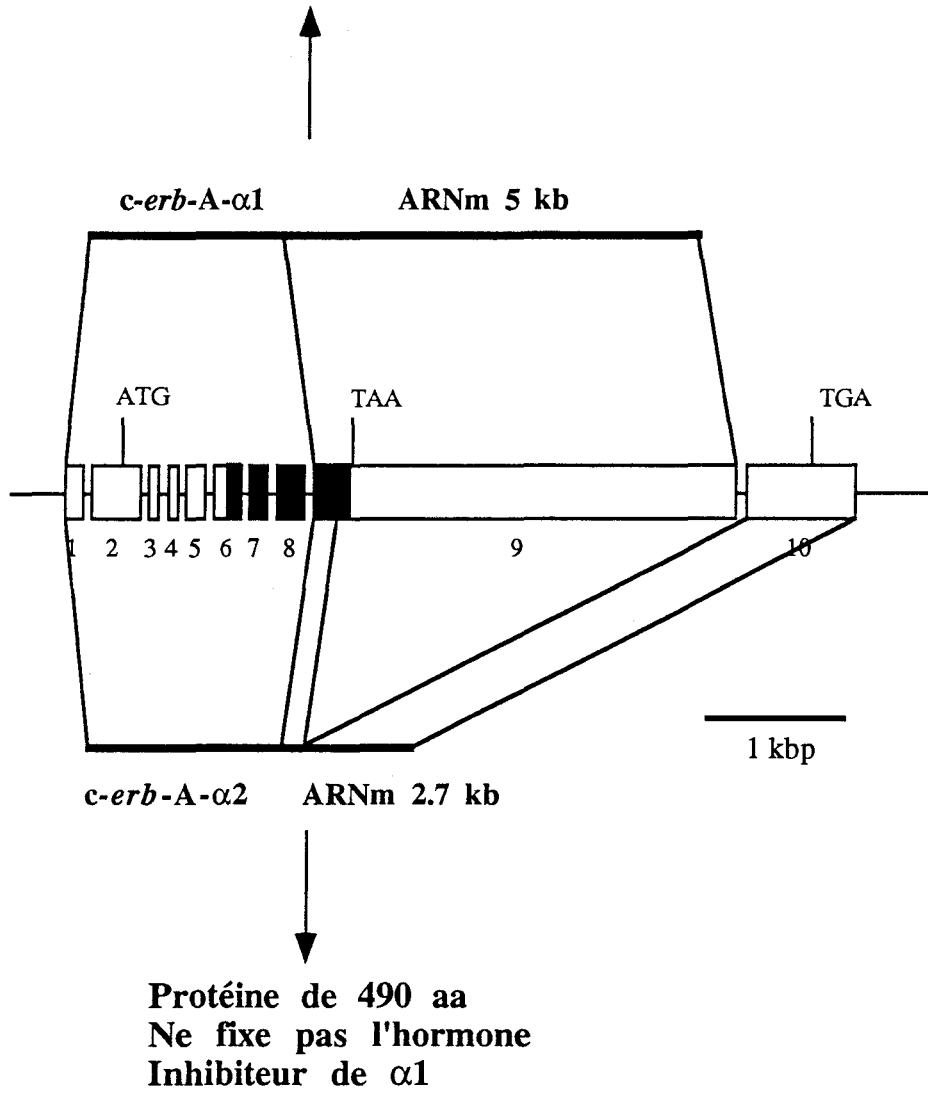


Figure 13 : Organisation génomique de *c-erbA-1* et isoformes $\alpha1/\alpha2$

Les différents exons sont indiqués, les introns ne sont pas à l'échelle

■ Domaine de fixation de l'hormone

à l'égard du pH et de la force ionique (Kahn et al., 1986 ; Damm et al., 1987). *v-erbA* est également capable de promouvoir la transdifférenciation de cellules musculaires cardiaques transformées par *myc* en nodules cartilagineux (Bachnou et al., 1991).

En bref (et d'une manière très schématique), on pourrait considérer *v-erbB* comme véritablement transformant tandis que *v-erbA* ne ferait qu'exacerber les potentialités oncogènes de *v-erbB* en agissant, entre autres, négativement sur la différenciation cellulaire qu'il est coutumier d'opposer à la prolifération.

2. Du v-onc au c-onc

Après la découverte d'un oncogène viral, on s'intéresse donc à son homologue cellulaire. Il est vite apparu que *v-erbA* possède plusieurs séquences homologues chez les Vertébrés (Jansson et al., 1983). Deux gènes ont ainsi été identifiés de manière indépendante, qui codent tous deux un récepteur des hormones thyroïdiennes (Sap et al., 1986 ; Weinberger et al., 1986). Le gène *c-erbA-1*, le plus homologue à *v-erbA*, est, chez l'homme, localisé sur le chromosome 17 en q11.2 tandis que *c-erbA2* est situé sur le chromosome 3 en p24 (Spurr et al., 1984 ; Dayton et al., 1984 ; Drabkin et al., 1988). Chacun de ces deux gènes est capable de s'exprimer sous diverses isoformes produites par épissage alternatif de l'ARN (Izumo and Mahdavi, 1988 ; Hodin et al., 1989 ; figure 13). *c-erbA1*, qui nous intéresse particulièrement, possède deux isoformes majeures :

- i) la forme $\alpha 1$ est représentée par un ARNm de 5kb traduit en une protéine de 410 aa appelée THR $\alpha 1$
- ii) la forme $\alpha 2$ est représentée par un ARNm de 2,7kb. La protéine de 490 aa qui en dérive est appelée THR $\alpha 2$

Les gènes *c-erbA* appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Les membres de celle-ci possèdent un certain nombre de propriétés communes, entre autres, une organisation en domaines fonctionnels voisine. De l'étude de celle-ci découle l'explication des activités biochimiques des différentes isoformes de *c-erbA1*. Il est donc nécessaire d'effectuer un détour par cette famille de gènes.

| Abréviation | Nom | Espèce |
|---------------|--|------------|
| AR | Récepteur des androgènes | Homme |
| ARP-1 | (récepteur orphelin) | Homme |
| COUP | = <i>ear3</i> (récepteur orphelin) | Homme |
| | équivalent de Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-TF | |
| DHR3 | Drosophila Hormone Receptor 3 | Drosophile |
| E75 | (récepteur orphelin) | Drosophile |
| EAR1 | = <i>Rev-erbA</i> (récepteur orphelin) | Homme |
| EAR2 | (récepteur orphelin) | Homme |
| ECR | Récepteur de l'ecdysone | Drosophile |
| EGON | (récepteur orphelin) | Drosophile |
| ELP | | |
| ER | Récepteurs des œstrogènes | Homme |
| ERR1 | Estrogen Rec. Related 1 (récepteur orphelin) | Homme |
| ERR2 | Estrogen Rec. Related 2 (récepteur orphelin) | Homme |
| FTZ-F1 | (récepteur orphelin) | Drosophile |
| GR | Récepteur des glucocorticoïdes | Homme |
| HNF4 | (récepteur orphelin) | Rat |
| KNI | <i>knirps</i> (récepteur orphelin) | Drosophile |
| KNRL | <i>knirps-related</i> (récepteur orphelin) | Drosophile |
| LRH1 | | |
| MR | Récepteur des minéralocorticoïdes | Homme |
| NGF1B | = <i>nur77</i> = N10 (récepteur orphelin) | Rat |
| PPAR α | Peroxisome-Proliferator Activated Receptor (récepteur orphelin) | Souris |
| PPAR β | (récepteur orphelin) | Xénope |
| PPAR γ | (récepteur orphelin) | Xénope |
| PR | Récepteur de la progestérone | Homme |
| RAR α | Récepteur de l'acide rétinoïque α | Homme |
| RAR β | Récepteur de l'acide rétinoïque β | Homme |
| RAR γ | Récepteur de l'acide rétinoïque γ | Souris |
| RXR α | Récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque (α) | |
| RXR β | Récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque (β) = H2RIIBP | |
| RXR γ | Récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque (γ) | |
| SVP | <i>sevenup</i> (récepteur orphelin) | Drosophile |
| TLL | <i>tailless</i> (récepteur orphelin) | Drosophile |
| TR2 | (récepteur orphelin) | Homme |
| THRA | Récepteur des hormones thyroïdiennes α = <i>c-erbA1</i> | Homme |
| THRB | Récepteur des hormones thyroïdiennes β = <i>c-erbA2</i> | Homme |
| USP | <i>ultraspiracle</i> = CF1 (récepteur orphelin) | Drosophile |
| VDR | Récepteur de la vitamine D | Homme |

Tableau V : Les récepteurs nucléaires clonés

d'après Laudet et al., 1991, complété des références citées

II. VISITE DE FAMILLE

1. Généralités

Si on veut donner une définition au terme de récepteur nucléaire, on dira qu'il s'agit de molécules pouvant réguler la transcription de gènes d'une manière dépendante d'un ligand. Cette proposition est néanmoins spéculative. Elle laisse en effet entendre que chacun des gènes de la famille a vu son ligand identifié. En réalité, il n'en est rien et si on connaît clairement le ligand naturel de certains des membres de la famille, d'autres attendent de trouver chaussure à leur pied. Ces derniers sont classés "récepteurs orphelins" bien qu'on ne sache pas si leur ligand n'est simplement pas encore découvert ou s'ils fonctionnent en l'absence de tout ligand. Récemment, les gènes RXR (Retinoid X Receptor) sont passés de l'étiquette orphelin à celle de récepteurs vrais après qu'on eut découvert leur capacité à fixer un isomère de l'acide rétinoïque, la forme 9-*cis* (Heyman et al., 1992 ; Levin et al., 1992).

De fait, une définition plus adéquate de l'appartenance à la famille se fonde sur des caractéristiques structurelles communes. En effet, la quarantaine de gènes de la famille actuellement clonés (tableau V) présentent tous la même organisation en domaines fonctionnels typiques dénommés A/B, C, D et E (figure 14). Cette terminologie trouve son origine dans la comparaison de la séquence des récepteurs des œstrogènes (ER) humain et aviaire (Krust et al., 1986). Les domaines A, C et E sont les plus conservés et sont séparés par les domaines B, D et parfois F, plus divergents. Entre différents membres de la famille (récepteurs des œstrogènes, des glucocorticoïdes [GR] et *v-erbA* par exemple), un schéma voisin se retrouve. Les domaines B, D et F sont très peu homologues, alors que E et surtout C sont bien conservés. Seul, le domaine A échappe à cette règle, ne présentant pas d'homologie entre ER, GR et *v-erbA*. On peut s'attendre à ce que des domaines conservés entre différentes espèces moléculaires aient une fonction similaire. En effet, l'analyse de mutants de délétion a permis de montrer que le domaine C est responsable de l'interaction avec l'ADN tandis que le domaine E fixe l'hormone (Giguere et al., 1986 ; Kumar et al., 1986, 1987). Le domaine D, comportant les signaux de translocation nucléaire (Picard et Yamamoto, 1987), représente une charnière flexible entre C et E et où on peut introduire des mutations sans lèses les fonctions du récepteur (Kumar et al., 1987). Des comparaisons de séquences quasi-exhaustives sur les domaines C et E ont été réalisées (Laudet et al., 1992) qui ont permis de classer les récepteurs nucléaires en trois sous-familles : la première comporte les récepteurs des hormones thyroïdiennes (THR) et de l'acide rétinoïque (RAR) ainsi que des récepteurs orphelins comme *ear-1*. La sous-famille II regroupe des récepteurs orphelins et les gènes RXRs. Dans la troisième, trouvent place les récepteurs des stéroïdes, de la vitamine D et de l'ecdysone. Il est probable que tous les récepteurs nucléaires n'ont pas encore été identifiés et clonés. Certains de ces produits étant doués d'expression et d'activité tissu-spécifique ne pourront être reconnus que par des études particulières comme

l'illustre le clonage récent, à partir de lymphocyte T, d'une protéine de 100 kDa, se fixant sur le LTR du HIV et apparentée à (mais distincte de) COUP-TF (Orchard et al., 1992).

2. Dissection moléculaire et fonctionnelle des récepteurs nucléaires

a. Fixation à l'ADN

La plupart des facteurs de transcription peuvent être classés dans différentes familles suivant le type de structures protéiques qui régit leurs interactions avec l'ADN cible : Leu-zipper pour *fos* et *jun* (Jones, 1990), domaine ETS pour ... *ets* (McLeod et al., 1992) par exemple. L'étude de la séquence du domaine C a révélé la présence de résidus Cys conservés et espacés régulièrement (Weinberger et al., 1985 ; Krust et al., 1986), réminiscents de certains facteurs de transcription dont le domaine de fixation à l'ADN est constitué de doigts de zinc (figure 15). Il s'agit pour les récepteurs nucléaires, de doigts particuliers ne fixant le zinc que par l'intermédiaire des Cys (Freedman et al., 1988) tout comme Gal4 par exemple et non d'une combinaison de Cys et His comme pour TFIIIA (Klug et Rhodes, 1987), un paradigme (et premier membre, historiquement) de cette classe de facteurs de transcription. D'autre part, seuls deux doigts (appelés C1 et C2) sont présents dans les récepteurs nucléaires contre 9 chez TFIIIA par exemple (Miller et al., 1985). Les zones importantes pour la fixation à l'ADN comprennent :

- i) les résidus Cys (9 au total pour les récepteurs des hormones thyroïdiennes, 8 pour les autres membres de la famille) sans lesquels le zinc ne peut assurer son rôle de maintien de la conformation de la molécule
- ii) d'autres résidus conservés dont, bien souvent, la mutation inactive le récepteur (quoique pas systématiquement) mais également des résidus non conservés entre différents récepteurs.

Le domaine C est également requis pour d'autres fonctions. La transactivation, du moins dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes semble dépendre du domaine C, en association avec le domaine A/B (Giguere et al., 1986 ; Godowski et al., 1988). D'autre part, la dimérisation, une des caractéristiques des récepteurs nucléaires (Kumar et Chambon, 1988 ; Tsai et al., 1988) est également contrôlée par le domaine C (en coopération avec le domaine de fixation du ligand E).

Les deux doigts de zinc semblent chacun jouer un rôle différent (figure 15). Ces conclusions ont été tirées d'expériences de d'échanges de domaines (ici "finger-swap"). Généralement, le but de ces dernières est de fabriquer des récepteurs chimères où les domaines C et E proviennent de récepteurs différents. Il est également possibles de réaliser ces expériences en permutant seulement les doigts de zinc dans un contexte restant identique. Ces

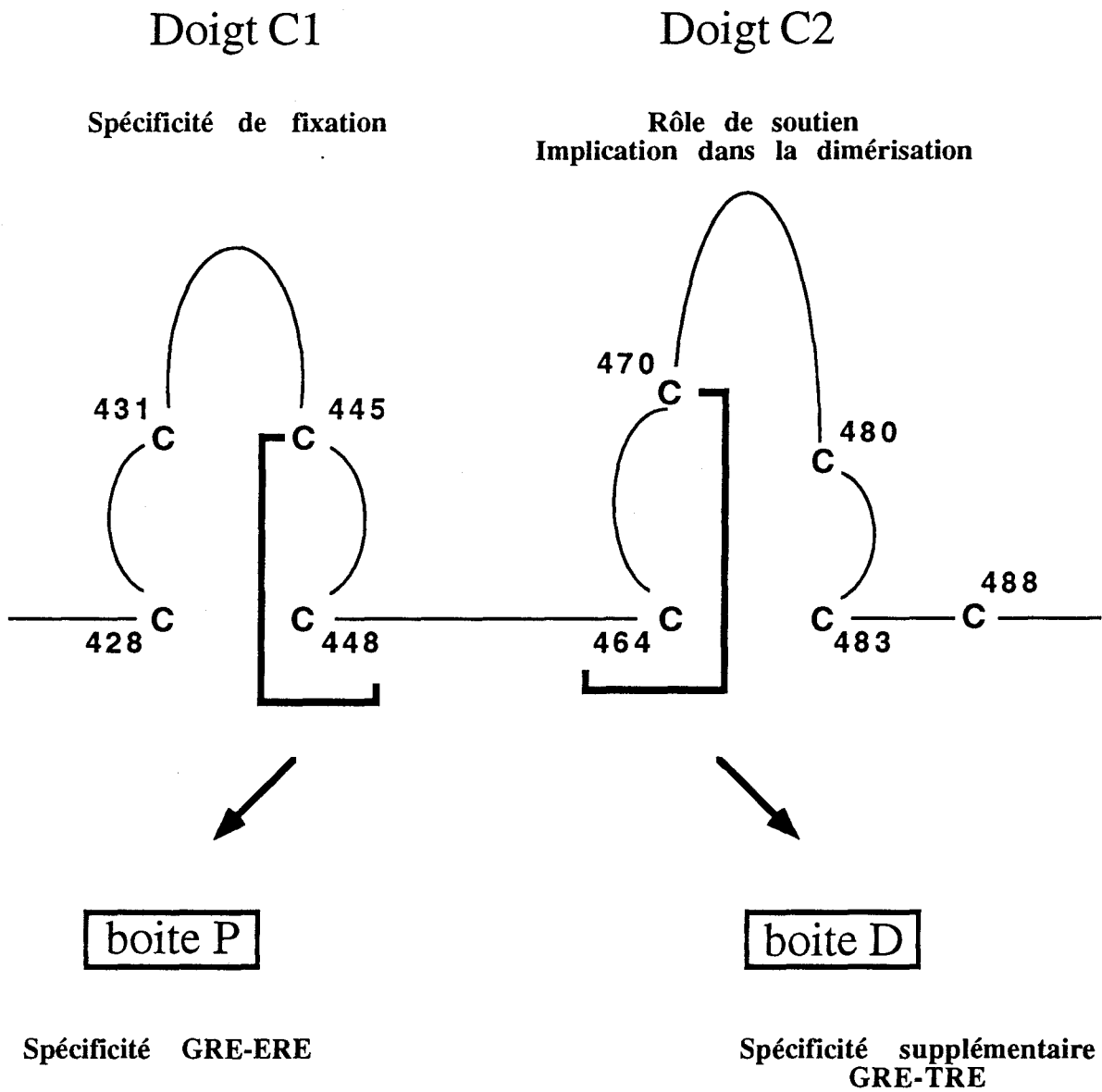


Figure 15 : Structure des doigts de zinc et implications fonctionnelles

La numérotation se réfère au récepteur des glucocorticoïdes de souris

échanges entre les domaines C1 ou C2 du récepteur des glucocorticoïdes avec ceux du récepteur des œstrogènes ont montré que C1 est impliqué dans la fixation spécifique à l'ADN, tandis que C2 agit en tant que "soutien" de la structure (Green et al., 1988).

Ceci nous amène droit à la spécificité de la reconnaissance de l'ADN. En effet, les récepteurs nucléaires sont capables de se fixer à une séquence d'ADN palindromique appelée HRE (Hormone Responsive Element) et dont il existe trois grands types différents : GRE (Glucocorticoid RE), ERE (Estrogen RE) et TRE (Thyroid RE). La spécificité de reconnaissance du récepteur des glucocorticoïdes et des œstrogènes est déterminée par l'articulation C-terminale du doigt C1 (Mader et al., 1989 ; Danielsen et al., 1989 ; Umesono et Evans, 1989) appelée boîte P pour "proximal". Le changement de deux acides aminés particuliers suffit à inverser la spécificité de fixation de ces récepteurs. En ne changeant que le premier de ces acides aminés, on obtient un récepteur hybride, capable de se fixer à la fois sur au GRE et à l'ERE (Umesono et Evans, 1989). Si on souhaite passer d'une spécificité GRE à une TRE, il faut non seulement muter la boîte P mais également l'articulation N-terminale du doigt C2 (boîte D pour "distal") (figure 15).

Constatons encore que c'est C2 qui intervient dans la dimérisation des récepteurs (qu'on étudiera plus en détail ultérieurement) et on pourra résumer la situation en disant qu'un récepteur se fixe sur sa séquence cible spécifiquement par l'intermédiaire du doigt C1. C2 stabilise la structure, d'une part, par des interactions aspécifiques avec l'ADN, d'autre part, par des interactions interprotéiques avec le second membre du dimère. Chacun des composants de la paire se fixe sur un demi-palindrome et fait ainsi face à son acolyte (Schwabe et al., 1990 ; Schwabe et Rhodes, 1991).

b. Multifonctionnalité du domaine E

Nous avons vu que le domaine E (le plus grand des domaines conservés avec environ 250 acides aminés), à l'extrémité C-terminale des récepteurs nucléaires, est responsable de la fixation de l'hormone. Il possède également d'autres capacités (voir la figure 14). Il a pu être divisé en quatre régions (du moins pour une majorité de récepteurs), bien que les frontières de celles-ci ne soit pas très claires. Par d'ordre d'entrée en scène du N-terminal au C-terminal, on trouve :

- L1, directement impliquée dans la fixation du ligand
- Ti, requise pour la régulation de la transcription et les interactions protéine-protéine
- DM, dévolue à la dimérisation
- L2, co-responsable de la fixation de l'hormone

La classification ci-dessus exposée, en dépit de son pratique, est réductionniste. En effet, diverses études (mutations de délétion, réactions de couplage ligand-récepteur) ont montré que la totalité du domaine E est impliquée dans la fixation du ligand avec un rôle certes prédominant des régions L1 et L2 (Green et Chambon, 1991 ; Danielsen, 1991). Celles-ci, riches en acides aminés hydrophobes doivent se trouver en contact l'une de l'autre par repliement de la molécule pour former une poche hydrophobe putative. En guise de confirmation du rôle de ces régions, notons leur extrême conservation entre les deux types de récepteurs des hormones thyroïdiennes (*c-erbA-1* et *c-erbA-2*) fixant le même ligand (Chin et al., 1991).

Nous avons vu l'implication du domaine C dans la dimérisation. Le domaine E intervient également, régulant la dimérisation d'une manière dépendante de la présence du ligand (Green et Chambon, 1988 ; Forman et al., 1988). La région DM est riche en acides aminés hydrophobes exposés sur un côté d'une hélice α permettant l'interaction entre membres du dimère, et son importance a été montrée pour les récepteurs des stéroïdes (Fawell et al., 1990) et des hormones thyroïdiennes (Forman et al., 1989).

Le nom de la région Ti (Transcriptional inhibition) provient de ce qu'elle a été reconnue initialement comme régulant négativement l'activation en *trans*. Il semblerait que cet effet soit indirect. En effet, la région Ti du récepteur des glucocorticoïdes est capable de fixer hsp90, une protéine de choc thermique (Sanchez et al., 1985). Cette interaction maintient le récepteur dans une conformation inactive (Picard et al., 1990) mais néanmoins très affine pour le ligand (Danielsen, 1991). La fixation de l'hormone dissocie le complexe récepteur-hsp90 permettant au premier d'accomplir son œuvre transcriptionnelle. On peut donc voir l'effet de hsp90 comme inactivant les capacités transactivatrices mais également comme favorisant celles-ci en préparant le récepteur à fixer son ligand. A titre de digression, il semblerait que ce type de régulation conformationnelle par hsp90 soit assez général, avec la preuve apportée récemment que hsp90 est capable de convertir la protéine MyoD1 d'une forme inactive à une forme active (Shaknovich et al., 1992). *v-erbA* interagit également avec hsp90 (Privalsky, 1991) mais, semble-t-il, pas son homologue cellulaire *c-erbA*. Si on peut justifier cette différence par une mutation présente dans la région Ti de *v-erbA* par rapport à celle de *c-erbA*, on ne dispose pas d'explication sur les conséquences d'un tel changement. La région Ti régule la transactivation par une deuxième voie encore une fois indirecte (O'Donnel et Koenig, 1990). Un facteur nucléaire (baptisé TRAP pour Thyroid hormone Receptor Auxiliary Protein) est en effet capable de se fixer sur la région Ti du récepteur des hormones thyroïdiennes (le domaine C2 est également concerné [O'Donnel et al., 1991]) et de réguler la transcription des gènes cibles (Burnside et al., 1990).


c. Régulation de la transcription

Pour schématiser, deux domaines ont été caractérisés pour leur importance dans l'activation de la transcription par les récepteurs des œstrogènes (Green et Chambon, 1991) et des glucocorticoïdes (Danielsen, 1991). La région TAF-1 recouvre le domaine A/B et semble être responsable de l'activité constitutive du récepteur tandis que TAF-2, située dans le domaine E, agit d'une manière hormono-dépendante (voir leur localisation figure 14). Les bornes précises de ces deux régions (si tant est qu'elles puissent être délimitées) n'ont néanmoins pas été définies. Cette division en deux domaines n'est cependant pas généralisable à tous les récepteurs nucléaires : les deux récepteurs des hormones thyroïdiennes ne sont pas affectés dans leur activité transcriptionnelle par la délétion du domaine A/B (Thompson et Evans, 1989). Il semble que, pour ces récepteurs, la région responsable de la transactivation soit située dans le domaine de fixation du ligand E.

Si la présence d'hormone est requise pour une activation transcriptionnelle optimale, la question de l'activité de base du récepteur en l'absence d'hormone est sujette à discussion, au vu de résultats contradictoires obtenus dans différents laboratoires (Ponglikitmongkol et al., 1988 ; Lees et al., 1989). Néanmoins, pour certains récepteurs, la présence d'hormone est requise, non seulement pour la transcription, mais également pour la fixation à l'ADN (Webster et al., 1988) et/ou le type de complexe (monomère, homo- ou hétérodimères) qui se fixe sur la séquence cible, ce dont nous verrons quelques exemples ultérieurement.

3. Eléments de réponse sur l'ADN

Le premier récepteur nucléaire dont on a caractérisé l'élément de réponse est le récepteur des glucocorticoïdes. Le groupe de Miguel Beato disposait, en effet, d'un outil de choix avec le promoteur (LTR) du MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) activé par les glucocorticoïdes (Scheidereit et al., 1983). En comparant des éléments de réponse de divers promoteurs, des séquences consensus ont pu être dégagées (Mulvihill et al., 1982 ; Scheidereit et al., 1983). Le GRE (Glucocorticoid Responsive Element) présente une séquence palindromique imparfaite (Martinez et Wahli, 1991) qui est également cible des récepteurs de la progestérone, des minéralocorticoïdes et des androgènes. Pour assurer une spécificité d'action d'une hormone donnée, il est donc clair que d'autres éléments doivent entrer en jeu. De même, pour d'autres groupes de récepteurs, la cible ADN peut être identique : un élément de réponse à l'acide rétinoïque (RARE : Retinoic Acid Responsive Element, Umesono et al., 1988) peut être identique à celui conférant la réponse aux hormones thyroïdiennes (TRE : Thyroid hormone Responsive Element [Glass et al., 1987 ; Koenig et al., 1987]) dans le cas de la structure Pal

Motif répété : **AGGTCA**


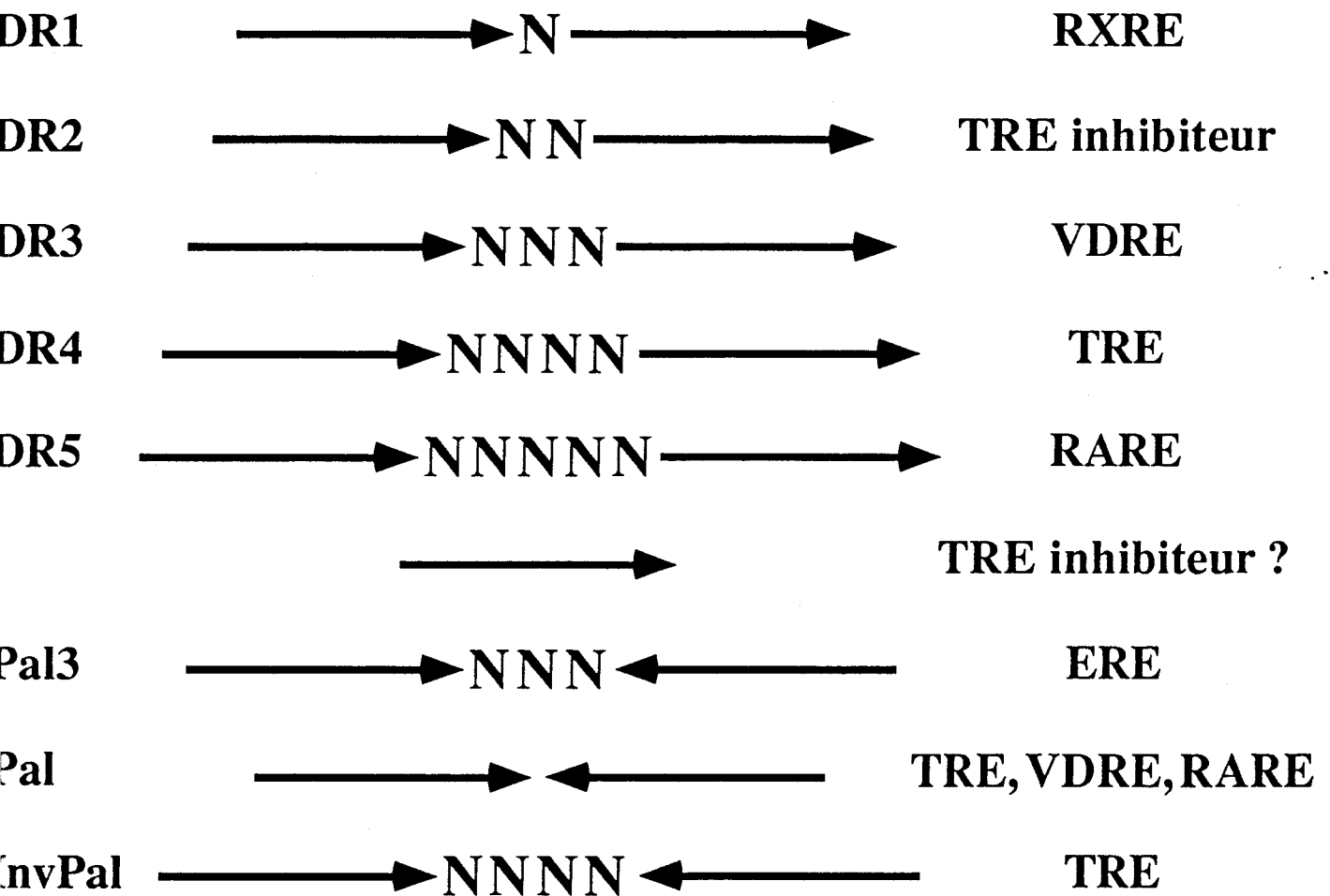


Figure 16 : Structure de différents HRE (Hormone Response Element)

Compilation d'après Umesono et al., 1991 ; Näär et al., 1991
 Seules ont été pris en compte les répétitions du motif AGGTCA
 TRE : Thyroid hormone Response Element
 RXRE : Retinoid X Receptor Response Element
 VDRE : Vitamin D Response Element
 RARE : Retinoic Acid Response Element
 ERE : Estrogen Response Element

(voir figure 16). Il existe néanmoins des RARE spécifiques de l'acide rétinoïque (cas du promoteur du gène du récepteur β de l'acide rétinoïque [De Thé et al., 1990]).

Les HRE (Hormone Responsive Element) ont donc une structure palindromique imparfaite (bien qu'on trouve dans certains cas des demi-palindromes). Les études *in vitro* utilisent généralement des versions idéalisées de ces structures. Ces expériences sont permises suite à la démonstration que le TRE présent dans le promoteur du gène de l'hormone de croissance de rat peut être rendu parfaitement palindromique en conservant sa spécificité à l'égard des hormones thyroïdiennes (Glass et al., 1988). Dans ce cas, l'activation est même plus efficace qu'avec le TRE d'origine, d'où on peut inférer que les "imperfections" de la nature doivent en fait engendrer une régulation fine. Les éléments de réponse ne se contentent pas d'être palindromiques. Le TRE présent dans le promoteur du gène de la chaîne lourde de la myosine cardiaque de rat a été analysé par l'équipe de Ron Evans. Cet élément avait été caractérisé comme imparfaitement palindromique et ne répondant pas à l'acide rétinoïque (Izumo et Mahdavi, 1988). Il est en fait constitué d'une répétition directe (DR pour Direct Repeat) de la séquence AGGTCA (Umesono et al., 1991) sur laquelle se fixe effectivement le récepteur. C'est le nombre de bases entre les deux demi-sites AGGTCA (qui ne peut subir que peu de mutations) qui régit la spécificité d'interaction avec un récepteur donné. La "règle du 3-4-5" prédit que des espacements de 3, 4 et 5 nucléotides (engendrant les éléments DR3, DR4 et DR5, respectivement) déterminent la sélectivité d'interaction avec, respectivement, le récepteur de la vitamine D, le récepteur des hormones thyroïdiennes et celui de l'acide rétinoïque (figure 16). Un nouveau venu, le DR1 semble, entre autres, médier la spécificité de fixation du récepteur RXR (Umesono et al., 1991 ; Mangelsdorf et al., 1991).

Le même type d'analyse quasi-systématique a été menée par le groupe de M. Rosenfeld qui étudie en plus les combinaisons d'orientation des demi-sites l'un par rapport à l'autre (Näär et al., 1991). Les résultats sont voisins mais ajoutent un degré de complexité (figure 16). En fait, même si une théorie simplificatrice a été émise par Umesono et al. (1991), il existe une grande variété de combinaisons possibles. Un même HRE peut fixer plusieurs types de récepteurs avec des affinités différentes et peut même être activateur pour un récepteur donné et inhibiteur pour un autre. Inversement, un même récepteur possède plusieurs sites de fixation conférant des activités différentes (activateur ou inhibiteur) ou des puissances d'activation différentes. Gardons-nous d'oublier que des substitutions de nucléotides à l'intérieur d'un demi-site AGGTCA, de même que dans les séquences flanquantes, comme récemment démontré (Kim et al., 1992), peuvent également influencer sur son affinité avec un récepteur et nous aurons (outre une migraine) une vue d'ensemble permettant de concevoir la panoplie des régulations induites par les récepteurs nucléaires.

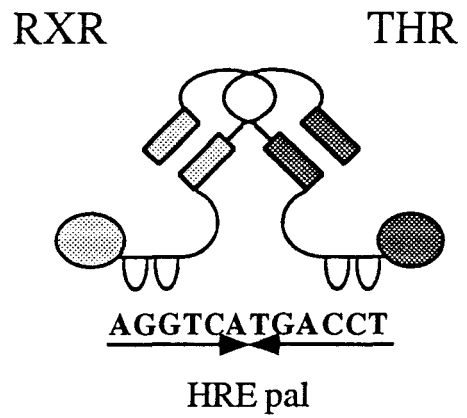
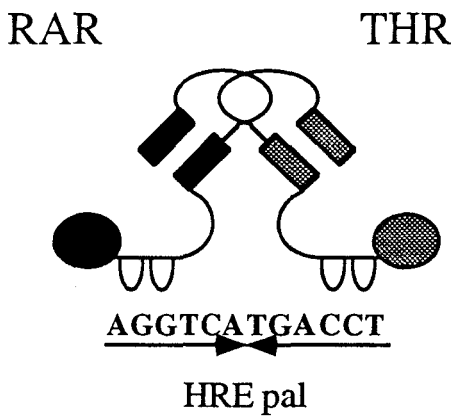
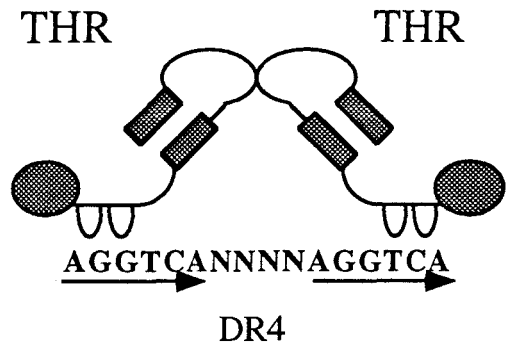
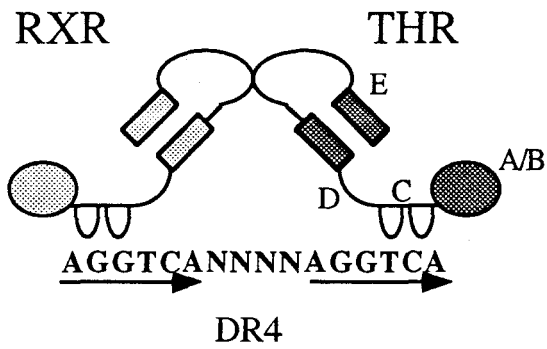
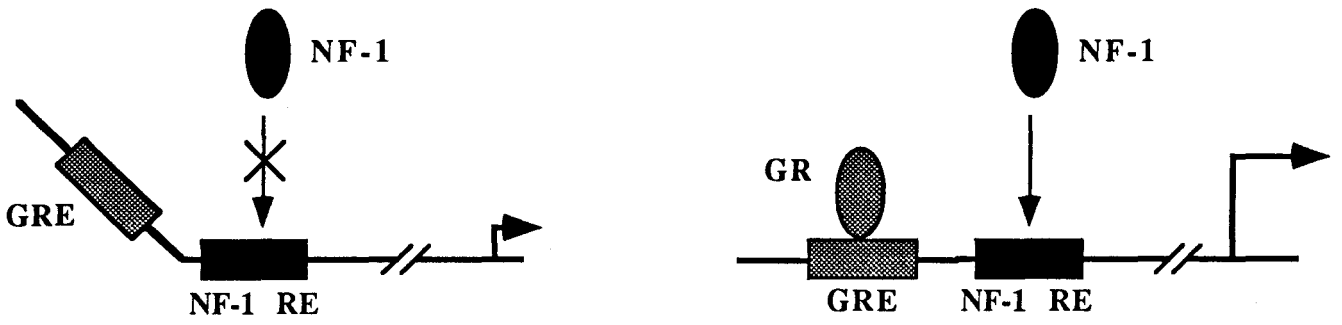


Figure 17 : Quatre exemples de dimérisation impliquant le récepteur des hormones thyroïdiennes

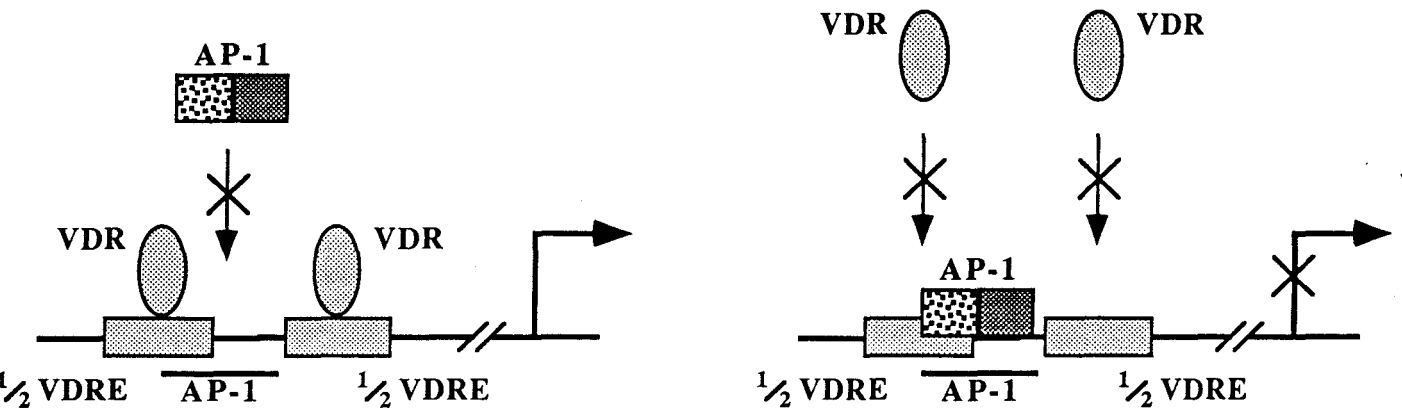
4. De la dimérisation, considérée comme un art de vivre

Il semble que la dimérisation soit une propriété assez répandue chez les récepteurs nucléaires (Laudet et Stéhelin, 1992). Néanmoins, le fait que le facteur NGF1-B (nur77), un récepteur orphelin, se fixe sur son site préféré comme monomère (Wilson et al., 1992) nous évite de formuler des généralisations trop abusives. Des différences existent cependant d'un facteur à l'autre : si le récepteur des glucocorticoïdes peut dimériser en solution (Fawell et al., 1990), les récepteurs des hormones thyroïdiennes nécessitent pour cela la fixation préalable à l'ADN (Forman et Samuels, 1990). Pour le groupe auquel appartiennent les récepteurs des hormones thyroïdiennes, de l'acide rétinoïque et de la vitamine D, l'hétérodimérisation est bien documentée. THR peut dimériser avec RAR (Glass et al., 1989), mais également avec des protéines baptisées TRAP (Thyroid hormone Receptor Auxilary Protein) (Burnside et al., 1990) (voir figure 17 pour des exemples impliquant le récepteur des hormones thyroïdiennes). La formation de ces complexes semble augmenter la capacité de fixation de THR sur son site TRE. La fixation des RAR et VDR sur des HRE est également stimulée par des facteurs présents dans des extraits de différents types cellulaires. Récemment, un bon candidat pour ce rôle de protéine auxiliaire a été proposé avec la preuve que la protéine RXR β (un des récepteurs de l'acide rétinoïque 9-*cis*) est capable de se fixer aux récepteurs des hormones thyroïdiennes, de l'acide rétinoïque et de la vitamine D (Yu et al., 1991 ; Leid et al., 1992 ; Zhang et al., 1992 ; Kliewer et al., 1992). Il semblerait que le facteur RXR α soit également doté de propriétés de ce type (Bugge et al., 1992) ainsi qu'un autre membre de la famille, COUP-TF (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor) (Berrodin et al., 1992).

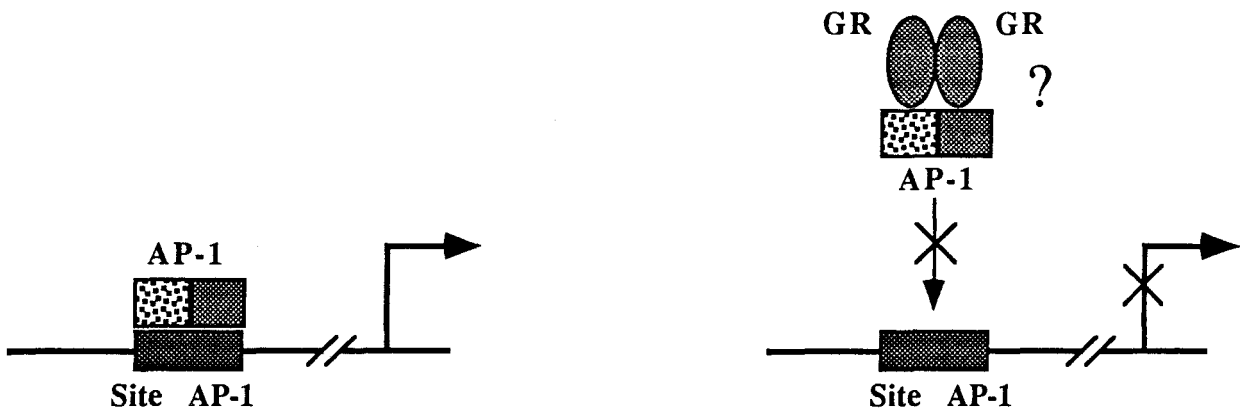
Quel est l'effet de l'hormone sur ce type d'interaction ? On pensait à l'origine que les RXRs n'avaient qu'un rôle de cofacteur. En effet, en l'absence de son ligand naturel, RXR α est incapable de se fixer seul sur un site TRE palindromique mais exige l'hétérodimérisation avec le récepteur RAR ou THR (Yu et al., 1991 ; Leid et al., 1992). L'addition d'acide 9-*cis* rétinoïque permet l'homodimérisation des RXR et leur fixation indépendante d'autres récepteurs (Zhang et al., 1992). Les récepteurs des hormones thyroïdiennes n'exigent pas leur ligand pour se fixer sur leurs séquences cibles mais, en présence d'hormone, les types de complexes associés à l'ADN varient : T3 inhibe la formation d'homodimère (favorisant ainsi les formes monomères) et d'hétérodimère THR α -THR β . La formation d'hétérodimère n'est pas (cas des dimères THR-RXR) ou peu (dimères THR-RAR) affectée par la présence d'hormone (Andersson et al., 1992 ; Yen et al., 1992). Ces études montrent également que la T3 est capable d'induire des changements de conformation des protéines fixées à l'ADN. Divers analogues de T3 ont également ce type d'activité avec, en plus, une action antagoniste vis-à-vis de l'activation transcriptionnelle (Andersson et al., 1992). On peut supposer que les changements conformationnels rendent accessible certaines parties de la molécule requises, par exemple, pour la transactivation et/ou l'interaction avec d'autres facteurs. A l'opposé des



Exemple du LTR du MMTV



Exemple du promoteur du gène de l'ostéocalcine



Exemple du promoteur du gène de la collagénase

Figure 18 : Trois exemples d'interactions entre récepteurs nucléaires et facteurs de transcription

THR, la présence d'œstrogènes induit la formation d'homodimères de leurs récepteurs (Kumar et Chambon, 1988).

Il ressort de tout ceci que, du moins pour le groupe formé par THR, RAR et RXR, les différents récepteurs sont dotés de beaucoup de capacités d'hétérodimérisation, modulables par la fixation de l'hormone. Les conséquences de ces alliances entre facteurs sont des changements d'affinité pour les différentes séquences cibles (Forman et al., 1990), résultant à leur tour en des potentialités différentes à l'égard de l'activation transcriptionnelle, y compris, dans certains cas, une synergie d'activation comme entre les RXRs et les PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) sur le promoteur du gène de l'Acyl-CoA oxydase (Kliwer et al., 1992). En clair, conjuguée aux différents types de séquences cibles l'hétérodimérisation démontre l'extrême plasticité du système. Qu'on se rassure : il existe des facteurs incapables d'hétérodimériser, du moins avec THR (Berrodin et al., 1992). C'est le cas de *ear-1* (un gène pourtant très proche structurellement et porté par le même locus que *c-erbA-1*, transcrit dans une orientation différente [Lazar et al., 1989]) et de *nur77/NGF1-B* (Hazel et al., 1988).

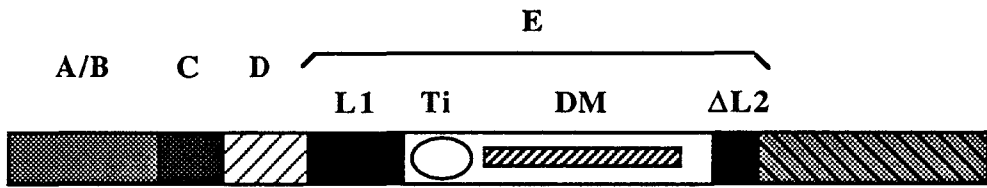
5. Interaction avec d'autres facteurs de transcription

Non contents d'interagir entre eux, à titre d'homo- ou d'hétérodimères, les récepteurs nucléaires sont capables de se mêler d'affaires regardant d'autres facteurs de transcription. Soit dit en passant, l'importance des interactions entre facteurs de transcription appartenant ou non à la même famille tend à être de plus en plus reconnue, ce qui ne fait qu'un peu plus rendre compte de la complexité de la régulation de l'expression des gènes. Quelques variations sur ce thème illustreront le cas des récepteurs nucléaires (résumé sur la figure 18).

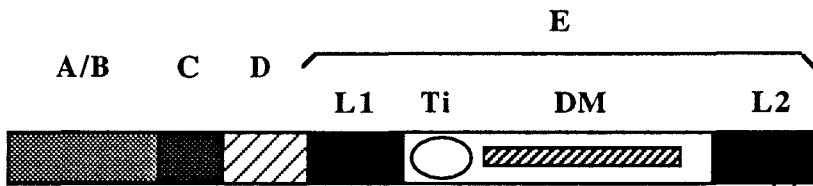
L'expression du promoteur (LTR) du MMTV est stimulée par le récepteur des glucocorticoïdes par l'intermédiaire de plusieurs sites HRE (Beato et al., 1991). Il semble que ce récepteur agisse d'une manière indirecte en induisant, par sa fixation sur le HRE proximal (le plus proche du promoteur), une modification de la structure de la chromatine permettant la fixation subséquente du facteur NF-1 sur son site situé quelques nucléotides en aval. NF-1 serait ici le véritable activateur de transcription (Cordingley et al., 1987 ; Pina et al., 1990a).

Les interactions entre facteurs de transcription peuvent également avoir pour objet la compétition pour un même site de fixation sur l'ADN. C'est le cas pour le promoteur du gène de l'ostéocalcine, dont l'expression est, d'une part, activée par la vitamine D et l'acide rétinoïque, d'autre part, réprimée par le complexe AP-1 (Schüle et al., 1990a). Il s'agit ici d'un site particulier, à moitié VDRE, à moitié AP-1. Si un des types de complexes se trouve sur le site, l'autre ne peut s'y fixer. On se trouve donc en présence d'un commutateur, dont la position (ouvert : transcription ou fermée : répression) dépend de la compétition entre deux facteurs.

c-erbA α 2



c-erbA α 1



v-erbA

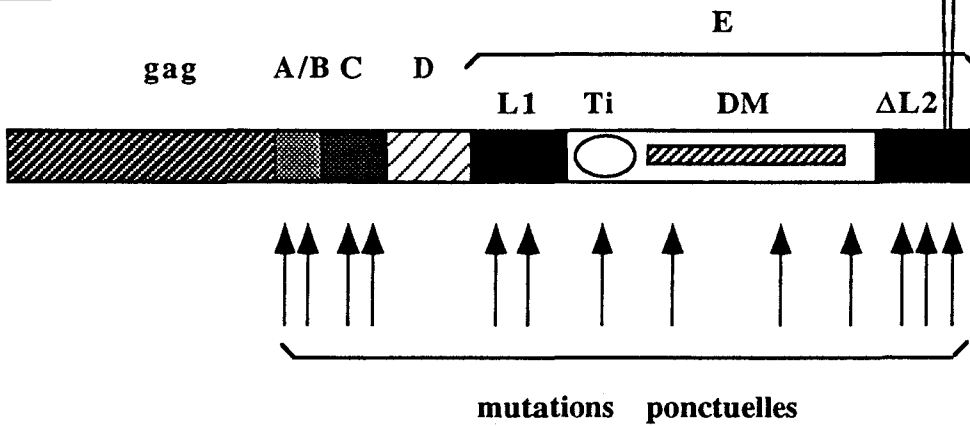


Figure 19 : Structure comparée de c-erbA et v-erbA

Troisième mode d'interaction possible : les interactions protéines-protéines. Le promoteur du gène de la collagénase est régulé positivement par le complexe fos/jun (AP-1) par l'intermédiaire d'un site AP-1 classique. Cette séquence est également fondamentale pour la répression exercée par le récepteur des glucocorticoïdes. Celui-ci ne se fixe pas sur le site AP-1, bien que son domaine de fixation à l'ADN soit requis pour l'inhibition transcriptionnelle. Nous avons vu plus haut que ce domaine est intervenu dans les contacts protéines-protéines. C'est l'interaction entre le récepteur des glucocorticoïdes, d'une part, et les protéines fos/jun, d'autre part, qui inhibe la fixation de celles-ci sur le site AP-1. Des complexes AP-1/GR ont pu être visualisés, du moins dans certains laboratoires (Jonat et al., 1990 ; Yang-Yen et al., 1990). Les interactions protéines-protéines peuvent également passer par des facteurs intermédiaires. Dans le promoteur du gène de l'uPA (urokinase-type plasminogen activator), on trouve un site AP-1/PEA3 activant la transcription en synergie avec un autre site AP-1 situé plus en aval. Ce qui nous intéresse ici est que ce dernier site peut être remplacé par un site GRE. La synergie s'obtient alors entre AP-1 et les glucocorticoïdes et dépend de l'intégrité des séquences localisées entre les sites AP-1 et GRE. Ce fragment d'ADN baptisé COM (pour Co-Operation Mediator) fixe au moins quatre complexes protéiques interagissant, du moins pour certains, soit avec AP-1, soit avec le récepteur des glucocorticoïdes (Nerlov et al., 1992).

III. LE CAS C-ERBA

Notre visite dans le monde des récepteurs nucléaires nous a permis de dégager certaines lois générales de structure, de fonctionnement. Quelle en est l'application à *c-erbA-1*, récepteur des hormones thyroïdiennes ? Que peut-on dire de ses mécanismes d'action ?

1. Domaines fonctionnels

Nous avons vu l'organisation générale en domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires. C'est bien souvent par analogie avec ces protéines que l'identification des domaines a été initialement faite pour *c-erbA* (figure 19). On s'est très vite rendu compte que si les gènes *c-erbA* codent des récepteurs des hormones thyroïdiennes, le produit de *v-erbA*, lui, est incapable de fixer la T3 (Sap et al., 1986). La comparaison des séquences des deux protéines est donc un bon moyen d'étudier les relations structures-fonctions du récepteur. Cela a permis de montrer que l'extrémité C-terminale de la protéine est impliquée dans la fixation de l'hormone. Un échange de cette région de *v-erbA* contre l'équivalent de *c-erbA* permet

d'acquérir la fixation hormonale (Munoz et al., 1988). C'est ici la région L2 qui est déficiente dans *v-erbA*.

Comparons maintenant la séquence des différentes isoformes de *c-erbA-1*. L'épissage alternatif a pour conséquence, dans la forme $\alpha 2$, l'absence de la région L2, remplacée par des séquences plus en aval. Ce produit est donc incapable de fixer efficacement la T3 (Lazar et al., 1989a). Ceci explique des observations initialement contradictoires : pour certains laboratoires, l'équivalent cellulaire de *v-erbA* ne fixait pas l'hormone, alors que pour d'autres, oui.

C'est donc la forme $\alpha 1$ qui représente le vrai récepteur des hormones thyroïdiennes et est dotée de la capacité de transactivation d'une manière dépendante de la fixation de l'hormone. $\alpha 2$ est capable d'interférer négativement avec la transactivation induite par $\alpha 1$ (Izumo et Mahdavi, 1988 ; Koenig et al., 1989). Le domaine de fixation à l'ADN étant identique entre $\alpha 1$ et $\alpha 2$, on pourrait, *a priori*, supposer une fixation de cette dernière forme sur les mêmes sites que $\alpha 1$ et /ou une interaction avec des facteurs communs. Néanmoins, des résultats récents suggèrent que, si la forme $\alpha 2$, exprimée en bactéries, peut se fixer sur un site TRE palindromique, la stabilité du complexe est plus faible que pour une liaison TRE- $\alpha 1$ (Katz et al., 1992). De plus, $\alpha 2$ semble incapable d'hétérodimériser avec les cofacteurs cellulaires favorisant la fixation de $\alpha 1$ à l'ADN. C'est clairement la région C-terminale qui est impliquée dans cette incapacitation puisque le remplacement de ces séquences de $\alpha 2$ par celles de $\alpha 1$ confère les propriétés fixatrices de cette dernière isoforme. Il faut certainement mettre ces résultats en parallèle avec les données concernant l'effet de l'hormone sur la fixation du récepteur à l'ADN. Quoiqu'il en soit, il semble clair que $\alpha 2$ peut jouer un rôle d'antagoniste de la forme $\alpha 1$ et inhiber la transcription des gènes cibles de celle-ci, de manière indépendante de l'hormone.

2. Expression de *c-erbA-1* et sa régulation

Qu'en est-il de l'expression de *c-erbA* et de ses différentes formes ? Il apparaît d'abord que le gène *c-erbA-1* est exprimé un peu partout dans l'organisme mais faiblement alors que l'autre récepteur des hormones thyroïdiennes (codé par *c-erbA-2*) possède une expression plus forte mais plus variable d'un tissu à un autre (Mitsuhashi et Nikodem, 1989 ; Sakurai et al., 1989). Les formes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ semblent exprimées à taux constant avec une légère prédominance de cette dernière sur la première dans certains organes (Mitsuhashi et Nikodem, 1989). Certaines données suggèrent que la T3 régule négativement l'expression des gènes *c-erbA* chez le rat (Lazar et al., 1988 ; Mitsuhashi et Nikodem, 1989 ; Hodin et al, 1990) avec toutefois des exceptions tissulaires. On ne sait ce qu'il en est chez l'homme.

Il semble néanmoins que cette balance $\alpha 1/\alpha 2$ puisse être affectée par la transformation. Le taux de l'ARN présent dans des fibroblastes de rongeurs et codant le produit $\alpha 2$ augmente

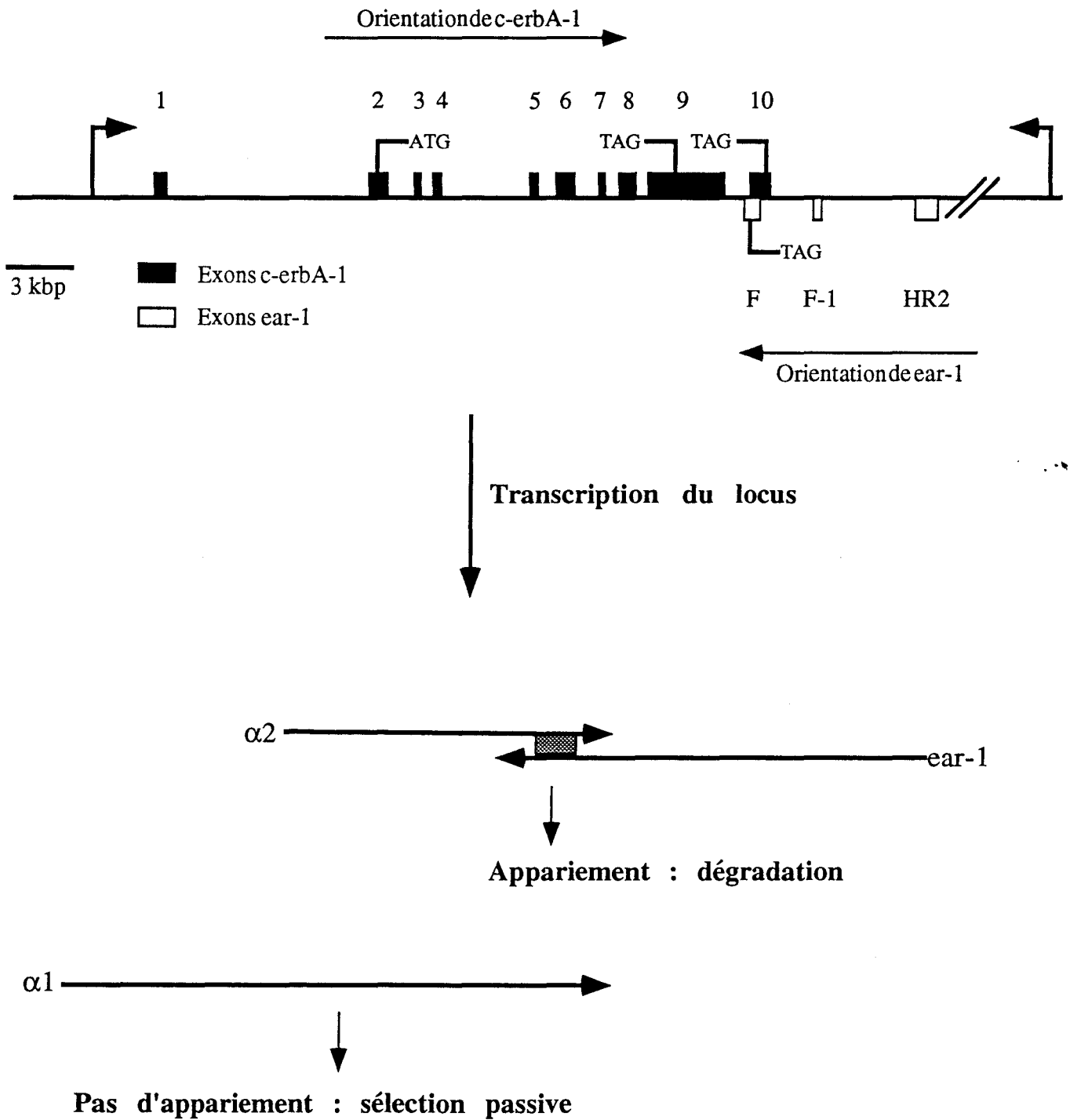


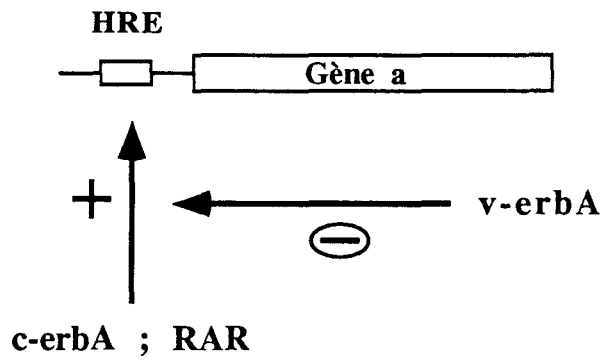
Figure 20 : Chevauchement c-erbA-1/ear-1 et hypothèse de régulation

avec la transformation (par l'Adénovirus, les rayons X), conjointement avec une baisse du taux de $\alpha 1$ (Too et Guernsey, 1992). Les auteurs en tirent l'explication de la perte de l'action de la T3 observée pour certains tissus néoplasiques, avec l'opposition classique entre voies de différenciation (inductible par l'hormone) et voies de prolifération.

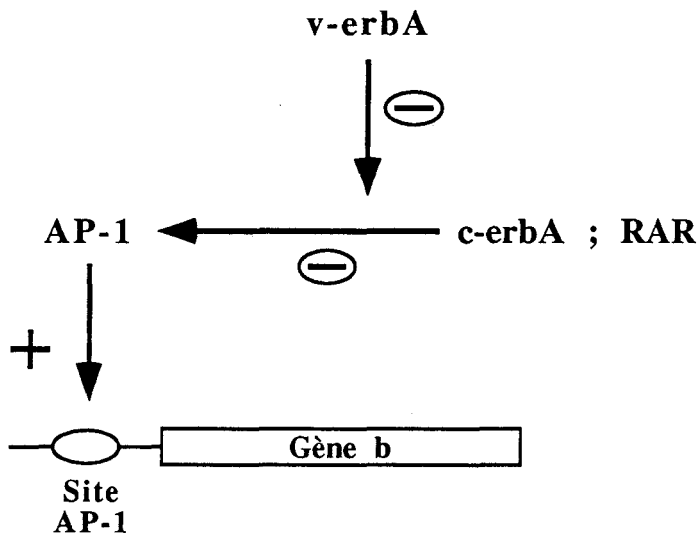
Comment peut se faire la régulation $\alpha 1/\alpha 2$? L'étude de la partie 3' du gène *c-erbA-1* réalisée chez le rat (Lazar et al., 1989b) a révélé à cet égard une caractéristique intéressante. Le locus *c-erbA-1* porte également un autre gène appelé *rev-erbA* ou *ear-1* (Miyajima et al., 1989), transcrit dans l'orientation opposée et chevauchant le gène *c-erbA-1* en son extrémité 3' (figure 20). La détermination de l'organisation génomique du locus *c-erbA-1* chez l'homme par Laudet et al. (1991) a démontré la conservation phylogénique de cette structure unique en son genre. Il existe, certes, des gènes cellulaires se chevauchant chez les eucaryotes, mais aucun cas n'a été décrit où les deux gènes appartiennent à la même famille. Le gène *ear-1* fait donc également partie de la famille des récepteurs nucléaires mais il est pour l'instant orphelin et on ne connaît rien de ses caractéristiques de fixation à l'ADN (si tant est qu'il en ait la capacité, ce qui n'est que suggéré par l'homologie de séquence). La zone 3' de *ear-1* (correspondant à ses exons F et F-1) chevauche le gène *c-erbA-1* au niveau de l'exon 10. Celui-ci n'est présent que dans l'ARN correspondant à la forme $\alpha 2$. On peut donc supposer une régulation de la balance $\alpha 1/\alpha 2$ passant par l'expression de *ear-1*. La présence du complexe de transcription sur un des deux brins (codant pour *ear-1* ou *c-erbA1*) peut, par encombrement stérique, inhiber l'expression de l'autre. Alternativement (et de façon non mutuellement exclusive), les ARN correspondant à $\alpha 2$ et à *ear-1* peuvent s'hybrider dans leur partie 3', ce qui conduirait à une dégradation du complexe par les RNases friandes de ce genres de structure ARN double-brin (seule cette dernière hypothèse est illustrée figure 20). L'expression du gène *ear-1* induirait en tous cas une expression accrue des formes $\alpha 1$ par sélection négative des formes $\alpha 2$. Dans ce sens, un parallèle a été dressé entre l'expression de *ear-1* et la prédominance des formes $\alpha 1$, mais la relation n'est pas établie (Lazar et al., 1990). Le promoteur du gène *ear-1* n'étant pas encore cloné, on ne peut rien savoir des stimuli qui l'activent. D'autre part, une étude de l'expression de ce gène en fonction de la transformation (puisque la balance $\alpha 1/\alpha 2$ semble altérée par celle-ci [Too et Guernsey, 1992]) demande à être faite.

3. Mécanismes d'action de *v-erbA*

Le produit de *v-erbA* est incapable de fixer les hormones thyroïdiennes mais peut néanmoins se fixer sur les mêmes sites que les produits de *c-erbA-1*. La protéine p75^{*v-erbA*} peut donc agir comme un répresseur constitutif de l'action de son homologue cellulaire (Sap et al., 1986, 1989 ; Privalsky et al., 1988), en particulier par compétition pour l'occupation des sites TRE dans les promoteurs des gènes régulés par les récepteurs des hormones thyroïdiennes



Exemple du gène de l'anhydrase carbonique



Exemple du gène de la collagénase

Figure 21 : Deux mécanismes d'actions possibles de v-erbA

(figure 21). On a effectivement trouvé de ces gènes dont l'expression est susceptible d'être régulée positivement par les THR et négativement par le produit de *v-erbA*. C'est le cas de Band 3 (un transporteur d'anion des érythrocytes), de l'anhydrase carbonique de type II (ACOII), une protéine importante pour la régulation du métabolisme du CO₂ et de l'acide δ-aminolévulinique synthétase (ALA-S), enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'hème (Zenke et al., 1988 ; 1990). Des résultats récents (Fuerstenberg et al., 1992) suggèrent que l'inhibition de l'expression de Band 3 et de l'ACOII n'est pas directement responsable du blocage de la différenciation mais confère à la cellule transformée par *v-erbA* une plus grande tolérance vis-à-vis du pH et de la force ionique du milieu de culture. Les gènes cibles de *v-erbA* impliqués dans la différenciation érythroïdes sont donc encore à identifier. L'importance des différences dans le domaine C-terminal des deux protéines (et particulièrement, la délétion, dans *v-erbA*, des 9 derniers acides aminés de *c-erbA*) a été clairement mise en évidence dans les effets transcriptionnels différentiels de *c-erbA* et *v-erbA*. On pourrait supposer, au vu des grandes capacités d'hétérodimérisation des membres de la famille des récepteurs nucléaires, qu'un des mécanismes d'action de *v-erbA* passe par la dimérisation des produits *v-erbA-c-erbA*, résultant en un complexe inactif. Il n'en est rien, une mutation dans le domaine E de *v-erbA* empêchant ce type de complexe de se former (Forman et Samuels, 1990a et b). Néanmoins, il a été récemment montré que *v-erbA* est capable d'hétérodimériser avec les RXR (Hermann et al., 1993). Les complexes *v-erbA-RXR* peuvent se fixer sur des TRE et exercer un effet dominant négatif sur l'activation médiée par le produit du gène *c-erbA-1*. Une autre mutation importante de *v-erbA* a été mise en évidence, cette fois dans le domaine C (responsable de la fixation à l'ADN). La conséquence de celle-ci est le fait que les sites de reconnaissance sur l'ADN *in vivo* peuvent être légèrement différents entre *c-erbA* et *v-erbA* (Boucher et Privalsky, 1990 ; De Verneuil et Metzger, 1990).

Les recherches actuelles semblent évoluer dans une autre direction. En effet, le produit de *v-erbA* est capable d'interférer avec les récepteurs de l'acide rétinoïque, de même qu'avec celui des œstrogènes mais pas avec celui des glucocorticoïdes (Sharif et Privalsky, 1991). Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont capables d'inhiber la prolifération de fibroblastes de poulet. C'est cet effet represser qui est, à son tour inhibé *in vivo* par le produit de *v-erbA* (Desbois et al., 1991a et b). De plus, ces mêmes travaux ont montré que *v-erbA* est capable d'empêcher l'inactivation du complexe AP-1 induite par les récepteurs de l'acide rétinoïque (Desbois et al., 1991b). Cette inhibition d'inhibition a été montrée sur le promoteur du gène de la collagénase impliquée dans la prolifération (voir figure 21). *v-erbA* est également capable d'interférer avec les récepteurs de l'acide rétinoïque dans des cellules d'érythroleucémie. Un blocage de l'activation transcriptionnelle exercée par les trois RARs et passant par les sites RARE a été récemment démontré (Sande et al., 1993). La surexpression de RAR α annule partiellement l'action de *v-erbA*. Ces résultats semblent toutefois en contradiction avec ceux de Hermann et al. (1993) pour qui les hétérodimères *v-erbA-RXR* (effecteurs du caractère dominant négatif de

v-erbA sur son homologue cellulaire) sont capables de se fixer sur et de réprimer la transcription à partir de sites TRE mais n'ont aucune action sur les sites RARE. Notons toutefois que les cibles moléculaires utilisées dans ces deux études ne sont pas identiques, de mêmes que les systèmes cellulaires. Hermann et al. (1993) ne s'intéressent d'autre part qu'à l'hétérodimérisation de *v-erbA* avec les RXR.

On conçoit donc deux niveaux d'action de *v-erbA*. Le premier implique un blocage de la différenciation induite par *c-erbA*. Le second concerne l'inhibition de la répression de fonctions associées à la prolifération par les récepteurs de l'acide rétinoïque.

v-erbA promeut la prolifération cellulaire et *c-erbA* a une action antagoniste à cet égard. Peut-on pour autant dire que *c-erbA* est un anti-oncogène comme le considère R. Weinberg (1991) ? Les travaux récents de l'équipe de Hartmut Beug ont en effet montré que le produit de *c-erbA-1*, en coopération avec le récepteur de l'acide rétinoïque, (et de manière dépendante des deux ligands) est capable d'interférer avec l'effet transformant de kinases oncogènes comme *v-erbB* ou *v-sea* (Schroeder et al, 1992a et b) en déclenchant la différenciation terminale des cellules transformées (érythroblastes) en érythrocytes matures. Cette réversion semble impossible lorsqu'on a transformation à la fois par une kinase et par *v-erbA*, confirmant par là le caractère dominant de l'action de *v-erbA* sur son homologue cellulaire. Il ne s'agit, bien sûr, pas là d'une réversion "canonique" de la transformation mais d'une réactivation de programmes de différenciation cellulaire. On peut néanmoins donner raison à la définition de R. Weinberg, en précisant qu'il s'agit d'une mode particulier d'antitransformation (et en évitant les querelles de nature sémantique). Le rôle de $THR\alpha$ a également été mis en évidence dans la différenciation des myoblastes (Carnac et al., 1992) : l'expression du gène *MyoDI* est augmentée de manière directe par le produit de *c-erbA* α 1. Ce phénomène s'accompagne d'une apparition de marqueurs spécifiques de la différenciation musculaire terminale. Notons que l'influence de $THR\alpha$ se marque sur ce qui semble être un "master gene" de la différenciation de ces tissus. En effet, la transformation des myoblastes par *ras* ou *fos* activés se traduit par un blocage de la myogénèse s'accompagnant d'une inhibition de l'expression de *MyoDI* (Lassar et al., 1989). La surexpression de ce gène dans ces myoblastes transformés ré-enclenche les processus de différenciation musculaire. En mettant ces divers travaux en parallèle, on pourrait s'attendre à ce que *c-erbA-1* soit capable d'induire une réversion de la transformation des myoblastes transformés par *ras* ou *fos* puisque THR agit sur les mêmes cibles que ces oncogènes, mais ce ne sont que spéculations.

IV. DEUXIEME CONCLUSION TOUJOURS AUSSI PROVISoire

Nous avons présenté la famille des récepteurs nucléaires et tâché de dégager certaines propriétés générales et caractéristiques communes à ses membres, insistant parfois sur les concordances, à d'autres endroits sur les différences.

Se focalisant sur *c-erbA*, nous avons vu la grande complexité du système : les possibilités de régulation de l'expression, les différents produits du gène, les séquences d'ADN cibles, la souplesse des combinatoires de dimérisation, les interactions avec d'autres éléments transcriptionnels, tout concourt à conférer un haut degré de variabilité dans les effets observables. On conçoit, certes, depuis longtemps la finesse des régulations hormonales, mais les pièces du puzzle ne commencent à être identifiées que depuis récemment et, somme toute, partiellement. En particulier, au vu de la plasticité des réponses possibles, on reste un peu sur sa faim quant aux cibles moléculaires identifiées et à leurs impacts physiologiques.

En soi, *c-erbA-1* a été (tout comme les Parvovirus) victime d'une tragique erreur juridico-tumorale : considéré un temps comme un oncogène, il est maintenant lavé de ces soupçons infâmes et réhabilité au titre d'antioncogène (Weinberg, 1991). Impliqué dans la différenciation érythroïde, divers phénomènes de régulation hormonale et d'antiprolifération, l'intérêt de son étude n'a pas baissé avec son procès en révision. Il est ainsi important de déterminer la régulation de l'expression de ce gène, en soi, et au niveau des rapports de ses différentes isoformes, antagonistes entre elles. Une des étapes de cette étude consiste en la caractérisation d'un promoteur fonctionnel pour *c-erbA-1* ainsi qu'en la mise en évidence d'effecteurs pouvant influencer son activité. La présence, parmi ceux-ci, de produits parvoviraux est certes inattendue. Le confluent de ces problématiques *a priori* distinctes amène néanmoins d'intéressantes hypothèses quant au fonctionnement des deux parties.

RESULTATS ET DISCUSSION

ARTICLE I

ACTIVITES TRANSCRIPTIONNELLES EXERCEES PAR LES PROTEINES NON STRUCTURALES DU PARVOVIRUS MVMp

Les protéines non structurales (NS) du parvovirus MVMp sont les effecteurs de la lyse engendrée par ce virus. Elles interviennent, de plus, dans un certain nombre de phénomènes comme la régulation de la réplication du génome viral, l'activation en *trans* du promoteur tardif parvoviral P38, la répression de l'expression de différents promoteurs hétérologues. Ces activités transcriptionnelles n'ont pu, jusqu'à présent, être physiquement séparées de l'effet cytopathique exercé par les protéines NS (Legendre et Rommelaere, 1992). De plus, ces mêmes travaux ont montré que, outre la séquence de fixation de nucléotides, la zone majoritairement responsable de ces fonctions est confinée à l'extrémité C-terminale de la protéine NS1. En quelque sorte, et malgré le raccourci dialectique que cette formule représente, étudier l'effet transcriptionnel des protéines NS revient à étudier les mécanismes de la lyse parvovirale.

I. RESUME

Nous avons choisi d'étudier le comportement de différentes constructions mutantes des protéines NS du parvovirus MVMp sur le promoteur (LTR) du RSV (Rous Sarcoma Virus). A titre de contrôle, nous avons, en parallèle, déterminé la réponse du promoteur P38 de MVMp à la présence de ces mutants. La coopération entre les deux protéines NS1 et NS2 semble requise pour la répression optimale du LTR de RSV, alors que NS1 est non seulement nécessaire mais également suffisante pour l'activation en *trans* du promoteur P38. L'extrémité C-terminale de NS1, exprimée seule, est, de plus, capable d'inhiber l'expression du LTR de RSV, sans toutefois augmenter l'expression du P38.

Nous avons, dans un deuxième temps, examiné l'expression de différents promoteurs en présence d'un plasmide codant les protéines NS1 et NS2. Ce dernier est capable de réprimer (outre le LTR de RSV, déjà cité) les promoteurs suivants : P4 de MVMp, promoteur précoce de SV40, promoteur minimal du gène *tk* (Thymidine Kinase) de HSV (Herpes Simplex Virus), promoteur du gène *c-mil* de poulet. Une comparaison de la structure primaire de ces différents promoteurs a permis de définir une séquence minimale commune qui pourrait éventuellement servir de cible à l'action répressive des protéines NS.

Titre : ACTIVITES TRANSCRIPTIONNELLES EXERCEES PAR LES PROTEINES NON STRUCTURALES DU PARVOVIRUS MVMp

Jean-Marc VANACKER, Manoussos PERROS, Nadine DUPONCHEL et Jean ROMMELAERE

Unité d'Oncologie Moléculaire, CNRS URA 1160, Institut Pasteur, 1 rue Calmette, 59019 LILLE

Résumé :

Le pouvoir cytopathique des protéines non structurales (NS) du parvovirus autonome MVMp semble être indissociable de leurs activités transcriptionnelles. La partie C-terminale de la protéine NS1 de MVMp est non seulement indispensable à l'inhibition du promoteur (LTR) du virus RSV mais est également capable d'exercer seule cette répression. Nous montrons, d'autre part, que l'inhibition transcriptionnelle peut s'exercer indépendamment de la présence d'une boîte TATA dans le promoteur considéré.

Introduction :

Les parvovirus autonomes sont de petits virus à ADN possédant des propriétés oncosuppressives *in vivo* corrélables à leurs activités oncolytiques *in vitro* (voir pour revue [1]). Celles-ci s'exercent par l'intermédiaire des protéines non structurales (NS, [2], [3]) codées par l'unité de transcription précoce et dont le taux d'expression est supérieur dans les cellules transformées sensibles par rapport aux cellules normales résistantes à l'attaque virale [4, 5]. Les protéines NS1 et NS2 du virus MVMp sont, en outre, impliquées dans la régulation de la réplication de l'ADN et de la transcription des gènes parvoviraux, ainsi que dans la répression de différents promoteurs hétérologues [6]. Si cette dernière activité semble, dans les cellules humaines NB-E, physiquement indissociable de la cytotoxicité induite par les protéines non structurales [7], ses mécanismes sont encore largement inconnus et notamment, la cible moléculaire de ces protéines.

Afin d'augmenter nos connaissances dans ce domaine, nous avons construit une série de mutants de délétion dans l'unité de transcription précoce du parvovirus MVMp. Nous avons analysé, dans les cellules FREJ4 (fibroblastes de rat FR3T3 transformés de manière stable par l'oncogène humain *c-Ha-ras*, [8]) l'effet des plasmides résultants sur l'expression du gène CAT placé en aval de différents promoteurs. Nos résultats montrent que, i) si la protéine NS1 est nécessaire et suffisante à l'activation du promoteur parvoviral tardif P38, la coopération entre NS1 et NS2 semble requise pour la répression du LTR de RSV. Un fragment C-terminal de NS1 est néanmoins capable à lui seul d'imiter les effets inhibiteurs de

| | | Répression du LTR de RSV | Activation du P38 de MVMP |
|-----------|--|--------------------------------|---------------------------------|
| pULB 3566 | | + | + |
| pULB 3259 | | - | + |
| pIPLX | | - | - |
| pIPLB | | - | - |
| pIPLN | | + | - |
| pULB 3543 | | - | - |

l'unité complète. ii) l'inhibition de la transcription est indépendante de la présence d'une boîte TATA dans le promoteur considéré. D'autre part, la comparaison de la séquence des différents promoteurs étudiés nous a permis de mettre en évidence une séquence qui pourrait être la cible moléculaire de l'action négative des protéines NS.

Matériel et Méthodes :

Plasmides : Les plasmides pULB3566 (exprimant les protéines NS1 et NS2 sous le contrôle de leur propre promoteur P4), pULB3543 (ne contenant que les séquences du promoteur P4) et pULB3259 seront décrits ailleurs (Spegelaere et al., en préparation). Le plasmide pULB3566 nous a servi de base de clonage. Le plasmide pIPLK est obtenu par digestion par BstEII, remplissage du site et religation. Le plasmide pIPLX est obtenu par insertion d'un linker XbaI dans le site PvuII. Le plasmide pIPLN est obtenu par digestion par NcoI et religation. Le clonage et la caractérisation du promoteur du gène *c-mil* de poulet sera décrit ailleurs (Ansieau et al., en préparation).

Transfection et test CAT : Différentes quantités (0,5 µg, 1 µg, 2 µg) d'ADN des plasmides portant des séquences dérivées de MVM ont été cotransfectées dans les cellules FREJ4 avec 1,5 µg d'ADN de plasmide portant le gène rapporteur CAT sous le contrôle des différents promoteurs par la méthode de précipitation au Phosphate de Calcium déjà décrite [9]. Les réactions ont été normalisées par la quantité de protéines présentes dans chaque échantillon. L'activité CAT a été déterminée après lyse des cellules 48 h après transfection.

Résultats :

La figure présente l'effet de séquences mutantes des protéines NS1 et NS2 sur l'activation du promoteur P38 de MVMp et sur la répression du promoteur (LTR) du virus RSV. La protéine NS1 est nécessaire et suffisante à l'activation du P38 alors qu'une coopération entre les deux protéines NS semble requise pour la répression du promoteur hétérologue. Néanmoins, comme en témoigne le plasmide pIPLN, l'extrémité C-terminale de NS1 semble douée d'activité inhibitrice compensant l'absence, dans cette construction, de la protéine NS2.

Le tableau présente les résultats obtenus par trois expériences indépendantes réalisées dans les cellules FREJ4. Les protéines NS répriment l'expression de tous les promoteurs testés (sauf dans le cas du promoteur contrôle P38 de MVMp, [10]) indépendamment de la présence d'une boîte TATA (dont le promoteur *c-mil* est dépourvu).

| Promoteurs | Boîte TATA | Effet régulateur en <i>trans</i> des protéines NS |
|--------------|------------|---|
| P4 MVMp | + | - |
| LTR RSV | + | - |
| SV40 précoce | + | - |
| P38 MVMp | + | + |
| <i>c-mil</i> | - | - |

Tableau

Discussion :

Les protéines NS du parvovirus MVMp sont requises pour la cytotoxicité exercée par ce virus et pour un certain nombre d'activités biochimiques. Parmi celles-ci, la capacité à réprimer les promoteurs hétérologues semble physiquement reliée à l'effet cytopathique de ces protéines [7]. La répression optimale du LTR de RSV dans les cellules de rat FREJ4 semble requérir la présence de NS1 et NS2, alors que dans les cellules humaines NB-E, NS1 est suffisante pour cette activité. Divers travaux ont montré que NS2 n'est indispensable au bon déroulement du cycle parvoviral (et notamment pour la production d'ADN viral et de particules virales infectieuses matures) que dans les cellules murines [11, 12]. Nos résultats, conjointement à ceux de Legendre et Rommelaere [7] suggèrent que la protéine NS2 intervient également dans la répression de promoteurs hétérologues de manière dépendante de l'espèce cellulaire étudiée.

La faible expression du promoteur P38 en l'absence d'activateur en *trans* est inhibée en présence du plasmide pIPLN. Ce dernier résultat pourrait suggérer la présence d'une zone activatrice de la transcription dans une partie plus centrale ou N-terminale de NS : en présence de celle-ci (plasmide pULB3259), on observe, en effet, une stimulation du promoteur P38. Bien que nécessaire, cette zone n'apparaît cependant pas suffisante à l'activation, le plasmide pIPLK étant par exemple incapable de stimuler le promoteur P38.

Nous avons comparé deux à deux les séquences de promoteurs étudiés. Une séquence de dix nucléotides a pu être mise en évidence, dont l'homologie d'un promoteur à l'autre est de 80 %. Sa structure (de consensus déduit : AGNNAG(T/C)(A/G)AC) ne semble pas présenter d'analogie avec un site de fixation de facteur de transcription déjà décrit. Elle est absente du promoteur parvoviral P38, activé par les protéines NS, ainsi que de la construction P4-CAT utilisée par Doerig et al. [13]. Ces auteurs ayant démontré l'activation du promoteur P4 par les protéines NS du parvovirus MVMp, il serait tentant de suggérer une implication de cette séquence dans la répression transcriptionnelle exercée par les protéines NS.

Références :

- [1] J. ROMMELAERE *M/S*, 6, 1990, p. 534-543
- [2] P. CAILLET-FAUQUET, M. PERROS, A. BRANDENBURGER, P. SPEGELAERE et J. ROMMELAERE *EMBO. J.*, 9, 1990, p. 2989-2995
- [3] A. BRANDENBURGER, D. LEGENDRE, B. AVALOSSE et J. ROMMELAERE *Virology*, 174, 1990, p. 576-584
- [4] J.J. CORNELIS, N. SPRUYT, P. SPEGELAERE, E. GUETTA, T. DARAWSHI, S.F. COTMORE, J. TAL et J. ROMMELAERE *J Virol*, 62, 1988, p. 3438-3444.

- [5] J.J. CORNELIS, Y.Q. CHEN, N. SPRUYT, N. DUPONCHEL, S.F. COTMORE, P. TATTERSALL et J. ROMMELAERE, *J. Virol.*, 64, 1990, p. 2537-2544
- [6] S.L. III RHODE et S.M. RICHARD *J. Virol.*, 61, 1987, p. 2807-2815
- [7] D. LEGENDRE et J. ROMMELAERE *J. Virol.*, 66, 1992, p. 5705-5713
- [8] B. VAN HILLE, N. DUPONCHEL, N. SALOME, N. SPRUYT, S.F. COTMORE, P. TATTERSALL, J.J. CORNELIS et J. ROMMELAERE. *Virology*, 171, 1989, p. 89-97.
- [9] C. CHEN et H. OKAYAMA. *Molec. cell. Biol.*, 7, 1987, p. 2745-2752.
- [10] S. L. III RHODE *J. Virol.*, 55, 1985, p. 886-889
- [11] L.K. NAEGER, J. CATER et D. PINTEL *J. Virol.*, 64, 1990, p. 6166-6175
- [12] J. CATER et D. PINTEL *J. Gen. Virol.*, 73, 1992, p. 1839-1843
- [13] C. DOERIG, B. HIRT, J.P. ANTONIETTI et P. BEARD *J. Virol.*, 64, 1990, p. 387-396

Légende de la figure :

Effet de différentes constructions mutantes des protéines NS du parvovirus MVMp sur le promoteur (LTR) du virus RSV. Les parties codantes exprimées des protéines non structurales de MVMp sont en blanc, les parties non exprimées en noir. Les sites de restriction utilisés pour les constructions sont indiqués. Le promoteur P4 de MVMp dirigeant la synthèse des protéines NS est indiqué par une flèche.

Effect of mutant constructs of NS proteins of parvovirus MVMp on RSV promoter (LTR) Expressed coding sequences of MVMp NS proteins are represented as white blocks, non expressed parts are in black. Restriction sites used for cloning procedures are indicated. MVMp P4 promoter driving NS protein production is marked by an arrow.

Légende du tableau :

Activité des protéines NS du parvovirus MVMp sur différents promoteurs. L'effet des protéines (déterminé par test CAT) est indiqué par (-) : répression du promoteur ou (+) : activation du promoteur.

Activity of MVMp NS proteins on various promoters. The effect of NS proteins (determined by CAT assay) is indicated as (-) for repression or (+) for activation.

English abridged version :

Title : TRANSCRIPTIONAL ACTIVITIES EXERTED BY THE NON STRUCTURAL PROTEINS OF PARVOVIRUS MVMp

Abstract : Cytopathic properties of the non structural (NS) proteins of parvovirus MVMp have been shown to be physically linked to their transcriptional activities. C-terminal part of NS1 protein is not only necessary to inhibit the promoter (LTR) of RSV virus but also displays repressing activities on its own. We also show that transcription inhibition is independent of the presence of a TATA box in the target promoter.

Parvoviruses are oncosuppressive agents that exert cytopathic effects thought to be mediated by their non structural (NS) products [1]. These proteins display transcriptional activities (transactivation of the late parvoviral promoter P38, transinhibition of some heterologous promoters [6, 10]) which have not been physically separated so far from their lytic behaviour [7]. We have constructed a series of deletion mutants in the NS proteins coding sequence of parvovirus MVMp and have studied their effect on the promoter (LTR) of the Rous Sarcoma Virus (RSV). Our results show that, in the *ras*-transformed rat FR3T3 (FREJ4) cell line, both NS1 and NS2 proteins are required for optimal repression of the LTR, on the contrary to the human cell line NB-E [7] in which NS2 is dispensable for this activity. This may suggest that the participation of NS2 in transcriptional inhibition is species-specific as is its role in parvoviral DNA- and infectious virion production [11, 12]. On the other hand, NS1 is necessary and sufficient for transactivation of the late parvoviral P38 promoter. The transinhibition function is abrogated by deletion of the C-terminal part of the NS1 protein, which is able to exert, on its own, a similar repressing effect.

We also analysed the expression driven by other promoters (SV40 early, chicken *c-mil*, MVMp P4 early promoter) in the presence of parvoviral non structural proteins. In FREJ4 cells, all of them are inhibited by NS proteins. In agreement with other results [6, 7, 10], MVMp P38 promoter was found to be stimulated. Repression is independent of the presence of a TATA-box (absent in the *c-mil* promoter). Sequence comparison between the four promoters tested (including RSV LTR) revealed the existence of a structure (deducted consensus : AGNNAG(T/C)(A/G)AC) which does not display any significant homology with described cis-acting site. The sequence could be hypothesized to mediate repression by NS proteins.

II. COMMENTAIRE

Nos résultats sur l'effet des constructions mutantes des protéines NS confirment partiellement les données développées par Legendre et Rommelaere (1992) : NS1 est indispensable à l'inhibition en *trans* de promoteurs hétérologues et une zone essentielle à cette activité est localisée en l'extrémité C-terminale de la protéine. Les résultats obtenus avec le plasmide pULB3259 (présentant des mutations dans le site donneur d'épissage du grand intron) suggèrent néanmoins que, si NS1 est suffisante pour l'activation du P38, la répression optimale du LTR de RSV requiert la présence de NS2 (notons quand même une inhibition partielle de l'expression par pULB3259). Ces propriétés transcriptionnelles ont été examinées dans les cellules de rat FREJ4, alors que Legendre et Rommelaere (1992) ont travaillé dans les cellules humaines NB-E. Cette différence de système cellulaire peut être à l'origine des discordances observées à propos de l'utilité de la protéine NS2 dans la répression transcriptionnelle. En effet, le groupe de David Pintel a montré que la protéine NS2 du parvovirus MVMp est requise pour la réplication de l'ADN viral et la production de particules infectieuses dans les cellules murines (Naeger et al., 1990 ; Cater et Pintel, 1992). Peut-être avons-nous là un autre exemple du caractère essentiel de NS2 dans les cellules murines.

La zone C-terminale de NS1 est, de manière indépendante, capable de réprimer l'expression du LTR et pourrait représenter une zone inhibitrice forte, indépendante de la séquence cible ; en effet, la faible expression du promoteur P38 en l'absence d'activateur en *trans* est inhibée en présence du plasmide pIPLN. Ce dernier résultat suggère la présence d'une zone de modulation de la répression située dans une partie plus centrale ou N-terminale de NS : en présence de celle-ci (plasmide pULB3259), on observe, en effet, une activation du promoteur P38. Cependant, il ne s'agit certainement pas d'une zone activatrice de la transcription, le plasmide pIPLK étant par exemple incapable d'activer le promoteur P38. On peut, alternativement, penser à la création artificielle d'un répresseur de transcription agissant, par sa conformation particulière, d'une manière radicalement indépendante des mécanismes régissant l'inhibition transcriptionnelle par NS1 complète.

Le fait que les différents promoteurs analysés présentent tous la même réponse négative à la présence de NS1 suggère que cette réponse passe par des facteurs de transcription assez généraux. La présence de la boîte TATA n'est pas nécessaire mais cela n'implique rien par rapport aux éléments du complexe basal de transcription ; on sait, par exemple, que la protéine TBP (TATA-Binding Protein) est requise pour l'activité de promoteurs contenant ou non une boîte TATA, par l'intermédiaire de TAF (TBP-Associated Factors) différents suivant le type de promoteur considéré (Taggart et al., 1992 ; Lobo et al., 1992 ; White et Jackson, 1992 ; Kassavetis et al., 1992). Il se pourrait ainsi que NS1 agisse en bloquant l'activité de la TBP ou de TAF (de type différent entre le LTR de RSV et le promoteur de *c-mil* par exemple). Il

| | | | | |
|----|----|----|----|----|
| AG | TC | AG | TT | AC |
| AG | TT | AG | CA | AC |
| AG | TC | AG | CA | AC |
| AG | GG | AG | TG | AC |

Promoteur P4, MVMp, nucléotide 200

LTR de RSV

Promoteur précoce de SV40

Promoteur de *c-mil*

AG^T_GNAG^T_CNAC

Consensus définissable

| | | | | |
|----|----|----|----|----|
| AG | AG | AG | TA | AC |
| AG | TT | AG | CA | AC |
| AG | TC | AG | CA | AC |
| AG | GG | AG | TG | AC |

Promoteur P4, MVMp, nucléotide 243

LTR de RSV

Promoteur précoce de SV40

Promoteur de *c-mil*

AGNNAG^{TA}_{CG}AC

Consensus définissable

Figure 22 : Séquences communes aux promoteurs réprimés par NS1

faudrait, dans ce cas, justifier l'activation d'autres promoteurs (P38 de MVM, *c-erbA-1*) requérant eux aussi la présence de TBP (et donc susceptible par là même d'être réprimés par NS1), par l'intervention d'un vrai site d'activation en *trans*, interférant avec l'effet négatif exercé sur TBP.

Les effets transcriptionnels des protéines NS n'ont été mesurés que par test CAT. Nous mettons ainsi en évidence un phénomène peut-être purement artificiel d'inhibition d'expression transitoire. Ceci ne préjuge en rien de ce qui peut se passer *in vivo* et en particulier au niveau du promoteur endogène du gène *c-mil* ou plutôt, dans le cas des cellules FREJ4, de son équivalent chez les Mammifères, le gène *c-raf*. Il faudrait déterminer les éventuelles variations d'expression de ce gène (par Northern blot) suite à l'infection par MVM. Le gène *c-raf* est considéré comme un "master-gene" dans la cascade des événements transmettant les signaux de prolifération extracellulaires vers le noyau. Il serait tentant de penser qu'une des actions antiprolifératives des parvovirus passe par l'inhibition de la transcription d'un gène clef de la transmission du signal mitotique, mais ce ne sont là que spéculations. Une critique possible de ces expériences en test CAT est le fait qu'on analyse un promoteur de poulet dans des cellules murines, ce qui est (quoiqu'on pense de la conservation phylogénique des promoteurs et des régulations) peu représentatif physiologiquement. Rien n'indique, en effet, que le promoteur du gène *c-raf* de rat réagirait de la même manière à la présence de protéines NS.

Les séquences des promoteurs réprimés par les protéines NS ont été comparées deux à deux par ordinateur. Un certain nombre de sites apparaissent communs à ces promoteurs pris par paires (ne serait-ce que les boîtes GC ou TATA, pour ceux qui en sont pourvus). Pour la plupart de ces sites, le taux d'homologie est faible, la séquence courte et, surtout, n'est pas retrouvée dans la totalité des promoteurs analysés. Une séquence de dix nucléotides a néanmoins pu être mise en évidence, dont l'homologie d'un promoteur à l'autre est de 80%. Cette séquence est présente, sous des formes variantes, en deux exemplaires dans le promoteur P4 de MVMp. En alignant la séquence présente dans tous les promoteurs testés, on peut définir une séquence minimale commune (présentée figure 22) que nous appellerons "consensus" pour la commodité de l'exposé et dont la structure est : AG(T/G)NAG(T/C)NAC si on prend en compte la première séquence de P4 de MVMp ou AGNNAG(T/C)(A/G)AC si on considère la seconde séquence parvovirale (les positions du A initial sont : 194 et 243, respectivement ; voir figure a). Cette structure représente 1 choix parmi 16384 séquences possibles de huit bases (calcul effectué dans le cas de la première séquence consensus compte-tenu des deux nucléotides aléatoires et des deux variations). La probabilité d'apparition au hasard d'une telle séquence dans une structure de 400 nucléotides (taille moyenne des promoteurs testés) peut être estimée à 2,4%. Qu'elle existe dans quatre promoteurs différents ne représente plus qu'une probabilité d'environ $3 \cdot 10^{-7}$. Cette séquence ne correspond apparemment pas à un site consensus de fixation décrit de facteur de transcription, du moins par rapport à la compilation de facteurs effectuée par Faisst et Meyer (1992). Il est clair que ces données, certes intrigantes, ne sont

justifiées que par des arguments informatiques et probabilistes. Il faudrait analyser l'effet de mutations de ces séquences sur l'inhibition d'expression exercée par NS1, les éventuelles fixations de protéines sur le site, analyser d'autres promoteurs pour la présence du consensus en fonction de l'effet de NS1, l'aptitude qu'aurait le consensus à conférer l'inhibition d'expression à un promoteur ne la contenant originellement pas... Un argument confortant l'intérêt de cette séquence réside également dans le fait qu'elle n'est pas présente dans les deux promoteurs dont l'expression est, non plus réprimée, mais stimulée par la protéine NS1 (le promoteur tardif P38 de MVM et le promoteur du gène *c-erbA-1* que nous étudions plus loin). D'autre part, elle n'a pas été retrouvée dans un sens inverse complémentaire, quel que soit le promoteur examiné. Si l'orientation est ainsi constante, la localisation du consensus dans les différents promoteurs est variable : entre la boîte TATA et le site d'initiation pour le P4, après ce dernier pour *c-mil*, avant la boîte TATA pour le LTR de RSV et le promoteur de SV40. Si tant est que le consensus soit fonctionnel, il doit donc être doté d'une certaine indépendance de position mais doit peut-être être orienté.

Nos résultats sur la répression du promoteur P4 de MVMp par NS1 sont en contradiction flagrante avec les données publiées par Doerig et al. (1990) pour qui les protéines NS stimulent l'activité de ce promoteur. Les constructions utilisées dans les deux laboratoires sont légèrement différentes. Le clone P4 utilisé par ces auteurs contient 228 nucléotides du promoteur (jusqu'au site TaqI), le notre 266 (jusqu'au site NcoI, soit 38 nucléotides supplémentaires). Les divergences de résultats peuvent être justifiées par cette différence de taille. Remarquons ainsi que le second site consensus mis en évidence dans le promoteur P4 débute en position 243, donc après le site TaqI final utilisé par Doerig et al. (1990). Peut-être faut-il y voir là un argument supplémentaire (un peu plus expérimental, cette fois) en faveur de la réalité fonctionnelle du site défini comme consensus.

ARTICLE II

CHARACTERIZATION OF A FUNCTIONAL PROMOTER FOR THE HUMAN THYROID HORMONE RECEPTOR ALPHA (*c-erbA*) GENE

Compte-tenu de la complexité et de la finesse des activités potentiellement exercées par les produits du gène *c-erbA-1*, il est essentiel de caractériser l'expression de celui-ci et sa régulation. Nous avons certes vu que l'expression de ce gène est plus importante dans les tissus embryonnaires que dans les tissus adultes où peu de variations existent. Néanmoins, l'étude de la régulation de la balance $\alpha 1/\alpha 2$ est importante, puisque de cet équilibre dépend la présence de facteurs antagonistes agissant en principe sur des cibles identiques.

L'étude de l'expression de *c-erbA-1* passe bien évidemment par la caractérisation d'un promoteur fonctionnel pour celui-ci, qu'a entreprise Vincent Laudet, en collaboration avec nous-mêmes.

I. RESUME

Nous nous sommes servi de la partie 5' de l'ADNc de *c-erbA-1* pour cribler une banque d'ADN génomique d'origine humaine. Ce fragment est commun aux deux ARNm $\alpha 1$ et $\alpha 2$ synthétisés à partir du gène. Ceci nous a permis d'isoler un fragment d'ADN correspondant au promoteur putatif du gène *c-erbA-1* (situé en 5' du début de l'ADNc). La séquence de ce fragment a été déterminée et n'a pas montré l'existence d'une boîte TATA classique présidant à l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II dans beaucoup de gènes. Les sites probables d'initiation de la transcription (en deux endroits du promoteur) ont été mis en évidence par des expériences de RNase protection et d'extension d'amorce. Dans ce fragment riche en nucléotides G et C, plusieurs sites putatifs d'interaction avec des facteurs de transcription ont été mis en évidence, en particulier avec Sp1, se fixant sur les boîtes GC. D'un point de vue fonctionnel, ce fragment, cloné en amont du gène rapporteur CAT, est capable d'en diriger la transcription d'une manière dose-dépendante. Nous avons également montré que ce promoteur faible est régulé positivement par la Dexaméthasone, un analogue synthétique des glucocorticoïdes.

Title page**CHARACTERIZATION OF A FUNCTIONAL PROMOTER FOR THE HUMAN THYROID HORMONE RECEPTOR ALPHA (*c-erbA-1*) GENE.**

Vincent LAUDET*, Jean Marc VANACKER, Guillaume ADELMANT, Agnès BEGUE and Dominique STEHELIN.

CNRS URA 1160, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette, 59019 LILLE Cedex, FRANCE

* To whom correspondence should be addressed

Running Title : THRA promoter.

Key words : Nuclear Receptors, Thyroid hormone, *c-erbA-1*, Promoter, Transcription Factors

ABSTRACT

The thyroid hormone receptor α (THRA or *c-erbA-1*) gene belongs to a family of genes which encode nuclear receptors for various hydrophobic ligands such as steroids, retinoic acid and thyroid hormones. We have previously described the genomic organization of the human THRA gene which comprises 10 exons distributed along 27 kbp of genomic DNA. We describe here a promoter which initiates THRA transcription. This promoter contains no obvious TATA-like element but is very GC rich and harbors numerous Sp1 sites. It also contains several sites similar to previously described *cis*-acting sequences including Hormone Responsive Elements (HRE). When transfected into cultured HeLa cells, it drives the expression of a CAT reporter gene. The activity of this human THRA promoter is enhanced by the synthetic glucocorticoid dexamethasone but seems unaffected by thyroid hormones.

INTRODUCTION

The thyroid hormone receptor α (THRA or *c-erbA-1*) belongs to a family of ligand-activated transcription factors which regulate the expression of target genes by binding to specific *cis*-acting sequences (Evans, 1988 ; Green and Chambon, 1991 ; Laudet and Stéhelin, 1992). This family includes nuclear receptors for several hydrophobic ligands, such as glucocorticoids, estrogens, progesterone, vitamin D, ecdysone and retinoic acid. In addition to these receptors for known ligands, several authors have described "orphan receptors" which are putative receptors for ligands still to be identified (Moore, 1990). Through phylogenic analyses, we and others have divided the superfamily of nuclear receptors into three subfamilies (Amero et al., 1992 ; Laudet et al., 1992) : one subfamily includes the 9-*cis*-retinoic acid receptors (RXRs) and the COUP group of genes, another one comprises the steroid hormone receptors as well as the *Drosophila knirps* genes. The last subfamily includes the genes encoding thyroid hormone receptors, all-*trans* retinoic acid receptors (RARs) as well as several orphan receptors. To date, this family contains three retinoic acid receptors α , β and γ (Giguere et al., 1987 ; Petkovitch et al., 1987 ; Brand et al., 1988 ; Zelent et al., 1989), five orphan receptors : *ear-1* (erbA related gene 1) (Lazar et al., 1989 ; Miyajima et al., 1988 ; 1989) its *Drosophila* homologue E75 gene (Segraves and Hogness, 1990) as well as the three recently described peroxysome proliferators activated receptors (PPARs α , β and γ ; Isseman and Green, 1990 ; Dreyer et al., 1992). This family also comprises two thyroid hormone receptors α (THRA on chromosome 17q11) and β (THRB on chromosome 3p24 ; Sap et al., 1986 ; Weinberger et al., 1986). THRA and THRB are similar in overall structure, being most related in the cysteine-rich

DNA-binding and C-terminal hormone-binding regions and more divergent in the N-terminal A/B domain for which no obvious function has been yet assigned. Nucleotide sequence comparison has revealed that the chicken THRA gene is the cellular progenitor of the *v-erbA* oncogene found in the Avian Erythroblastosis Virus (AEV ; Debuire et al., 1984 ; Sap et al., 1986). The *v-erbA* oncogene acts as a dominant negative regulator of the endogenous thyroid hormone receptors and blocks the differentiation of the erythroid target cells of AEV (reviewed in Beug and Vennström, 1991).

In addition to this diversity, isolation of THR cDNA clones has revealed that a variety of THRs may be produced (Mitsushashi et al., 1988 ; Thompson et al., 1987 ; Benbrook and Pfahl, 1987 ; Izumo et al., 1990). Alternative splicing of the two THR transcripts leads to the generation of functionally different receptors (Koenig et al., 1989 ; Izumo and Mahdavi, 1988). In the case of the THRA gene, two major receptor forms are generated which differ in their C-terminal region. One receptor (THRA α 1), binds T3 and activates the transcription of target genes. The other receptor (THRA α 2), does not bind T3 and acts as a dominant negative regulator of THRs. This dominant negative regulation is exerted by suppression of the transactivation mediated by products of either the THRA α 1 or the THRB genes (Koenig et al., 1989 ; Lazar et al., 1989b). The THRA gene is also able to give rise to several other minor isoforms which have not been functionally characterized (Izumo et al., 1990 ; Wills et al., 1991). This intricate situation is rendered more complex by the unusual structure of the THRA locus. Several authors have reported that this gene partially overlaps with another gene encoding the orphan receptor *ear-1*, a member of the nuclear receptor superfamily (Lazar et al., 1989 ; 1990 ; Miyajima et al., 1989 ; Laudet et al., 1991).

The two THR genes are differentially expressed in mammals, in chickens as well as in *Xenopus*. Briefly, the THRA gene is expressed at moderate levels in numerous organs. In contrast, the THRB gene is highly variable both from one tissue to another or from one developmental stage to another (Forrest et al., 1990 ; Wills et al., 1991 ; Mellström et al., 1991). The two major isoforms of THRA, α 1 and, α 2 are expressed in most tissues but the α 1/ α 2 ratio varies from one tissue to another, from 1/1 in the spleen, to 1/6 in the brain. It will be useful to better delineate the mechanisms responsible for this variation of the α 1/ α 2 level since these two products have opposed regulatory functions. Some reports indicate that the thyroid hormones may either positively or negatively regulate the expression of both THRA or THRB (reviewed in Chin, 1991). As these regulations appear to be variable depending on the isoforms or of the organ studied, the precise mechanisms responsible of these effects are poorly understood.

To gain insight into these regulation mechanisms, we have isolated and characterized a functional promoter for the human *c-erbA-1* gene which resembles GC rich RNA polymerase II promoters. This promoter is active in HeLa, NBE and *ras* transformed FR3T3 cells and is positively regulated by glucocorticoids.

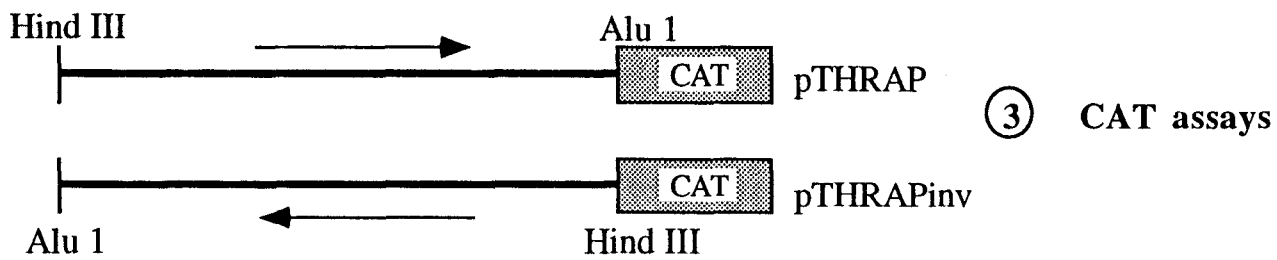
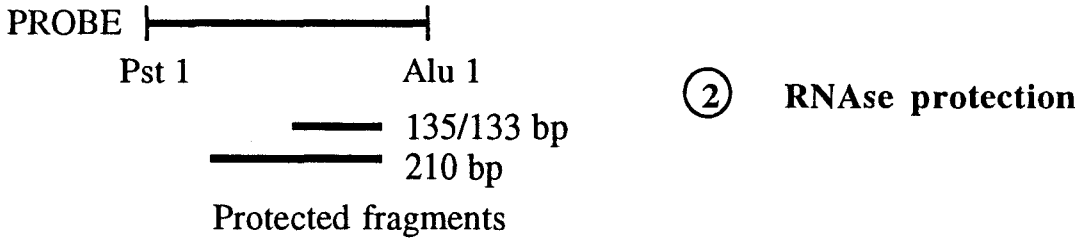
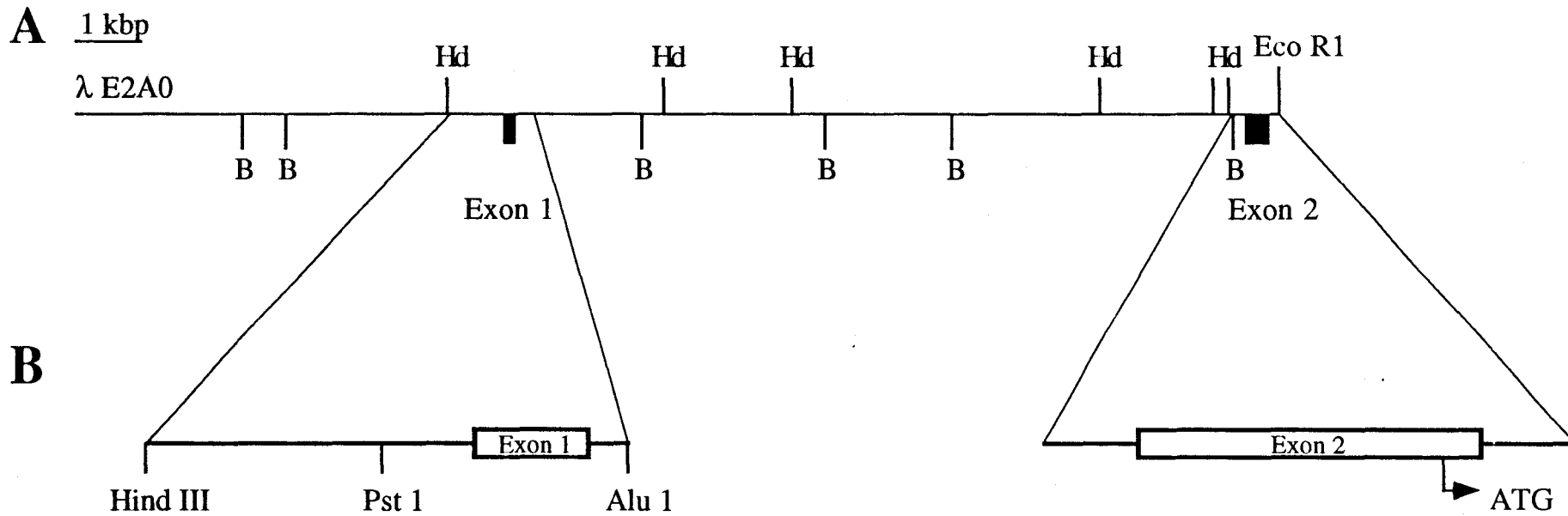


Figure 1

RESULTS

Identification of the human THRA promoter

In order to isolate genomic sequences corresponding to the 5' region of the human THRA gene an ovarian carcinoma (IGROV2 cells) DNA library constructed in the lambda vector EMBL4 was screened with a probe corresponding to the extreme 5' part of our previously described THRA cDNA clone named 14C (Laudet et al., 1991). This probe corresponds to the first two exons of THRA. The isolated lambda clone, named λ E2A0, contains an 18 kbp insert. Figure 1 shows a restriction map for the clone λ E2A0 and plasmid subclones derived from it. Exon 1 of *c-erbA-1* is contained in a 3 kbp Hind III fragment and separated from exon 2 by 11 kbp of intronic sequences (Laudet et al., 1991). A 749 bp Alu I fragment corresponding to the 5' part of the 3 kbp Hind III fragment and containing exon 1 as well as 5' flanking sequences was subcloned giving rise to the pTHRAP construct (see Materials and Methods). The nucleotide sequence of this 749 bp Alu I fragment was then determined from both strands and is presented in Figure 2. Within this sequence, we identified a 169 bp region homologous to the 5' end of the 14C cDNA clone with a consensus splice donor site. The initiation codon ATG is localized at the 3' end of exon 2 (Laudet et al., 1991).

The 5' boundary of exon 1 was determined by primer extension analysis and RNAase protection mapping. Since exon 1 is very GC rich (more than 80%) we used a 40 bp oligonucleotide corresponding to sequences localized in the 5' part of exon 2 to perform the primer extension experiments. This labeled primer, complementary to positions 177-214 of the 14C cDNA, was annealed to RNA from HeLa, K562, MRC5 and NBE cells and extended by reverse transcription. Multiple reproducible bands were identified with the RNA from these different cell lines (Figure 3A). The two major start sites corresponding to the 175 and 255 nucleotide bands of Figure 3A are indicated by vertical arrows in Figure 2. These two major start sites, called S1 and S2, are located 38 bp 5' and 26 bp 3', respectively, from the beginning of the 14C cDNA. This is consistent with the 5' end of the majority of the largest published cDNAs (Pfahl and Benbrook, 1987 ; Miyajima et al., 1989 ; Laudet et al., 1991). Additional minor bands clustering in the vicinity of the small 175 nucleotide band were also observed. The four cell lines used in this experiment gave the same two major start sites. Although the pattern observed with HeLa cells was very weak additional primer experiments, as well as RNAase protection analysis confirmed that the THRA-encoding RNAs of HeLa cells begin at the same sites. We have also performed primer extension experiments with a primer annealing more 3' in exon 2 which reveals the same start sites in exon 1 (data not shown).

That the two major start sites mapped in the primer extension experiments are indeed the authentic initiation sites of the THRA messages is also consistent with the independent RNAase protection analysis. For this experiment a 353 bp Pst I -Alu I fragment containing the entire exon 1 (see Figure 1B) was subcloned in the pSP64 plasmid and an anti-sense 32 P-labeled

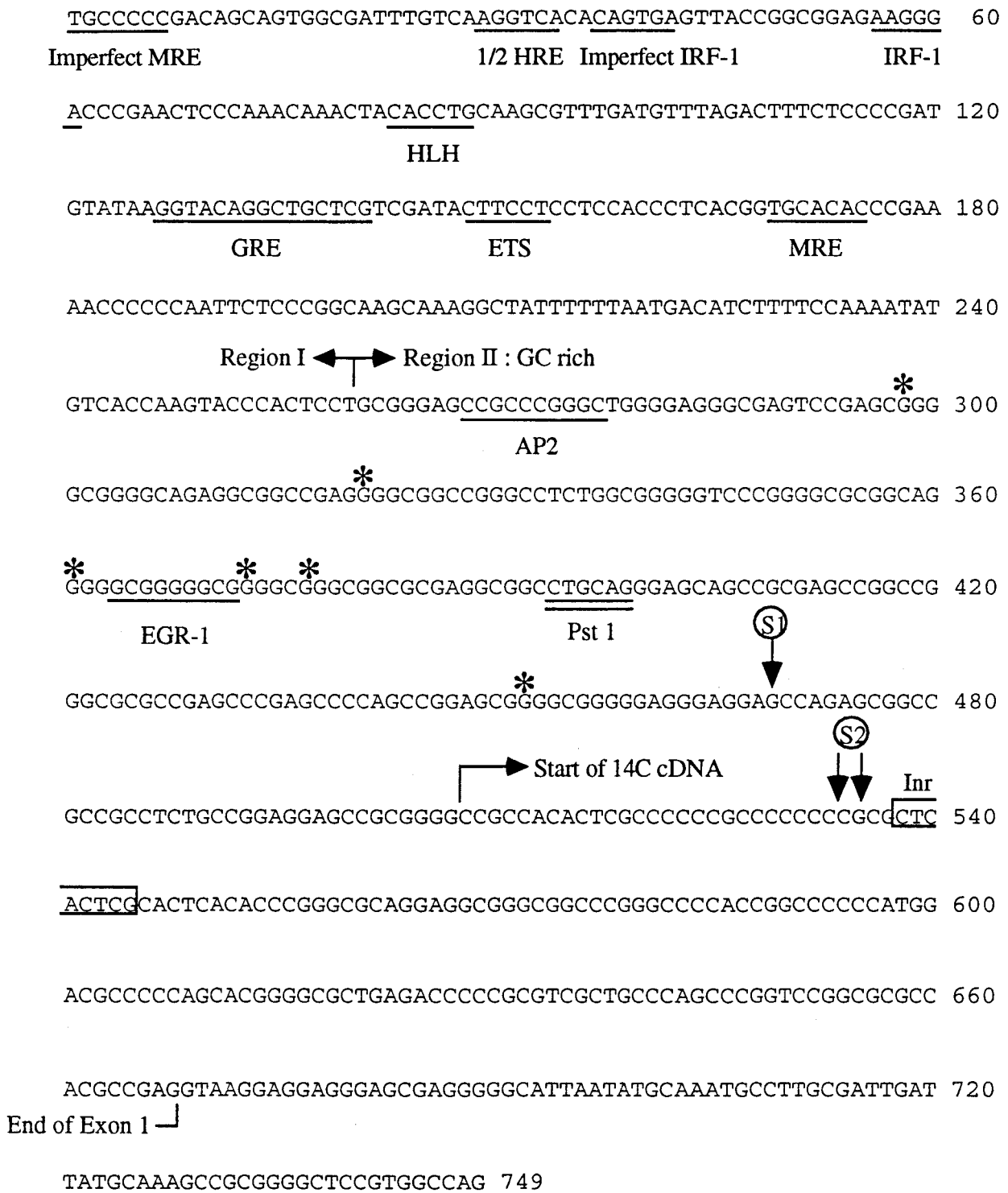


Figure 2

RNA probe was synthesized using SP6 polymerase. Again, we identified two major protected fragments (210 bp and 135-133 bp) whose sizes correspond to the initiation sites S1 and S2 determined by the primer extension analysis (Figure 3B). The two major start sites identified were found in HeLa, K562, NBE and MRC5 cells (Figure 3B and data not shown) but not in RNAase protection experiments performed with tRNA instead of mRNAs. Furthermore, we obtained no signal with a probe corresponding to the same strand as the cellular RNAs (not shown). These data provide strong evidence that the obtained protected bands are not due to secondary structures within the sequence but correspond to the real start sites of the THRA mRNAs. It is, nevertheless, important to note that two protected fragments (135 and 133 bp) correspond to the second start site S2, identified by primer extension as a single 175 nt band. The reason for this discrepancy is unclear and we must emphasize the fact that other weaker bands were observed in the primer extension analysis in the vicinity of S2. Thus, taken together, our results show that the THRA mRNAs begin at two different sites separated by 65 bp. These two major start sites, S1 and S2, are located 5' and 3' of the beginning of the previously described 14C cDNA, isolated from K562 cells, suggesting that this cDNA is an incomplete copy of a mRNA beginning at the S1 start site. It is also possible that this mRNA initiates at a minor start site lying between S1 and S2.

Sequence of the promoter region.

The DNA sequence immediately upstream from the major RNA start sites (either S1 or S2 ; Figure 2) does not contain the typical "TATA box" or "CAAT box" elements found in most characterized eukaryotic genes. Since the TATA box determines the point at which transcription will start, the absence of any TATA sequence may account for the multiple initiation sites observed for THRA mRNAs. The only possible TATA and CAAT boxes within the sequence reported here do not correspond to any of the identified transcription start sites. Consensus signals characterized in the control regions of other genes can also be identified in the THRA promoter region. We have performed a computer comparison using the Transcription Factor Database available on the French CITI-II/Bisance network (either the TFD data base or the vertebrates encoded transcription factors compiled by Faisst and Meyer, 1992 ; Dessen et al., 1990). We have localized putative binding sites for known transcription factors. The promoter region may be divided into two parts : (i) a GC-rich region in the 3' part starting at nucleotide 261 (Figure 2), containing the start sites S1 and S2, and numerous putative Sp1 sites (see Figure 2, and Briggs et al., 1986), a Krox 24 site (also named EGR-1) which may also be recognized by the Zinc finger proteins Krox 20 and WT1 (Christy and Nathans, 1989 ; Rauscher III et al., 1990 ; Chavrier et al., 1990), and an AP2 site (Imagawa et al., 1987) and (ii) an upstream region with a weaker GC content. This latter region also contains several putative recognition sites for transcription factors such as IRF-1 (2 sites, Figure 2 ; Fujita et al.,

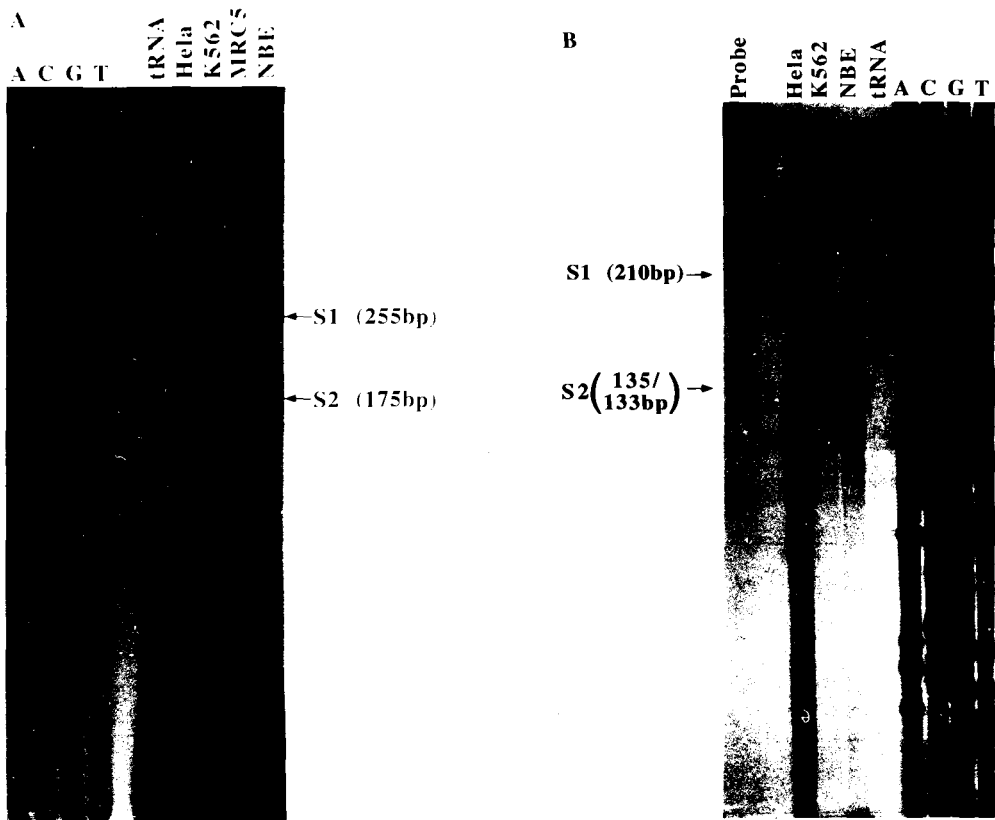


Figure 3

1985 ; Miyamoto et al., 1985), Helix-Loop-Helix proteins (putative E-box binding motif CACCTG ; Blackwell and Weintraub, 1990) or members of the *ets* gene family (Macleod et al., 1992). In addition, this region also contains a Metal Response Element (MRE) (Culotta and Hamer, 1989). Finally, we have scrutinized the promoter sequence in search of putative binding sites for nuclear receptor family members. We found a perfect half palindrome for nuclear receptor binding (AGGTCA = 1/2 HRE, position 29-34 in Figure 2) and we also observed other possible consensus sequences for the binding of nuclear receptors such as a Glucocorticoid Responsive Element (GRE ; see Discussion ; Jantzen et al., 1987 ; reviewed in Martinez and Wahli, 1991). We therefore investigated whether the human THRA promoter might be hormone-responsive

Activity of the human THRA promoter in cultured cells

The human THRA promoter was tested in various cell lines by linking it to the bacterial chloramphenicol acetyl transferase (CAT) gene. The 749 bp Alu 1 fragment from λ E2A0 containing ca. 500 bp of promoter (depending of the start site considered) and exon 1 was ligated immediately upstream of a promoterless CAT gene contained in pBLCAT3 giving the recombinant pTHRAP (see Figure 1B). The same fragment was also cloned in an opposite orientation giving rise to the pTHRAPinv construct. As a positive control, we also used the pBLCAT4 vector, which contains the thymidine kinase minimal promoter of HSV-1 linked to the CAT gene (Lückow and Schütz, 1987). Either pBLCAT3, pTHRAP, pTHRAPinv or pBLCAT4 were transfected into cultured cells and, after either 48 or 72 hours, crude cell lysates were prepared and assayed for CAT activity (see Materials and Methods). Figure 4A shows the results of the transfection of increasing amounts of pTHRAP and pTHRAPinv constructs into HeLa cells. As expected the pTHRAPinv vector did not show any activity whereas CAT expression was clearly driven by the 749 bp fragment contained in pTHRAP. When the amount of pTHRAP transfected was increased from 2 to 10 μ g per dish (Figure 4A), there was a corresponding increase in the amount of CAT activity observed with a plateau effect between 5 and 10 μ g per dish. Parallel transfections with the pBLCAT3 vector yielded no visible CAT activity except when 10 μ g of vector was transfected. Even in this case, the difference of CAT activity between pBLCAT3 and the same amount of pTHRAP was very clear (data not shown). We have also analyzed the activity of pTHRAP in other cells such as NBE cells or FR3T3 cells transformed with the activated human *c-Ha-ras* oncogene (FREJ4 ; Van Hille et al., 1989 ; JMV, unpublished results). In FREJ4 cells the activity of pTHRAP was much higher than in HeLa cells which could be due to a higher plasmid uptake by the FREJ4 cells during the transfection. Taken together these results clearly suggest that we have isolated a functional THRA promoter.

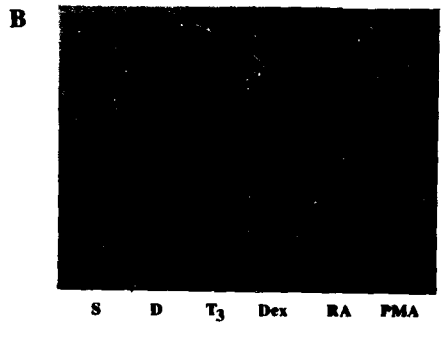
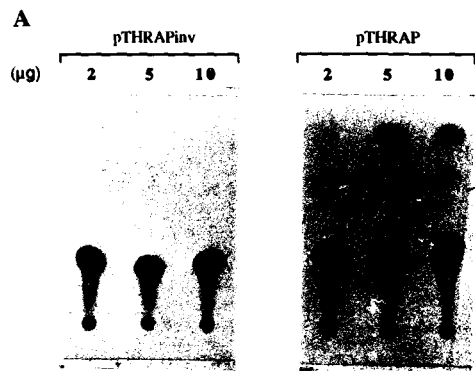


Figure 4

Since we observe the presence of a consensus sequence for the binding of the glucocorticoid receptor (Jantzen et al., 1987), we studied the effect of the synthetic glucocorticoid dexamethasone on pTHRAP activity. A 6-fold induction of the THRA promoter was observed when adding 10^{-6} M dexamethasone to HeLa cells cultivated on depleted medium (Figure 4B). This effect was not observed in cells transfected with the pTHRAP_{inv} plasmid or with pBLCAT3 (data not shown ; Jantzen et al., 1987). We next investigated whether thyroid hormones, retinoic acid (RA), or phorbol esters can regulate the activity of the human THRA promoter in HeLa cells. Supplementation of the hormone-depleted culture medium with either thyroid hormones or retinoic acid did not alter CAT expression from pTHRAP (Figure 4B). The slight variability observed in Figure 4B between the signal seen for RA- versus vehicle-treated cells or between cells cultured with untreated- or depleted-serum was not significant as judged from several independent experiments. Similar results were obtained in NBE and FREJ4 cells (data not shown). HeLa cells were transfected with various THR expression vectors (either the 14C cDNA encoding THRA α 1, the 14E cDNA encoding THRA α 2 or a cDNA encoding THRB cloned in the pSG5 expression vector ; Weinberger et al., 1986) and then treated by 100nM thyroid hormones. This also had no effect upon the level of CAT activity in pTHRAP transfections (data not shown ; see Discussion). We also treated the cells with phorbol esters (PMA 50ng/ml) and show that the THRA promoter (which is devoid of AP1 sites) is unresponsive to this compound.

DISCUSSION

We report in this paper the isolation and characterization of a functional promoter for the human thyroid hormone receptor gene. To our knowledge, this paper represents the first isolation of a promoter for a thyroid hormone receptor. The two start sites determined by our analyses fit perfectly with various cDNAs already published. The 5' end of the 14C cDNA begins between S1 and S2 (Laudet et al., 1991). The *ear7* cDNA isolated by Miyajima et al.(1989) maps just 18 bp downstream from the S2 site. Another cDNA, isolated from a human testis cDNA library (Pfahl and Benbrook, 1987) begins in exon 1, 90 bp downstream from the S2 site and probably represents an incomplete version of an mRNA which begins at this site. The sequence that surrounds the two start sites has a high GC content and does not harbor a classical TATA- or CAAT-box. Nevertheless, very close to the S2 site, we found a sequence which closely resembles the consensus initiator sequence (Inr) present in some TATA-less promoters that act in an Sp1 sites context as does the THRA promoter (Smale et al., 1990 ; Brand et al., 1990 ; Inr consensus: CTCANTCT; S2 site : CTCACTCG). Whether this sequence is active or not in the THRA promoter remains to be determined. The THRA gene

encodes two isoforms of opposed biological functions differing in their C-terminal portion (Izumo and Mahdavi, 1988 ; Koenig et al., 1989 ; Mitsuhashi et al., 1988 ; Lazar et al., 1989). In humans, these isoforms are encoded by two mRNAs of 5.0 kb and 2.7 kb (Izumo and Mahdavi, 1988 ; Koenig et al., 1989 ; Miyajima et al., 1989 ; Laudet et al., 1991). It is interesting to note that these various mRNAs begin within human exon 1 suggesting that the various isoforms can all initiate at the same promoter.

A 749 bp upstream fragment functions as a promoter when linked to a promoterless CAT reporter vector. The two described THR genes encoding the α and β type THRs are differentially expressed during development but also in adults in the various organisms studied (Bradley et al., 1989 ; Forrest et al., 1990 ; Baker and Tata, 1990 ; Wills et al., 1991 ; Mellström et al., 1991). THRA is expressed at moderate levels in most organs studied. Moreover, the two isoforms encoded by THRA are differentially expressed : $\alpha 1$ is expressed at a higher level in skeletal muscles and brown fat and $\alpha 2$ is more abundant in the brain. The relatively moderate level of THRA previously reported in most tissues and cultured cells (Miyajima et al., 1989) may be correlated to the low CAT activity that we observed in our transient expression experiments.

The human THRA upstream promoter region contains several sequences similar to known *cis*-acting elements shown to bind transcription factors. The most numerous sites are the six Sp1 consensus sites. We have also noted the presence of a putative AP2 binding site (Imagawa et al., 1987). AP2 binds and activates gene expression from viral and cellular promoters including the metallothionein promoter and is implicated in induction pathways involving cyclic AMP (Muchardt et al., 1992 ; Culotta and Hamer, 1989). We have noted the presence of other putative binding sites which may also mediate induction of THRA by growth factors. For example there is a putative binding site for Krox-24 (the EGR-1 consensus sequence), a factor rapidly induced in cultured cells by growth factors or depolarizing agents (Christy and Nathans, 1989) and two sites for the IRF-1 factor which specifically binds interferon β gene regulatory elements (Fujita et al., 1985 ; Miyamoto et al., 1988). Although the relatively invariable expression pattern of *c-erba-1* argues rather against a regulation by growth factors, it is not known whether some extracellular reagents may regulate its expression. The EGR-1 consensus sequence is interesting since it may be recognized by several Zinc finger proteins such as Krox-24, Krox-20 or the anti-oncogene product WT1 (Rauscher III et al., 1990 ; Haber and Buckler, 1992). Krox-20 has been implicated in the development of the central nervous system where the accumulation of THRA transcripts has been described (Chavrier et al., 1990 ; Bradley et al., 1989 ; Wills et al., 1991 ; Mellström et al., 1991 ; Forrest et al., 1990). Thus, it will be interesting to determine whether these factors affect the transcription of the THRA gene.

The human THRA promoter we described in this paper is not regulated by thyroid hormones in the cells tested. In the same series of experiments, we also noticed that retinoic

acid was inactive on the THRA promoter. Regulation of THR genes by thyroid hormones has been an open question for a long time (Samuels et al., 1977 ; Hodin et al., 1990). Numerous reports have emphasized a down regulation of expression of either THRA and THRB genes by thyroid hormones in some tissues such as the pituitary gland (Mitsuhashi and Nikodem, 1989 ; Lazar and Chin 1988 ; Lazar et al., 1989a ; 1990 ; Hodin et al., 1990). However, in other tissues as well as in other organisms, such as *Xenopus*, there is no effect (or positive effects) of thyroid hormones on THRA or THRB expression (Hodin et al., 1990 ; Kanamori and Brown, 1992 ; reviewed in Chin, 1991). Thus, the regulation of expression of THR genes by thyroid hormones seems to be dependant of the cellular context. The fact that we do not observe an effect of thyroid hormones on THRA promoter activity can be explained by several hypotheses : (i) there might a Thyroid hormone Responsive Element outside the pTHRAP as is the case for the rat Growth Hormone gene where a TRE is active in the third intron of the gene (Sap et al., 1990) ; (ii) the pTHRAP might be regulated by thyroid hormones only in particular cells ; (iii) the activity of the pTHRAP construct as measured by CAT assays might be too low to see a potential negative effect. Nevertheless, when the activity of the promoter was increased by addition of dexamethasone we could not see any effect of thyroid hormones, suggesting that, at least in HeLa cells, thyroid hormones are indeed inactive on pTHRAP (data not shown).

To our knowledge, our study provides the first demonstration of an action of glucocorticoids on the expression of a thyroid hormone receptor gene in mammalian cells. Previous reports have detected an action of glucocorticoids on the affinity of thyroid hormone receptors in rat (De Nayer et al., 1987 ; Lee et al., 1991). Nevertheless, during a study of the *Rana catesbeiana* tadpole, Galton, (1990) had observed an acceleration of the thyroid hormone-induced metamorphosis by corticosterone. Others have suggested that glucocorticoids accelerate thyroid hormone-induced tail regression of tadpoles by increasing tissue sensitivity to thyroid hormones (Niki et al., 1981). Whether this effect is elicited through an increase in the number of THR genes remains an open possibility. The THRA promoter we described in this paper harbors a site whose sequence is in good agreement with a Glucocorticoid Responsive Element consensus sequence (GRE ; Jantzen et al., 1987). Nevertheless, we do not know whether the glucocorticoid action on THRA expression is direct and, if so, if it is mediated by this site. Work is in progress in our laboratory to test whether glucocorticoids, as well as other factors such as growth factors, or the product of the *ear-1* gene, which partially overlaps with *c-erbA-1*, directly regulate the THRA promoter.

MATERIALS AND METHODS

Molecular probes, library screening and sequencing experiments

The human *c-erbA-1* promoter is derived from a genomic DNA clone called λ E2AO. This clone was derived from DNA of ovarian carcinoma IGROV-2 cells, partially digested with *Sau3A* and inserted into the EMBL4 vector. The λ E2AO clone (Figure 1) was isolated by screening with a 550 bp *EcoR1*-*BstEII* fragment representing the 5' part of our previously described THRA-encoding cDNA clone called 14C (Laudet et al., 1991). Cloning, phage and plasmid growth and isolation were performed using standard procedures (Maniatis et al., 1989).

The different genomic fragments were subcloned into the M13mp18 or M13 mp19 sequencing vectors using standard techniques. The nucleotide sequence was determined with an Applied Biosystem 370A automatic sequencer and the protocol and reagents recommended by the supplier.

Primer extension and RNAase protection analyses

For primer extension, 500ng of oligonucleotides were labeled at the 5' end using phage T4 polynucleotide kinase (Appligene, Strasbourg). The oligonucleotides were incubated in a total volume of 20 μ l for 45min at 37°C in 50 mM Tris HCl (pH7.6), 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 100 mM spermine and 100 μ M EDTA (pH 8.0) with 100 μ Ci of [γ 32P] ATP and the reaction was stopped by addition of 100 μ l of H₂O. The mixture was then ethanol precipitated using 10 μ g of tRNA as carrier. For the annealing of the labeled primer, 10⁶ cpm of oligonucleotides and 10 μ g of total RNA prepared by the guanidine isothiocyanate method (Chirgwin et al., 1979) were mixed in a standard reverse transcriptase buffer from BRL (50mM Tris HCl (pH 7.5), 75 mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT, and 50 μ g/ml actinomycin D) and incubated 3 min at 80°C. The temperature was then slowly decreased to the T_m of the oligonucleotide (65°C) and incubated for an additional 30 min at T_m. The mixture was finally cooled on ice. The annealed primer were then extended for 30 min at 45°C using a 1/10 aliquot of the annealing reaction, 10mM DTT, 400 μ M dATP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 200 μ M dCTP, 10 μ Ci of [α 32P]dCTP, 100 units of Mu-MLV reverse transcriptase (BRL) and the corresponding BRL buffer. The reaction was stopped by addition of water ; products were extracted by phenol-chloroform and ethanol precipitated. The reaction products were analyzed on a 6% acrylamide gel containing 8.4 M urea.

The oligonucleotide used which corresponds to the nucleotides 177 to 214 of the 14C cDNA clone (Laudet et al., 1989) was synthesized by Eurogentec (Liege) and was as follows: 5'-TGTGCTGGGGGAGTAGCTTCGGAGTCTTGTCCTGTCCAGAGAT-3'.

To perform RNAase protection experiments a 348 bp Pst1-Alu1 fragment ORF that corresponds to nucleotides 399 to 749 of the promoter and exon 1 *c-erbA-1* sequence (Figure 2) was first cloned into the pSP64 plasmid. An antisense RNA probe was transcribed *in vitro* from linearized plasmid using SP6 polymerase in the presence of [α - 32 P]UTP (Promega Biotec). Transcription by SP6 polymerase generated an RNA transcript containing 348 nt of the genomic *c-erbA-1* sequence. The protection experiments were performed according to Dozier et al. (1991) : 10^8 cpm of labeled antisense RNA probe and 20 μ g of total RNA were denatured in 30 μ l of hybridization buffer (80 % formamide, 40 mM PIPES, pH 6.7, 0.4 M NaCl, 1mM EDTA) at 85°C for 5 min and hybridized at 45°C overnight. Following hybridization, 0.3 ml of RNAase digestion buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 300 mM NaCl) containing 40 μ g/ml RNAase A and 2000 units/ml RNAase T1 was added. After incubation at 30°C for 45 min RNAases were inactivated by the addition of 20 μ l of 10 % SDS and 50 μ g of proteinase K. The mixture was incubated at 37°C for 15 min. After phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation, samples were analyzed in a denaturing 6 % acrylamide-8M urea gel.

Expression in cultured cells and CAT assays

The vector pBLCAT3 contains the bacterial chloramphenicol acetyl transferase (CAT) gene positioned upstream of the SV40 polyadenylation signal (Lückow and Schütz, 1987). The 749 bp Alu 1 fragment of λ E2AO which contains exon 1 was cloned into pBLCAT3. The resulting recombinant pTHRAP (Figure 1B), contains the THRA promoter fragment linked 5' to the CAT gene. Two to ten micrograms of the recombinant or the parent vector were used to transfect cells. In each case, denatured salmon sperm DNA was added to a final total of 10 μ g. The same fragment was cloned in an inverted orientation to generate the pTHRAPinv construct. DNA introduction was performed through lipofection (Boehringer kit). CAT assays were performed as described (Spegelaere et al., 1991) using for each sample an equal amount of cellular protein as measured by the Coomassie assay (Bio-Rad). HeLa, NBE, and FREJ4 cells (FR3T3 cells transformed by an activated *c-Ha-ras* oncogene ; Van Hille et al., 1989) were cultured in MEM supplemented with 10 % FCS, either untreated (complete medium) or pretreated with 5 % activated charcoal (Merck) to remove hormones (depleted medium). Where appropriate, the latter medium was supplemented 6 hrs after transfection with 10^{-7} M T3 (Sigma), 10^{-6} M Dexamethasone (Sigma), 10^{-6} M RA (All-*trans* retinoic acid, Sigma), 50 ng/ml PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, Sigma) or an equal volume of vehicle (ethanol).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Kathryn Nason-Burchenal, Jean Coll, Yvan de Launoit and Christophe Quéva for discussions and comments on our paper. We are grateful to Christian Lagrou for cell culture and to Jean Rommelaere for support. This project is supported by grants from Association de la Recherche contre le Cancer, CNRS and Institut Pasteur de Lille.

REFERENCES

- Amero, S.A., Kretsinger, R.H., Moncrief, N.D., Yamamoto, K.R. & Pearson, W.R. (1992). *Mol. Endo.*, **6**, 3-7.
- Baker, B.S. & Tata, J.R. (1990). *The EMBO J.*, **9**, 885-885.
- Benbrook, D. & Pfahl, M. (1987). *Science* **238**, 788-791.
- Beug, H. & Vennstrom, B. (1991). In Nuclear Hormone Receptors. Ed. Parker, M.G.. Academic Press : 355-372.
- Blackwell, T.K. & Weintraub, H. (1990). *Science*, **250**, 1104-1110.
- Bradley, D.J., Young III, W.S. & Weinberger, C. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7250-7254.
- Brand, N., Petkovich, M., Krust, A., Chambon, P., de The, H., Marchio, A., Tiollais, P. & Dejean, A. (1988). *Nature*, **332**, 850-853.
- Brand, N.J., Petkovich, M. & Chambon, P. (1990). *Nuc. Acids. Res.*, **18**, 6799-6806
- Briggs, M.R., Kadonaga, J.T., Bell, S.P. & Tjian, R. (1986). *Science*, **234**, 47-52.
- Chavrier, P., Vesque, C., Galliot, B., Vigneron, M. Dollé, P., Duboule, D. and Charnay, P. (1990). *The EMBO J.*, **9**, 1209-1218.
- Chin, W.W. (1991). In Nuclear Hormone Receptors. Ed. Parker, M.G. Academic Press : 79-96.
- Chirgwing, J.M., Przybyla, A.E., Mac Donald, R.J. & Rutter, W.J. (1979). *Biochemistry*, **18**, 5294-5299.
- Christy, B. & Nathans, D. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8737-8741.
- Culotta, V.C. & Hamer, D.H. (1989). *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1376-1380.
- Debuire, B., Henry, C., Benaissa, M., Biserte, G., Claverie, J.M., Saule, S., Martin, P. & Stéhelin, D. (1984). *Science*, **224**, 1456-1459.
- De Nayer, P.H., Dozin, B., Vandeput, Y., Bottazzo, F.C. & Crabbe, J. (1987). *Eur. J. Clin. Inv.*, **17**, 106-110.
- Dessen, P., Fondrat, C., Valencien, C. & Mugnier, C. (1990). *Comput. Appl. Biosci.*, **6**, 355-356.

- Dozier, C., Ansieau, S., Ferreira, E., Coll, J. & Stéhelin, D. (1991). *Oncogene*, **6**, 1307-1311.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. & Wahli, W. (1992). *Cell*, **68**, 879- 887.
- Evans, R. (1988). *Science*, **240**, 889-895.
- Faisst, S. & Meyer, S. (1992). *Nucl. Acids. Res.*, **20**, 3-26.
- Forrest, D., Sjöberg, M. & Vennström, B. (1990). *The EMBO J.*, **9**, 1519-1528.
- Fujita, T., Ohno, S., Yasumitsu, H. & Taniguchi, T. (1985). *Cell*, **41**, 489-496.
- Galton, V.A. (1990). *Endocrinology*, **127**, 2997-3002.
- Green, S. & Chambon, P. (1991). In Nuclear Hormone Receptors. Ed. Parker, M.G. Academic Press : 15-33.
- Giguere, V., Ong, E.S., Segui, P. & Evans, R.M. (1987). *Nature*, **330**, 624-629.
- Haber, D.A. & Buckler, A.J. (1992). *The New Biologist*, **4**, 97-106.
- Hobin, R.A., Lazar, M.A. & Chin, W.W. (1990). *J. Clin. Invest.*, **85**, 101-105.
- Imagawa, M., Chiu, R. & Karin, M. (1987). *Cell*, **51**, 251-260.
- Issemann, I. & Green, S. (1990). *Nature*, **347**, 645-650.
- Izumo, S. & Mahdavi, V. (1988). *Nature*, **334**, 539-542.
- Izumo, S., Nadal-Ginard, B. & Mahdavi, V. (1990). *Mol. Biol. Card. Syst.*, 111-123.
- Jantzen, H-M., Strähle, U., Gloss, B., Stewart, F., Schmid, W., Boshart, M., Miksicek, R. & Schütz, G. (1987). *Cell*, **49**, 29-38.
- Kanamori, A. & Brown, D.D. (1992). *J. Biol. Chem.*, **267**, 739-745.
- Koenig, R.J., Lazar, M.A., Hodin, R.A., Brent, G.A., Larsen, P.R., Chin, W.W. & Moore, D.D. (1989). *Nature*, **337**, 659-661.
- Laudet, V., Begue, A., Henry-Duthoit, C., Joubel, A., Martin, P., Stéhelin, D. & Saule, S. (1991). *Nuc. Acids. Res.*, **19**, 1105-1112.
- Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F. & Stéhelin, D. (1992). *The EMBO J.*, **11**, 1003-1013.
- Laudet, V. & Stéhelin, D. (1992). *Current Biology*, **2**, 293-295.
- Lazar, M.A. & Chin, W.W. (1988). *Mol. Endo.*, **2**, 479-484.
- Lazar, M.A., Hodin, R.A., Darling, D.S. & Chin, W.W. (1989). *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 1128-1136.
- Lazar, M.A., Hodin, R.A. & Chin, W.W. (1989b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7771-7774.
- Lazar, M.A., Hodin, R.A., Cardona, G. & Chin, W.W. (1990). *J. Biol. Chem.*, **265**, 12859-12863.
- Lee, J.T., Lebenthal, E. & Lee, P-C. (1991). *Pancreas*, **6**, 96-103.
- Lückow, B. & Schütz, G. (1987). *Nuc. Acids. Res.*, **15**, 5490.
- Macleod, K., Leprince, D. & Stéhelin, D. (1992). *TIBS*, **17**, 251-256.

- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1989). in *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Martinez, E. and Wahli, W. (1991). In *Nuclear Hormone Receptors*. Ed. Parker, M.G. Academic Press : 125-146.
- Mavrothalassitis, G.J., Watson, D.K. & Papas, T.S. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1047-1051.
- Mellström, B., Naranjo, J.R., Santos, A., Gonzales, A.M. & Bernal, J. (1991). *Mol. Endo.*, **5**, 1139-1350.
- Mitsuhashi, T., Tennyson, G.E. & Nikodem, V.M. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5804-5808.
- Mitsuhasi, T. & Nikodem, V.M. (1989). *J. Biol. Chem.*, **264**, 8900-8904.
- Miyajima, N., Kadowaki, Y., Fukushige, S.I., Shimizu, S.I., Semba, K., Yamanashi, Y., Matsubara, K.I., Toyoshima, K. & Yamamoto, T. (1988). *Nuc. Acids. Res.*, **16**, 11057-11074.
- Miyajima, N., Horiuchi, R., Shibuya, Y., Fukushige, S-I., Matsubara, K-I, Toyoshima, K. & Yamamoto, T. (1989). *Cell*, **57**, 31-39.
- Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T. & Taniguchi, T. (1988). *Cell*, **54**, 903-913.
- Moore, D.D. (1990). *The New Biol.*, **2**, 100-105.
- Muchardt, C., Seeler, J-S., Nirula, A., Gong, S. & Gaynor, R. (1992). *The EMBO J.* **11**, 2573-2581.
- Niki, K., Yoshizato, K., Kikuyama, S. (1981). *Proc. Jpn. Acad. Ser., B* **57**, 271-275.
- Petkovich, M. Brand, N.J., Krust, A. & Chambon, P. (1987). *Nature*, **330**, 444-450.
- Pfahl, M. & Benbrook, D. (1987). *Nuc. Acids. Res.*, **15**, 9613.
- Rauscher,III, F.J., Morris, J.F., Tournay, O.E., Cook, D.M. & Curran, T. (19090). *Science*, **250**, 1259-1262.
- Samuels, H.H., Stanley, F. & Shapiro, L.E. (1977). *J. Biol. Chem.*, **252**, 6052-6060.
- Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H. & Vennstrom, B. (1986). *Nature*, **324**, 635-640.
- Sap, J., De Magistris, L., Stunnenberg, H., & Vennström, B. (1990). *The EMBO J.*, **9**, 887-896.
- Graves, W.A. & Hogness, D.S. (1990). *Genes and Dev.*, **4**, 204-219.
- Smale, S.T., Schmidt, M.C., Berk, A.J. & Baltimore, D. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4509-4513.
- Spegelaere, P., Van-Hille, B., Spruyt, N., Faisst, S., Cornelis, J.J. & Rommelaere, J. (1991). *J. Virol.*, **65**, 4919-4928.
- Thompson, C.C., Weinberger, C., Lebo, R. & Evans, R.M. (1987). *Science*, **237**, 1610-1614.

- Van Hille, B., Duponchel, N., Salomé, N., Spruyt, N., Cotmore, S.F., Tattersall, P., Cornelis, J.J. & Rommelaere, J. (1989). *Virology*, **171**, 89-97.
- Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J. & Evans, R.M. (1986). *Nature*, **324**, 641-646.
- Wills, K.N., Zhang, X-K. & Pfahl, M. (1991). *Mol. Endo.*, **5**, 1109-1119.
- Zelent, A., Krust, A., Petkovich, M., Kastner, P. & Chambon, P. (1989). *Nature*, **339**, 714-717.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Organization of the 5' region of the THRA gene. (A) restriction map of the λ E2AO clone containing the first two exons (black boxes) of the THRA gene. B : Bam HI ; Hd : Hind III. (B) Organization of the various plasmid subclones derived from λ E2AO. A 749 bp Alu-1 fragment containing the exon 1 and ca. 500 bp of promoter sequence was subcloned in the pBLCAT 3 to give the pTHRAP vector. The initiation ATG codon of exon 2 is indicated. Exons are represented by white boxes. The labeled oligonucleotide used for primer extension is indicated by an arrow under exon 2. The two major bands visualized in the primer extension experiments are shown (see Figure 3A). For RNase protection experiments the genomic probe used (348 bp Pst 1-Alu 1) is depicted as well as the two major protected bands (see Figure 3B). The two constructs pTHRAP and pTHRAPinv used for CAT assays are also indicated.

Figure 2 : Sequence of the 749 bp Alu 1 fragment containing the pTHRA promoter as well as exon 1. The beginning of the 14C cDNA and the 3' splice site of exon 1 are indicated. The two major start sites, S1 and S2, are indicated by vertical arrows. The Inr sequence located just downstream of S2 and discussed in the text is boxed. The promoter region is arbitrarily separated in two regions, I and II, with region II being very GC-rich. The Pst 1 site used for generation of the genomic probe in RNAase protection experiments is indicated by a double line. The various consensus sites identified during the computer search against the transcription factor database are underlined, except the Sp1 sites which are indicated by stars. The consensus sequences used to search for these sites were GGGGCGGGGC or GGGCGG (see the text for references).

Figure 3 : (A) Primer extension analysis of THRA encoding mRNAs. The sequence presented at the left corresponds to the 348 bp Pst 1-Alu 1 fragment as determined by the classical dideoxy method (Maniatis et al., 1989). The different lanes correspond to a negative control (tRNA i.e. no cellular mRNAs added) or to mRNAs extracted from HeLa, K562, MRC5 or NBE cells. The arrows indicate to two major start sites S1 and S2. (B) RNAase

protection analysis. The sequence is the same as in panel A. The probe corresponds to the genomic 348 bp Pst 1-Alu 1 fragment cloned in the pSP64 plasmid vector. The protection of the probe was studied against tRNAs (negative control) or mRNAs extracted from HeLa, K562 or NBE cells. The two major start sites S1 and S2 are indicated.

Figure 4 : Activity of the human THRA promoter studied in HeLa cells. **(A)** Increasing amounts (2, 5 or 10 μg) of pTHRAPinv or pTHRAP were transfected into HeLa cells and CAT activity was determined after 72 hours. **(B)** effect of various compounds on THRA promoter activity. 10 μg of pTHRAP was transfected into HeLa cells cultivated in 10 % Fetal Calf Serum (lane S) or in depleted serum (D ; see Material and Methods) or in depleted serum supplemented with either 100 nM thyroid hormones (T3), 1 μM dexamethasone (Dex), 1 μM retinoic acid (RA) or 50 ng/ml of PMA.

II. COMMENTAIRE

Le promoteur du gène *c-erbA-1* semble être un promoteur faible, par rapport à certains promoteurs viraux ou cellulaires que nous avons pu étudier. Nous avons néanmoins remarqué une plus forte activité dans les cellules de rat FREJ4 que dans les cellules humaines HeLa ou NBE. Il est clair qu'il est difficile de tirer des conclusions sur la signification physiologique de cet état de fait, étudiant l'activité d'un promoteur d'origine humaine dans des cellules murines. On peut juste, par exemple, poser l'hypothèse d'une plus grande transfectabilité des cellules FREJ4 par rapport aux autres types cellulaires. La faible activité du promoteur n'est pas une surprise, attendu que le taux d'ARN correspondant à ce gène n'est pas présent à des quantités énormes.

Nous avons étudié l'effet de différents régulateurs potentiels de la transcription (Dexaméthasone, hormones thyroïdiennes, acide rétinoïque, PMA) sur l'activité du promoteur de *c-erbA-1*. Une étude plus exhaustive pourrait être envisagée, au vu du nombre important de sites putatifs d'interaction avec des facteurs de transcription. Jusqu'à présent, seule la Dexaméthasone semble active à cet égard. L'absence d'effet du PMA n'est pas surprenante, le taux de produit de *c-erbA-1* n'ayant jamais été montré comme régulé par des substances stimulant la prolifération. De plus, la séquence du promoteur n'a pas révélé la présence de site AP-1, servant d'intermédiaire à l'action du PMA. L'hormone T3 ne semble pas non plus avoir un quelconque effet sur l'expression du promoteur. Des résultats d'autres laboratoires mettent pourtant en évidence un effet négatif de T3 sur le taux de THR dans certaines cellules (Lazar et Chin, 1988 ; Mitsuhashi et Nikodem, 1989). Plusieurs explications peuvent être invoquées pour réconcilier ces apparentes contradictions : i) la régulation par T3 peut être spécifique à un type cellulaire, ii) le site d'interaction avec l'hormone peut être extérieur à la séquence étudiée (y compris hors du promoteur, comme dans le cas du gène de l'hormone de croissance de rat, où un TRE fonctionnel a été localisé dans le troisième intron [Sap et al., 1990]), iii) la régulation peut avoir lieu au niveau post-transcriptionnel. On se sera permis d'exclure le fait que les cellules testées ne puissent contenir qu'un taux insuffisant de récepteur aux hormones thyroïdiennes, ayant constaté l'absence de réponse du promoteur après cotransfection avec des vecteurs d'expression dirigeant la synthèse des formes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de *c-erbA-1*.

L'expression dirigée par le promoteur est augmentée en présence de Dexaméthasone d'un facteur 4 à 6. Nous n'avons pas encore pu préciser s'il s'agit d'un effet direct ou non de ce glucocorticoïde synthétique. Un site GRE putatif a été identifié dans la séquence, dont il serait tentant de penser qu'il sert d'intermédiaire à l'effet positif de la Dexaméthasone. Nous avons commencé à construire des mutants de délétion du promoteur afin, entre autres, de localiser l'élément responsable de cette activation. La haute teneur en bases G et C de la séquence considérée rend néanmoins les clonages délicats. Ainsi, des mutants ont pu être

construits mais qui, en plus des délétions séquentielles à partir de l'extrémité 5', ont une suppression de séquence plus en aval (aux alentours du site Pst I). Dans des expériences préliminaires, aucune de ces constructions (dont certaines contiennent pourtant le site putatif GRE) ne semble être activable par la Dexaméthasone. Ceci suggère l'importance de la séquence accidentellement délétée dans ces constructions, au titre de site de fixation du récepteur des glucocorticoïdes ou d'un facteur de coopération comme dans le cas du promoteur du gène de l'uPA (urokinase-type Plasminogen Activator, [Nerlov et al., 1992]). Notons pourtant que le fragment supprimé ne possède pas de site GRE évident, ce qui semble en faveur de la seconde hypothèse.

L'effet de la Dexaméthasone sur le promoteur endogène de *c-erbA-1* a été déterminé dans les cellules HeLa (G. Adelmant, résultats non publiés). Là aussi, l'addition de glucocorticoïdes augmente le taux d'ARN correspondant à *c-erbA-1* mais uniquement de l'isoforme $\alpha 2$. Il est surprenant de constater que l'isoforme $\alpha 1$ n'est pas affectée par la présence d'hormone. En effet, l'étude du locus *c-erbA-1* n'a pas fait soupçonner le fait que la synthèse des différentes isoformes puisse être dirigée par des promoteurs différents. De plus, les ADNc correspondant à $\alpha 1$ (ainsi que ceux correspondant à $\alpha 2$) contiennent tous au moins une partie de l'exon 1 de *c-erbA-1*, ce qui laisserait entendre que la synthèse de ces deux isoformes est effectivement contrôlée par les mêmes éléments promoteurs. On ne peut néanmoins, dans l'état actuel des connaissances, exclure formellement l'existence d'un promoteur situé très en amont du promoteur cloné et qui dirigerait au moins la synthèse de l'ARN $\alpha 1$. Une explication alternative consisterait à dire que la Dexaméthasone agit également (d'une manière inconnue) au niveau de la régulation de l'épissage, favorisant l'apparition d'isoforme $\alpha 2$. Le fait que l'activation par la Dexaméthasone ait lieu à la fois sur l'isoforme $\alpha 2$ (activité du promoteur endogène visualisée par technique de Northern) et sur le promoteur cloné est un bon argument en faveur du caractère physiologique de celui-ci, du moins comme dirigeant la synthèse de $\alpha 2$. Il est à noter que pour les mêmes échantillons étudiés par Northern, le taux d'ARN correspondant à *ear-1* diminue en fonction de la présence de Dexaméthasone. Ceci va dans le sens de la corégulation inverse de l'expression des deux gènes suggérée par Lazar et al. (1990) (la présence d'ARN correspondant à l'isoforme $\alpha 2$ de *c-erbA-1* diminuant la quantité d'ARN *ear-1*). Ce n'en est cependant pas une preuve, n'ayant pas étudié l'effet (peut-être inhibiteur) de la Dexaméthasone sur le promoteur du gène *ear-1*.

ARTICLE III

INTERCONNEXION BETWEEN THYROID HORMONE SIGNALLING PATHWAYS AND PARVOVIRUS CYTOTOXIC FUNCTIONS

Nous avons vu que les protéines non structurales du parvovirus MVMp sont les effecteurs de la cytotoxicité virale. Pour la protéine NS1 (nécessaire et suffisante à cet effet), la seule activité biochimique véritablement inséparable de l'activité lytique est l'effet transcriptionnel négatif exercé sur des promoteurs hétérologues (Legendre et Rommelaere, 1992). Ayant, dans le laboratoire, participé à la caractérisation du promoteur du gène *c-erbA-1*, nous avons décidé d'examiner le comportement de ce promoteur en présence des protéines non structurales du parvovirus MVM. Ce promoteur est en effet dépourvu de boîte TATA et fournit ainsi un complément d'information aux travaux sur la réponse du promoteur du gène *c-mil* à l'égard des séquences d'ADN requises par les protéines parvovirales pour exercer leur effet transcriptionnel. De plus, nous possédions, avec *c-erbA*, un promoteur d'origine humaine, à l'opposé de celui de *c-mil* provenant du poulet. Le produit du gène *c-erbA-1* est, d'autre part, impliqué dans différentes activités reliées à une inhibition de la prolifération, ce qui en faisait un bon candidat potentiel pour servir de "relai" cellulaire à l'action antiproliférative des parvovirus.

I. RESUME

Nous avons donc mis en évidence un effet positif de la protéine NS1 de MVMp sur l'expression du promoteur du gène *c-erbA-1* humain, et ce, dans les cellules transformées FREJ4 sensibles à l'effet lytique parvoviral. Ce promoteur est ainsi le premier promoteur régulé positivement par la protéine NS1, à l'exception du promoteur tardif parvoviral P38. Nous avons ensuite cherché à déterminer si cette activation pouvait être reproduite sur le promoteur *c-erbA-1* endogène, dans le cas où les protéines virales sont amenées par la voie plus "naturelle" de l'infection. Nous avons, pour ce faire, utilisé deux méthodes. Tout d'abord, la technique de Northern qui nous donne accès à des informations sur le taux d'ARN présent dans une cellule à un instant donné : nous avons ainsi constaté une augmentation du taux d'ARN correspondant à *c-erbA-1* dans les cellules FR3T3 et FREJ4. Néanmoins, l'ARN *c-erbA* présent dans chaque type cellulaire infecté par MVMp est différent. Les cellules FR3T3, normales, résistantes au

parvovirus expriment préférentiellement l'isoforme $\alpha 2$, alors que leurs dérivées isogéniques transformées, sensibles au parvovirus (FREJ4) expriment l'isoforme $\alpha 1$. Nous avons ensuite cherché à visualiser cet effet activateur de l'infection par le parvovirus MVM au niveau protéique, et ce, par un test fonctionnel. En effet, comme nous l'avons vu, les produits du gène *c-erbA-1* sont capables de se fixer sur des séquences d'ADN spécifiques. Nous avons donc utilisé la technique de retard sur gel et montré, que la quantité de complexe ADN-protéine retardé est supérieure après infection parvovirale si on utilise un oligonucléotide dont la séquence correspond au site de fixation des récepteurs des hormones thyroïdiennes. Cette augmentation du taux de complexe retardé n'est pas reproductible avec un oligonucléotide correspondant au site de fixation d'un facteur de transcription sans rapport avec *c-erbA-1* (dans nos expériences : MLTF/USF). Nous verrons plus loin que cet argument "retard sur gel" ne constitue pas une preuve absolue de l'activation transcriptionnelle du gène *c-erbA-1* par l'infection parvovirale.

Nous avons vu que ces deux isoformes, produites par épissage alternatif des pré-messagers *c-erbA-1*, ont des activités biologiques opposées. $\alpha 1$ est le récepteur vrai des hormones thyroïdiennes et a une fonction d'activateur de transcription, agissant sur des séquences spécifiques et de manière dépendante de la fixation de son ligand. Au contraire, $\alpha 2$ est incapable de fixer efficacement l'hormone T3 mais peut agir comme inhibiteur spécifique de $\alpha 1$. Le fait que ce soit la forme fixatrice de l'hormone qui est produite dans les cellules sensibles au parvovirus après infection par celui-ci nous a conduit à poser l'hypothèse d'une implication des hormones thyroïdiennes dans la lyse parvovirale. Pour vérifier cette assertion, nous avons analysé la sensibilité des cellules FREJ4 à l'infection par MVMp en fonction de la présence ou non d'hormones thyroïdiennes dans le milieu de culture. Dans un milieu dépourvu d'hormones (déplété par passage sur charbon actif), nous avons constaté la plus grande résistance des cellules à l'effet antiprolifératif du virus. L'addition d'une quantité physiologique d'hormone T3 purifiée restaure une grande partie de l'aptitude du virus MVM à inhiber la clonogénicité cellulaire. Cette aptitude étant sous la dépendance du cycle cellulaire, nous avons également vérifié que l'effet observé n'est pas trivialement un reflet de modifications du taux de croissance ou de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle.

Title page

**INTERCONNEXION BETWEEN THYROID HORMONE SIGNALLING
PATHWAYS AND PARVOVIRUS CYTOTOXIC FUNCTIONS**

**JEAN-MARC VANACKER §*, VINCENT LAUDET, GUILLAUME ADELMANT,
DOMINIQUE STÉHELIN AND JEAN ROMMELAERE ***

Unité d'Oncologie Moléculaire, Institut Pasteur de Lille, Centre National de la Recherche
Scientifique URA 1160 BP 245, 59019 Lille Cedex, FRANCE

§ : corresponding author

* : present address :

Deutsches Krebsforschungszentrum

Angewandte Tumorstudiologie - Abteilung 0610

Im Neuenheimer Feld, 242

D-6900 Heidelberg, Germany

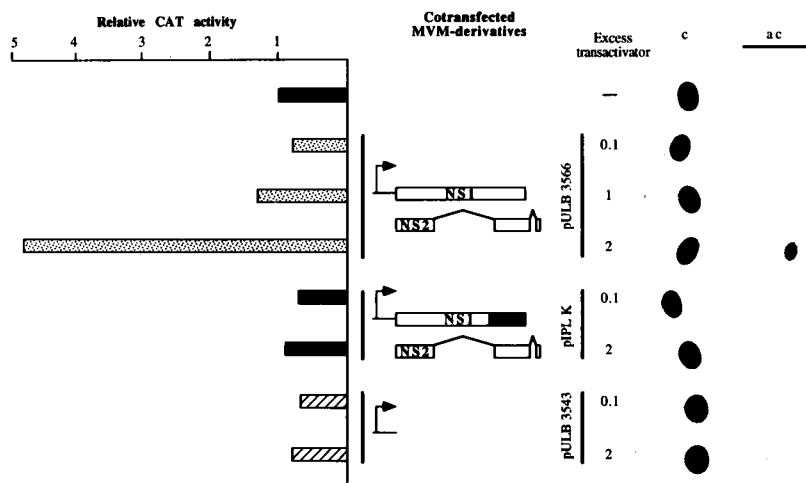


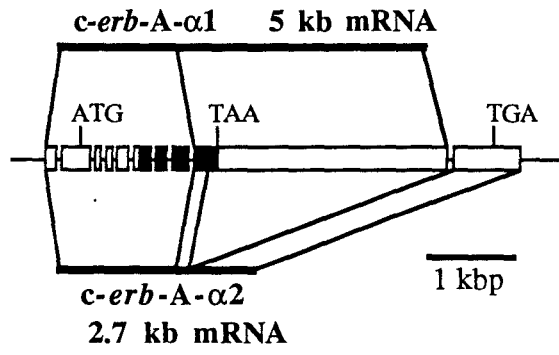
Figure 1

ABSTRACT

Non-structural (NS) proteins of autonomous parvoviruses can repress expression driven by heterologous promoters, an activity which could not be separated so far from their cytotoxic effects. It is shown here that, in transient transfection assays, the NS-1 protein of parvovirus Minute Virus of Mice (MVMp) activates the promoter of the human *c-erb-A-1* gene, encoding the thyroid hormone (T3) receptor α (THR α). The endogenous *c-erb-A-1* promoter is also a target for induction upon MVMp infection. Moreover, T3 was found to up-modulate the level of cell sensitivity to parvoviral attack. These data suggest an interconnection between T3 signalling and NS cytotoxic pathways.

Autonomous parvoviruses are oncosuppressive agents that exert a preferential lytic effect on a number of transformed (compared with parental normal) cells (5, 7, 17). Although little is known about its mechanism, parvoviral cytopathogenicity is thought to be mediated, at least in part, by the non-structural (NS) proteins encoded by these viruses (2, 3). NS products are multifunctional proteins that can activate the late parvoviral promoter and inhibit several heterologous promoters (16). These transcriptional properties map in the same molecular region as the cytotoxic effect (12). Given that THR α is involved in differentiation and antiproliferation events (20, 24, 27) and that parvoviruses exert both cytotoxic and cytostatic effects, NS proteins of MVMp were tested for their influence on the expression of the *c-erb-A-1* gene, encoding THR α (18, 25). To this end, a 749 bp genomic region comprising a promoter of the human *c-erb-A-1* gene (11) was cloned upstream of the Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT) reporter gene in plasmid pBLCat3 (14) to give rise to the pTHRA recombinant plasmid. This construct was transfected into FREJ4 cells, a MVMp-sensitive line of rat fibroblasts transformed with activated human *c-Ha-ras* (23), together with increasing amounts of MVMp molecular clones. pULB3566 (encoding both NS proteins under the control of their own P4 promoter) and pULB3543 (carrying only P4 sequences) will be described elsewhere (both kindly provided by P. Spegelaere). To generate pIPLK, pULB3566 was digested with BstEII, filled-in with Klenow polymerase and religated (this creates a frameshift mutation into the NS1 coding sequence). Transfection were performed according to the calcium phosphate precipitation method (4) in which denatured sonicated salmon sperm DNA was added as a carrier up to 10 μ g of total DNA per sample. Cells were collected 48 hrs after transfection and CAT activity were determined. Reactions were normalized to the total amount of protein present in cell lysates (16). In transient expression experiments (Fig 1), cotransfection with pULB 3566 led to an increase (4- to 6-fold) of CAT activity. This enhancement could not be seen upon cotransfection with either pIPL K or pULB 3543 both of which are also unable to

A



B

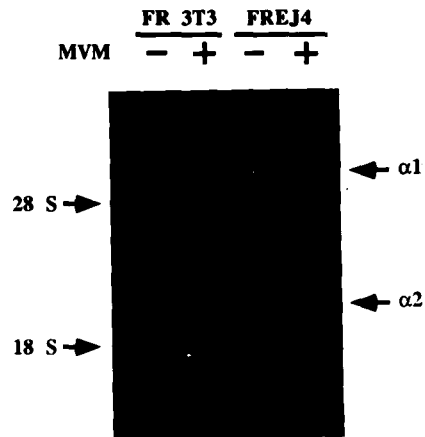


Figure 2

transactivate the late parvoviral promoter P38 (3). This data indicates that the NS1 protein stimulates transient expression driven by the human *c-erb-A-1* promoter.

THR α RNAs and proteins coexist as two major isoforms (Fig. 2a and ref. 9). The α 1 polypeptide, encoded by a 5 kb mRNA, has a fully functional T3 binding domain and is a sequence-specific ligand-dependent transcriptional activator. The α 2 product, encoded by a 2.7 kb mRNA, is unable to efficiently bind T3 and is a dominant inhibitor of α 1. We undertook to determine whether the endogenous *c-erb-A-1* promoter is also activated in cells infected by MVMp. With this aim in view, Northern blotting experiments were first performed, using FREJ4 cells and the MVMp-resistant normal parental line FR3T3 (23) (Fig. 2b). MVMp inoculation (Multiplicity of Infection [MOI] = 3 plaque-forming units [pfu] per cell), RNA extraction, electrophoresis and Northern blotting were performed as described (6). RNAs extracted from MVM- or mock-infected cells were electrophoresed, blotted and hybridized to a ³²P-labelled cDNA probe corresponding to a region shared by both *c-erb-A-1* transcripts (1.7 kb EcoRI-XhoI fragment of the 14C *c-erbA-1* cDNA clone, 10). MVMp infection proved to induce both cell lines to accumulate *c-erb-A-1* mRNAs. Yet, a striking difference was observed between the cells with respect to the type of transcript induced, i.e. only the THR α 1-encoding 5.0 kb mRNA could be detected in the FREJ4 line at the very time when FR 3T3 cells mostly expressed the THR α 2 2.7 kb species.

THR proteins (as well as retinoic acid and vitamin D3 receptors) are able to bind to a DNA element containing a direct repeat of the consensus half-site AGGTCA (ref. 1 and therein). The spacing between the two core motives defines the binding specificity (15, 22). With intent to confirm the inducing effect seen in Northern blotting experiments by means of a functional test, electrophoretic mobility shift assays were performed, using a synthetic oligonucleotide that carries two consensus half-site spaced by 4 bp (DR4) and is known to specifically bind THRs (15, 22). MVMp infection (6) (MOI = 3 pfu/cell) and preparation of nuclear extracts (8) were as described. Probes were labelled with T4 polynucleotide kinase in the presence of [γ -³²P]-ATP. Binding reactions were performed for 10 min on ice, using radiolabelled DNA probe (1 ng), nuclear extract (4 μ g) in 14 μ l of 10% glycerol, 10 mM HEPES, 30 mM KCl, 4 mM Spermidine, 0.1 mM EDTA, 0.25 mM DTT, 1 mM Na₂PO₄ (pH 7.9). Single-stranded salmon sperm DNA (1 μ g) and poly dI-dC (1.5 μ g) were added. Unlabelled competitor oligonucleotides were included at the indicated molar excesses in the binding reactions. Samples were loaded on a 6% native polyacrylamide gel and run for 2 h at 180 V. As shown in fig. 3, a much greater fraction of the DR4 probe was in the form of a retarded DNA-protein complex upon incubation with nuclear extracts from MVM-, compared with mock-infected FREJ4 cells. In contrast, the unrelated MLTF probe was retarded to a quantitatively similar extent by both types of extracts, thus indicating that MVM-induced DNA-binding activities were specific, in particular for DR4. Although the participation of factors other than THR (e.g. : RXRs, 13, 26) in MVM-induced DR4-protein complexes could not be

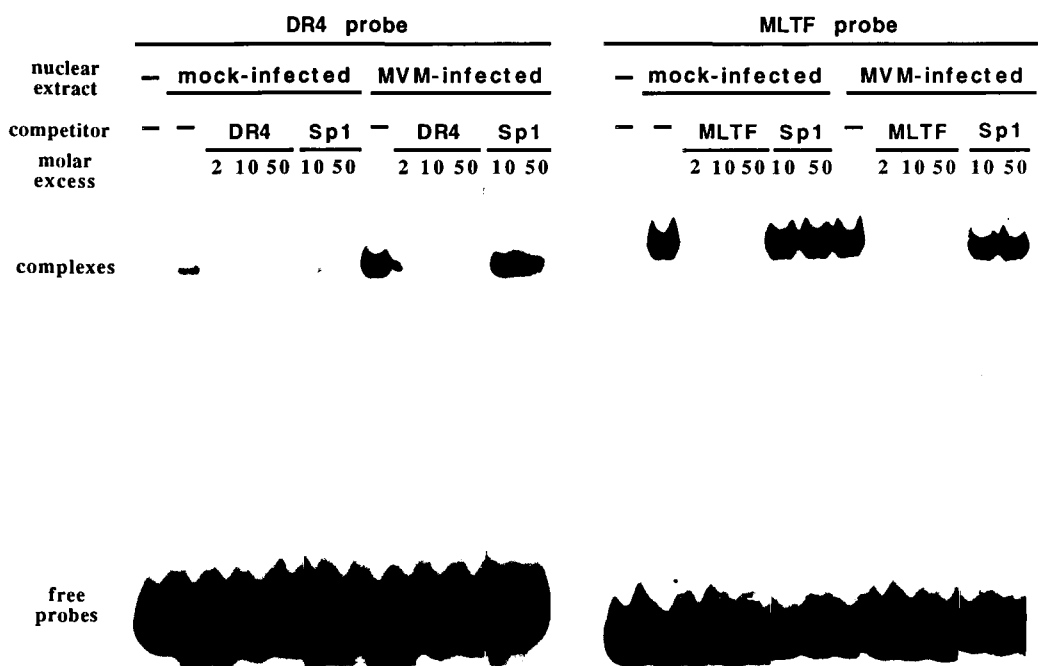


Figure 3

ruled out, these results concur with the above-mentioned Northern blotting data to suggest that endogenous *c-erb-A-1* expression is activated as a result of cell infection with MVM.

As the T3-binding form of THR was produced in MVMp-sensitive FREJ4 cells but not in the virus-resistant FR 3T3 parental line, we next hypothesized that, by acting through its receptor, T3 may modulate the susceptibility of host cells to MVMp-infection. To test this assumption, FREJ4 cells were inoculated with MVMp in phosphate-buffered saline (PBS) for one hour as described (5), trypsinized, seeded at appropriate dilutions and grown for colony formation either in complete medium or in hormone-depleted (by incubation at room temperature with AG1-X8 resin and active chacoal) medium supplemented or not with purified T3 (Sigma) at a physiological concentration (20 nM). After one week, clones were fixed, stained with 1% methylene blue, 50% methanol in PBS and subsequently counted. The number of MVMp-resistant clones was normalized to the plating efficiency of mock-infected cells in each medium. As illustrated in fig. 4a, the cytopathic effect of MVMp was reduced as a result of hormone withdrawal : upon this treatment, the cellular resistance to MVMp is enhanced by 49 +/- 9% (average of six experiments). The inhibition of colony formation exerted by MVMp is partially restored by T3 addition to the depleted medium (resistance of cells cultured in T3 medium is only 9 +/- 6% superior to that obtained in complete medium). Similar results were obtained irrespective of the culture medium used prior to infection (data not shown), showing that the survival of target cells depended on their hormonal exposure after virus uptake. The incompleteness of cell sensitization to MVMp after complementing the depleted medium with T3 suggests that other serum factors besides this hormone contribute to viral cytotoxicity.

It is well established that parvovirus replication is highly dependent on the cell cycle, in particular on factors transiently expressed during S phase (7), and can be stimulated as a result of cell transformation (17). The question therefore arose whether the enhanced cytotoxicity of MVMp in the presence of T3 reflects changes in these cellular parameters. We thus determined the growth rate of FREJ4 cells. Parallel cultures were grown in the three media and harvested every 24 hrs for cell counting. We also analyzed the cell cycle, for which exponentially growing FREJ4 cells were harvested in 0.1% NaCitrate, 0.1% Triton X100, stained with propidium iodide and analyzed in a Becton-Dickinson FACScan (5×10^{-3} events). Although hormone withdrawal reduced the cellular growth rate, the addition of T3 had no significant effect on cell proliferation in the depleted medium (Fig. 4b). Moreover, cultures maintained in the three media tested had a similar cell cycle distribution, as measured by cytofluorometry (Fig. 4c). On the other hand, the addition of T3 failed to induce signs of morphological transformation (data not shown), in agreement with other studies (20) and the current view of *c-erb-A-1* as a potential tumor suppressor gene (24). Furthermore, steps of the parvoviral life-cycle that were reported to be stimulated in some transformed cells, i.e. DNA amplification, promoter activity and protein (in particular NS polypeptides) production (17), were not significantly affected by the addition of T3 (data not shown). It therefore appears that

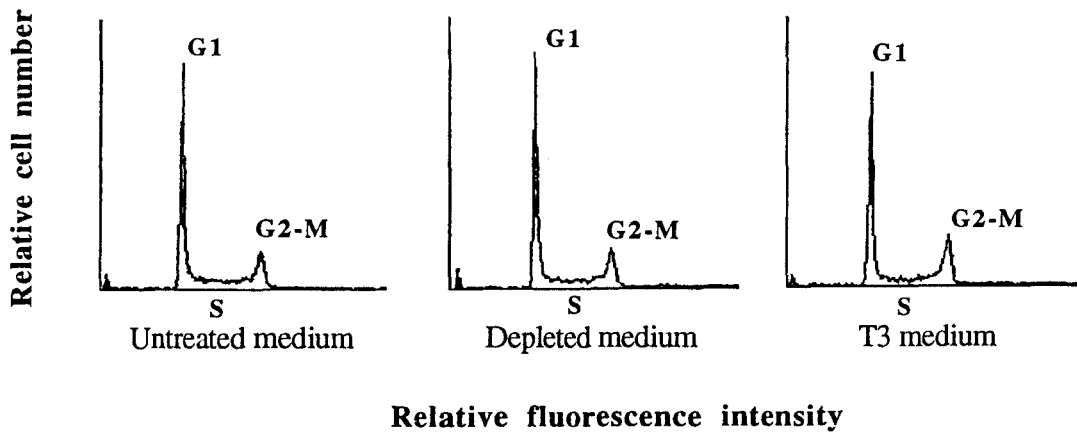
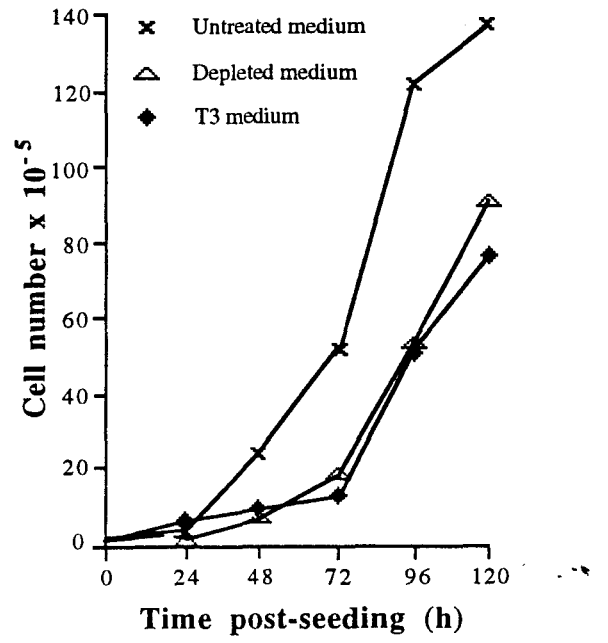
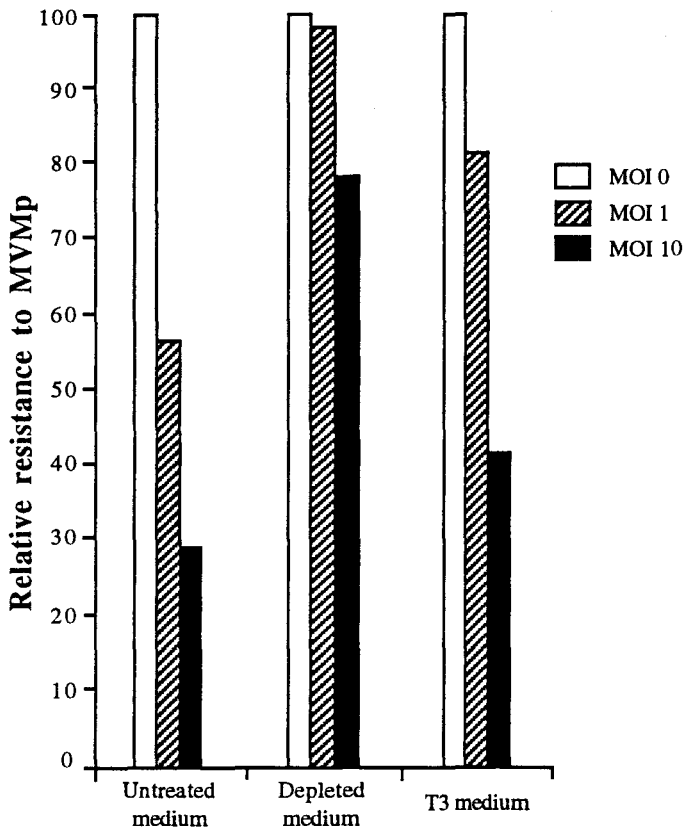


Figure 4

the sensitization of cells propagated in T3-supplemented medium to MVMp infection could not be correlated with detectable changes in the cellular and viral growth parameters tested.

Altogether, these data point to the interconnection of the pathways involved in T3 signalling and parvoviral cytotoxicity, i.e. the promoter of the $\text{THR}\alpha$ gene (*c-erb-A-1*) was activated by viral cytotoxic products, while the viral cytopathic effect was up-modulated in the presence of T3. This interrelation leads to the assumption that the $\text{THR}\alpha$ -T3 complex may act either downstream of NS proteins as an effector of the toxic activity of these products or by modulating the activity and/or cellular targets of these proteins. These interpretations could be consistent with (i) the antiproliferative/differentiative effects of T3 hormone in some systems (20), (ii) the genetic linkage of cytotoxic and transregulatory properties of NS proteins (12), (iii) the induction of T3-binding form of $\text{THR}\alpha$ in virus-sensitive but not in virus-resistant cells and (iv) the lack of a detectable perturbation of uninfected cell and virus growth upon incubation of the present system with T3.

This study disclosed another feature of the regulation of *c-erb-A-1* gene expression, besides the transcriptional activation induced by parvoviruses. Indeed, the balance of the $\text{THR}\alpha 1$ and $\text{THR}\alpha 2$ forms of the T3 receptor, thought to be determined at the post-transcriptional level (9), was strikingly different between the normal cell line analyzed and its *ras*-transformed derivative. Studies by others have demonstrated that, in neoplastic rodent cells, the levels of $\text{THR}\alpha 2$ mRNA are higher than these of $\text{THR}\alpha 1$ mRNA, whereas the opposite relation exists in normal cells (21). Our results show an inversion of this ratio upon MVMp infection. It would be of interest to establish whether parvoviral infection is able to alter the $\alpha 1/\alpha 2$ balance in other transformed cells characterized, in particular, by their enhanced susceptibility to parvovirus attack.

We thank Jan Cornelis, Jean Coll and Kay McLeod for helpful discussions, Anne Opdebeeck for cell cycle analysis, Agnès Bègue and Serge Plaza for technical assistance and advice.

REFERENCES :

1. **BEATO, M.** 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56** : 335-344
2. **BRANDENBURGER, A., D. LEGENDRE, B. AVALOSSE, AND J. ROMMELAERE.** 1990. NS-1 and NS-2 proteins may acts synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp. *Virology* **174** : 576-584
3. **CAILLET-FAUQUET, P., M. PERROS, A. BRANDENBURGER, P. SPEGELAERE AND J. ROMMELAERE.** 1990 Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding the non-structural proteins. *EMBO. J.* **9** : 2989-2995
4. **CHEN, C. AND H. OKAYAMA.** 1987. High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molec. cell. Biol.* **7** : 2745-2752.
5. **CORNELIS, J.J., P. BECQUART, N. DUPONCHEL, N. SALOME, 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.
6. **CORNELIS, J.J., Y.Q. CHEN, N. SPRUYT, N. DUPONCHEL, S.F. COTMORE, P. TATTERSALL AND J. ROMMELAERE.** 1990 Susceptibility of human cells to killing by the parvoviruses H-1 and Minute Virus of Mice correlates with viral transcription. *J. Virol.* **64** : 2537-2544
7. **COTMORE, S.F. AND P.J. TATTERSALL.** 1987 The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* **33** : 91-174
8. **DIGNAM, J.D., R.M. LEOVITZ AND R.G. ROEDER.** 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11** : 1475-1489
9. **IZUMO, S AND V. MAHDAVI.** 1988. Thyroid hormone receptor α isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature* **334** : 539-543.

10. LAUDET, V., A. BEGUE, C. HENRY-DUTHOIT, A. JOUBEL, P. MARTIN, D. STEHELIN AND S. SAULE. 1991 Genomic organization of the human thyroid hormone receptor α (*c-erbA-1*) gene. *Nuc. Acids Res.* **19** : 1105-1112
11. LAUDET, V., J.M. VANACKER, G. ADELMANT, A. BEGUE AND D. STÉHELIN. Characterization of a functional promoter for the human thyroid hormone receptor alpha (*c-erbA-1*) gene. *Oncogene* (in press)
12. LEGENDRE, D. AND J. ROMMELAERE. 1992 Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus Minute Virus of Mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition. *J. Virol.* **66** : 5705-5713
13. LEID, M., P. KASTNER, R. LYONS, H. NAKSHATRI, M. SAUNDERS, T. ZACHAREWSKI, J.Y. CHEN, A. STAUB, J.M. GARNIER, S. MADER AND P. CHAMBON. 1992 Purification, cloning and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* **68** : 377-395
14. LUCKOW, B. AND G. SCHÜTZ. 1987. CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* **15** : 5490
15. NÄÄR, A.M., J.M. BOUTIN, S.M. LIPKIN, V.C. YU, J.M. HOLLOWAY, C.K. GLASS AND M.G. ROSENFELD. 1991 The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* **65** : 1267-1279.
16. RHODE, S.L.III AND S.M. RICHARD. 1987 Characterization of the *trans*-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J. Virol.* **61** : 2807-2815
17. ROMMELAERE, J. AND J.J. CORNELIS. 1991 Antineoplastic activity of parvoviruses. *J. Virol. Methods* **33** : 233-251
18. SAP, J., A. MUNOZ, K. DAMM, Y. GOLDBERG, J. GHYSDAEL, A. LEUTZ, H. BEUG AND B. VENNSTRÖM. 1986. The *c-erbA* protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* **324** : 635-640.

19. SAWADOGO, M. AND R.G. ROEDER. 1985. Interaction of a gene-specific transcription factor with the Adenovirus Major Late Promoter upstream of the TATA box region. *Cell* **43** : 165-175.
20. SCHROEDER, C. , L. GIBSON AND H. BEUG. 1992 The *v-erbA* oncogene requires cooperation with tyrosine kinases to arrest erythroid differentiation induced by ligand-activated endogenous *c-erbA* and retinoic acid receptor. *Oncogene* **7** : 203-216
21. TOO, C.K.L. AND D.L. GUERNSEY. 1992. Increased messenger RNA levels of the antagonist thyroid hormone receptor *erbA- α 2* and decreased levels of *erbA- α 1* and *erbA- β 1* receptor messenger RNAs in neoplastic rodent cells. *Cancer Res.* **52** : 2186-2190
22. UMESONO, K., K.K. MURAKAMI, C.C. THOMPSON AND R.M. EVANS. 1991 Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* **65** : 1255-1266.
23. VAN HILLE, B., N. DUPONCHEL, N. SALOME, 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 rat cells to Minute Virus of Mice. *Virology* **171** : 89-97.
24. WEINBERG, R.A. 1991 Tumor suppressor genes. *Science* **254** : 1138-1146
25. WEINBERGER, C., C.C. THOMPSON, E.S. ONG, R. LEBO, D.J. GRUOL AND R.M. EVANS. 1986. The *c-erbA* gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* **324** : 641-646.
26. YU, V.C., C. DELSERT, B. ANDERSEN, J.M. HOLLOWAY, O.V. DEVARY, A.M. NÄÄR, S. YUN KIM, J.M. BOUTIN, C.K. GLASS AND M.G. ROSENFELD. 1991 RXR β : a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* **67** : 1251-1266.
27. ZENKE, M., A. MUNOZ, J. SAP, B. VENNSTROM and H. BEUG. 1990 *v-erbA* oncogene activation entails the loss of hormone-dependent regulator activity of *c-erbA*. *Cell* **61** : 1035-1049.

LEGEND TO FIGURE 1

Effect of MVMp NS proteins on the activity of the *c-erb-A-1* promoter. Expression plasmids carrying MVMp sequences under the control of their own promoter (P4) were cotransfected with a reporter plasmid containing upstream elements of the human *c-erb-A-1* gene (pTHRA, ref. 11). The construct pULB 3566 encodes full length NS1 and NS2 proteins whereas pIPL K harbours a frameshift mutation leading to the production of a truncated NS1 polypeptide lacking its C-terminal part (indicated in black). pULB 3543 only retains P4 promoter sequences. Positions of non-acetylated (c) and acetylated (ac) chloramphenicol are indicated. CAT activities were determined by densitometry and are given in the left panel relatively to the value measured for cells transfected with pTHRA alone.

LEGEND TO FIGURE 2

(A) Genomic organization of the *c-erb-A-1* locus. The *c-erb-A-1* gene contains 10 exons spanning 27 kbp of genomic DNA (10) (note that the introns are not represented to scale). Two RNAs of 5.0 and 2.7 kb are generated by differential splicing and encode the $\alpha 1$ (hormone binding) and the $\alpha 2$ (non hormone binding) isoforms of THR, respectively. Positions of the initiator Met and of the stop codons (TAA for $\alpha 1$ and TGA for $\alpha 2$) are indicated. Black boxes represent the hormone binding domain which is incomplete in $\alpha 2$, unabling this product to efficiently bind T3. (B) Effect of MVMp infection on *c-erb-A-1* mRNA production. Total RNAs extracted from mock (lanes -)- or MVM (lanes +)- infected FR 3T3 and FREJ4 cells were analyzed by Northern blotting. Positions of the $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -encoding mRNAs are indicated, together with those of crosshybridizing 28S and 18S ribosomal RNAs which were used to match total RNA loads.

LEGEND TO FIGURE 3

Effect of MVMp infection on the cellular DNA-binding activities. Nuclear extracts from mock- or MVM-infected FREJ4 cells were used in gel shift assays with radiolabelled DR4 or MLTF oligonucleotides. DR4 bears a direct repeat of the consensus half-sites spaced by 4 bp, reported to be specific for THR binding (15, 22). The MLTF probe, used as a control, harbours the motif recognized by the MLTF/USF protein (19). An oligonucleotide containing the consensus binding site for the Sp1 factor was used as an unrelated competitor. The positions of protein-DNA complexes and unbound probes are indicated. Sequence of the oligonucleotides used :

DR4 : GATCCCAGGTCACAGGAGGTCAGAAGATC

MLTF : GGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGT

Sp1 : GATCGATCGGGGCGGGGCGATC

LEGEND TO FIGURE 4

Growth parameters and susceptibility of FREJ4 cells as a function of the culture medium and virus infection. (A) Cell resistance to parvovirus MVMp infection. FREJ4 cells were mock-treated (white bars) or infected with MVMp at a MOI of 1 (hatched bars) or 10 (black bars) pfu per cell, and further incubated in the indicated culture media for one week. The survival was calculated from the number of clones formed by infected cells, expressed as a percentage of those formed by mock-treated cells. The depleted medium contained foetal calf serum from which hormones were withdrawn. The T3 medium consist of depleted medium supplemented with T3 hormone. (B) Effect of the cultutre medium on cell growth rates. The number of cells per uninfected culture maintained in complete medium (x) or in depleted medium supplemented (♦) or not (Δ) with T3 is indicated as a function of post-seeding time. (C) Distribution through the cell cycle. The relative number of cells in different phases within an uninfected culture is given as a function of their DNA content measured by cytofluorometry . Positions corresponding to the G1, S and G2-M phases are indicated.

II. COMMENTAIRE

Malgré le nombre important de boîtes GC présentes dans sa séquence, le promoteur de *c-erbA-1* est un promoteur faible. Ceci ne constitue pas, en soi, une surprise. Ce gène code un facteur de transcription et ceux-ci sont rarement exprimés à des taux héroïques. De plus, les hormones agissant à des concentrations très basses, une faible quantité de récepteurs peut très bien être suffisante pour une action optimale. La stimulation observée en présence des protéines parvovirales est également faible et voisine du taux d'activation obtenu par la Dexaméthasone. Ceci semble donc être relié au promoteur étudié, les mêmes quantités de plasmide codant les protéines NS de MVM étant capables de stimuler le promoteur parvoviral tardif P38 de manière nettement plus dramatique. Nous avons utilisé comme contrôle, les plasmides pULB3543 et pIPLK. pULB3543 ne comporte que les séquences du promoteur P4 et nous permettait de déterminer une éventuelle compétition de promoteurs pour des facteurs de transcription communs, en l'occurrence, qui auraient ici assurés une répression transcriptionnelle. pIPLK comporte la totalité des séquences codant les protéines non structurales mais porte une mutation dans la séquence spécifique de NS1. La partie C-terminale de cette protéine, dans laquelle Legendre et Rommelaere (1992) ont situé une zone nécessaire aux activités transcriptionnelles, n'est pas exprimée. L'incapacité de ce plasmide à reproduire l'effet d'activation en *trans* observé avec le plasmide pULB3566 montre que celle-ci est clairement dûe à la protéine NS1.

Nous possédons donc un second promoteur activé par la protéine NS1 (le premier étant le promoteur parvoviral tardif P38). Nous avons comparé les séquences de ces deux promoteurs dans l'espoir de mettre en évidence des sites communs, soupçonnables d'être les cibles de l'effet positif de NS1. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, une des séquences du P38 caractérisées comme responsable de l'activation en *trans* par NS1 (du moins sur le parvovirus H-1) est la boîte "tar" (Rhode et Richard, 1987). Nous n'avons pas retrouvé de séquence de ce type (dont l'implication dans la transactivation est, rappelons-le, contestée [Ahn et al., 1992]) dans le promoteur de *c-erbA-1*. Les seules séquences homologues dans les deux promoteurs semblent correspondre à la boîte GC du promoteur P38. Cette séquence n'apparaît pas comme telle de manière évidente dans le promoteur de *c-erbA-1*, malgré la haute teneur en nucléotides G et C de ce dernier. Dans celui-ci, le C central souvent caractéristique de ces sites (mais de manière non absolue) est en effet remplacé par un A. Nous avons comparé des extraits nucléaires de cellules FREJ4 infectées ou non par MVMp pour leur aptitude à former des complexes ADN-protéines avec un oligonucléotide portant les séquences homologues dans les deux promoteurs P38 et *c-erbA-1*. Aucune augmentation du taux de complexes retardés n'a pu être mise en évidence en fonction de l'infection. On peut imaginer plusieurs hypothèses pour expliquer ces résultats : i) ce n'est pas la quantité mais la qualité des facteurs fixés sur la boîte GC qui fait la différence entre cellules infectées et non infectées : on

sait, en effet, que le facteur Sp1 est capable d'être phosphorylé une fois fixé sur la boîte GC (Jackson et al., 1990) et que cet événement influe l'activité de ce facteur (voir pour revue Hunter et Karin, 1992 ; Jackson, 1992), on peut ainsi très bien supposer l'influence de NS1 sur une kinase de Sp1 ou sur un coactivateur de ce facteur, ii) la transactivation passe par d'autres sites non nécessairement détectables par comparaison de séquences, iii) il s'agit de mécanismes d'activation différents pour chaque promoteur, iv) la protéine NS1 est un activateur ubiquitaire qui ne réprimera les promoteurs qu'en présence d'une séquence de répression ; rappelons, à ce propos, l'absence, dans le promoteur de *c-erbA-1* (tout comme dans le P38 parvoviral) de la séquence de type AGNNAG(T/C)(A/G)AC, présente dans 4 promoteurs réprimés par NS1. Seule une étude plus fine (entre autres par l'analyse de mutants de délétion du promoteur de *c-erbA-1*) pourrait permettre de confirmer l'une de ces hypothèses.

L'étude des ARNm correspondant à *c-erbA-1* montre que ce gène est faiblement exprimé dans le système cellulaire étudié. Dans les deux types cellulaires, FR3T3 et FREJ4, l'expression de *c-erbA-1* est activée par l'infection parvovirale, mais nous avons affaire à différentes isoformes. Il serait prématuré de généraliser ce différentiel d'activation en fonction d'un paramètre quelconque, différent entre les deux cellules considérées. Néanmoins, quelques hypothèses peuvent retenir notre attention. Sachant que les cellules FREJ4 expriment une quantité plus importante de protéine NS1 après infection parvovirale que les cellules FR3T3, il serait tentant de considérer qu'un effet de seuil dans le taux de cette protéine préside à l'activation différentielle. Néanmoins, il faudrait pour cela que la balance $\alpha1/\alpha2$ soit régulée au niveau transcriptionnel, alors que l'hypothèse courante ne prévoit qu'une différence dans l'épissage (Izumo et Mahdavi, 1988 ; Hodin et al., 1989), à l'exclusion d'initiation différentielle de la transcription. L'analyse du promoteur du gène *c-erbA-1* n'a, d'autre part, pas fait soupçonner la présence de sites d'initiation différents suivant les isoformes produites (voir plus haut). Autre hypothèse de régulation de la balance $\alpha1/\alpha2$ dont nous avons eu l'occasion de parler : l'intervention du gène *ear-1* (Lazar et al., 1990). Nous avons, en effet, vu que la partie 3' de ce gène (correspondant aux exons F et F-1) chevauche *c-erbA-1* au niveau de son exon 10, ce dernier n'étant présent que dans l'isoforme $\alpha2$ (Lazar et al., 1989b ; Miyajima et al., 1989 ; Laudet et al., 1991). Il n'est ainsi pas exclu que NS1 puisse également influencer positivement la transcription du gène *ear-1* dans les cellules FREJ4. La production accrue d'ARNm correspondant à ce gène pourrait, conjointement à l'activation du promoteur de *c-erbA-1*, augmenter le taux des isoformes $\alpha1$ par dégradation sélective des complexes $\alpha2/ear1$ ou encombrement stérique du complexe de transcription au niveau de la zone chevauchante. Le fait que ces phénomènes se passent dans les cellules FREJ4 et non dans les FR3T3 peut nous faire incriminer soit les taux d'expression différents de NS1 dans ces deux cellules, soit la transformation qui pourrait réguler non pas l'activation mais ici l'activabilité de l'expression de *ear-1*. Une façon de trancher ce nœud gordien consisterait à étudier une paire cellulaire

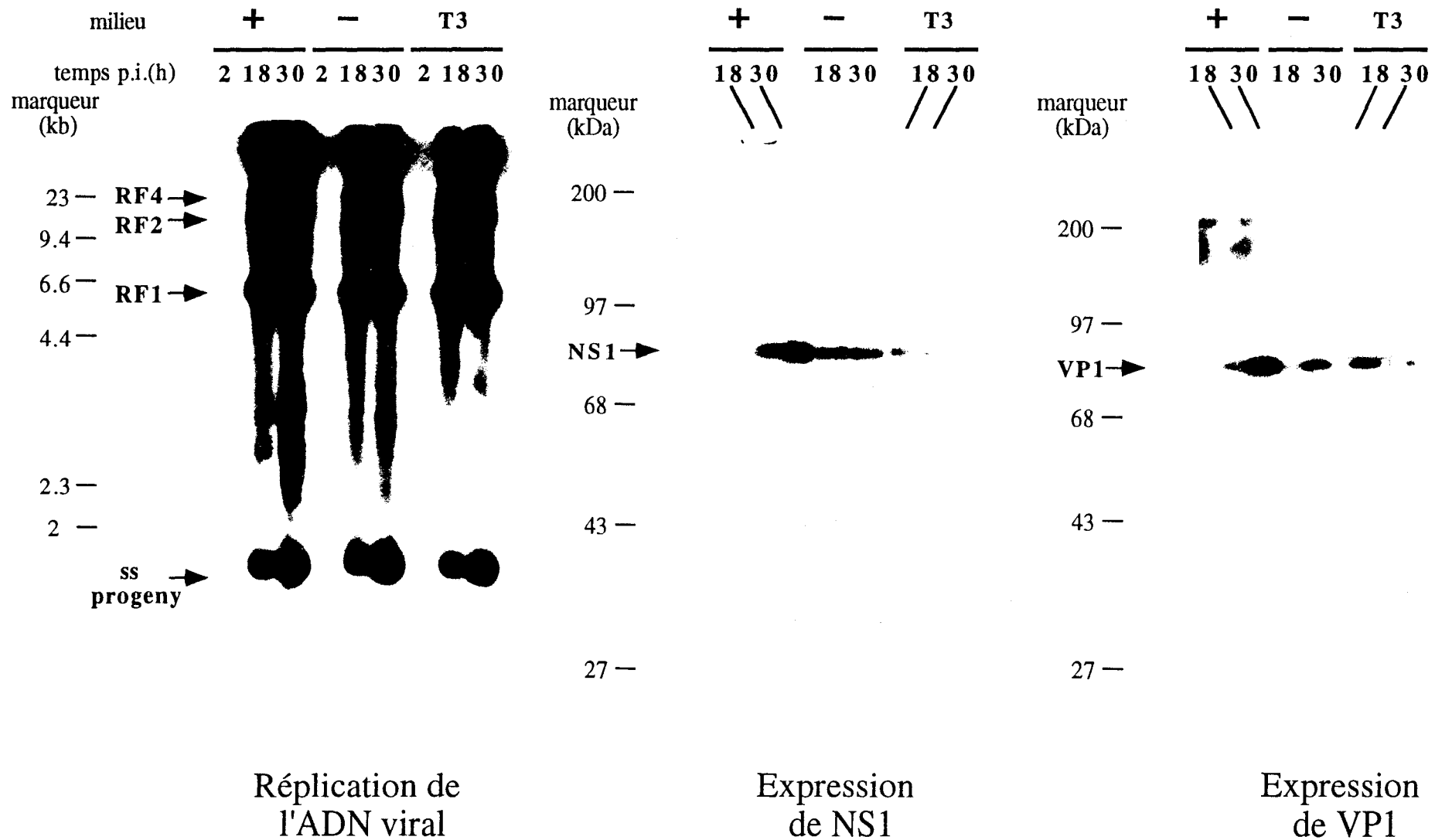


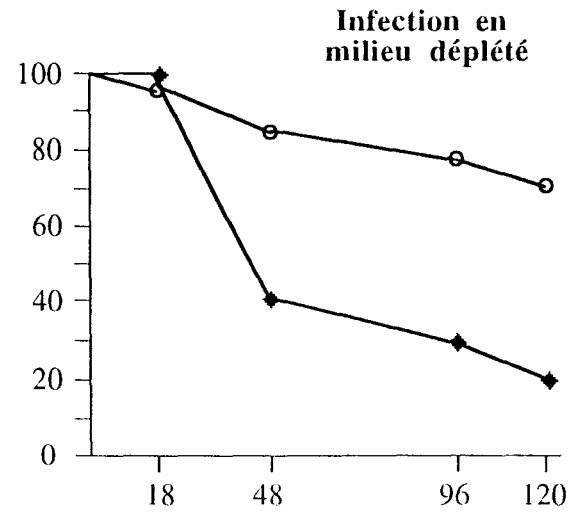
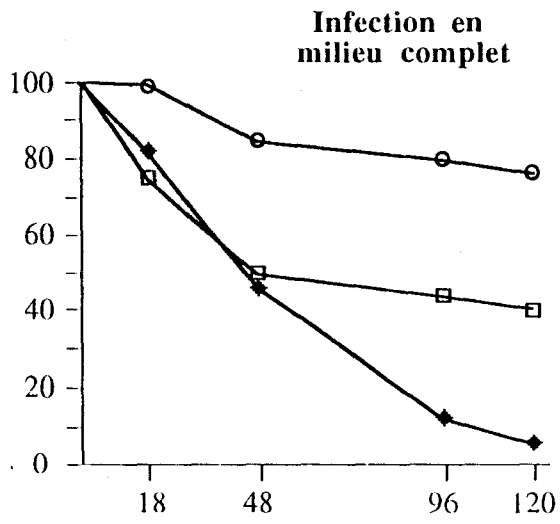
Figure 23 : Paramètres de la réplication parvovirale en fonction du milieu de culture

+ : milieu complet
 - : milieu déplété
 T3 : complémentation par T3

normale/transformée mais exprimant NS1 au même taux (sous le contrôle d'un promoteur inductible par exemple).

Les expériences de retard sur gel que nous montrons ne constituent pas, en soi, une preuve de l'augmentation du taux de THR dans la cellule suite à l'infection parvovirale. On sait, en effet, que le produit de *c-erbA-1* a une grande aptitude à hétérodimériser. Rien n'interdit, dans ce cas, de considérer que l'élévation du taux des complexes ADN-protéines dans les extraits nucléaires de cellules infectées par MVM reflète plus une augmentation de la quantité de ces cofacteurs que de THR. En particulier, le statut de l'expression des RXR dans les cellules infectées par MVM n'a pas été déterminé. D'autre part, au vu de la grande plasticité des sites de reconnaissance ADN par les protéines, il n'est pas exclu que nous examinions en fait l'augmentation du taux d'un tout autre facteur que THR, facteur capable de se fixer sur la séquence DR4 que nous avons utilisée. C'est conjointement avec la stimulation de l'expression transitoire et l'analyse de l'ARN qu'il faut considérer ces expériences de retard sur gel, comme renforçant, par un test fonctionnel (ou semi-fonctionnel), les données sur l'augmentation du taux de THR dans la cellule suite à l'infection parvovirale.

Une des explications les plus évidentes de la modification de l'inhibition de la clonogénicité cellulaire en fonction du milieu de culture consisterait en un effet de "feed-back" des hormones thyroïdiennes sur le cycle viral. Il se pourrait ainsi qu'une étape quelconque de celui-ci soit dépendante de la présence d'hormone T3. Nous avons donc analysé différents paramètres viraux en l'absence ou en présence d'hormones thyroïdiennes : taux d'amplification de l'ADN viral, activité du promoteur précoce P4 (sous le contrôle duquel est la production des protéines non structurales), quantité de protéines NS1 et VP1. La réplication de l'ADN viral et la présence de protéines non structurales ont en effet été corrélés à la lyse parvovirale (Cornelis et al., 1988a et b ; Rommelaere et Cornelis, 1991). L'analyse de la production de VP1 fournit également des renseignements sur la fonctionnalité de la protéine NS1. En effet, la synthèse de cette protéine est dépendante de l'activité du promoteur P38, activé en *trans* par la protéine NS1. Le fait d'analyser des paramètres relativement tardifs dans le cycle viral exclut une influence de T3 sur la pénétration virale dans la cellule. Tous les facteurs analysés (voir figure 23) sont affectés par l'absence d'hormones (i.e. : réduits en milieu déplété, bien qu'en des proportions non dramatiques), ce qui représente probablement un reflet de la plus faible croissance cellulaire en l'absence d'hormones. Néanmoins, aucun n'est stimulé par l'addition de T3 purifiée au milieu de culture, indiquant par là l'indépendance du cycle viral à l'égard de cette hormone. La protéine NS1 semble par ailleurs parfaitement fonctionnelle en l'absence de T3, tout au moins en ce qui concerne la transactivation du promoteur P38. L'analyse de séquence du promoteur P4 n'a jamais révélé la présence de sites HRE potentiels. On ne s'attendait donc pas à une régulation de ce promoteur par *c-erbA-1* bien qu'on pouvait imaginer un effet indirect, *c-erbA-1* agissant dans ce cas par l'intermédiaire d'un autre facteur de transcription. Ce ne semble donc pas être le cas.



Milieu de culture

◆ complet

○ déplété

◻ déplété + T3

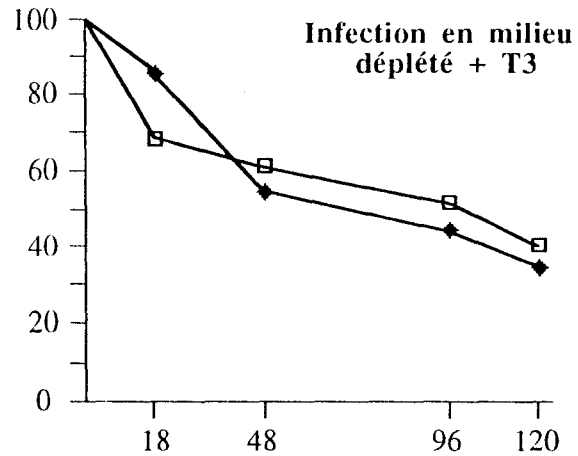


Figure 24 : Survie des cellules FREJ4 à l'infection parvovirale (MOI 10) en fonction du milieu de clonage et de culture

Les résultats sont exprimés en courbes de croissance :
 (pourcentage de cellules résistantes à MOI 10 par rapport à MOI 0)
 en fonction du temps de culture après l'infection (en heures)

Dans un milieu dépourvu d'hormone, la capacité qu'a MVM d'inhiber la clonogénicité cellulaire est réduite. Soyons clairs, le test que nous utilisons nous permet de mesurer un effet cytopathique et non une cytolyse. Certes, l'inhibition de clonogénicité est considérée comme reflétant les propriétés lytiques des parvovirus, mais nous n'excluons pas le fait que la ré-introduction de T3 dans le milieu de culture puisse conduire, par exemple, à un effet cytostatique du virus. Quoiqu'il en soit, il est clair que la présence des hormones thyroïdiennes a un effet sur l'action du virus. Le fait que l'inhibition de la clonogénicité ne soit que partiellement réduite suite à la déplétion du sérum peut être interprété en terme de déplétion incomplète ou, alternativement, dû à la présence d'un autre effecteur sérique de la lyse, non affecté par le passage sur charbon actif. La capacité cytopathique du virus n'est qu'imparfaitement restaurée par l'addition de T3 purifiée. On peut ici incriminer la présence dans le sérum d'un autre facteur favorisant l'effet viral (mais une moindre mesure) et retiré par la déplétion. Dans les expériences décrites ici, les cellules ont été maintenues dans un milieu "complet" (i.e. : non déplété). Le changement de milieu a été effectué après l'infection. Il est également possible de faire l'expérience inverse (représentée en courbes de croissance sur la figure 24). Les cellules cultivées dans un milieu x (appelé "milieu d'infection" sur la figure 24) sont infectées et réparties dans un milieu pouvant être différent (appelé "milieu de culture" sur la figure 24). Dans ce cas, la sensibilité cellulaire à MVM est en accord avec le milieu de culture et non avec le milieu d'infection. Ceci indique qu'il peut y avoir mise en branle rapide, après infection, de mécanismes cellulaires dépendant de la présence de T3 et présidants à l'effet tueur des parvovirus.

Il est bien connu que la lyse parvovirale est hautement dépendante du cycle cellulaire, en particulier, de facteurs transitoirement exprimés durant la phase S de celui-ci. Nous avons donc vérifié l'absence d'incidence de l'hormone T3 sur le cycle cellulaire en déterminant, en fonction du milieu de culture, d'une part, le taux de croissance de nos cellules, d'autre part, la répartition d'une population cellulaire dans les différentes phases du cycle. Là encore, si la croissance cellulaire est ralentie par l'absence d'hormone, l'addition de T3 ne la modifie pas sensiblement. On peut pratiquement superposer les courbes de croissance obtenues dans les milieux déplété et supplémenté par T3. La distribution des cellules dans les différentes phases (déterminée par la quantité de fluorescence émise par l'ADN) ne semble pas affectée par le milieu de culture. Ceci indique que, si la longueur des cycles augmente entre milieu complet et milieu déplété, la durée relative des phases est identique.

Il semble donc que NS1, effecteur viral de la lyse induite par MVM, contribue à augmenter la quantité de produits du gène *c-erbA-1*, et ce, par stimulation de l'activité de son promoteur. Par des mécanismes encore inconnus, c'est l'isoforme $\alpha 1$, fixatrice de l'hormone, qui est majoritairement produite dans les cellules sensibles au parvovirus. D'autre part, le fait que l'effet cytopathique induit par MVM semble dépendre de la présence de T3 nous induit à proposer une implication de THR comme un des relais de cet effet. La contribution de la

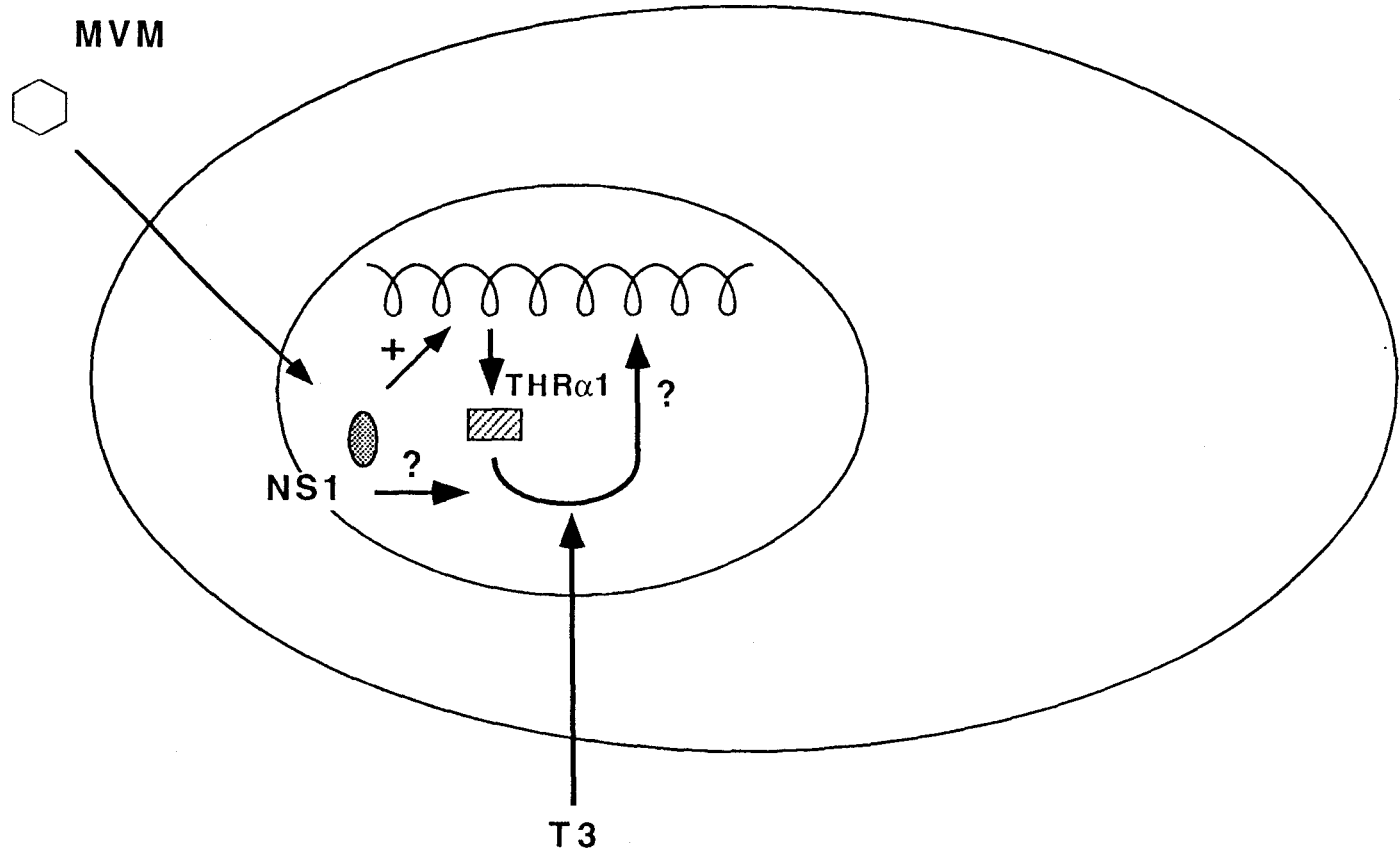


Figure 25 : Hypothèse d'action conjuguée de NS1 et THR α 1 dans les cellules transformées

protéine NS1 dans la lyse parvovirale se borne-t-elle à induire la synthèse de THR qui serait, ensuite, l'agent lytique essentiel ? On sait, en effet, l'implication de *c-erbA-1* dans des phénomènes d'antiprolifération (Zenke et al., 1990 ; Schoeder et al., 1992a et b ; Carnac et al., 1992). Néanmoins, la transformation stable de cellules FREJ4 par la version $\alpha 1$ de *c-erbA-1* est possible sans qu'il y ait lyse cellulaire ou arrêt de croissance (résultats personnels non publiés). Il faut donc admettre une double implication de NS1 : d'abord dans l'induction de l'expression de THR, puis, dans la lyse proprement dite, en coopération avec le produit de *c-erbA-1*, couplé à son ligand naturel T3 (voir figure 25). Puisque ce sont les cellules malignes qui sont cibles de l'effet lytique parvoviral, on peut, dans le cadre de ce modèle, supposer le rôle de la transformation à deux niveaux, non mutuellement exclusifs : i) dans la synthèse préférentielle d'isoforme $\alpha 1$ (par rapport à $\alpha 2$) dans les cellules sensibles (transformées) et ii) dans l'activité d'un cofacteur cellulaire indispensable à la lyse.



CONCLUSION

Le travail que nous avons accompli au laboratoire avait pour but de mettre en évidence les mécanismes par lesquels les parvovirus lysent les cellules transformées (ou, plus modestement, de gagner quelques connaissances dans ce domaine). Nous sommes partis des données montrant le lien physico-moléculaire entre les interférences transcriptionnelles exercées par les protéines non structurales et leurs effets cytopathiques. Sur cette base, nous avons confirmé le fait que l'extrémité C-terminale de la protéine NS1 du virus MVMp est essentielle à l'inhibition de promoteurs hétérologues, avec une activité indépendante possible de ce domaine. Les différents promoteurs étudiés ont permis de définir une séquence potentiellement consensus par laquelle NS1 pourrait (avec tous les conditionnels que cela implique, en l'absence de test fonctionnels) inhiber l'expression dirigée par ces promoteurs. Il est clair que la répression transcriptionnelle (et son éventuelle implication dans les activités antitransformantes des parvovirus) reste à démontrer *in vivo*, en particulier au niveau du promoteur endogène de *c-mil* (ou en l'occurrence *c-raf* dans les cellules murines). Néanmoins, ceci suggère qu'un des modes d'action antiproliférative de MVM pourrait être la diminution du taux d'une protéine clef (comme l'est effectivement le produit de *c-mil/raf*) dans la transmission du signal mitotique et peut constituer une hypothèse de travail pour des développements ultérieurs. En cas de vérification de cette supposition, il faudra déterminer en quoi cette dysrégulation de *c-raf* est spécifique des cellules transformées ou pourquoi son effet se marque de manière aussi cruciale dans ces dernières, mais gardons-nous des cascades d'hypothèses.

Nous avons également mis en évidence une action (positive, cette fois) de NS1 sur le promoteur du gène *c-erbA-1*, codant pour un récepteur des hormones thyroïdiennes. Nous avons également étudié l'implication de ces dernières dans les effets cytopathiques exercés par le virus MVMp. Ainsi, notre travail montre un deuxième mode d'action antitransformante des parvovirus passant par l'activation d'un gène dont le produit est connu pour ses propriétés antiprolifératives. Les deux modes d'action mis en évidence ne sont en aucun cas mutuellement exclusifs et peuvent conduire à un effet cumulatif.

Suggérons donc un modèle pour les mécanismes de l'oncolyse parvovirale, prospectif mais pouvant nous servir d'hypothèse de travail futur. Les virions entrent indistinctement dans les cellules sensibles et résistantes. Dans les premières, le promoteur précoce P4 est plus actif, ce qui a pour conséquence une plus grande production de protéines non structurales et particulièrement NS1. Celle-ci inhibe différents promoteurs hétérologues, dont on pourrait suggérer que certains contrôlent l'expression de gènes critiques impliqués dans la prolifération cellulaire (*c-raf* par exemple). Dans le même temps, NS1 active l'expression du promoteur du gène *c-erbA-1*. Dans les cellules sensibles (et par des mécanismes inconnus : effet de seuil de NS1, coactivation du gène *ear-1*, régulation de l'épissage) est produite spécifiquement la forme fixatrice d'hormone du récepteur des hormones thyroïdiennes. Celui-ci, à l'aide de son ligand

naturel (l'hormone T3), et très probablement en coopération avec NS1 exerce certaines activités (transcriptionnelles ?) conduisant *in fine*, à la lyse cellulaire. Il semble donc exister au moins deux clefs dans la différence cellule normale-résistante / cellule transformée-sensible : l'activation différentielle du promoteur P4 et la régulation de la production des différentes isoformes du produit du gène *c-erbA-1*.

Il est clair que les constatations exposées sont limitées à un seul système cellulaire parmi les nombreux démontrés comme assujettis à la menace parvovirale. Bien plus, le travail s'est limité à des expériences sur des cellules en culture. Si, comme nous l'avons vu, il existe une bonne corrélation entre oncosuppression (*in vivo*) et oncolyse (*in vitro*), rien n'indique formellement que les mêmes causes produisent ces deux phénomènes. Si nous avons apporté quelques éléments de réponse, nous avons également créé des questions. Cette troisième conclusion ne sera donc que provisoirement définitive (tout au moins pour ce mémoire).

REFERENCES

AHN, J.K., GAVIN, B.J., KUMAR, G. AND WARD, D.C. 1989 Transcriptional analysis of Minute Virus of Mice P4 promoter mutants. *J. Virol.* **63**, 5425-5439

AHN, J.K., PITLUK, Z.W. AND WARD, D.C. 1992 The GC box and TATA transcription control elements in the P38 promoter of the Minute Virus of Mice are necessary and sufficient for transactivation by the nonstructural protein NS1. *J. Virol.* **66**, 3776-3783

ALEXANDERSEN, S., BLOOM, M.E., AND PERRYMAN, S. 1988 Detailed transcription map of Aleutian mink disease parvovirus. *J. Virol.* **62**, 3684-3694

ANDERSSON, M.L., NORDSTRÖM, K., DEMCZUK, S., HARBERS, M. AND VENNSTRÖM, B. 1992 Thyroid hormone alters the DNA-binding properties of chicken thyroid hormone receptors α and β . *Nuc. Acids Res.* **20**, 4803-4810

ASHKTORAB, H. AND SRIVASTAVA, A. 1989 Identification of nuclear proteins that specifically interact with Adeno-associated virus type 2 inverted terminal repeat hairpin DNA. *J. Virol.* **63**, 3034-3039

ASTELL, C. R. AND BLUNDELL, M.C. 1989 Sequence of the right hand terminal palindrome of the human B19 parvovirus genome has a potential to form a "stem plus arms" structure. *Nucleic Acids Res.* **17**, 5857

ASTELL, C. R., THOMASON, M.J. MERCHLINSKY, M.J. AND WARD, D.C. 1984 The complete DNA sequence of Minute Virus of Mice, an autonomous parvovirus. *Nucleic Acids Res.* **11**, 999-1018

ASTELL, C.R., CHOW, M.B. AND WARD, D.C. 1985 Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of Minute Virus of Mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication. *J. Virol.* **54**, 171-177

AVALOSSE, B.L., BARRIJAL, S., CHEN, Y.Q., CASSIMAN, J.J. AND ROMMELAERE, J. 1989 Identification of a transformation-sensitive nuclear protein from normal human fibroblasts that specifically interacts with Minute Virus of Mice DNA and correlates with cell resistance to the parvovirus. *Mol Carcinog* , **2**, 245-251.

BACHNOU, N., LAUDET, V., JAFFREDO, T., QUATANNENS, B., SAULE, S. AND DIETERLEN-LIEVRE, F. 1991. Cooperative effect of *v-myc* and *v-erbA* in the chick embryo. *Oncogene* **6**, 1041-1047.

BARRIJAL, S., PERROS, M., GU, Z., AVALOSSE, B.L., BELENGUER, P., AMALRIC, F. AND ROMMELAERE, J. 1992 Nucleolin forms a specific complex with a fragment of the viral (minus) strand of Minute Virus of Mice DNA. *Nuc. Acids Res.* **20**, 5053-5060

BANDO, H., KUSUDA, J., GOJOBORI, T., MARUYAMA, T. AND KAWASE, S. 1987 Organization and nucleotide sequence of a densovirus imply a host-dependent evolution of the parvoviruses. *J. Virol.* **61**, 553-560

BANTEL-SCHAAL, U. 1990 Adeno-associated parvoviruses inhibit growth of cells derived from malignant human tumors. *Int J Cancer* **45**, 190-194.

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.

BEATO, M., BARETTINO, D., BRUGGEMEIR, U., CHALEPAKIS, G., HACHE, R.J.G., KALFF, M., PINA, B., SCHAUER, M., SLATER, E.P. AND TRUSS, P. 1991 Characterization of DNA receptor interactions. In *Nuclear Hormone Receptors*. Ed. Parker, M.G. Academic Press : 197-211.

BEATON, A., PALUMBO, P. AND BERNS, K.I. 1989 Expression from the Adeno-associated virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in *trans* by the *rep* protein. *J. Virol.* **63**, 4450-4454

BECERRA, S.P., ROSE, J.A., HARDY, M., BAROUDY, B.M. AND ANDERSON, C.W. 1985 Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C : a possible ACG initiation codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7919-7923.

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

BERNS, K.I. 1990 Parvovirus Replication. *Microbiol. Rev.* **54**, 316-329

BERNS, K.I., PINKERTON, T.C., THOMAS, G.F. AND HOGAN, M.D. 1975 Detection of Adeno-associated virus (AAV) specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit cells. *Virology* **68**, 556-560

BERNS, K.I. AND BOHENZKY, R.A. 1987 Adeno-associated viruses : an update. *Adv. Virus Res.* **32**, 243-306

BERRODIN, T.J., MARKS, M.S., OZATO, K., LINNEY, E. AND LAZAR, M.A. 1992 Heterodimerization among thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor, retinoid X receptor, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor and an endogenous liver protein. *Mol. Endocr.* **6**, 1468-1478

BEUG, H. AND VENNSTROM, B. 1991. Avian erythroleukaemia : possible mechanisms involved in *v-erbA* oncogene function. In *Nuclear Hormone Receptors*. Ed. Parker, M.G. Academic Press : 355-372.

BLANAR, M.A. AND RUTTER, W.J. 1992 Interaction cloning : identification of a helix-loop-helix zipper protein that interacts with c-fos. *Science* **256**, 1014-1018

BLUNDELL, M.D., BEARD, C. AND ASTELL, C.R. 1987 In vitro identification of a B19 parvovirus promoter. *Virology* **157**, 534-538

BODNAR, J.W. 1988 Sequence organization in regulatory regions of DNA of Minute Virus of Mice. *Virus Genes* **2**, 167-182

BONNARD, G.D., MANDERS, E.K., CAMPBELL, D.A., HERBEMANN, 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

BOUCHER, P. AND PRIVALSKY, P. 1990 Mapping of functional domains within the *v-erbA* oncogene protein : the remnants of the hormone binding domain play multiple, vital roles in protein action. *Oncogene* **5**, 1303-1311.

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

- BROWNSTEIN, D.G., SMITH, A.L., JOHNSON, E.A., PINTEL, D.J., NAEGER, L.K. AND TATTERSALL, P.** 1992 The pathogenesis of infection with Minute Virus of Mice depends on expression of the small nonstructural protein NS2 and on the genotype of the allotropic determinants VP1 and VP2. *J. Virol.* **66**, 3118-3124
- BULLER, R.M.L., JANIK, J., SEBRING, E.D. AND ROSE, J.A.** 1981 Herpes Simplex Virus types 1 and 2 completely help Adenovirus-associated virus replication. *J. Virol.* **40**, 241-247
- BURNSIDE, J., DARLING, D.S. AND CHIN, W.W.** 1990 A nuclear factor that enhances binding of thyroid hormone receptors to thyroid hormone response elements. *J. Biol. Chem.* **265**, 2500-2504.
- CAILLET-FAUQUET, P., PERROS, M., BRANDENBURGER, A., SPEGELAERE, P. AND ROMMELAERE, J.** 1990 Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding the non-structural proteins. *EMBO. J.* **9**, 2989-2995
- CARNAC, G., ALBAGLI-CURIEL, O., VANDROMME, M., PINSET, C., MONTARRAS, D., LAUDET, V. AND BONIEU, A.** 1992 3,5,3'-Triiodothyronine positively regulates both MyoD1 gene transcription and terminal differentiation in C2 myoblasts. *Mol. Endo.* **6**, 1185-1194.
- CATER, J.E. AND PINTEL, D.J.** 1992 The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus Minute Virus of Mice is required for virus growth in murine cells. *J. Gen. Virol.* **73**, 1839-1843
- CHANG, L.S., SHI, Y. AND SHENK, T.** 1989 Adeno-associated virus P5 promoter contains an Adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. *J. Virol.* **63**, 3479-3488
- CHEJANOVSKY, N. AND CARTER, B.J.** 1989 Mutagenesis of an AUG codon in the Adeno-associated virus rep gene : effects on viral DNA replication. *Virology* **173**, 120-128
- CHEN, Y.Q., DE FORESTA, F., HERTOOGHS, J., AVALOSSE, B.L., CORNELIS, J.J. AND ROMMELAERE, J.** 1986 Selective killing of simian virus 40-transformed human 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.

CHIN, W.W. 1991 Nuclear thyroid hormone receptors. In *Nuclear Hormone Receptors*. Ed. Parker, M.G. Academic Press : 79-96.

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

CORDINGLEY, M.G., RIEGEL, A.T. AND HAGER, G.L. 1987 Steroid-dependent interaction of transcription factors with the inducible promoter of Mouse Mammary Tumor Virus *in vivo*. *Cell* **48**, 261-270.

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., TAL, J. 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 parvoviruses H-1 and Minute Virus of Mice correlates with viral transcription. *J. Virol.* **64**, 2537-2544

COTMORE, S.F. AND TATTERSALL, P.J. 1986 The NS-1 polypeptide of the autonomous parvovirus MVM is a nuclear phosphoprotein. *Virus Res.* **4**, 243-250

COTMORE, S.F. AND TATTERSALL, P.J. 1987 The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* **33**, 91-174

COTMORE, S.F. AND TATTERSALL, P.J. 1988 The NS1 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

COTMORE, S.F. AND TATTERSALL, P.J. 1989 A genome-linked copy of the NS1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J. Virol.* **63**, 3901-3911

COTMORE, S.F. AND TATTERSALL, P.J. 1990 Alternate splicing in a parvoviral non structural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turn-over characteristics. *Virology* **177**, 477-487

COTMORE, S.F. AND TATTERSALL, P.J. 1992 In vitro resolution of circular plasmids containing concatemer junction fragments from Minute Virus of Mice DNA and their subsequent replication as linear molecules. *J. Virol.* **66**, 420-431

CRAWFORD, L.V. 1966 A Minute Virus of Mice., *Virology* **29**, 605-612

DALLDORF, G. 1960 Viruses and human cancers. *Bull. N.Y. Acad. Med.* **36**, 795-803

DAMM, K., BEUG, H., GRAF, T. AND VENNSTROM, B. 1987. A single point mutation in *erbA* restores the erythroid transforming potential of a mutant avian erythroblastosis virus (AEV) defective in both *erbA* and *erbB* oncogenes. *EMBO J.* **6**, 375-382.

DANIELSEN, M. 1991 Structure and function of the glucocorticoid receptor. In *Nuclear Hormone Receptors*. Ed.Parker,M.G. Academic Press : 39-68.

DANIELSEN, M., HINCK, L. AND G.M. 1989. Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor. *Cell* **57**, 1131-1138.

DAYTON, A.I., SELDEN, J.R., LAWS, G., DORNEY, D.J., FINAN, J., TRIPPUTI, P., EMANUEL, B.S., ROVERA, G., NOWEL, P.C. AND CROCE, C.M. 1984. A human *c-erbA* oncogene homologue is closely proximal to the chromosome 17 breakpoint in acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4495-4499.

DE LA MAZA, L. AND CARTER, B.J. 1981 Inhibition of Adenovirus oncogenicity in hamsters by Adeno-associated virus DNA. *J Natl Cancer Inst* **67**, 1323-1326.

DESBOIS, C., PAIN, B., GUILHOT, C., BENCHAIIBI, M., FRENCH, M., GHYSDAEL, J., MADJAR, J.J. AND SAMARUT, J. 1991a. *v-erbA* oncogene abrogates growth inhibition of chicken embryo fibroblasts induced by retinoic acid. *Oncogene* **6**, 2129-2135.

DESBOIS, C., AUBERT, D., LEGRAND, C., PAIN, B. AND SAMARUT, J. 1991b A novel mechanism of action for *v-erbA* : abrogation of the inactivation of transcription factor AP-1 by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Cell* **67**, 731-740.

DE THE, H., VIVANCO-RUIZ, M.M., TIOLLAIS, P., STUNNENBERG, H. AND DEJEAN, A. 1990 Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor β gene. *Nature* **343**, 177-180.

DE VERNEUIL, H. AND METZGER, D. 1990 The lack of transcriptional activation of the *v-erbA* oncogene is in part due to a mutation present in the DNA binding domain of the protein. *Nuc. Acids. Res.* **18**, 4489-4497.

DIFFOOT, N., SHULL, B.C., CHEN, K.C., STOUT, E.R., LEDERMAN, M. AND BATES, R.C. 1989 Identical ends are not required for the equal encapsidation of plus- and minus-strand parvovirus Lu III DNA. *J. Virol.* **63**, 3180-3184

DOERIG, C., HIRT, B., ANTONIETTI, J.P. AND BEARD, P. 1990 Nonstructural protein of parvoviruses B19 and Minute Virus of Mice controls transcription. *J. Virol.* **64**, 387-396

DOERIG, C., HIRT, B., BEARD, P. AND ANTONIETTI, J.P. 1990 Minute Virus of Mice non-structural protein NS-1 is necessary and sufficient for transactivation of the viral P39 promoter. *J. Gen. Virol.* **69**, 2563-2573

DRABKIN, H., KAO, F.T., HARTZ, J., HART, I., GAZDAR, A., WEINBERGER, C., EVANS, R. AND GERBER, M. 1988. Localization of human *erbA-2* to the 3p22--->3p24.1 region of chromosome 3 and variable deletion in small cell lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 9258-9262.

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.

EL DADAH, A.N., 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

ESCHYLE 458 av. J.-C. Orestie

FAISST, S. AND MEYER, S. 1992 Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3-26

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., BRUDZYNSKA, K. AND MORGAN, J. 1989 Characterization of novel populations of MVM virions containing covalent DNA-protein complexes. *Virology* **168**, 128-137

FAWELL, S.E., LEES, J.A., WHITE, J. AND PARKER, M.G. 1990 Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* **60**, 953-962.

FEARON, E., PARDOLL, D.M., ITAYA, T., GOLUMBEK, P., LEVITSKY, H.I., SIMONS, J.W., KARASUYAMA, H., VOGELSTEIN, B. AND FORST, P. 1990 Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* **60**, 397-403

FORMAN, B.M. AND SAMUELS, H.H. 1990a Dimerization among nuclear hormone receptors. *The New Biol.* **2**, 587-594.

FORMAN, B.M. AND SAMUELS, H.H. 1990b Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors : the regulatory zipper model. *Mol. Endo.* **4**, 1293-1301.

FORMAN, B.M., YANG, C.R., STANLEY, F., CASANOVA, J. AND SAMUELS, H.H. 1988 *c-erbA* proto-oncogenes mediate thyroid hormone-dependent and independent regulation of the rat growth hormone and prolactin genes. *Mol. Endo.* **2**, 902-911.

FORMAN, B.M., YANG, C.R., CASANOVA, J., GHYSDAEL, J. AND SAMUELS, H.H. 1989 A domain containing leucine-zipper-like motifs mediates novel *in vivo* interactions between the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Mol. Endo.* **3**, 1610-1626.

FREEDMAN, L.P., LUISI, B.F., KORSZUN, Z.R., BASAVAPPA, R., SIGLER, P.B. AND YAMAMOTO, J.R. 1988. The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* **334**, 543-546.

FRYKBERG, L., PALMIERI, S., BEUG, H., GRAF T., HAYMAN, M.J. AND VENNSTRÖM, B. 1983. Transforming capacities of avian erythroblastosis virus mutants deleted in the *erbA* or *erbB* oncogenes. *Cell* **32**, 227-238.

FUERSTENBERG, S., LEITNER, I., SCHROEDER, C., SCHWARTZ, H., VENNSTRÖM, B. AND BEUG, H. 1992 Transcriptional repression of band 3 and CAII in *v-erbA* transformed erythroblasts accounts for an important part of the leukemic phenotype. *EMBO J.* **11**, 3355-3365

GANDRILLON, O., JURDIC, P., BENCHAIIBI, M, XIAO, J.-H., GHYSDAEL, J. AND SAMARUT, J. 1987. Expression of the *v-erbA* oncogene in chicken embryo fibroblasts stimulates their proliferation *in vitro* and enhances tumor growth *in vivo*.. *Cell* **49**, 687-697.

GARDINER, E.M. AND TATTERSALL, P. 1988a Evidence that the developmentally regulated control gene expression by a parvoviral allotropic determinant is particle mediated. *J. Virol.* **62**, 1713-1722

GARDINER, E.M. AND TATTERSALL, P. 1988b Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus Minute Virus of Mice. *J. Virol.* **62**, 2605-2613

GAVIN, B.J. AND WARD, D.C. 1990 Positive and negative regulation of the Minute Virus of Mice P38 promoter. *J. Virol.* **64**, 2057-2063

GIGUERE, V., HOLLENBERG, S.M., ROSENFELD, M.G. AND EVANS, R.M. 1986. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* **46**, 645-652.

GLASS, C.K., FRANCO, R., WEINBERGER, C., ALBERT, V.R., EVANS, R.M. AND ROSENFELD, M.G. 1987 A *c-erbA* binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone. *Nature* **329**, 738-741.

GLASS, C.K., HOLLOWAY, J.M., DEVARY, O.V. AND ROSENFELD, M.G. 1988 The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell* **54**, 313-323.

GLASS, C.K., LIPKIN, S.M., DEVARY, O.V. AND ROSENFELD, M.G. 1989 Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer. *Cell* **59**, 697-708.

GODOWSKI, P.J., PICARD, D. AND YAMAMOTO, K.R. 1988. Signal transduction and transcriptional regulation by glucocorticoid receptor-LexA fusion proteins. *Science* **214**, 812-816.

GREEN, S. and CHAMBON, P. 1988 Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *TIG* **4**, 309-314.

GREEN, S. AND CHAMBON, P. 1991. The estrogen receptor : from perception to mechanism. In *Nuclear Hormone Receptors*. Ed. Parker, M.G. Academic Press : 15-33.

GREEN, S., KUMAR, V., THEULAZ, I., WAHLI, W. AND CHAMBON, P. 1988. The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the estrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J.* **7**, 3037-3044.

GU, M.-L. AND RHODE, S.L. 1992 *Trans*-activation of H-1 parvovirus P38 promoter is correlated with increased binding of cellular protein(s) to the *trans*-activation responsive element (tar). *Virology* **190**, 116-123

GU, M.-L., CHEN, F.-X. AND RHODE, S.L. 1992 Parvovirus H-1 P38 promoter requires the *trans*-activation region (tar), an SP1 site, and a TATA box for full activity. *Virology* **187**, 10-17

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.

GUETTA, E., MINCBERG, M., MOUSSET, S., BERTINCHAMPS, C., ROMMELAERE, J. AND TAL, J. 1990 Selective killing of transformed rat cells by Minute Virus of Mice does not require infectious virus production. *J Virol* **64**, 458-462.

HAZEL, T.G., NATHANS, D. AND LAU, L.F. 1988 A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8444-8448.

HEILBRONN, R., SCHLEHOFER, J.R. AND ZUR HAUSEN, H. 1984 Selective killing of carcinogen-treated SV40-transformed Chinese hamster cells by a defective parvovirus. *Virology* **136**, 439-441.

HEILBRONN, R., BURKLE, A., STEPHAN, S. AND ZUR HAUSEN, H. 1990 The Adeno-associated virus *rep* gene suppresses herpes simplex virus-induced DNA amplification. *J Virol* **64**, 3012-3018.

HERMANN, T., HOFFMAN, B., PIEDRAFITA, F.J., ZHANG, X.-K. AND PFAHL, M. 1993 v-erbA requires auxiliary proteins for dominant negative activity. *Oncogene* **8**, 55-65

HERMONAT, P.L. 1989 The Adeno-associated virus *Rep78* gene inhibits cellular transformation induced by bovine papillomavirus. *Virology* **172**, 253-261.

HERMONAT, P.L., LABOW, M.A., WRIGHT, R., BERNS, K.I. AND MUZYCZKA, N. 1984 Genetics of Adeno-associated virus : isolation and preliminary characterization of Adeno-associated virus type 2 mutants. *J. Virol.* **51**, 329-339

HEYMAN, R.A., MANGELSDORF, D.J., DYCK, J.A., STEIN, R.B., EICHELE, G., EVANS, R.M. AND THALLER, C. 1992. 9-Cis Retinoic Acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* **68**,397-406.

HODIN, R.A., LAZAR, M.A. WINTMAN, B.I., DARLING, D.S., KOENIG, R.J., LARSEN, P.R., MOORE, D.D. AND CHIN, W.W. 1989 Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* **244**, 76-79

HODIN, R.A., LAZAR, M.A. AND CHIN, W.W. 1990 Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat *c-erbA* messenger RNA species by thyroid hormone. *J. Clin Invest.* **85**, 101-105.

HONG, G., WARD, P. AND BERNS, K.I. 1992 In vitro replication of Adeno-associated virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4673-4677

HUNTER, T. AND KARIN, M. 1992 The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**, 375-387

IM, D.S. AND MUZYCZKA, N. 1989 Factors that bind to Adeno-associated virus terminal repeats. *J. Virol.* **63**, 3095-3104

IM, D.S. AND MUZYCZKA, N. 1990 The AAV origin-binding proteins Rep68 is an ATP-dependent site specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* **61**, 447-457

IVERSEN, P. AND RHODE, S.L. 1990 Parvovirus proteins. in : Tijssen, P., ed. *Handbook of parvoviruses*. Boca Raton : CRC Press, vol. I, 81-90.

IZUMO, S AND MAHDAVI, V. 1988. Thyroid hormone receptor α isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature* **334**, 539-543.

JACKSON, S.P. 1992 Regulating transcription factor activity by phosphorylation. *TIBS* **2**, 104-108.

JACKSON, S.P., MACDONALD, J.J., LEES-MILLER, S. AND TJIAN, R. 1990 GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* **63**, 155-165

JANSSON, M., PHILIPSON, L. AND VENNSTROM, B. 1983. Isolation and characterization of multiple human genes homologous to the oncogenes of avian erythroblastosis virus. *EMBO J.* **2**, 561-565.

JOHNSON, F.B. 1983 Parvovirus proteins, p. 239-268. in K.I. Berns ed., *The Parvoviruses*. Plenum Publishing Corp., New York.

JONAT, C., RAHMSDORF, H.J., PARK, K.K., CATO, A.C.B, GEBEL, S., PONTA, H. AND HERRLICH, P. 1990 Antitumor promotion and antiinflammation : down-modulation of AP-1 (*fos/jun*) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**, 1189-1204.

JONES, N. 1990 Transcriptional regulation by dimerization : two sides to an incestuous relationship. *Cell* **61**, 9-11

JONGENEEL, C.V., SAHLI, R., McMASTER, 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

KAHN, P., FRYKBERG, L., BRADY, L., STANLEY, I., BEUG, H., VENNSTRÖM, B. AND GRAF, Y. 1986. *v-erbA* cooperates with sarcoma oncogenes in leukemic cell transformation. *Cell* **45**, 349-356.

KARIN, M. AND SMEAL, T. 1992 Control of transcription factors by signal transduction pathways : the beginning of the end. *TIBS* **17**, 418-422

KASSAVETIS, G.A., JOAZEIRO, C.A.P., PISANO, M., GEIDUSCHEK, E.P., COLBERT, T., HAHN, S. AND BLANCO, J.A. 1992 The role of the TATA-binding protein in the assembly and function of the multisubunit Yeast RNA Polymerase III Transcription Factor, TFIIB. *Cell* **71**, 1055-1064

KATZ, E. AND CARTER, B.J. 1986 Effect of Adeno-associated virus on transformation of NIH 3T3 cells by ras gene and on tumorigenicity of an NIH 3T3 transformed cell line. *Cancer Res.* **46**, 3023-3026.

KATZ, D., BERRODIN, T.J. AND LAZAR, M.A. 1992 The unique C-termini of the thyroid hormone receptor variant, *c-erbA α 2*, and thyroid hormone receptor α 1 mediate different DNA-binding and heterodimerization properties. *Mol. Endo.* **6**, 805-814

KAWASE, S. 1987 Organization and nucleotide sequence of a densovirus genome imply a host-dependent evolution of the parvoviruses. *J. Virol.* **61**, 553-560

KELLER, J.M. AND ALWINE, J.C. 1984 Activation of the SV40 late promoter : direct effects of T antigene in the absence of viral DNA replication. *Cell* **36**, 381-389

KHAZAIE, K., DULL, T.J., GRAF, T., SCHLESSINGER, J., ULLRICH, A., BEUG, H. AND VENNSTRÖM, B. 1988. Truncation of the human EGF receptor leads to differential transforming potentials in primary avian fibroblasts and erythroblasts. *EMBO J.* **7**, 3061-3171.

KILHAM, L. AND OLIVIER, L.J. 1959 A latent virus of rats isolated in tissue culture *Virology* **7**, 428-437

KIM, H.S., CRONE, D.E., SPRUNG, C.N., TILLMAN, J.B., FORCE, W.R., CREW, M.D., MOTE, P.L. AND SPINDLER, S.R. 1992 Positive and negative thyroid hormone response elements are composed of strong and weak half-sites 10 nucleotides in length. *Mol. Endo.* **6**, 1486-1501

KIRSCH, I.R., BERTNESS, V., SILVER, J. AND HOLLIS, G.F. 1986 Regulated expression of the *c-myb* and *c-myc* oncogenes during erythroid differentiation. *J. Biol. Chem.* **32**, 11-21

KLEIN-BAUERNSCHMITT, P., BOTQUIN, V. AND SCHLEHOFER, J.R. 1991 Induction of differentiation by Adeno-associated virus. 4th Parvovirus workshop. Elsinore, DK, p 38

KLEIN-BAUERNSCHMITT, P., ZUR HAUSEN, H. AND SCHLEHOFER, J.R. 1992 Induction of differentiation-associated changes in established human cells by infection with Adeno-associated virus type-2. *J. Virol* **66**, 4191-4200.

KLIEWER, S.A., UMESONO, K., NOONAN, D.J., HEYMAN, R.A. AND EVANS, R.M. 1992 Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**, 771-774

KLUG, A. AND RHODES, D. 1987. "Zinc fingers" : a novel protein motif for nucleic acid recognition. *TIBS* **12**, 464-469.

KOELLE, M.R., SEGRAVES, W.A. AND HOGNESS, D.S. 1992 DHR3 : a *Drosophila* steroid receptor homolog. *Proc. Natl. Acad. USA* **89**, 6167-6171

KOENIG, R.J., BRENT, G.A., WARNE, R.L., LARSEN, P.R. AND MOORE, D.D. 1987 Thyroid hormone receptor binds to a site in the rat growth hormone promoter required for induction by thyroid hormone. *Proc.Natl.Acad.Sci..USA* **84**, 5670-5674.

KOENIG, R.J., LAZAR, M.A., HODIN, R.A., BRENT, G.A., LARSEN, P.R., CHIN, W.W. AND MOORE, D.D. 1989 Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding *c-erbA* protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature* **337**, 659-661.

KOLLECK, R., TSENG, B.Y. AND GOULIAN, M. 1982 DNA polymerase requirements for parvovirus H-1 DNA replication in vitro. *J. Virol.* **41**, 982-989

KOTIN, R.M., SINISCALCO, M., SAMULSKI, R.J., ZHU, X., HUNTER, L., LAUGHLIN, C.A., McLAUGHLIN, S., MUZYCZKA, N., ROCCHI, M. AND BERNIS, K.I. 1990 Site-specific integration by Adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2211-2215

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 virus of mice. *J. Virol.* **64**, 354-360.

KRUST, A., GREEN, S., ARGOS, P., KUMAR, V., WALTER, P., BORNERT, J.M. AND CHAMBON, P. 1986. The chicken estrogen receptor sequence : homology with *v-erbA* and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* **5** : 891-897.

KUMAR, V. AND CHAMBON, P. 1988. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* **55** : 145-156.

KUMAR, V., GREEN, S., STACK, G., BERRY, M., JIN, J.R. AND CHAMBON, P. 1987. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* **51** : 941-951.

KUMAR, V., GREEN, S., STAUB, A. AND CHAMBON, P. 1986. Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human estrogen receptor. *The EMBO J.* **5** : 2231-2236.

- KUTOH, E., STRÖMSTEDT, P.-E. AND POELLINGER, L.** 1992 Functional interference between the ubiquitous and constitutive Octamer Transcription Factor 1 (OTF 1) and the Glucocorticoid Receptor by direct protein-protein interaction involving the homeo subdomain of OTF 1. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 4960-4969
- LABOW, M.A., GRAF, L.J. AND BERNIS, K.I.** 1987b Adeno-associated virus gene expression inhibits cellular transformation by heterologous genes. *Mol Cell Biol.* **7**, 1320-1325.
- LABOW, M.A., HERMONAT, P.L. AND BERNIS, K.I.** 1986 Positive and negative autoregulation of the Adeno-associated virus type 2 genome. *J. Virol.* **60**, 251-258
- LAUDET, V., BEGUE, A. HENRY-DUTHOIT, C., JOUBEL, A., MARTIN, P., STEHELIN, D. AND SAULE, S.** 1991 Genomic organization of the human thyroid hormone receptor α (*c-erbA-1*) gene. *Nuc. Acids Res.* **19**, 1105-1112
- LAUDET, V., HÄNNI, C., COLL, J., CATZEFLIS, F. AND STEHELIN, D.** 1992 Evolution of the nuclear receptor superfamily. *EMBO J.* **11**, 1003-1013
- LAUDET, V. AND STEHELIN, D.** 1992 Flexible friends. *Current Biology* **2**, 293-295
- LAZAR, M.A. AND CHIN, W.W.** 1988 Regulation of two *c-erbA* messenger ribonucleic acids in rat GH3 cells by thyroid hormone. *Mol. Endo.* **2** : 479-484.
- LAZAR, M.A., HODIN, R.A., DARLING, D.S. AND CHIN, W.W.** 1989 A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat *c-erbA α* transcriptional unit. *Mol. Cell. Biol.* **9** : 1128-1136.
- LAZAR, M.A., HODIN, R.A., CARDONA, G. AND CHIN, W.W.** 1990 Gene expression from the *c-erbA α /Rev-erbA α* genomic locus. *J. Biol. Chem.* **265**, 12859-12863
- LEBKOWSKI, J.S., MCNALLY, M.M., OKARMA, T.B. AND LERCH, L.B.** 1988 Adeno-associated virus : a vector system for efficient introduction and integration of DNA into a variety of mammalian cell types. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3988-3996
- LEES, J. A., FAWELL, S.E. AND PARKER, MG.** 1989 Identification of two transactivation domains in the mouse estrogen receptor. *Nuc. Acids. Res.* **17** : 5477-5488.

LEGENDRE, D. AND ROMMELAERE, J. 1992 Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus Minute Virus of Mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition. *J. Virol.* **66**, 5705-5713

LEID, M., KASTNER, P., LYONS, R., NAKSHATRI, H., SAUNDERS, M., ZACHAREWSKI, T., CHEN, J.-Y., STAUB, A., GARNIER, J.-M., MADER, S. AND CHAMBON, P. 1992 Purification, cloning and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* **68**, 377-395

LEVIN, A.A., STURZENBECKER, L.J., KAZMER, S., BOSAKOWSKI, T., HUSELTON, C., ALLENBY, G., SPECK, J., KRATZEISEN, C., ROSENBERGER, M., LOVEY, A. AND GRIPPO, J.F. 1992. 9-Cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR α . *Nature* **355** : 359-361.

LI, X. AND RHODE, S.L. III 1990 Mutation of Lysine 405 to Serine in the parvovirus H-1 NS1 abolishes its functions for viral DNA replication, late promoter trans activation and cytotoxicity. *J. Virol.* **64**, 4654-4660

LIU, J.M., GREEN, S.W., SHIMADA, T. AND YOUNG, N.S. 1992 A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus. *J. Virol.* **66**, 4686-4692

LOBO, S.M., TANAKA, M., SULLIVAN, M.L. AND HERNANDEZ, N. 1992 A TBP complex essential for transcription from TATA-less but not TATA-containing RNA Polymerase III promoters is part of the TFIIB fraction. *Cell* **71**, 1029-1040

LUM, G.S. ET SCHREINER, A.W. 1963 Study of a virus isolated from a chloroleukemic Wistar rat *Cancer Res.* **23** 1742-1747

LUSBY, E.W. AND BERNS, K.I. 1982 Mapping of the 5' termini of two Adeno-associated virus 2 RNAs in the left half of the genome. *J. Virol.* **41** 518-526

MAC LEOD, K., LEPRINCE, D. AND STEHELIN, D. 1992 The *ets* gene family. *TIBS* **17**, 251-256

MADER, S., KUMAR, V., DE VERNEUIL, H. AND CHAMBON, P. 1989 Three amino acids of estrogen receptor are essential to its ability to distinguish an estrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature* **338** : 271-274.

MANGELSDORF, D.J., UMESONO, K., KLIEWER, S.A., BORGMEYER, U., ONG, E.S. AND EVANS, R.M. 1991 A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* **66** : 555-561.

MANGELSDORF, D.J., BORGMEYER, U., HEYMAN, R.A., YANG ZHOU, J., ONG, E.S., ORO, A.E., KAKIZUKA, A. AND EVANS, R.M. 1992 Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-*cis* retinoic acid. *Genes & Dev.* **6**, 329-344.

MARTINEZ, E. AND WAHLI, W. 1991 Characterization of hormone response elements. In *Nuclear Hormone Receptors*. Ed. Parker, M.G. Academic Press : 125-146.

MATSUNAGA, Y., MATSUNO, S. AND MUKOYAMA, J. 1977 Isolation and characterization of a parvovirus of rabbits *Infect. Immunity* **18**, 495-500

McCARTY, D.M., CHRISTENSEN, M. AND MUZYCZKA, N. 1991 Sequences required for coordinate induction of Adeno-Associated Virus p19 and p40 promoters by Rep protein. *J. Virol.* **65**, 2936-2945

MILLER, J., MCLACHLAN, A.D. AND KLUG, A. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **4** : 1609-1614.

MITSUHASHI, T. AND NIKODEM, V.M. 1989 Regulation of expression of the alternative mRNAs of the rat α -thyroid hormone receptor gene. *J. Biol. Chem.* **264** : 8900-8904.

MIYAJIMA, M., HORIUCHI, R., SHIBUYA, Y., FUKUSHIGE, S.I., MATSUBARA, K.I., TOYOSHIMA, K. AND YAMAMOTO, T. 1989 Two *c-erbA* homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell* **57**, 31-39

MORGAN, W. R. AND WARD, D.C. 1986 Three splicing patterns are used to excise the small intron common to all Minute Virus of Mice RNAs. *J. Virol.* **60**, 1170-1174

MORINET, F. ET TCHERNIA, G. 1991 Le parvovirus B19 et l'hématopoïèse. *M/S* **7**, 127-137

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.* **9**, 107-117.

MOUSSET, S., CORNELIS, J., SPRUYT, N. AND ROMMELAERE, J. 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.

MULVIHILL, E.R., LEPENNEC, J.P. AND CHAMBON, P. 1982 Chicken oviduct progesterone receptor : location of specific regions of high-affinity binding in cloned DNA fragments of hormone-responsive genes. *Cell* **24** : 621-632.

MUNOZ, A., ZENKE, M., GEHRING, U., SAP, J., BEUG, H. AND VENNSTRÖM, B. 1988 Characterization of the hormone-binding domain of the chicken *c-erbA*/thyroid hormone receptor protein. *EMBO J.* **7** : 155-159.

NÄÄR, A.M., BOUTIN, J.M., LIPKIN, S.M., YU, VC., HOLLOWAY, J.M., GLASS, C.K. AND ROSENFELD, M.G. 1991 The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* **65** : 1267-1279.

NAEGER, L.K., CATER, J. AND PINTEL, D.J. 1990 The small nonstructural protein (NS2) of the parvovirus Minute Virus of Mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type specific manner. *J. Virol.* **64**, 6166-6175

NAGAKI, M. AND KAWASE, S. 1980 DNA of a new parvo-like virus isolated from the silkworm, *Bombix mori*. *J. Invertebr. Pathol.* **35**, 124-133

NERLOV, C., DE CESARE, D., PERGOLA, F., CARACCILO, A., BLASI, F., JOHNSEN, M. AND VERDE, P. 1992 A regulatory element that mediates cooperation between a PEA3-AP-1 element and an AP-1 site is required for phorbol ester induction of urokinase enhancer activity in HepG2 hepatoma cells. *EMBO J.* **11**, 4573-4582

NEVINS, J.R. 1981 Mechanisms of activation of early viral transcription by the adenovirus E1a gene product. *Cell* **26**, 213-220

O'DONNELL, A.L. AND KOENIG, R.J. 1990 Mutational analysis identifies a new functional domain of the thyroid hormone receptor. *Mol. Endo.* **4** : 715-720.

O'DONNELL, A.L., ROSEN, E.D., DARLING, D.S. AND KOENIG, R.J. 1991 Thyroid hormone receptor mutations that interfere with transcriptional activation also interfere with receptor interaction with a nuclear protein. *Mol. Endo.* **5** : 94-99.

ORCHARD, K., LANG, G., COLLINS, M. AND LATCHMAN, D. 1992 Characterization of a novel T lymphocyte protein which binds to a site related to steroid/thyroid hormone receptor response elements in the negative regulatory sequence of the Human Immunodeficiency Virus long terminal repeat. *Nuc. Acids Res.* **20**, 5429-5434

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.

OWENS, R.A. AND CARTER, B.J. 1992 In vitro resolution of Adeno-associated virus DNA hairpin termini by wild-type rep protein is inhibited by a dominant-negative mutant of rep. *J. Virol.* **66**, 1236-1240

OWENS, R.A., TREMPE, J.P., CHEJANOVSKY, N. AND CARTER, B.J. 1991 Adeno-associated virus rep proteins produced in insect and mammalian expression systems : wild-type and dominant negative mutant proteins bind to the viral replication origin. *Virology* **184**, 14-22

OZAWA, K., AYUB, J., HAO, Y.S., KURTZMAN, G., SHIMADA, T. AND YOUNG, N. 1987 Novel transcription map of the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J. Virol.* **61**, 2395-2406

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

PARADISO, P.R. 1984 Identification of multiple forms of the noncapsid parvovirus protein NCVP1 in H1 parvovirus-infected cells. *J. Virol.* **52**, 82-87

PEDRAZZOLI, P., BAINS, M.A., WATSON, R., FISHER, J., HOY, T.G. AND JACOBS, A. 1989 *c-myc* and *c-myb* oncoproteins during induced maturation of myeloid and erythroid human leukemic cell line. *Cancer Res.* **49**, 6911-6916

PICARD, D. AND YAMAMOTO, K.R. 1987. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *The EMBO J.* **6** : 3333-3340.

PICARD, D., KHURSHEED, B., GARABEDIAN, M.J., FORTIN, M.G., LINDQUIST, S. AND YAMAMOTO, K.R. 1990 Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action *in vivo*. *Nature* **348** : 166-168.

PINA, B., BRUGGEMEIER, U. AND BEATO, M. 1990 Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the Mouse Mammary Tumor Virus promoter. *Cell* **60** : 719-731.

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 Acids Res.* **11**, 1019-1038

PITLUK, Z.W. AND WARD, D.C. 1991 Unusual Sp1-GC box interaction in a parvovirus promoter. *J. Virol.* **65**, 6661-6670

PONGLIKITMONGKOL, M., GREEN, S. AND CHAMBON, P. 1988 Genomic organization of the human estrogen receptor gene. *EMBO J.* **7** : 3385-3388.

POST, L., MACKEM, S. AND ROIZMAN, B. 1981 Regulation of alpha genes of Herpes Simplex Virus : expression of chimeric genes produced by fusion of thymidine kinase with alpha gene promoters. *Cell* **24**, 555-566

PRESTON, C.M. 1979 Control of Herpes Simplex Virus type 1 mRNA synthesis in cells infected with wild-type virus or the temperature-sensitive mutant *tsK*. *J. Virol.* **29**, 275-284

PRIVALSKY, M.L., BOUCHER, P., KONING, A. AND JUDELSON, C. 1988 Genetic dissection of functional domains within the avian erythroblastosis virus *v-erbA* oncogene. *Mol. Cell. Biol.* **8** : 4510-4517.

PRIVALSKY, M.L. 1991 A subpopulation of the *v-erbA* oncogene protein, a derivative of thyroid hormone receptor, associates with heat shock protein 90. *J. Biol. Chem.* **266** : 1456-1462.

PTASHNE, M. 1988 How eukaryotic transcriptional activator work. *Nature* **335**, 683-689

PUGH, F.B. AND TJIAN, R. 1990 Mechanism of transcriptional activation by Sp1 : evidence for coactivators. *Cell* **61**, 1187-1197

REED, S.I., STARK, G.R. AND ALWINE, J.C. 1976 Autoregulation of simian virus 40 gene A by T antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3083-3087

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.L. III 1985 *trans*-activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *J. Virol.* **55**, 886-889

RHODE, S.L. III 1987 Construction of a genetic switch for inducible *trans*-activation of gene expression in eukaryotic cells. *J. Virol.* **61**, 1448-1456

RHODE, S.L. III AND RICHARD, S.M. 1987 Characterization of the *trans*-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J. Virol.* **61**, 2807-2815

RHODE, S.L. III 1989 Both excision and replication of cloned autonomous parvovirus DNA require the NS1 (rep) protein. *J. Virol.* **63**, 4249-4256

RHODE, S. L. III AND PARADISO, P.R. 1989 Parvovirus replication in normal and transformed human cells correlates with the nuclear translocation of the early protein NS1. *J. Virol.* **63**, 349-355

ROMMELAERE, J. 1990 Action anticancéreuse des Parvovirus. *M/S* **6**, 534-543

ROMMELAERE, J. AND TATTERSALL, P. 1990 Oncosuppression by parvoviruses. in : Tijssen, P., ed. Handbook of parvoviruses. Boca Raton : CRC Press, vol. II, 41-57.

ROMMELAERE, J. AND CORNELIS, J.J. 1991 Antineoplastic activity of parvoviruses. *J. Virol. Methods* **33**, 233-251

ROUSSEL, M., SAULE, S., LAGROU, C., ROMMENS, C., BEUG, H., T.GRAF AND STEHELIN, D. 1979. Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature* **281** : 452-455.

RUSSELL, S.J., BRANDENBURGER, A., FLEMMING, C.L., COLLINS, M.K.L. AND ROMMELAERE, J. 1992 Transformationdependent expression of Interleukin genes delivered by a recombinant parvovirus. *J. Virol.* **66**, 2821-2828

SAKURAI, A., NAKAI, A. AND DE GROOT, L.J. 1989 Expression of three forms of thyroid hormone receptor in human tissues. *Mol. Endo.* **3** : 392-399.

SALOME, N., VAN HILLE, B., GEUSKENS, M. AND ROMMELAERE, J. 1989 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. *J Virol* **63**, 4797-807.

SALOME, N., VAN HILLE, B., DUPONCHEL, N., MENEGUZZI, G., CUZIN, F., ROMMELAERE, J. AND CORNELIS, J.J. 1990 Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMP is restricted to specific oncogenes. *Oncogene* **5**, 123-30.

SAMULSKI, R.J., ZHU, X., XIAO, X., BROOK, J.D., HOUSMAN, D.E., EPSTEIN, N. AND HUNTER, L.A. 1991 Targeted integration of Adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* **10**, 3941-3950

SANCHEZ, E.R., TOFT, D.O., SCHLESINGER, M.J. AND PRATT, W.B. 1985 Evidence that the 90 kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein. *J.Biol. Chem.* **260** : 12398-12401.

SANDE, S., SHARIF, M., CHEN, H. AND PRIVALSKY, M. 1993 *v-erbA* acts on retinoic acid receptors in immature avian erythroid cells. *J. Virol.* **67**, 1067-1074

SAP, J., MUNOZ, A., DAMM, K., GOLDBERG, Y., GHYSDAEL, J., LEUTZ, A., BEUG, H. AND VENNSTRÖM, B. 1986. The c-erbA protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* **324** : 635-640.

SAP, J., MUNOZ, A., SCHMITT, J., STUNNENBERG, H. AND VENNSTROM, B. 1989 Repression of transcription mediated at a thyroid hormone response element by the *v-erbA* oncogene product. *Nature* **340** : 242-244.

SAULE, S., ROUSSEL, M., LAGROU, C. AND STEHELIN, D.. 1981 Characterization of the oncogene (*erb*) of avian erythroblastosis virus and its cellular progenitor. *J.Virol.* **38** : 409-419.

SCHEIDEREIT, C., GEISSE, S., WESTPHAL, H.M. AND BEATO, M. 1983 The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of Mouse Mammary Tumour Virus. *Nature* **304** : 749-752.

SCHLEHOFER, J.R., HEILBRONN, R., GEORG, F.B. AND ZUR HAUSEN, H. 1983 Inhibition of initiator-induced SV40 gene amplification in SV40-transformed Chinese hamster cells by infection with a defective parvovirus. *Int J Cancer* **32**, 591-595.

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 helpervirus dependent parvovirus. *Virology* **152**, 110-117.

SCHMITT, J., SCHLEHOFER, J.R., MERGENER, K., GISSMANN, L. AND ZUR HAUSEN, H. 1989 Amplification of bovine papillomavirus DNA by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, ultraviolet irradiation, or infection with herpes simplex virus. *Virology* **172**, 73-81.

SCHOBORG, R.V. AND PINTEL, D.J. 1991 Accumulation of MVM gene products is differentially regulated by transcription initiation, RNA processing and protein stability. *Virology* **181**, 22-34.

SCHROEDER, C., GIBSON, L. AND BEUG, H. 1992a The *v-erbA* oncogene requires cooperation with tyrosine kinases to arrest erythroid differentiation induced by ligand-activated endogenous *c-erbA* and retinoic acid receptor. *Oncogene* **7**, 203-216

SCHROEDER, C., GIBSON, L. ZENKZ, M. AND BEUG, H. 1992b Modulation of normal erythroid differentiation by the endogenous thyroid hormone and retinoic acid receptors : a possible target for *v-erbA* oncogene action. *Oncogene* **7**, 217-227

SCHOLER, H.R., CIESIOLKO, T. AND GRUSS, P. 1991 A nexus between Oct-4 and E1a : implications for gene regulation in embryonic stem cells. *Cell* **66**, 291-304

SCHÜLE, R., UMESONO, K., MANGELSDORF, D.J., BOLADO, J., PIKE, J.W. AND EVANS, R.M. 1990 *Jun-Fos* and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell* **61** : 497-504.

SCHWABE, J.W.R. AND RHODES, D. 1991 Beyond zinc fingers : steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. *TIBS* **16** : 291-296.

SCHWABE, J.W.R., NEUHAUS, D. AND RHODES, D. 1990 Solution structure of the DNA-binding domain of the estrogen receptor. *Nature* **348** : 458-461.

SHAKNOVICH, R., SHUE, G. AND KOHTZ, D.S. 1992 Conformational activation of a basic Helix-loop-helix protein (MyoD1) by the C-terminal region of murine hsp90 (hsp84). *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5059-5068

SHARIF, M. AND PRIVALSKY, M.L. 1991 *v-erbA* oncogene function in neoplasia correlates with its ability to repress retinoic acid receptor action. *Cell* **66** : 885-893.

SIEGL, G. 1984 Biology and pathogenicity of autonomous parvoviruses in *The Parvoviruses* (K.I. Berns ed.) Plenum Press N.Y. 297-362

SIEGL, G., BATES, R.C., BERNS, K.I., CARTER, B.J., KELLY, D.C., KURSTAK, E. AND TATTERSALL, P. 1985 Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* **23**, 61-73

SKIADOPOULOS, M.H., SALVINO, R., LEONG, W.L. AND FAUST, E.A. 1992 Characterization of linker insertion and point mutations in the NS1 gene of Minute Virus of Mice : effects on DNA replication and transcriptional activation functions of NS1. *Virology* **188**, 122-134

SNYDER, R.D., SAMULSKI, R.J. AND MUZYCZKA, N. 1990 In vitro resolution of covalently joined AAV chromosome ends. *Cell* **60**, 105-113

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

SPEGELAERE, P., VAN HILLE, B., SPRUYT, N., FAISST, S., CORNELIS, J.J. AND ROMMELAERE, J. 1991 Initiation of transcription from Minute Virus of Mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a c-Ha-*ras* oncogene. *J. Virol.* **65**, 4919-4928

SPURR, N.K., SOLOMON, E., JANSSON, M., SHEER, D., GOODFELLOW, P.N., BODMER, W.F. AND VENNSTRÖM, B. 1984. Chromosomal localisation of the human homologous to the oncogenes *erbA* and B. *EMBO J.* **3** : 159-163.

SRIVASTAVA, A., LUSBY, E.W. AND BERNS, K.I. 1983 Nucleotide sequence and organization of the Adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* **45**, 555-564

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

SU, Z.Z., LUO, Z.Y., GUO, L.P., DUPONT, F., AVALOSSE, B. AND ROMMELAERE, J. 1988 Positive selection of human cells lacking several transformation parameters from an SV40-transformed culture by means of parvovirus H-1. *Carcinogenesis* **9**, 1395-400.

TAGGART, A.K.P., FISHER, T.S. AND PUGH, B.F. 1992 The TATA-binding protein and associated factors are components of Pol III Transcription Factor TFIIB. *Cell* **71**, 1015-1028

TEPPER, R.I., OATTENGALE, PK. AND LEDER, P. 1989 Murine interleukin-4 displays potent antitumor activity *in vivo*. *Cell* **57**, 503-512

THOMPSON, C.C. AND EVANS, R.M. 1989 Trans-activation by thyroid hormone receptors : functional parallels with steroid hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 3494-3498.

TIJSSEN, P., ARELLA, M. AND KAWASE, S. 1990 Molecular biology of Densovirus. in : Tijssen, ed. Handbook of Parvoviruses. Boca Raton : CRC Press, vol. I, 41-57

TOO, C.K.L. AND GUERNSEY, D.L. 1992 Increased messenger RNA levels of the antagonist thyroid hormone receptor *erbA- α 2* and decreased levels of *erbA- α 1* and *erbA- β 1* receptor messenger RNAs in neoplastic rodent cells. *Cancer Res.* **52**, 2186-2190

TOOLAN, H.W. 1963 Experimental production of mongoloid hamsters *Science* **131**, 1446-1448

TOOLAN, H.W., DALLDORF, G., BARCLAY, M., CHANDRA, S. AND MOORE, A.E. 1960 An unidentified filtrable agent isolated from transplantable tumors *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 1256-1259

TOOLAN, H.W., RHODE, S.L. 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.

TRATSCHIN, J.D., WEST, M.H.P., SANDBANK, T. AND CARTER, B.J. 1984 A human parvovirus, Adeno-associated virus, as a eukaryotic vector : transient expression and encapsidation of the procaryotic vector for chloramphenicol acetyl transferase. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2072-2081

TRATSCHIN, J.D., MILLER, I.L., SMITH, M.G. AND CARTER, B.J. 1985 Adeno-associated virus vector for high frequency integration, expression and rescue of genes in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3251-3260

TRATSCHIN, J.D., TAL, J. AND CARTER, B.J. 1986 Negative and positive regulation in *trans* of gene expression from Adeno-associated virus vectors in mammalian cells by a viral *rep* gene product. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2884-2894

TSAI, S.Y., CARLSTEDT-DUKE, J.A., WEIGEL N.L., DAHLMAN, K., GUSTAFSSON, J.A., TSAI, M.J. AND O'MALLEY, B.W. 1988. Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element : evidence for receptor dimer formation. *Cell* **55** : 361-369.

TSUKIYAMA, T., UEDA, H., HIROSE, S. AND NIWA, O. 1992 Embryonal long terminal repeat-binding protein is a murine homolog of FTZ-F1, a member of the steroid receptor superfamily. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1286-1291.

UMESONO, K., GIGUERE, V., GLASS, C.K., ROSENFELD, M.G. AND EVANS, R.M. 1988 Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature* **336** : 262-265.

UMESONO, K., MURAKAMI, K.K., THOMPSON, C.C. AND EVANS, R.M. 1991 Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* **65** : 1255-1266.

UMESONO, K. AND R.M. EVANS. 1989 Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* **57** : 1139-1146.

VAN HILLE, B., DUPONCHEL, N., SALOME, N., SPRUYT, N., COTMORE, S.F., TATTERSALL, P., CORNELIS, J.J. AND ROMMELAERE, J. 1989 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.

WALZ, C. AND SCHLEHOFER, J.R. 1992 Modification of some biological properties of HeLa cells containing Adeno-associated virus DNA integrated into chromosome-17. *J Virol.* **66**, 2990-3002.

WARD, D.C. AND TATTERSALL, P. (1982) Minute Virus of Mice in "The mouse in biomedical research" vol II Academic Press, inc.p 313-334

WEBSTER, N.J., GREEN, S., JIN, J.R. AND CHAMBON, P. 1988 The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* **54** : 1299-207.

WEINBERG, R.A. 1991 Tumor suppressor genes. *Science* **254**, 1138-1146

WEINBERGER, C., HOLLENBERG, S.M., ROSENFELD, M.G. AND EVANS, R.M. 1985. Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the *v-erbA* oncogene product. *Nature* **318** : 670-672.

WEINBERGER, C., THOMPSON, C.C., ONG E.S., LEBO, R., GRUOL, D.J. AND EVANS, R.M. 1986. The *c-erbA* gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* **324** : 641-646.

WHITE, R.J. AND JACKSON, S.P. 1992 Mechanism of TATA-binding protein recruitment to a TATA-less class III promoter. *Cell* **71**, 1041-1053

WILSON, T.E., PAULSEN, R.E., PADGETT, K.A. AND MILBRANDT, J. 1992 Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science* **256**, 107-110

WINOCOUR, E., CALLAHAM, M.F. AND HUBERMAN, E. 1988 Perturbation of the cell cycle by Adeno-associated virus. *Virology* **167**, 393-399.

YAKOBSON, B., KOCH, T. AND WINOCOUR, E. 1987 Replication of Adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus. *J Virol.* **61**, 972-981.

YALKINOGLU, A.O., HEILBRONN, R., BURKLE, A., SCHLEHOFER, J.R. AND ZUR HAUSEN, H. 1988 DNA amplification of Adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res.* **48**, 3123-3129

YALKINOGLU, A.O., SCHLEHOFER, J.R. AND ZUR HAUSEN, H. 1990 Inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced methotrexate and adriamycin resistance in CHO cells by Adeno-associated virus type 2. *Int J Cancer* **45**, 1195-1203.

YANG-YEN, H.F., CHAMBARD, J.C., SUN, Y.L., SMEAL, T., SCHMIDT, T.J., DROUIN, T. AND KARIN, M. 1990 Transcriptional interference between *c-jun* and the glucocorticoid receptor : mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* **62** : 1205-1215.

YEN, P.M., DARLING, D.S., CARTER, R.L., FORGIONE, M., UMEDA, P.K. AND CHIN, W.W. 1992 Triiodothyronine (T3) decreases binding to DNA by T3-receptor homodimers but not receptor-auxiliary protein heterodimers. *J. Biol. Chem.* **267**, 3565-3568

YU, V.C., DELSERT, C., ANDERSEN, B., HOLLOWAY, J.M., DEVARY, O.V., NÄÄR, A.M., YUN KIM, S., BOUTIN, J.M., GLASS, C.K. AND ROSENFELD, M.G. 1991 RXR β : a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* **67** : 1251-1266.

ZENKE, M., KAHN, P., DISELA, C., VENNSTRÖM, B., LEUTZ, A., KEEGAN, K., HAYMAN, M.J., CHOI, H.R., YEW, N., ENGEL, J.D. AND BEUG, H. 1988 *v-erbA* specifically suppresses transcription of the avian erythrocyte anion transporter (Band 3) gene. *Cell* **52** : 107-119.

ZENKE, M., MUNOZ, A., SAP, J., VENNSTROM, B. AND BEUG, H. 1990 *v-erbA* oncogene activation entails the loss of hormone-dependent regulator activity of *c-erbA*. *Cell* **61** : 1035-1049.

ZHANG, X.-K., LEHMANN, J., HOFFMANN, B., DAWSON, M.I., CAMERON, J., GRAUPNER, G., HERMANN, T., TRAN, P. AND PFAHL, M. 1992 Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. *Nature* **358**, 587-591

