

50376
1994
91

ccogen20101043

50376
1994
91

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Numéro d'ordre: 1285

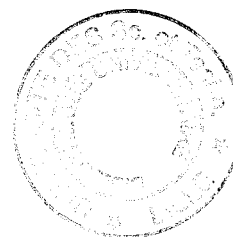
THESE

présentée pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**

par

CATHERINE KOERING



**STRATÉGIES ANTI-CANCÉREUSES:
ETUDE D'UN SYSTÈME MODULABLE DE L'ONCOSUPPRESSION
PARVOVIRALE**

Soutenue le 11 Février 1994

devant la commission d'examen

Président : **Pr. ANDRÉ VERBERT**

Rapporteurs : **Dr. JÖRG SCHLEHOFER
Dr. ALAIN SERGEANT**

Examineurs : **Pr. JEAN ROMMELAERE
Pr. DOMINIQUE STEHELIN**

*pour Amélie et Nelly
mes Grand-mères*

SOMMAIRE

Remerciements	I
Synopsis	II
Abréviations	III
Table des matières des figures	IV
Prologue	V

A INTRODUCTION 1

I. LE PETIT LIVRE DES PARVOVIRUS. 2

1. Propriétés générales des Parvovirus.	3
1.1. Taxonomie.	3
1.2. Structure.	4
1.3. Spectre d'hôte des Parvovirus Autonomes.	5
1.4. Pathogénicité.	5
2. Les Parvovirus Autonomes.	6
2.1. Généralités.	6
2.2. Le Parvovirus Minute Virus of Mice (MVM).	7
2.2.1. Organisation génomique de MVMp.	8
2.2.1.1. Structure du génome.	8
2.2.1.2. Organisation des unités de transcription.	8
2.2.2. Nature et fonction de la protéine Non-Structurale NS1.	10
2.2.3. Organisation des promoteurs.	12
2.2.3.1. Le promoteur P4.	12
2.2.3.2. Le promoteur P38.	13
2.2.4. Régulation du promoteur P4 par atténuation de la transcription.	14
2.3. Interactions cellules hôtes-virus.	15
2.3.1. Permissivité cellulaire.	15
2.3.2. L'infection cryptique.	16
2.3.3. L'infection abortive.	16
2.3.4. Infection restrictive.	16
2.4. Le cycle viral de MVMp.	17
2.4.1. L'infection virale.	17
2.4.2. La réplication de l'ADN.	17
2.4.3. La synthèse protéique.	19
2.4.5. Assemblage et maturation des virions.	19

3.	Activité antinéoplasique des Parvovirus H-1, MVM et AAV.	20
3.1.	Oncotropisme parvoviral.	20
3.2.	Oncosuppression parvovirale.	21
3.2.1.	Persistance, latence et activation des Parvovirus.	21
3.2.2.	Surveillance antinéoplasique.	22
3.2.3.	Toxicité directe des Parvovirus sur les cellules (pré)néoplasiques.	22
3.2.3.1.	Action lytique des Parvovirus Autonomes.	23
3.2.3.2.	Les virus Adéno-Associés (AAV).	24
3.2.4.	Interférence parvovirale avec le métabolisme cellulaire.	24
3.2.5.	Lyse préférentielle des cellules transformées par H-1 et MVMp.	25
3.2.4.	Réversion du phénotype transformé par les AAV.	25
4.	Mécanismes possibles de l'oncosuppression: "qui fait quoi?".	26

II A PROPOS DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE. 27

1.	Introduction.	28
2.	Les virus transformants.	28
3.	Les gènes cellulaires à potentialité "oncogène" ou proto-oncogènes.	29
3.1.	Classification et fonctions.	29
3.2.	Les gènes <i>ras</i> .	30
3.2.1.	Rôle et propriétés biochimiques des p21Ras.	30
3.2.2.	La transformation induite par le produit du gène <i>ras</i> .	31
3.2.2.1.	La transformation spontanée.	31
3.2.2.2.	La transformation virale.	32
4.	Différences entre proto-oncogènes cellulaires et oncogènes viraux.	32
5.	Cancérisation par activation de gènes cellulaires à potentialité "oncogène".	32
6.	Cancérisation par perte ou mutation "d'anti-oncogène".	33
7.	Réversion de la cancérigénèse.	34
7.1.	Des drogues anti-cancéreuses.	34
7.2.	Le ciblage des drogues.	35

III.	STRATÉGIES ANTI-CANCÉREUSES: DES VECTEURS PARVOVIRAUX....	37
1.	Le concept.	38
2.	Les techniques: de la transfection au vecteur viral.	39
3.	Le ciblage.	39
4.	Comment réaliser un vecteur parvoviral?	40
5.	Comment produire un vecteur parvoviral?	41
6.	A propos des AAV.	41
IV.	CONCLUSION PRÉLIMINAIRE	43
B.	RESULTATS & DISCUSSIONS	46
I	ARTICLE I	47
1.	Introduction.	48
2.	Résumé.	48
3.	Résultats annexes.	65
4.	Discussion.	67
II	ARTICLE II	68
1.	Introduction.	69
2.	Résumé.	69
3.	Résultats annexes.	90

4.	Discussion.	93
----	--------------------	----

III ARTICLE III 94

1.	Introduction.	95
----	----------------------	----

2.	Résumé.	95
----	----------------	----

3.	Résultats annexes.	113
----	---------------------------	-----

4.	Discussion.	115
----	--------------------	-----

C. CONCLUSION-EPILOGUE 117

D. REFERENCES 119

Remerciements

A la fin ma maîtrise (juin 1988), je devais faire le choix d'un DEA. La solution la plus simple et la plus évidente aurait été certainement de rester à Strasbourg - terre natale - afin d'y faire celui de Biologie Moléculaire. Mais...

Il y a toujours un "mais" dans la vie. Mais donc, parmi les stages que j'avais effectué trois étés durant, c'est celui que j'ai fait en juin 1986, chez Dominique Stehelin, qui a guidé mon choix.

Une thématique - l'oncologie - plus que passionnante, la réponse positive de DS (Dominique Stehelin, cf. liste des abréviations) à ma demande d'accueil, et un sujet à visée thérapeutique au sein d'une équipe de premier plan ont été les raisons de mon expatriation dans le Nord.

Les "Parvos", ce petit groupe appartenant à la famille de DS, dont la multiplication et l'amplification ont été gérées avec maestria et sagesse par Jean Rommelaere (JR), m'ont primoinfectée. Non pas d'une infection cryptique ou abortive, mais d'une infection productive, si bien qu'aujourd'hui, 4 ans plus tard, cette thèse est une production sans lyse...

Je remercie DS de m'avoir accueillie dans son unité, pour le DEA et le Doctorat. Je le remercie d'avoir lancé le groupe "Oncosuppression Parvovirale", et de m'y avoir associée.

Je remercie JR qui, où qu'il fût, Lille, Bruxelles, ou Heidelberg, a guidé avec intérêt mes travaux.

Je remercie Jörg Schlehofer (JRS) pour son enthousiasme et nos discussions entre café et volutes de fumée.

Je remercie Thierry Dupressoir (TD), pour m'avoir initiée au joies du Macintosh, et pour ses petites souris.

Je remercie Monsieur le Président et Messieurs les membres du Jury d'avoir accepté de juger ce travail, et tout particulièrement Alain Sergeant qui a traversé la France pour venir participer à l'évaluation de celui-ci.

Je remercie Agnès Begue pour m'avoir enseigné les secrets du clonage.

Je remercie toute l'équipe "Parvo", même JMV (Jean-Marc Vanacker) qui toujours, régulièrement et jusqu'à la fin sans répis et sans scrupules, envahi ma paillasse.

Et Domi-Domino, avec qui j'ai partagé un pseudo-bureau dans un placard.

Et Nathalie Provost la plus mignonne des techniciennes.

Et Jean-Phi, qui m'amadouait à grand renfort de rochers suchard et de petites fleurs (carnivores) lorsque je pestais vraiment trop fort.

Et Fabian, un stagiaire comme il est impossible d'en souhaiter de plus appliqué et consciencieux.

Et Muriel, pour son implication et son aide mais surtout aussi pour son sourire, son soutien, "ses" chromosomes.

Et Carole Loonis, mon toubib préféré, avec qui j'ai débuté ces premières années lilloises.

Je remercie toute l'URA 1160.

Je remercie mes parents, qui malgré leur peine, ont laissé leur poussin quitter le nid surtout qui m'ont soutenue jusqu'à aujourd'hui.

Je remercie l'Institut Pasteur de Lille, le conseil régional Nord-Pas de Calais et la Fondation des Treilles pour leur aide financière.

SYNOPSIS

Sous la rubrique signes particuliers de la carte d'identité des Parvovirus Autonomes, il peut être spécifié: Oncotropisme, puis Oncosuppression et Oncolyse.

- *onco-: préfixe, de nature tumorale, cancéreuse.
- *tropisme: mouvement par lequel un organisme s'oriente par rapport à une source stimulante.
- *suppression: action qui consiste à supprimer, crime qui consiste à faire disparaître.
- *lyse: dissolution, destruction.

L'oncotropisme ne reflète pas un tropisme préférentiel des Parvovirus pour les cellules transformées, mais plutôt le fait que ces cellules expriment des facteurs qui complètent ou/et supplémentent des fonctions virales permettant l'expression des protéines virales précoces, la cytolysse, le déroulement complet du cycle viral et la production de virions. L'oncolyse démontrée *in vitro* et l'oncosuppression *in vivo* sont les conséquences de l'oncotropisme, mais n'en sont pas des caractéristiques intangibles. En effet, si le virus a une activité cytotolytique dans de nombreuses cellules tumorales, et aussi cytotoxique via la protéine précoce NS1, certaines cellules tumorales y résistent. Cela est frustrant pour les parvovirologue-oncologistes qui ont placé tous leurs espoirs dans la thérapie anti-cancéreuse parvovirale. Aussi, nous nous sommes appliqués à essayer de concevoir le Parvovirus recombinant qui répondrait à leurs attentes, à savoir oncolyse-oncosuppression, quelque soit la cellule tumorale infectée. Notre système a été conçu afin que le gène de la thymidine kinase (*tk*) du Virus Herpès Simplex 1 (HSV1), dont le produit rend toxique l'Acyclovir, soit uniquement transcrit dans les cellules permissives au Parvovirus. Grâce à ce système qui permet l'expression du gène HSV1-*tk*, placé dans un vecteur plasmidique sous le contrôle d'éléments régulateurs parvoviraux actifs uniquement en présence de la protéine virale NS1, nous avons pu induire la mort de cellules par la synergie entre les effets cytotoxiques de NS1 et ceux de l'Acyclovir modifié.

Un tel projet de thérapie anti-cancéreuse ne pose évidemment pas le problème de la spécificité tissulaire, car bien que les Parvovirus infectent aussi des cellules "normales", la protéine NS1 n'est active que dans les cellules transformées. Cependant, pour réaliser ce projet, il est nécessaire de passer d'un vecteur plasmidique à un Parvovirus recombinant. Il faut donc disposer d'une cellule permettant une production continue du virus recombinant, sans effet toxique de NS1, et qui soit apte à compléter les fonctions d'un virus rendu déficient. Nous avons réussi à isoler et caractériser une telle cellule (FR3T3C), qui pourrait nous permettre de fabriquer une cellule de trans-complémentation pour produire des Parvovirus recombinants.

Enfin, nous avons tiré parti du fait que la majorité des cellules "normales" sont résistantes aux Parvovirus, pour évaluer l'effet de l'Azatyrosine. Cette substance apparaît potentiellement "normalisante" de la transformation, en particulier par le produit de l'oncogène *ras*. Nous avons testé si des cellules dont la transformation est indépendante de *ras* et qui sont sensibles au Parvovirus étaient aussi "normalisées" par l'AzTyr. Cette normalisation devrait avoir pour conséquence leur résistance à l'infection parvovirale. Nous avons sélectionné des cellules FR3T3C pour leur capacité à pousser en colonies isolées en milieu semi-solide (cellules FRST-: transformation "spontanée"). Ces cellules forment des tumeurs chez les souris athymiques, et sont sensibles à l'effet cytopathique des Parvovirus. Nous avons observé que sous l'effet de l'Azatyrosine, une fraction importante des cellules FRST- mouraient, et que les cellules survivantes avaient acquis un phénotype "normalisé". En effet, elles n'étaient plus capables de former des tumeurs chez la souris athymique et surtout étaient devenues résistantes aux Parvovirus.

ABRÉVIATIONS

AAV	Adeno-Associated Viruses ou Dependovirus
ACV	Acyclovir
AEV	Avian Erythroblastosis Virus
ALV	Associated Leucosis Virus
AMPc	Adenosine Mono-Phosphate cyclique
AP1	Activating Protein 1
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
AzTyr	Azatyrosine
BPV	Bovine Papilloma Virus
CAT	Chloramphenicol Acetyl Transferase
CHP	Cis Hydroxy-Proline
CPV	Canine ParvoVirus
CREB	cAMP Responsive Element Binding protein
DLV	Defective Leukemia Virus
DMBA	DiMethyl-Benz(a)Anthracene
DPE	Downstream Promoter Element
EGF	Epidermal Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
FPV	Feline ParvoVirus
GAP	GTPase Activating Protein
GDP	Guanidine Di-Phosphate
GDS	Guanine-nucleotide Dissociation Stimulator-protein
Grb2	SH2/SH3 adaptator protein
GTP	Guanidine Tri-Phosphate
H-1	Hamster osteolytic virus 1
HSV-1	Herpes Simplex Virus type 1
IFN	Interferon
IL-2	Interleukine 2
ITR	Inverted Terminal Repeat: séquence terminale des AAV
LTR	Long Terminal Repeat: promoteur des Rétrovirus
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase, (Microtubule associated protein kinase)
MEV	Mink Enteritis Virus
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MoMuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mSos	mammalian Son of sevenless
mu (ug)	map unit (unité génomique)
MVM	Minute Virus of Mice

MVMi	Minute Virus of Mice immunosuppresif
MVMp	Minute Virus of Mice prototype
NGF	Nerve Growth Factor
NIH	National Institute of Health
NK	Natural Killer
NMU	Nitroso-Methylurea
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PKC	Protein Kinase C
PyV	Polyoma Virus
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
Rb	Retinoblastome
RF	Forme Réplivative
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rrg	Ras Recision Gene (lysyl oxidase enzyme)
RSV	Rous Sarcoma Virus
RV	Rat Virus
src	oncogène du sarcome de Rous
SV40	Simian Virus 40: papovavirus
TAR	Trans-Activation Responsive Element
TDP	Thymidine Di-Phosphate
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocyte
tk	thymidine kinase
TMP	Thymidine Mono-Phosphate
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNM	TetraNitroMethane
TTP	Thymidine Tri-Phosphate
UDP	Uridine Di-Phosphate
USF/MLTF	Upstream Stimulatory Factor / Major Late Transcription Factor
DS	Dominique STEHELIN
JR	Jean ROMMELAERE
JRS	Jörg SCHLEHOFER
TD	Thierry DUPRESSOIR

TABLE DES FIGURES

Fig 1 :	Photo Microscopie électronique (R100FR3T3C infectée de manière persistante par MVMp)	<i>en couverture</i>
<u>Tableau 1:</u>	Classification et origines des membres de la famille des Parvovirus. (Tattersall et Cotmore, 1987)	<i>face page 3</i>
Fig 2 :	Spectre de pathologie des Parvovirus. (Cotmore et Tattersall, 1987; Brownstein et al., 1991)	<i>face page 5</i>
Fig 3 :	Structure de l'ADN de MVMp et séquences des palindromes 5' et 3'. (Astell 90)	<i>face page 7</i>
Fig 4 :	Organisation génomique MVMp. (Cotmore, 1990)	<i>face page 8</i>
Fig 5A:	Action de NS1: régulation des promoteurs, réplication de l'ADN, cytotoxicité.	<i>face page 10</i>
Fig5B:	Promoteurs P ₄ et sa séquence de régulation. (Ahn et al., 1989; Bodnar et al., 1988; Pitluk et Ward, 1991)	<i>face page 12</i>
Fig5C:	Promoteurs P ₃₈ et sa séquence de régulation. (Ahn et al., 1989; Gavin et Ward, 1990)	<i>face page 13</i>
Fig6 :	Conformation alternative atténuation (A) et passage (B) de la régulation par atténuation du promoteur P ₄ . (Ben-asher et Aloni, 1984)	<i>face page 14</i>
Fig7 :	Cycle lytique de MVMp	<i>face page 17</i>
Fig8 :	Réplication de l'ADN de MVMp: modèle de "modified rolling hairpin". (Astell 90)	<i>face page 18</i>
<u>Tableau 2:</u>	Effet inhibiteur des Parvovirus sur l'induction de tumeurs.	<i>face page 22</i>
<u>Tableau 3a:</u>	Sensibilité des cellules humaines au Parvovirus.	<i>face page 23</i>
<u>Tableau 3b:</u>	Effet inhibiteur des Parvovirus sur la transformation cellulaire <i>in vitro</i> .	
<u>Tableau 4:</u>	Facteurs parvoviraux interférant avec le métabolisme cellulaire.	<i>face page 24</i>

<u>Tableau 5:</u>	Réponses spécifiques des cellules transformées à l'infection par les Parvovirus H-1 et MVMP.	face page
<u>Tableau 6:</u>	Réponses spécifiques des cellules infectées par les AAV.	face page
Fig9 :	Schéma de transmission du signal passant par Ras. (Kahn, 1992; Marshall, 1993; McCormick, 1993)	face page
Fig10:	Modèle de régulation de la p21Ras. (Lowy et al., 1991)	face page
<u>Tableau 7:</u>	Comment cibler les drogues: toxigènes utilisés et leurs effets.	face page
Fig11:	Mode d'action de l'enzyme TK et l'Acyclovir.	face page
<u>Tableau 8:</u>	Parvovirus recombinants et leur système de complémentation.	face page
Fig12:	Clonage de CAT	face page
Fig13:	"CAT assay"	face page
Fig14:	Système	face page
Fig15:	Caryotypes	face page
Fig16:	RFLP: "Restriction Fragment Length Polymorphism"	face page
Fig17:	RAPD: "Rapid Amplification Polymorphic DNA"	face page
<u>Tableau 9:</u>	Comparaison des cellules FR3T3 et FR3T3C sur les critères de normalité.	face page
<u>Tableau 10:</u>	Comparaison des cellules FR3T3, MixRA et FR3T3C pour leurs comportements face au Parvovirus MVMP	face page
Fig18A,B,C:	Adaptation des cellules R100FR3T3C à la culture en spinner	face page
Fig18D:	Colorations des cellules FR3T3C et R100FR3T3C	face page

- Fig19: Détection de la présence de l'ADN de H-1 dans les cellules R(H-1)FR3T3C
face page 93
- Tableau 11: Résultats complets: systèmes FR3T3C/FRST- et FR3T3/FREJ4. *face page 113*
- Fig20: Détection de l'ADN de MVM dans les cellules révertées infectées par MVMp
face page 113
- Tableau 12: Traitement AzTyr: systèmes souris (A9) et humain (NBE). *face page 114*
- Fig21: Analyse protéique bidimensionnelle *face page 125*
- Fig22: Analyse des transcrits Clusterine *face page 126*

PROLOGUE

Isolés de stocks de virus transformants et de tumeurs, les Parvovirus ont toujours été associés au cancer. Leurs propriétés les plus singulières, mais aussi les plus intéressantes sont l'oncotropisme et l'oncosuppression-oncolyse démontrées *in vitro* mais aussi *in vivo*.

L'oncotropisme ne reflète pas un tropisme préférentiel pour les cellules transformées, mais reflète les besoins de ces virus à faible capacité codante: les cellules tumorales apportent des fonctions indispensables à la multiplication des Parvovirus. L'oncolyse se caractérise par la lyse précoce de la cellule hôte, souvent avant que le cycle de réplication des Parvovirus soit complet. Le mécanisme est mal connu, toutefois, les résultats d'un certain nombre de travaux ont permis de proposer un modèle, impliquant les protéines précoces non-structurales (NS). En effet, le pouvoir oncolytique du virus a pu être imité à l'aide de vecteurs exprimant les NS, ce qui a aussi permis de dissocier la lyse engendrée par NS - cytotoxique -, de celle due à la libération des virions lors de l'accomplissement du cycle réplcatif.

Cependant, l'oncolyse est loin de représenter un phénomène général puisque certaines cellules, bien que transformées, y échappent sans que les raisons en soient connues.

Dans la première partie de ce mémoire, nous avons tenté de résumer nos connaissances sur les Parvovirus en décrivant leurs caractéristiques virologiques, puis les aspects moléculaires de leur fonctionnement, et enfin leurs propriétés anti-tumorales. Ce chapitre concerne plus particulièrement les Parvovirus Autonomes, dont MVMP, mais aussi quoique plus ponctuellement les Virus-Adéno-Associés (AAV). Le chapitre sur la transformation cellulaire ne prétend aucunement être exhaustif, mais permet, outre de fixer les idées sur la tumorigenèse, de mesurer l'intérêt d'utiliser des Parvovirus Autonomes recombinants pour des stratégies anti-cancéreuses nouvelles.

La deuxième partie de notre mémoire contient les résultats de nos travaux personnels. Nous avons tiré parti du fait que le promoteur P₃₈ de MVMP fonctionne préférentiellement dans les cellules tumorales, pour exprimer dans de telles cellules le gène de la thymidine kinase (*tk*) du Virus Herpes Simplex 1 (HSV1), dont le produit rend toxique l'Acyclovir. Le but de notre travail a été, en bon architecte, de dessiner les plans d'un vecteur exprimant HSV1-*tk* sous le contrôle du promoteur P₃₈, puis de le construire et d'en démontrer la fonctionnalité et l'efficacité. Ce premier pas vers l'élaboration d'un Parvovirus recombinant a été largement stimulé par la découverte d'un système susceptible de produire un tel virus. En effet, nous avons aussi caractérisé une cellule qui permet la production constitutive et non lytique du Parvovirus MVMP, et qui est insensible à l'effet cytotoxique de la protéine NS1. Enfin, nous avons engagé un travail sur un antibiotique, l'Azatyrosine, connu pour ses effets "normalisants" à l'égard de cellules transformées par le produit de l'oncogène *ras*. La question qui se posait alors, était de savoir si l'Azatyrosine était réellement capable de "normaliser" des cellules transformées par le produit de l'oncogène *ras*, et dans l'affirmative, si des cellules transformées par d'autres produits que Ras l'étaient aussi. Dans ce travail, nous avons utilisé les Parvovirus pour évaluer l'effet de l'Azatyrosine, et démontré que les cellules, qui sous l'effet de cet antibiotique avaient perdu le phénotype transformé, étaient aussi résistantes aux Parvovirus.

A

INTRODUCTION

I

LE PETIT LIVRE DES PARVOVIRUS

I. LE PETIT LIVRE DES PARVOVIRUS.

La petite histoire des Parvovirus commence en l'an de grâce 1959. En effet, c'est vers la fin des années 50 que deux savants, Kilham et Olivier, cherchant à identifier un virus responsable des tumeurs de rat isolèrent un tout petit virus doué d'une grande stabilité et d'un fort pouvoir agglutinant. Ils le baptisèrent RV pour Rat Virus (Kilham et Olivier, 1959). La voie était ouverte. Les années qui suivirent furent fastes, et plusieurs équipes isolèrent de tumeurs de rat des virus apparentés (Lum et Schreiner, 1963; El Dadah et al., 1967). Au même moment, l'équipe d'Helen Toolan identifiait un virus, issu des tumeurs humaines, responsable de nanisme et microencéphalie chez les hamsters nouveaux-nés. Ce virus fut catalogué sous le patronyme de H-1. L'histoire ne s'arrête pas là. H-1 possédant des caractéristiques similaires à RV, d'autres équipes examinèrent alors de nombreux tissus animaux et en isolèrent d'autres virus (Crawford, 1966; Bonnard et al., 1976; Siegl, 1976). Leur nombre s'accroissant au cours des ans, un jour il fallut bien les classer. Bien que ces virus aient été en majorité isolés de tumeurs, ils ne sont pas associés de manière causale à la croissance dérégulée des cellules tumorales, mais trouvent dans ces cellules les fonctions nécessaires au déroulement de leur cycle répliatif.

1. Propriétés générales des Parvovirus.

1.1. Taxonomie

Les Parvovirus (latin parvus = petits) font partie des plus petits virus à ADN connus. Parmi ceux-ci, ce sont les seuls virus pour lesquels aucune activité transformante n'a pu être mise en évidence. Ils infectent aussi bien les invertébrés que les vertébrés, dont l'homme.

La famille des Parvoviridae, dont le génome est constitué d'une molécule d'ADN monocaténaire, regroupe une quarantaine de virus. Elle est divisée en trois genres: les Densovirus, les Virus Adéno-Associés et les Parvovirus Autonomes, qui présentent les mêmes caractéristiques physico-chimiques, mais se démarquent par leurs exigences lors de la répliation (cf. Tableau 1: origine et date d'isolement (Tattersall et Ward, 1978; Siegl et al., 1985; Cotmore et Tattersall, 1987)).

- Les Densovirus infectent les arthropodes, essentiellement les lépidoptères. Leur dénomination vient du fait qu'ils provoquent une forte affinité pour l'éosine et une hypertrophie des noyaux des cellules infectées. Ils sont Autonomes pour la répliation, et le brin négatif ou positif de l'ADN est indifféremment encapsidé (Arella et al., 1990).

- Les Virus Adéno-Associés dits AAV ou Dépendovirus, infectent les vertébrés, et leur ADN s'intègre dans le génome de la cellule infectée (Carter et al., 1990). Leur répliation généralement défective, nécessite des fonctions apportées, soit par un virus "auxiliaire" (helper), soit *in vitro* par une synchronisation particulière de la culture

cellulaire qu'ils infectent (Yacobson et al., 1987), soit encore par un stress de croissance par des agents génotoxiques tumorigènes permettant alors à la cellule de supporter transitoirement le déroulement de la réplication (Yalkinogou et al., 1988). Ces virus auxiliaires ("helper"), qui apportent des fonctions biochimiques indispensables à l'expression de l'ADN parvoviral, sont des virus à ADN linéaire et à réplication intranucléaire, de type Adénovirus (d'où le AAV), Herpes-virus (Buller et al., 1981), ou du virus de la vaccine (Schlehofer et al., 1986; Berns et Bohenzky, 1987).

- Les Parvovirus Autonomes infectent les vertébrés. Leur réplication, ne nécessitant pas de virus "helper", est très dépendante de l'état de différenciation et de certaines phases du cycle cellulaire (Cotmore et Tattersall, 1987).

Outre leur réplication défective ou autonome, les deux genres infectant les vertébrés, AAV et Parvovirus, diffèrent par cinq propriétés importantes :

1-Il y a peu d'homologie de séquence entre les virus des deux genres.

2-Le génome des AAV, plus court d'environ 500 nucléotides, est encadré de séquences terminales inversées identiques (ITR), alors que celui des Autonomes a des séquences terminales palindromiques différentes (B19 excepté) (Tattersall et Ward, 1978).

3-Leur organisation transcriptionnelle est différente: deux promoteurs contrôlent l'expression des gènes des Autonomes (un seul pour B19), et trois ceux des AAV.

4-Aucune maladie ne semble être associée à l'infection par les AAV (Cukor et al., 1984; Georg-Fries, 1984), alors que les Parvovirus Autonomes provoquent toute une série de pathologies différentes (Cotmore et Tattersall, 1987).

5-La capacité des AAV à s'intégrer dans le génome cellulaire. Cette intégration, en des sites spécifiques (Kotin et al., 1990; Samulski et al., 1991; Walz et Schlehofer, 1989; 1992), se fait généralement lorsque l'AAV infecte en absence de virus "helper" (Hoggan et al., 1973; Berns et al., 1975). Cependant, l'AAV intégré (Cheung et al., 1980) peut être excisé et se répliquer à la suite de l'infection par un virus "helper" (Hoggan et al., 1973; Handa et al., 1977).

Des résultats récents suggèrent que cette classification, fondée sur la réplication devrait être repensée. En effet, les données actuelles permettent de répertorier les Parvovirus de genres différents selon leurs caractéristiques structurales génomiques en une famille de 5 ou 6 genres (Berns, 1990).

1.2. Structure.

Tous les membres de la famille des parvoviridae possèdent les caractéristiques physico-chimiques suivantes (Arella et al., 1990):

1-Les virions sont constitués d'une capsid non-enveloppée de symétrie icosaédrique à 2, 3, ou 5 axes de symétrie, de diamètre compris entre 18 et 26nm et formée de 32 capsomères (Figure 1). Ils renferment une molécule d'ADN monocaténaire linéaire d'environ 5000 nucléotides dont le poids varie de 1.2 à 2.2×10^6 Daltons.

2-Les particules virales ont une densité apparente de 1.39 à 1.42 g/ml en gradient de chlorure de césium, 1.3 à 1.32 pour les capsides vides et 1.35 à 1.37 pour celles renfermant un génome incomplet. Leur vitesse de sédimentation à l'équilibre est, 100 (Densovirus), 110 (Parvovirus), et 147 Swedberg (AAV). Leur poids moléculaire varie de 5.5 à 6.2×10^6 Daltons.

3-Les Parvovirus sont thermostables, ils résistent 60 min à une température de 56°C et à la congélation. Ils résistent aussi à la dessiccation, aux solvants lipidiques et aux

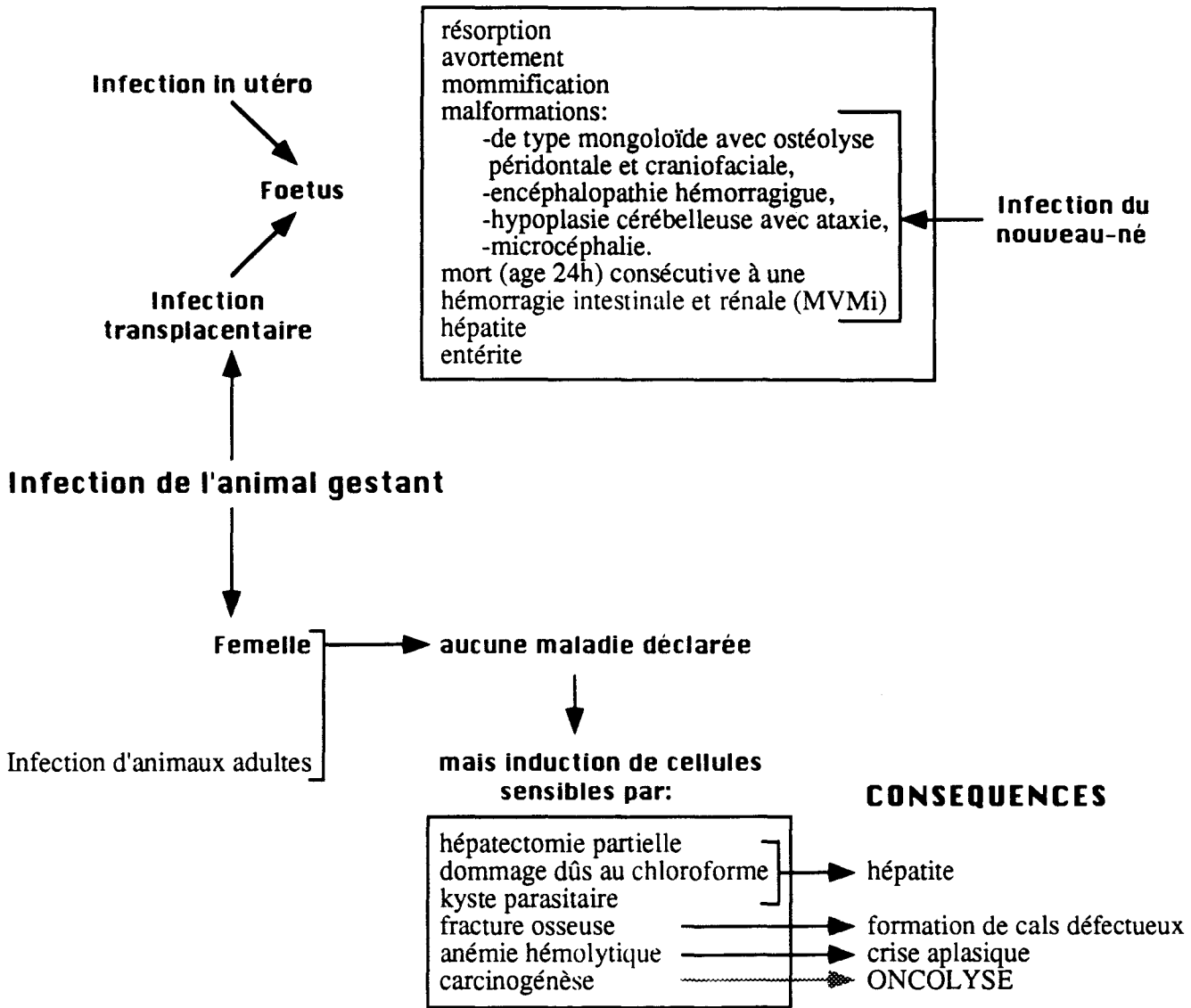


Figure 2: Spectre de pathologie des Parvovirus. Cotmore et Tattersall, 1987; Browstein et al., 1991.

détergents, à des pH de 3.0 à 9.0, à de fortes concentrations salines et aux protéases et nucléases.

4-Les particules virales ne contiennent ni molécule d'ARN, ni hydrates de carbones, ni lipides, ni enzymes d'origine cellulaire, ni protéines de faible poids moléculaire de type histone. Une exception, toutefois, concerne les Densovirus infectieux qui contiennent trois types de polyamines.

5-Les particules infectieuses renferment soit exclusivement une molécule d'ADN linéaire simple brin de polarité négative, soit indifféremment le brin positif ou négatif, comme c'est le cas pour B19 (Cotmore et Tattersall, 1984) et Lu-III (Muller et Siegl, 1983). Par convention, le brin négatif se représente l'extrémité 3' à gauche.

1.3. Spectre d'hôte des Parvovirus Autonomes.

Les Parvovirus ont un spectre d'hôte assez restreint et n'infectent généralement qu'une seule espèce. Les mammifères sont les principales espèces infectées: l'homme, mais aussi bovins, ovins, et porcins pour lesquels le Parvovirus constitue une menace réelle. Les oiseaux sont moins fréquemment infectés, et deux cas seulement sont connus: l'oie (GPV) et la caille (le Dépendovirus AAV). Des changements naturels d'hôtes ont été décrits: les virus CPV du chien et MEV du vison sont des variants d'un seul et même virus félin (FPV) (cf. Tableau 1). Sous certaines conditions expérimentales, la spécificité d'hôte peut être étendue à d'autres espèces. Par exemple, le hamster syrien est l'hôte de la réplication des Parvovirus humain (Lu-III), murin (MVM) et de rat (H-1), et l'homme peut être infecté par le Parvovirus de rat (H-1). La transmission des Parvovirus se fait en général de manière horizontale, par les fèces, sécrétions salivaires et expectorations, et parfois verticalement (Matthews, 1982).

1.4. Pathogénicité.

L'infection parvovirale est généralement très contagieuse. Ainsi MVMp est présent à l'état endémique chez la souris et la population humaine est séropositive à 80% pour le Dépendovirus AAV2. Le spectre de pathogénicité est assez restreint, car le Parvovirus n'est capable de se multiplier que dans les cellules à forte activité mitotique et dans un état de différenciation particulier (Figure 2). Les infections les plus graves ont essentiellement lieu au moment de la reproduction/gestation. La gravité et l'ampleur des signes cliniques sont fonction de la voie d'inoculation, de l'importance de la dose virale inoculée, de la souche virale, de l'hôte, ainsi que de la période de gestation (Siegl, 1984). L'infection post-reproduction provoque une entérite chez le chien (CPV) et le vison (MEV), et une panleucopénie chez le chat (FPV) (Siegl, 1984). Lors de la gestation, les Parvovirus Autonomes occasionnent des anomalies suivies de morts foetales ou néonatales, en détruisant spécifiquement des cellules qui prolifèrent lors du développement normal des tissus (Siegl, 1984). Certains Parvovirus sont capables de traverser la barrière placentaire et infectent le fœtus. A des stades précoces de l'organogenèse l'infection provoque généralement l'avortement spontané ou la momification du fœtus. Une infection néonatale qui permet une naissance viable, est accompagnée d'anomalies sérieuses telles que dégénérescence musculaire et osseuse. En infectant de manière sélective des tissus osseux et dentaires en développement, certaines souches parvovirales provoquent, chez le hamster nouveau-né, une croissance retardée et des déformations de type "mongoloïde" (Toolan, 1960).

En revanche, chez l'animal adulte, la croissance osseuse et dentaire étant accomplie, ces tissus résistent à l'infection qui aura lieu alors dans des tissus en multiplication active ou en régénération tels l'épithélium intestinal (entérite), le foie (hépatite), la rate, les tissus lymphoïdes et la moelle osseuse (Siegl, 1984). En résumé, si l'infection par les Parvovirus constitue une réelle menace pour l'embryon et le nouveau-né, l'infection de l'adulte reste de nature opportuniste.

Seul le Parvovirus B19 est connu pour être étiologiquement associé à des maladies humaines (Anderson et Pattison, 1984; Cotmore et Tattersall, 1984). Il est responsable de deux affections: l'une dermatologique - l'exanthème infectieux ou la cinquième maladie éruptive chez l'enfant (Anderson et al., 1984; 1985) -, l'autre hématologique - l'érythroblastopénie aiguë -. Son tropisme pour les cellules précurseurs de la lignée érythroïde provoque des crises d'anémies aiguës chez les sujets atteints d'hyperhémolyse constitutionnelle (Mortimer et al., 1983). Ce virus semble aussi être impliqué dans des pathologies cardiaque, obstétricale (Morinet et Tchernia, 1991), et rhumatismale (Feder et al., 1989), où chez l'adulte il induit une polyarthrite transitoire (Naides et al., 1990).

B19 peut aussi traverser la barrière placentaire et provoquer une anémie foetale profonde entraînant l'avortement (Pattison, 1987; 1988). L'examen des foetus infectés a montré que les cibles préférentielles du virus sont les cellules précurseurs de la lignée érythroïde, particulièrement abondantes dans le foie, l'infection étant accompagnée de signes cliniques comparables à ceux d'un enfant atteint d'anémie hémolytique constitutionnelle (Franciosi et Tattersall, 1988). Toutefois, l'infection par B19 est le plus souvent asymptomatique ou se traduit par des syndromes respiratoires bénins ou mononucléosiques discrets. La majorité de la population est séropositive et on estime que 76 % de la population a développé une virémie B19 (Niel, S., communication personnelle).

2. Les Parvovirus Autonomes.

2.1. Généralités.

Le génome des Parvovirus Autonomes est une molécule d'ADN linéaire simple brin, de 5000 à 5500 nucléotides, de polarité généralement négative (complémentaire de l'ARNm), et terminée à ses deux extrémités par une structure dite en épingle à cheveux (palindrome replié) (Figure 3). L'organisation génomique et les mécanismes de réplication sont analogues chez les différents Parvovirus Autonomes (B19 excépté). La partie 3'-gauche du génome simple brin contient l'information nécessaire à la production des protéines non-structurales, et la partie 5'-droite celle nécessaire à la production des protéines de capsides (Cotmore et al., 1983).

La réplication parvovirale dépend de certains facteurs cellulaires dont la présence est fonction de l'état de prolifération et de différenciation de la cellule (Spalholz et Tattersall, 1983; Cotmore et Tattersall, 1987). Ces facteurs étant exprimés transitoirement durant les phases G2 ou S du cycle cellulaire, la multiplication des

Parvovirus a donc lieu sélectivement dans le noyau des cellules en division active (Rhode, 1973; Tattersall, 1972; 1978; Tattersall et Gardiner, 1990).

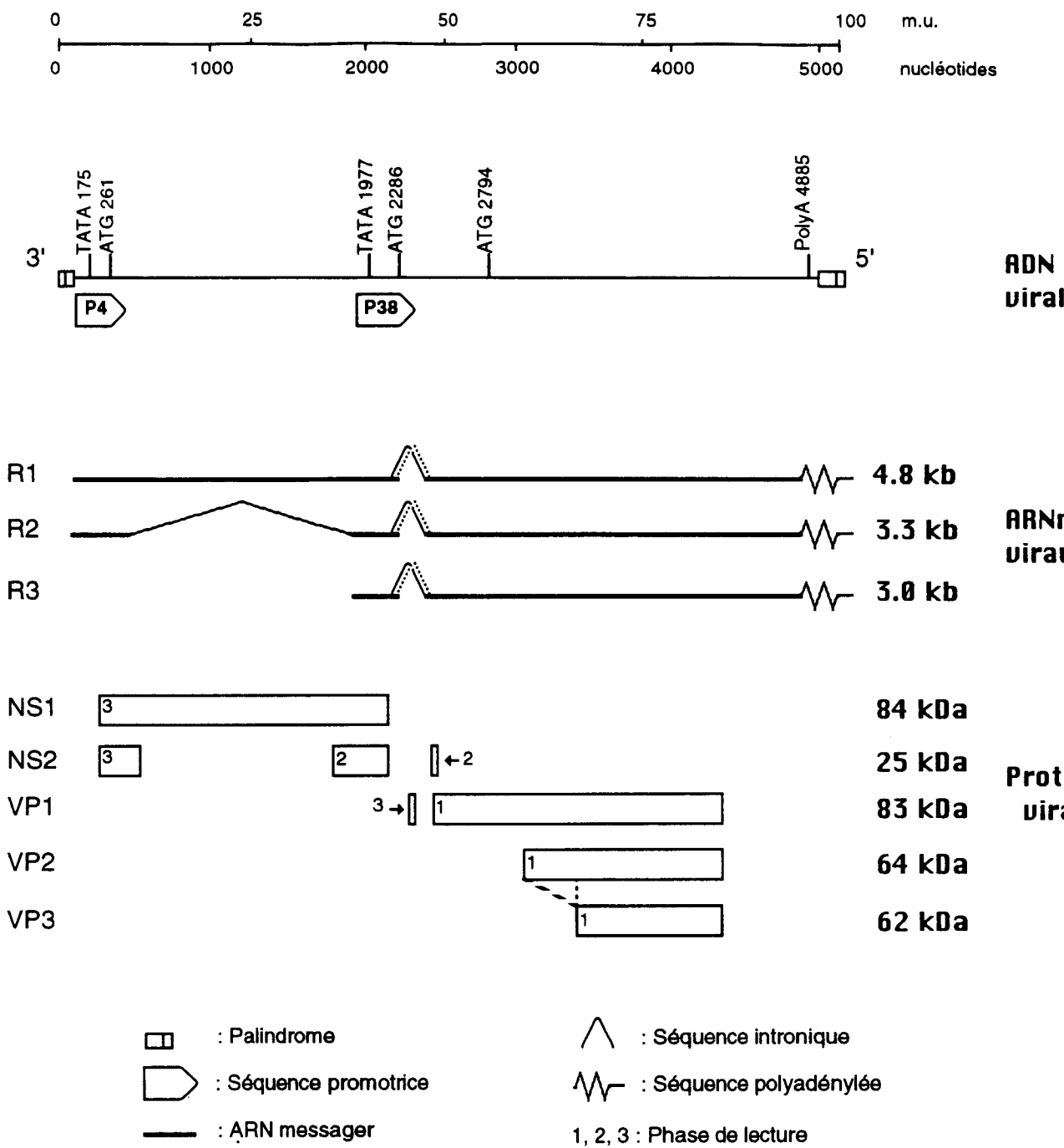
Une autre sélectivité, qui dépend des facteurs cellulaires, est l'oncotropisme. En effet, de nombreuses souches parvovirales ont été isolées à partir de cellules tumorales, en absence de toute contamination décelable dans les tissus sains correspondants. L'association fréquente entre les Parvovirus et les tissus néoplasiques d'origine humaine notamment, a initialement conduit à leur attribuer une fonction oncogène. En fait, cette association est d'ordre opportuniste, car il est maintenant démontré que les cellules transformées fournissent des fonctions nécessaires à la réplication parvovirale. La fonction oncogène des Parvovirus a été contredite par une série de travaux ultérieurs réalisés sur des animaux de laboratoire, qui ont montré que l'infection parvovirale entraînait, au contraire, une réduction de l'incidence de tumeurs spontanées ou induites par des virus oncogènes, par des cancérigènes chimiques, ou par des cellules néoplasiques transplantées (Guetta et al., 1986; Mousset et al., 1986; Yang, 1987; Cornelis et al., 1988a; Chen et al., 1989; Salomé et al., 1990). Ces observations ont permis de proposer la fonction "oncosuppression". En effet, l'apparition de tumeurs spontanées est réduite d'un facteur 20 chez des hamster syriens infectés de manière chronique par le Parvovirus H-1 (Toolan, 1967). De plus, sous certaines conditions, l'infection parvovirale permet la régression voire la disparition de tumeurs humaines implantées chez la souris nue (Dupressoir et al., 1989). Cette oncosuppression résulterait de l'interférence parvovirale avec l'induction de la transformation et/ou avec la croissance et survie des cellules tumorales, ces effets se trouvant être vérifiés *in vitro* et *in vivo* (Rommelaere et Tattersall, 1990; Rommelaere et Cornelis, 1991).

Les caractéristiques susmentionnées sont communes à la plupart des Parvovirus Autonomes isolés à ce jour (cf. Tableau I), et seules des variations de protéines de capsides et d'identité antigénique ont permis d'individualiser deux sous-groupes: les virus de sérotype FPV et ceux de sérotype RV auquel appartiennent les espèces MVM, H-1, B19 et Lu-III (Mengeling et al., 1986). L'un des Parvovirus le mieux caractérisé est le virus de la souris MVM, et son organisation génomique, qui est représentative de celle des autres Parvovirus Autonomes sera décrite dans le chapitre suivant. Les travaux décrits dans ce mémoire utilisent la souche MVMp.

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

Le Minute Virus of Mice ("minute" pour petit) est un contaminant d'un Adénovirus isolé en 1960 par Hartley et Rowe, à partir d'un adénocarcinome de souris. Il a été décrit par Crawford en 1966, purifié par Tattersall en 1972, puis rattaché au groupe des Parvovirus Autonomes par Ward et Tattersall en 1982.

Deux variants étroitement apparentés au Parvovirus MVM ont été isolés indépendamment. Le premier, fibrotropique, a été isolé en 1966 par Crawford et appelé MVMp ("p" pour prototype). Le second, lymphotropique, a été isolé d'une lignée de lymphome murin (EL-4), et dénommé MVMi ("i" pour immunosuppresseur) (Bonnard et al., 1976; MacMaster et al., 1981, Kimsey, et al., 1986). Bien que ces deux souches virales aient des spécificités tissulaires différentes, leurs ADN ont une très forte homologie de séquence (Sahli et al., 1985). Cette spécificité, est due à des différences en acides aminés des protéines de capsides (Astell et al., 1986; Antonietti et al., 1988; Gardiner et Tattersall, 1988b; Ballgoodrich et Tattersall, 1992), et à pour conséquence une baisse significative de la transcription virale précoce (x10) mais surtout une réduction importante de l'amplification de l'ADN (x100) dans les cellules non-



Carte détaillée des épissages médians



Figure 4: Organisation génomique de MVMP. Cotmore, 1990.

permissives (Ballgoodrich et Tattersall, 1992). Une des causes de ces variations transcriptionnelle et répllicative, serait l'interaction de VP2 avec des facteurs spécifiques du type cellulaire, très tôt après la pénétration, lors du transfert cytoplasme-noyau et de la décapsidation, mais aussi au moment de la maturation des virions (Gardiner et Tattersall, 1988a) (cf. § 1/2.4.1., p. 17).

2.2.1. Organisation génomique de MVMp.

2.2.1.1. Structure du génome.

Le génome de MVMp est un ADN monocaténaire linéaire de 5149 nucléotides. Il a été cloné par Merchlinsky en 1983, séquencé (Astell et al., 1983a; 1986) et analysé pour identifier la présence de séquences potentiellement impliquées dans la régulation de l'expression et de la maturation des ARN messagers viraux (Bodnar, 1988). Ce génome est à 90% sous forme simple brin (4828 nucléotides), et contient aux extrémités 3' et 5' des séquences pouvant adopter une structure palindromique. Ces palindromes sont des séquences répétée-inversées pouvant former des duplex pseudo-bicaténaires (épingle à cheveux), dont les conformations potentielles les plus stables sont schématisées dans la figure 3A (Bourgignon et al., 1976; Cotmore et Tattersall, 1987). Les extrémités palindromiques 3' (gauche) et 5' (droite) contiennent respectivement 115 et 206 nucléotides, soit 57 et 103 paires de bases lorsqu'elles sont sous forme de duplex (Figure 3: B et C) (Astell et al., 1979, 1983a, 1983b, 1985). Si le palindrome 3', qui sert d'initiateur "naturel" de la réplication, possède une structure unique, en revanche le palindrome 5' peut avoir 2 structures primaires qui sont les inverses complémentaires l'une de l'autre, dites "flip" et "flop", démontrées par les analyses de cartographie enzymatique et de séquençage (Astell et al., 1983a, 1983b). La présence équiprobable de ces configurations dans les formes répliquatives (double brin) monomériques du génome, isolées de cellules infectées (Astell et al., 1983a; 1983b; 1985) est expliquée par le mode de réplication dit de "modified rolling hairpin" (transfert de palindrome). La figure 4 représente l'organisation générale du génome de MVMp.

2.2.1.2. Organisation des unités de transcription.

Les deux régions transcrites sont situées uniquement sur le brin négatif, hormis les palindromes. L'une contient l'information nécessaire à la production des protéines NS1 et NS2, régulatrices de la réplication de l'ADN, l'autre à la production des polypeptides de capsid VP1, VP2 et VP3 (Figure 4). Deux promoteurs P₄ et P₃₈, situés aux positions 4 et 38 "mu" correspondant aux nucléotides 177 et 1977 (1mu=map unit ou unité génomique représente 1% de longueur totale) (Astell et al., 1983a; Pintel et al., 1983), contrôlent les deux unités de transcription qui se chevauchent partiellement. Ces promoteurs dirigent la transcription de trois ARNm viraux majeurs qui sont épissés et polyadénylés, et dont l'extrémité 5' non cappée se situe respectivement aux nucléotides 201 et 2005 (Pintel et al., 1983). Les deux plus grands ARNm, R1 et R2, de tailles respectives de 4,8kb et 3,3kb, contrôlés par le promoteur précoce P₄, représentent 10-15 et 15-20% de la population totale d'ARNm (Pintel et al., 1983). Le troisième transcrit R3-R3' de 3,0kb, contrôlé par le promoteur tardif P₃₈ est le plus abondant (65-70%)(Figure 4). Certains sites d'épissage et le site de polyadénylation sont communs aux trois transcrits, l'épissage intervenant entre 46 et 48 mu (Figure 4) (Pintel et al., 1983; Morgan et Ward, 1986), et la polyadénylation ayant lieu au site préférentiel situé au nucléotide 4885 (Clemens et Pintel, 1987).

L'ARNm R1 est traduit en une protéine non structurale NS1 (672 acides aminés; poids moléculaire de 83kDa) qui s'accumule dans le noyau à des temps précoces après l'infection. NS1 existe sous deux formes selon qu'elle est (83kDa), ou non phosphorylée (84-85kDa) (Cotmore et Tattersall, 1986b). Les formes phosphorylées sont très abondantes après l'infection, puis leur quantité diminue (Cotmore et Tattersall, 1986b). Ces variations semblent être associées à l'activité de NS1 dans la cellule infectée (Cotmore et Tattersall, 1986b; Cotmore, 1990). Les fonctions de NS1 seront traitées ultérieurement (cf. § I/2.2.2., p. 10).

L'ARNm R2 est caractérisé par l'épissage de deux introns induisant deux changements de cadre de lecture (Jongeneel et al., 1986; Cotmore et Tattersall, 1986a). R2 est traduit en une protéine non-structurale NS2 de poids moléculaire de 25kDa. NS2 est localisée dans le cytoplasme, et sa demi-vie est inférieure à 3 heures (Cotmore, 90; Cotmore et Tattersall, 1990). L'épissage du petit intron en 3' (2280-2377) entraîne la formation de trois isoformes de NS2 différentes par leur séquence C-terminale et leur taux de phosphorylation (Jongeneel et al., 1986; Morgan et Ward, 1986) (Figure. 4). Elles sont exprimées et dégradées au même taux (Cotmore et Tattersall, 1990), et leurs rôles respectifs restent encore inconnus, mais probablement pas désuets car ces trois isoformes sont très conservées chez les Parvovirus de rongeurs (Cotmore et Tattersall, 1990). Le taux global de NS2 est 3 à 4 fois supérieur à celui de NS1, entre 6 et 12 heures post-infection, cette situation s'inversant en fin d'infection (Cotmore et Tattersall, 1990), alors que le nombre de transcripts R2 est 4 à 8 fois supérieur à celui de R1 (Schoborg et Pintel, 1991). Ces observations suggèrent une régulation différentielle de l'amorçage de la transcription et de la traduction. Les protéines NS2 interviendraient dans la synthèse de l'ADN et des protéines virales (Li et Rhode, 1991) et auraient des effets sur la production des particules virales (Brownstein et al., 1992). Ces fonctions seraient toutefois exclusivement limitées aux cellules de l'hôte naturel du virus (Naeger et al., 1990; Cater et Pintel, 1992). Cependant, il se pourrait que moins spécifiquement, NS2 régule une ou plusieurs activités de NS1 par compétition, car NS1 et NS2 ont en commun 84 acides aminés dans leur région aminoterminal, l'extrémité carboxyterminale portant les fonctions propres de NS2 (Cotmore et Tattersall, 1986b; Cotmore, 1990).

Les ARNm R3 et R3' sont traduits tardivement au cours de l'infection, et au même taux, en deux protéines structurales VP1 et VP2, de taille respective de 83 et 64kDa (Labienc-Pintel et Pintel, 1986). La traduction différentielle de ces deux transcrits est due à un épissage hétérogène du petit intron avec changement de cadre de lecture. L'ARNm R3 est traduit en protéine de capsid VP1 à partir de l'AUG₂₂₈₆, tandis que R3' est traduit en VP2 à partir de l'AUG₂₇₉₄. Le rapport quantitatif de cinq VP2 pour une VP1 est proportionnel au rapport de leurs ARNm respectifs (Clemens et Pintel, 1988). La troisième protéine structurale VP3 (62kDa), qui n'apparaît qu'après l'assemblage de la capsid et l'empaquetage du génome viral, est dérivée de VP2 par clivage protéolytique, supprimant les 20 premiers acides aminés de l'extrémité NH₂-terminale (Tattersall et al., 1976; 1977). Cette nouvelle extrémité amino-terminale riche en glycine est hydrophobe et intervient lors de la pénétration du virus dans la cellule hôte (Cotmore et Tattersall, 1987). Aucune de ces trois protéines ne semble être toxique pour la cellule qui les synthétise (Labienc-Pintel et Pintel, 1986). Outre leur rôle de constituant de la capsid, elles "déterminent" les deux souches de MVM (cf. § I/2.2., p. 7).

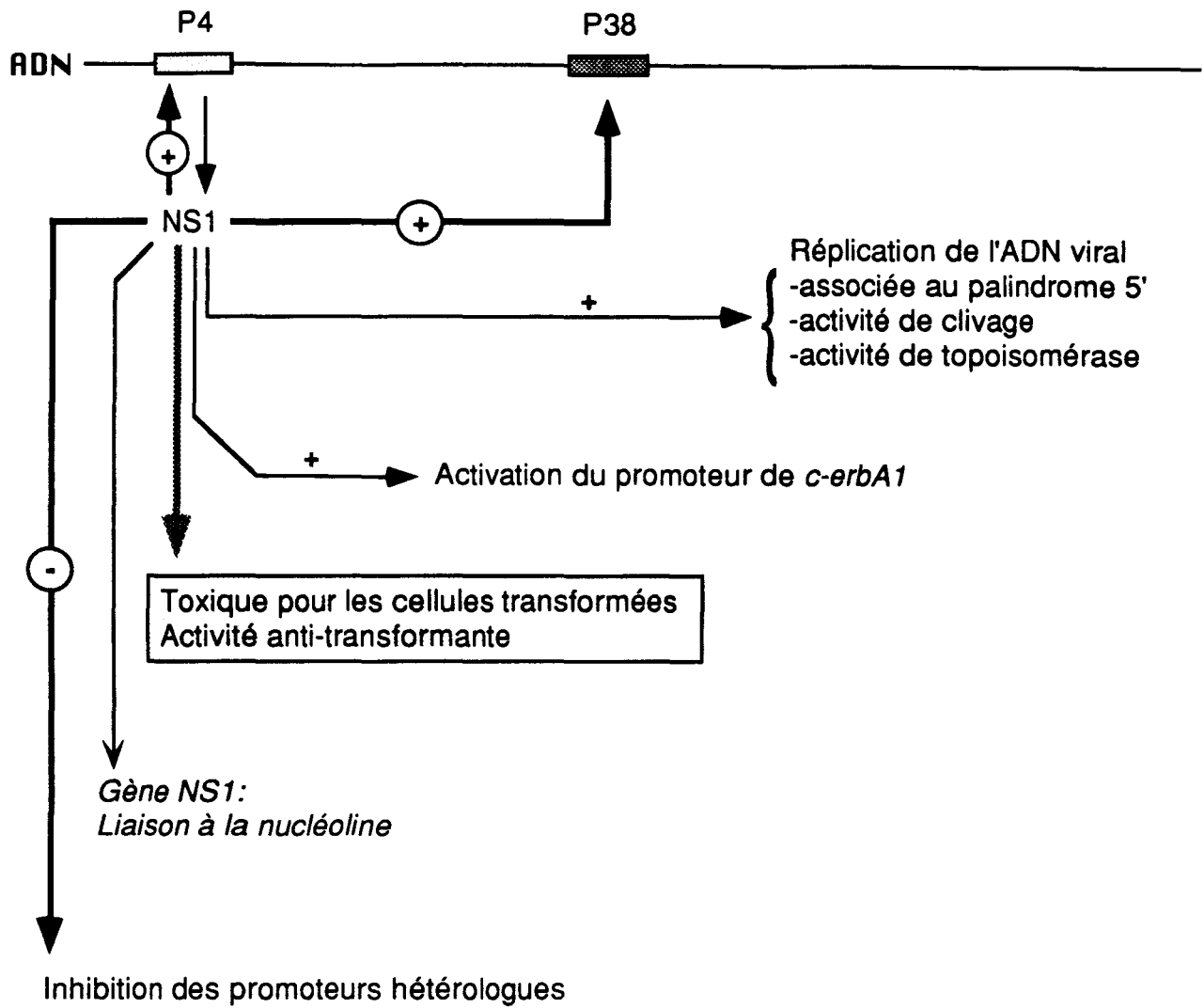


Figure 5A: Action de NS1 : régulation des promoteurs, réplication de l'ADN, cytotoxicité.

2.2.2. Nature et fonction de la protéine Non-Structurale NS1.

La protéine NS1 est nucléaire, et elle a une demi-vie supérieure à 6 heures (Cotmore et Tattersall, 1986b; 1990; Cotmore, 1990). Elle peut être modifiée post-traductionnellement par la phosphorylation de résidus serine, sans qu'aucune fonction particulière y ait été associée (Paradiso, 1984). NS1 est multifonctionnelle, et intervient non seulement dans la trans-activation ou -inhibition de promoteurs homo- ou hétérologues, mais aussi dans la réplication et l'encapsidation de l'ADN viral, ainsi que dans la cytotoxicité (Figure 5A).

En 1985, Rhode a démontré que le promoteur P₃₈ du Parvovirus H-1 (apparenté à MVM) est activé en trans par le produit d'un gène viral, et que cette trans-activation disparaissait quand il introduisait une mutation dans le gène NS1. Il faut souligner que, malgré la faible homologie de séquence entre AAV et MVM ou H-1, le même type de régulation a été mis en évidence pour P₄₀ de AAV qui est stimulé par les protéines Rep68/78 (Mendelson et al., 1986). D'ailleurs, les protéines Rep (AAV) sont elles aussi capables de transactiver le promoteur P₃₈ de MVM (Familia et al., 1993).

En 1987, Rhode et Richards ont caractérisé une séquence nommée TAR (pour Trans-Activating Responsive element) située en amont du promoteur P₃₈ de H1, entre les nucléotides 1860 et 1875, qui transmet la stimulation de P₃₈ par la protéine NS1. La même régulation a été trouvée chez MVM, ce qui n'est pas surprenant car H-1 et MVM ont des séquences homologues à 91.4%. La protéine NS1 est nécessaire et suffisante pour trans-activer P₃₈ (Doerig et al., 1988) via une séquence consensus TAR très similaire à celle de H-1: 3'- CNTGGTTGGTNA-5'.

TAR	Promoteur	Séquence ---core---	Position / Promoteur
H-1	P ₃₈	gtg CTTGGTTGGTAAA gaa	-139 à -127
MVM	P ₃₈	gtg CTTGGTTGGTGAA gaa	-138 à -126

La région TAR transmet l'activation par NS1 du promoteur P₃₈ quelque soit son orientation, mais placée en amont du promoteur précoce de SV40, elle est incapable de le rendre trans-activable par NS1 (Rhode et Richards, 1987). Dans les cellules Hela synchronisées, des facteurs cellulaires activent le promoteur P₄, qui dirige la synthèse progressive de NS1 transactivant le promoteur P₃₈ (Clemens et Pintel, 1988). La transactivation du promoteur P₃₈ par NS1 est directement responsable de l'augmentation des transcrits R3 et coïncide avec la diminution des messagers R1 et R2 (Clemens et Pintel, 1988).

On observe une variation de l'efficacité fonctionnelle de la séquence TAR selon le type de cellule (Rhode, 1987; Doerig et al., 1988), qui pourrait être expliquée par le fait que l'activité de NS1 dépend de facteurs cellulaires spécifiques de l'état transformé, et peut-être aussi impliqués dans la transcription parvovirale. Cette hypothèse est étayée par l'observation que les cellules transformées sont enrichies en messagers précoces R1, R2 et en protéines non-structurales correspondantes, alors que la quantité d'ADN viral accumulée est équivalente à celle présente dans les cellules normales correspondantes. Il s'agit là d'un réel enrichissement en messagers et non pas de leur stabilisation (Cornelis et al., 1988b; 1990; Van Hille et al., 1989).

En 1990, Doerig et al. ont mis en évidence une seconde séquence TAR (CNTGGTTGGTNA), similaire à celle de P₃₈, située entre les nucléotides -107 et -95 en amont du promoteur P₄. Leurs études montrent que NS1 transactive son propre promoteur (Doerig et al., 1990; Legendre et Rommelaere, 1992). Cette autoactivation pourrait s'expliquer par le fait que NS1 participe à la réplication de l'ADN, et que sa présence est nécessaire durant tout le cycle de réplication (Gunther et Tattersall, 1988).

(cf. § 1/2.4.2., p. 17). L'autorégulation par atténuation de la synthèse de NS1 sera décrite dans le paragraphe 1/2.2.4., p. 14.

La séquence TAR transmet l'activation par NS1, mais pas par NS2 (Doerig et al., 1988, 1990; Legendre et Rommelaere, 1992). Cependant, il est prématuré de conclure sur la manière dont agit NS1, d'autant plus que le rôle de la séquence TAR reste sujet à controverse (cf. § 1/2.2.3.2., p. 13). Pourtant, il est concevable d'envisager que NS1 puisse agir de manière indirecte, dans la mesure où elle ne se lie pas à la séquence TAR. Cette hypothèse paraît d'autant plus vraisemblable que Gavin et Ward (1990) ont identifié deux protéines cellulaires, l'une de 75kDa dont l'augmentation est concomitante à l'activation de P₃₈ après l'infection, l'autre de 83kDa diminuant fortement au même moment. Afin de localiser plus précisément les régions de NS1 impliquées dans l'activation transcriptionnelle, différents mutants ont été testés pour leur efficacité à compléter un mutant de MVM déficient pour NS1. Ceci a permis d'identifier les acides aminés essentiels au pouvoir trans-activateur de NS1 sur le promoteur tardif P₃₈ (région C-terminale: 467-468 et 543-544) (Legendre et Rommelaere, 1992; Skiadopoulos et al., 1992), ainsi que ceux requis pour la réplication de l'ADN parvoviral (Legendre et Rommelaere, 1992).

Il a aussi été démontré que NS1 était capable de réguler négativement des promoteurs viraux hétérologues (SV40, RSV, HSV-*tk*, *ck-c-mil*) ne possédant aucune région TAR ou similaire (Rhode et Richards, 1987; Dupont et al., 1990; Perros et al., 1992; Vanacker et al, soumis). Cette inhibition fait intervenir l'extrémité C-terminale de la protéine NS1 et est renforcée par la présence de NS2.

Outre ses propriétés régulatrices de l'expression temporelle des deux unités de transcription (Clemens et Pintel, 1988; Schoborg et Pintel, 1991) (Figure 5A), la protéine NS1 assure au moins quatre autres fonctions indispensables au bon déroulement du cycle viral (cf. § 1/2.4.2., p. 17):

1-NS1 est requise pour l'excision du génome viral des clones moléculaires plasmidiques de MVM (Merchliński, 1983; Li et Rhode, 1990). Il faut souligner que NS (Rep) de Lu-III assure cette même fonction de "nickase" (Rhode, 1989), de même que Rep68 pour l'AAV (Snyder et al. 1990a; 1990b).

2-NS1 a un domaine de fixation de l'ATP ("ATP-binding") et d'activité ATPase, un site de liaison à l'ADN ("DNA-binding") (Astell et al., 1987), et une activité hélicase (Wilson et al., 1991), suggérant son action dans les processus de réplication et de transcription. En 1990, Li et Rhode ont montré qu'une mutation de la Ser₄₀₅ dans le domaine "DNA-binding" inhibait la réplication de l'ADN et la trans-activation de P₃₈, et annulait la cytotoxicité de la protéine NS1. Toutefois, l'inhibition de la réplication observée ne permet pas d'identifier si l'activité touchée par cette mutation est "ATP-Binding", ATPase, ou hélicase. D'autres mutations dans ce domaine ont été faites et affectent simultanément trois fonctions de NS1: réplication de l'ADN, cytotoxicité, et trans-activation de P₃₈ (Li et Rhode 1990; Legendre et Rommelaere, 1992; Skiadopoulos et al., 1992). Les différents mutants construits par Legendre et Rommelaere (1992) montrent qu'il est possible de dissocier les fonctions de NS1 dans la réplication et la régulation transcriptionnelle, mais sa cytotoxicité semble être directement liée à sa capacité à trans-inhiber les promoteurs hétérologues.

3-NS1 intervient de par son activité "nickase" et topoisomérase dans la résolution des formes répliquatives ("RF") de l'ADN viral (Cotmore et Tattersall, 1992).

4-NS1 se fixe covalamment aux extrémité 5' des formes répliquatives de l'ADN monocaténaire des virions néoformés et dirige l'encapsidation de l'ADN (Cotmore, 1990).

Promoteur P4

Brin -
5'

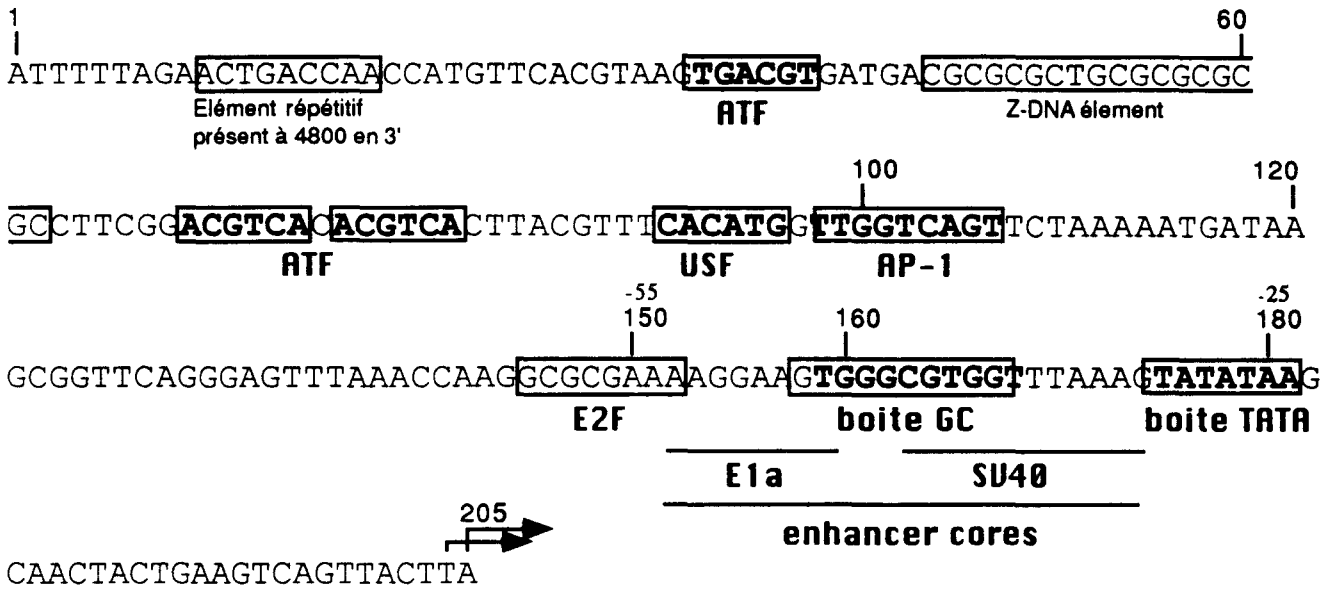


Figure 5B: Promoteur P4 de MVMp et sa séquence de régulation. Ahn et al., 1989; Bodnar et al., 1988; Pitluk et Ward, 1991.

Nous avons traité jusqu'ici des propriétés régulatrices de NS1, ainsi que de son implication dans le déroulement du cycle viral. Cependant, cette protéine est aussi directement responsable de la cytopathogénicité accrue des Parvovirus vis à vis des cellules transformées. De plus, une corrélation nette a pu être établie entre la transformation néoplasique et la stimulation de l'amplification des intermédiaires de réplication de l'ADN viral et l'expression des gènes viraux codants pour les protéines non-structurales (Cornelis et al., 1990). Il ressort des comparaisons de différents systèmes cellulaires, dont la sensibilité au Parvovirus diffère, que le niveau de synthèse de la protéine NS1 ainsi que la synergie entre les protéines NS1 et NS2 sont déterminants pour la toxicité, alors que la transactivation de P₃₈ en est indépendante. Ceci est corroboré par le fait que la mort des cellules transformées peut intervenir sans que le cycle viral ne soit accompli, c'est à dire sans qu'aucun virion ne soit produit (Guetta et al., 1990). De même que Brandenburger et al. (1990), Browstein et al. (1992) ont démontré que NS2 était nécessaire à la toxicité *in vivo*: l'infection par des mutants n'exprimant pas NS2 étant moins toxique que celle par des virus sauvages. Les résultats obtenus par Caillet-Fauquet et al. (1990) montrent que l'induction d'une expression continue de NS1, obtenue au moyen d'un clone moléculaire du gène NS1 placé sous le contrôle d'un promoteur induit par la dexaméthasone, provoque l'accumulation intracellulaire de quantité suffisante de protéine NS1 pour déclencher la mort cellulaire. L'isolement de clones résistants à ce traitement suggère que cette toxicité est transmise par des facteurs cellulaires, revenant ainsi au modèle d'action de NS1 dépendant d'effecteurs cellulaires spécifiques. Bien que le mécanisme par lequel NS1 induit la mort cellulaire ne soit pas encore élucidé, il est possible d'envisager qu'il soit lié à l'action inhibitrice de NS1 sur les promoteurs cellulaires (Legendre et Rommelaere, 1992).

NS1 inhibe aussi la transformation cellulaire. De ce point de vue, il semble NS1, empêcherait l'amplification de l'ADN induit par l'action des agents cancérogènes d'initiation (Mousset et Rommelaere, 1982; Cotmore et Tattersall, 1987; 1988; Berns et Bohenzky, 1987). Toutefois, NS1 n'est pas seule responsable de l'inhibition de la cancérisation, mais son action dépend du degré de transformation de la cellule (Mousset et Rommelaere, 1988). Une autre donnée récente concernant l'action anti-néoplasique de NS1, impliquerait le gène NS1 et une protéine nucléaire de 102kDa, la nucléoline (Avalosse et al., 1989; Barrijal et al., 1992). Il a été démontré que le gène NS1 possédait une séquence de 120 nucléotides comportant des sites d'interaction avec la p102. Le rôle de la nucléoline étant essentiel à la genèse des ribosomes et donc à l'expression protéique, sa séquestration par interaction avec NS1 aurait pour double conséquence son indisponibilité pour les besoins cellulaires et le contrôle du cycle parvoviral.

Un chapitre complet sera consacré, ultérieurement, au phénomène d'oncosuppression par les Parvovirus (cf. § 1/3., p.20).

2.2.3. Organisation des promoteurs.

2.2.3.1. Le promoteur P₄.

P₄ est considéré par la plupart des auteurs comme un promoteur constitutif fort, dans les cellules permissives aux Parvovirus. Il possède une boîte TATA (TATA box) située à -25 nucléotides du site d'initiation de la transcription. Une boîte GC (GC box) fonctionnelle est localisée à -55 nucléotides du site d'initiation. Anaogque à la séquence de reconnaissance du facteur de transcription humain SP1, 5' -TGGGCGTGGT- 3', elle semble interagir un facteur SP1-like murin (Ahn et al., 1989),

Promoteur P38

Brin -
5'

1840

ACAAAAATGAATGGCCCATGATTTGTGCTTGGTTGGTAAAGAATGGTTACCAATCTACCA

"AP1"

1899

homologie avec TAR H-1

boite CAAT

TGGCAAGCTACTGTGCTAAATGGGGCAAAGTTCCTGATTGGTCAGAAAACITGGGCGGAGC

SP1

1959

"AP1"

boite GC

-25
1980

CAAAGGTGCCAACTCCTATAAATTACTAGGTTTCGGCACGCTCACCATTTCACGACACCGA

boite TATA

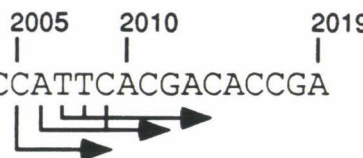


Figure 5C: Promoteur P38 de MVMP et sa séquence de régulation.
Ahn et al., 1989; Gavin et Ward, 1990.

et selon Pitluk et Ward (1991), l'interaction du facteur SP1 couvrirait la région TATA-GC (Kumar et Sharma, 1993). Il semblerait d'après les expériences menées dans notre laboratoire que le facteur SP1 se liant à la boîte GC est modifié qualitativement et quantitativement par la transformation (Faißt, S. et Perros, M., communications personnelles). Les boîtes TATA et GC sont décrites comme étant essentielles à la fonction du promoteur P₄. En effet, des mutations ponctuelles ou des délétions dans la boîte GC diminuent l'activité du promoteur P₄, et cette diminution est accentuée par l'augmentation de l'état transformé de la cellule. Les travaux de Ahn et al. (1989) montrent qu'il existe une série de motifs situés en amont de P₄ (de -139 à -55) responsables de l'optimisation de sa transcription. L'existence d'autres motifs de régulation a été suggérée par Bodnar (1988), par comparaison avec les séquences régulatrices de SV40 et du virus du polyome (Figure 5B).

1-aux nucléotides 34, 69 et 76, il y a trois séquences de type 5'-TGACG(T/A)-3', qui sont des sites potentiels de fixation des facteurs de transcription de la famille ATF (ATF1 à ATF6). Il est très intéressant de noter que, au moins pour ATF2, ce facteur de transcription n'est actif qu'en interagissant avec le produit du gène E1a de l'Adénovirus, qui apporte un domaine d'activation transcriptionnel fonctionnel. Cette séquence est présente quatre fois dans le génome de l'AAV2, et permet probablement l'activation de la réplication des AAV par la protéine E1a de l'Adénovirus "helper" (Bodnar, 1988). Elle est probablement aussi impliquée lorsque MVM se réplique dans les cellules Hela en présence de l'Adénovirus (Bodnar, 1988; Walton et al., 1989).

2-en position 100, il y a un site AP1 qui coopère avec un site USF immédiatement adjacent (CACATG entre les nucléotides 91 et 96) pour la fixation d'un complexe USF-Fos (Plaza et al., soumis).

3-aux nucléotides 146 à 152 un motif spécifique du facteur de transcription E2F [5'-TTTCGCGC-3'] ne semble pas être fonctionnel (Ahn et al., 1989).

4-entre les nucléotides 153 et 162, il existe un motif analogue à l'enhancer du virus du polyome. Cette séquence comprend l'élément [AGGAAGTG] présent dans l'enhancer du gène E1A de l'Adénovirus 5.

5-entre les nucléotides 167 et 175, une séquence [GTGGTTTAAAGT] est homologue à une séquence présente dans l'enhancer de SV40 (Bodnar, 1988).

Tous ces motifs sont très conservés dans les Parvovirus murins et canins, et sont probablement fonctionnels (Bodnar, 1988).

6-entre les nucléotides 153 et 158, une séquence consensus PEA3: [AGGAAG] et entre 234 et 241 un site potentiel de fixation AP1: [TGACGTGA], ont pu être mis en évidence, mais ce dernier n'est pas fonctionnel.

La présence des protéines cellulaires reconnaissant spécifiquement ces séquences semble dépendre du degré de transformation cellulaire, expliquant ainsi l'activité différentielle de P₄ selon l'état néoplasique ou normal de la cellule.

2.2.3.2. Le promoteur P₃₈.

Le promoteur P₃₈ a une activité constitutive faible et est activé par la protéine NS1. Le promoteur P₃₈ possède comme le promoteur P₄ la même boîte TATA-GC située entre les positions -23 (1986) et -55 (1950) en amont du site d'initiation de transcription (Figure 5C). Gavin et Ward (1990) ont montré qu'une délétion dans la boîte GC bloque l'initiation de la transcription *in vitro* et *in vivo*. Ces travaux ont été confirmés et complétés par l'équipe de Ward (Ahn et al., 1992), qui a défini que les boîtes GC et TATA seules étaient nécessaires et suffisantes à l'activation par NS1 du promoteur P₃₈. Ces résultats s'opposent à ceux de Rhode sur le rôle de la séquence TAR (cf. § 1/2.2.2., p. 10), puisqu'ils démontrent que la délétion de la séquence TAR n'empêche pas l'activation par NS1 du promoteur P₃₈. Si le rôle de la

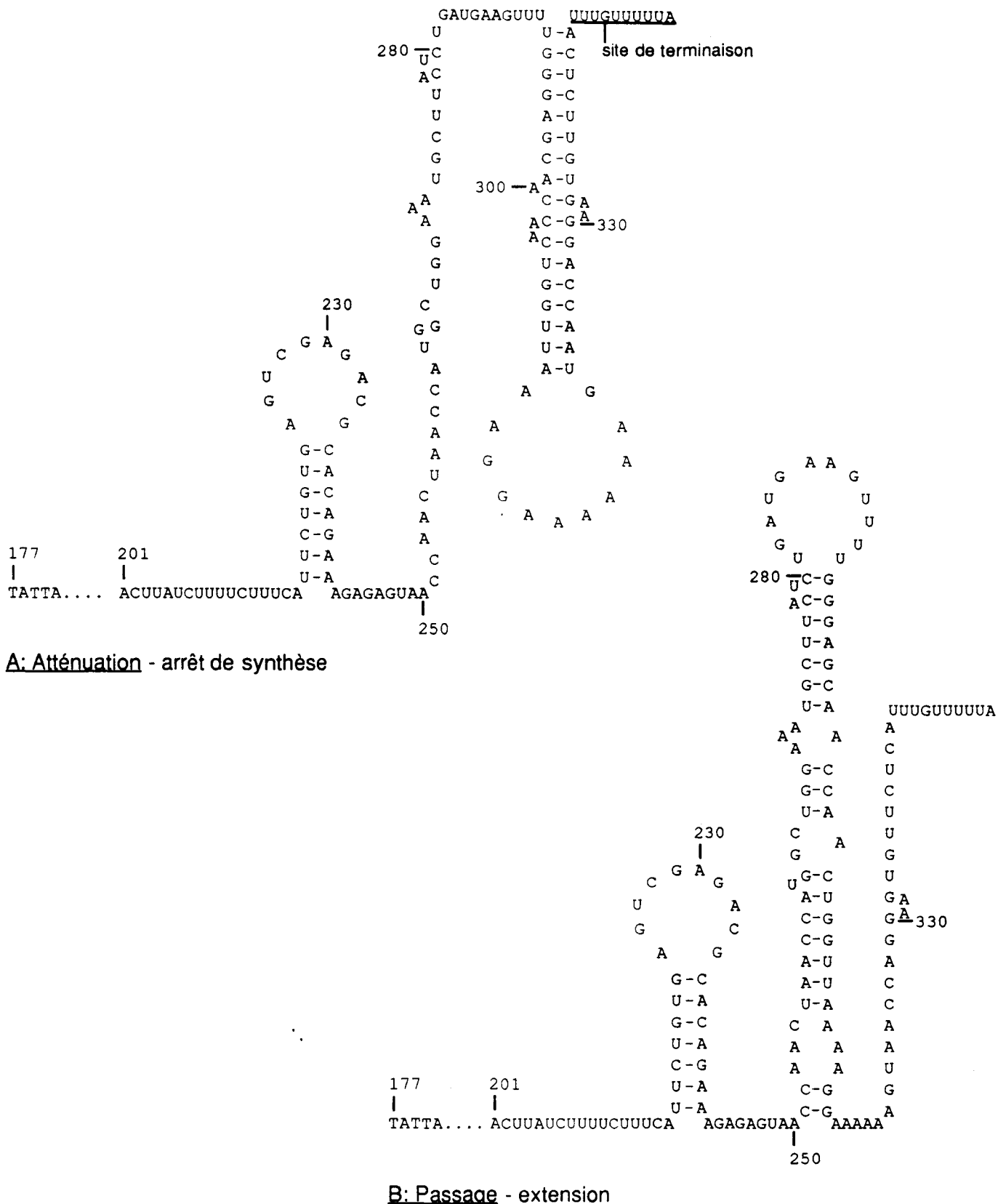


Figure 6: Conformation alternatives atténuation (A) et passage (B) de la régulation par atténuation du promoteur P4. Ben-Asher et Aloni, 1984.

séquence TAR reste controversé, en revanche le rôle prépondérant de NS1 dans l'activation du promoteur P₃₈ est maintenant établi. NS1 agirait en concert avec au moins deux protéines cellulaires (Gavin et Ward 1990; Ahn et al., 1992) (cf. § I/2.2.2., p. 10) et ceci est en accord avec les derniers travaux de Rhode (Gu et al., 1992) qui montrent l'existence de deux complexes se fixant sur la région TATA-GC. Outre cette région, d'autres sites potentiels de fixation de facteurs régulateurs ont été décrits:

- au nucléotide 1951, une séquence de fixation du facteur de transcription SP1 [GGGCGG] décrite par Gu et al. (1992) chez H-1 potentialise la transactivation de TAR par NS1.

- au nucléotide 1889, en amont de la boîte TATA, il y a une boîte CCAAT, [GGPyCAACT]. Cette boîte ne semble pas être essentielle, car elle n'est pas conservée dans le promoteur P₃₈ des autres Parvovirus Autonomes. En effet, elle est modifiée en [GGPyTGAAT] chez les Parvovirus canins CPV et félins FPV (Pintel et al., 1983; Cotmore et Tattersall, 1987). Toutefois les résultats obtenus par Gavin et Ward (1990) semblent indiquer que la CCAAT box serait fonctionnelle et un site de répression. Située à côté de TAR, la boîte CCAAT fixerait un répresseur en début de cycle viral qui serait déplacé par l'arrivée de NS1 activant TAR au moment de la synthèse des VP. Cette hypothèse est séduisante dans la mesure où le même type de régulation a été trouvé chez les AAV (Labow et al., 1986; Tratschin et al., 1986).

- des sites potentiels AP1 dégénérés seraient présents aux nucléotides 1862 et 1836. Mais aucune information n'existe quant à leur activité.

- Krauskopf et al (1990a; 1990b) ont mis en évidence en aval du second site d'initiation aux nucléotides 2287 et 2652, deux séquences qui régulent l'initiation de la transcription. La première séquence appelée DPE (Downstream Promotor Element) serait nécessaire pour assurer une initiation efficace de la transcription sous l'effet (in)direct de NS1. La seconde séquence serait impliquée dans la régulation négative de l'initiation de la transcription. Le rôle que pourrait jouer NS1 dans ce cas reste encore vague.

2.2.4. Régulation du promoteur P₄ par atténuation de la transcription.

Les aspects de la régulation de la transcription qui viennent d'être traités concernaient uniquement l'initiation. Cependant la transcription à partir du promoteur P₄ est aussi régulé au niveau de l'élongation des ARN messagers. Cette régulation appelée "atténuation" implique directement la structure primaire du transcrit, et c'est la structure secondaire qui est opérante dans l'atténuation. Les sites d'atténuation de la transcription ont été caractérisés par Rosenberg et Court en 1979. Ils sont définis par une région riche en cytosine suivie souvent par un motif palindromique, et une séquence de terminaison. C'est la structure secondaire palindromique du message en cours d'élongation qui est responsable de l'atténuation. Ce mode de régulation est fréquent chez les procaryotes, et chez les eucaryotes le gène *myc* est aussi régulé par atténuation. Aloni a démontré que l'atténuation régulait la transcription à partir du promoteur P₄ de MVM, *in vitro* et *in vivo*, conduisant à la formation d'un ARN de 142 nucléotides, transcrit entre les positions 201 et 342 (Ben-Asher et Aloni, 1984; Resnekov et Aloni, 1989). Une proportion importante de ces ARN atténués est synthétisée aux temps tardifs de la réplication. Ceci correspond à la régulation négative des transcrits R1 et R2. L'atténuation interviendrait sous l'effet de protéines virales agissant comme atténuateur en fin de cycle et anti-atténuateur au début du cycle viral stabilisant l'ARN dans l'une ou l'autre forme (Ben-Asher et Aloni, 1984). L'hypothèse d'une protéine atténuatrice de type VP est séduisante, et permettrait la synthèse temporelle et séquentielle des protéines traduites de messagers transcrits à partir des deux promoteurs. Ainsi, en réponse à la trans-activation du promoteur P₃₈

par NS1 il y aurait trans-inhibition par les protéines VP des ARN initiés à partir du promoteur P₄. Au niveau moléculaire, cette terminaison se ferait par la formation dans les messagers d'une structure secondaire dite "tige et boucles" ou "atténuation et passage" (Figure 6), qui ralentit l'ARN-Polymérase II et la stoppe au niveau de la séquence riche en uridine. Le décrochage de l'ARNm atténué de sa matrice d'ADN pourrait être expliqué par des interactions particulièrement instables créées entre l'ADN et l'ARNm atténué (Ben-Asher et Aloni, 1984; Resnekov et Aloni, 1989).

2.3. Interactions cellules hôtes-virus.

L'infection productive, nécessitant la permissivité cellulaire, se manifeste par la lyse de la cellule, sauf dans la cas particulier d'une cellule de rat (NRK transformée par l'oncogène *v-src* thermosensible) qui produit le virus sans lyser (Salomé et al., 1989). Cependant, il existe des interactions virus-cellule ne permettant pas de production virale. Elles sont de trois types: restrictive, cryptique et abortive (Tattersall et Gardiner, 1990).

2.3.1. Permissivité cellulaire.

Les cellules permises ont les caractéristiques suivantes:

1-ces cellules doivent appartenir à une espèce animale définie, les Parvovirus étant relativement spécifiques des hôtes qu'ils infectent.

2-elles doivent proliférer activement, la réplication virale étant sous dépendance de fonctions cellulaires exprimées temporairement durant la phase S ou G2 du cycle cellulaire (Tattersall, 1972; Rhode, 1973; Tattersall et Gardiner, 1990). Contrairement à d'autres virus, les Parvovirus sont incapables d'activer la multiplication de cellules quiescentes (Tattersall et Ward, 1978). Condition nécessaire à la réplication, la prolifération cellulaire n'est cependant pas suffisante. En effet, certaines cellules foetales ne sont pas sensibles au Parvovirus, la résistance s'expliquant par l'état de différenciation des cellules (Mohanty et Bachmann, 1974; Tattersall et Gardiner, 1990).

3-les cellules doivent être dans un état de différenciation déterminé, et il y a une différence de permissivité qui est fonction du degré de différenciation ou de transformation. En effet, la spécificité cellulaire de MVMi lymphotropique et de MVMP fibrotropique est due à des différences au niveau des gènes codant pour les VP et se manifeste par un blocage de la transcription et de l'amplification de l'ADN viral (Gardiner et Tattersall, 1988a). La sensibilité *in vitro* des tératocarcinomes murins dépend de leur état de différenciation (Tattersall, 1978). La sensibilité peut être fonction de l'oncogène responsable de la transformation. En effet, la plupart des oncogènes testés (*ras*, *myc*, *src*, AEV, SV40, PyV) sont capables de sensibiliser la cellule à l'effet cytopathique du virus, les cellules qu'ils transforment. Il existe cependant une exception, les fibroblastes de rat transformés par le virus du papillome bovin BPV-1, qui restent résistants à MVMP, bien qu'étant tumorigènes. Cette résistance peut être levée par la sur-transformation de ces cellules par un autre oncogène (Salomé et al., 1990).

Dans le cas d'une cellule non-permissive, la réplication de l'ADN viral est bloquée à différents niveaux (Cotmore et Tattersall, 1987).

2.3.2. L'infection cryptique.

Ce type d'infection se caractérise par l'internalisation du virus et par l'absence de toute réplication virale. L'infection cryptique est caractéristique des cellules quiescentes qui ne contiennent pas tous les facteurs cellulaires nécessaires à la réplication et à la transcription virale (cf. § 1/2.3.1., p.15).

Alors qu'un cycle lytique normal ne permet pas l'intégration du génome de MVM dans celui de la cellule, Tattersall et Gardiner (1990) envisagent une possibilité d'intégration lors d'infection cryptique ou restrictive, ce qui est le cas des AAV.

2.3.3. L'infection abortive.

Étudiée par Chen et al. (1986), cette infection, qui a lieu dans les cellules transformées, permet l'expression des protéines non-structurales et de capsides, à un taux équivalent à celui observé lors d'une infection productive. Mais dans la mesure où aucun virion n'est produit, le blocage intervient au niveau de la réplication de l'ADN. Ce type d'infection peut toutefois conduire à la mort cellulaire, non pas par lyse consécutive à une production virale, mais sous l'effet de la production de NS1, dont la cytotoxicité dans certains types cellulaires est reconnue (H-1 et MVMp).

2.3.4. Infection restrictive.

L'infection se déroule normalement jusqu'à l'étape 3 de la réplication produisant la forme répliquative monomérique (cf. § 1/2.4. p.17). Les étapes suivantes sont perturbées avec seulement 5 à 20% d'ADN produit comparé à une infection productive. Aucune synthèse de VP, ni donc de capside n'est détectable, révélant un blocage majeur au niveau de l'initiation de la transcription dû vraisemblablement à l'absence d'un facteur cellulaire activateur spécifique (Tattersall et Bratton, 1983). L'exemple le plus représentatif concerne les deux variants allotropiques de MVM, MVMp et MVMi. Bien que sérologiquement identiques, ces deux souches diffèrent l'une de l'autre par leur incapacité à se répliquer dans la cellule permissive pour l'autre souche. En revanche un hybride somatique de fibroblaste et de lymphocyte T permet l'infection productive pour les deux variants (Tattersall et Bratton, 1983). Ces résultats prouvent que les facteurs cellulaires requis pour l'initiation de la transcription virale sont spécifiques de l'état de différenciation de la cellule. La construction d'un virus recombinant MVMp-MVMi a permis de localiser une séquence dans le gène VP2 codant pour des déterminants allotropiques. Cette séquence de 235 nucléotides située entre les positions 3522 et 3757 diffère entre les deux variants, et comporte douze changements conservateurs et trois modifications de classes d'acides aminés, dont Pro_i -> Ser_p et Glu_i -> Gly_p (Astell et al., 1986; Antonietti et al., 1988; Gardiner et Tattersall, 1988a; 1988b; Ballgoodrich et Tattersall, 1992). Ces différences sont la cause de la spécificité allotropique des variants. En effet, Ron et al. (1984) ont sélectionné des mutants de spécificité d'hôte ("host range"), porteurs d'une mutation localisée dans cette séquence, pour lesquels le changement d'hôte devient possible. Antonietti et al. (1988) ont montré que par transfection de l'ADN de MVMi, il est possible d'obtenir une production virale par des cellules fibroblastiques permissives à MVMp. Ces derniers résultats démontrent le rôle déterminant que jouent les protéines de capside dans l'interaction virus-cellule, donc dans la spécificité cellulaire virale.

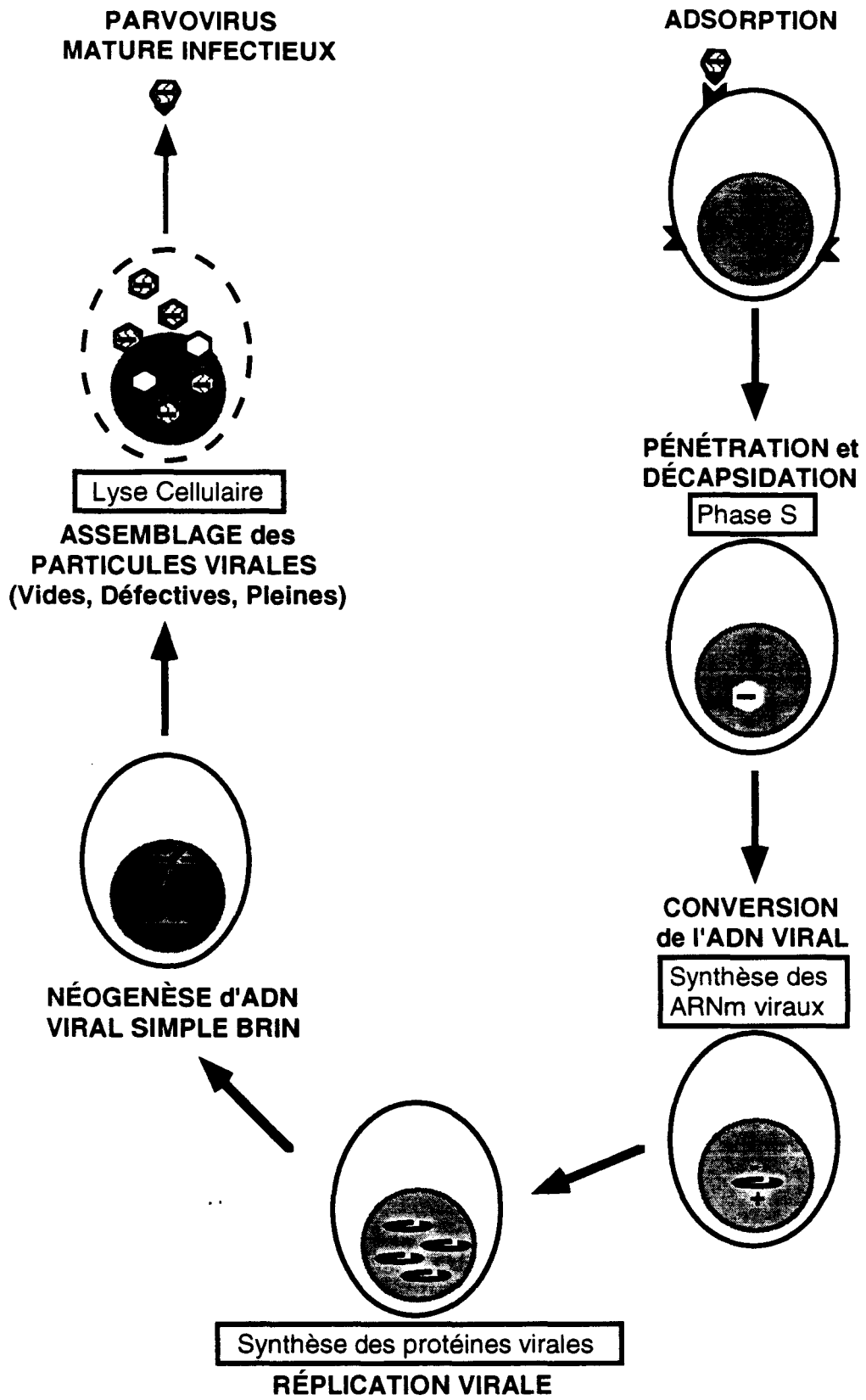


Figure 7: Cycle lytique de MVM.

2.4. Le cycle viral de MVMP.

2.4.1. L'infection virale.

Le cycle de MVMP débute par l'adsorption, réversible, du virus sur un récepteur membranaire spécifique, de nature glycoprotéique à acide sialique, l'acide N-acetyl neuraminique (Figure 7) (Ward et Tattersall, 1982; Tattersall et Gardiner, 1990). La présence, le nombre de représentants et l'accessibilité de ce récepteur dépendent de l'état de la cellule et notamment de son état de différenciation (Siegl, 1984). MVMP peut infecter *in vitro* de nombreuses cellules d'origine tissulaires et d'espèces différentes. Il y aurait 10^5 à 5×10^5 récepteurs spécifiques par cellule (Linser et al., 1977; Spalholz et Tattersall, 1983).

Le mécanisme par lequel se fait la pénétration du virus dans le cytoplasme est encore vague. Il s'agit probablement d'endocytose ou d'invagination de replis membranaires (Linser et al., 1977; Ward et Tattersall, 1982; Tattersall et Gardiner, 1990). Après pénétration, les particules virales migrent en direction du noyau, et sont décapsidées, ce qui libère le génome viral. Cette étape, dont les mécanismes sont encore mal connus, intervient entre 4 et 6 heures post-infection (p.i.) (Cotmore et Tattersall, 1987; Tattersall et Gardiner, 1990). Les trois étapes d'adsorption, pénétration et décapsidation peuvent avoir lieu dans toutes les cellules infectées, la seule restriction étant la présence de récepteurs spécifiques et fonctionnels (Cotmore et Tattersall, 1987; Tattersall et Gardiner, 1990). La notion de permissivité cellulaire est définie par la réplication de l'ADN viral.

2.4.2. La réplication de l'ADN viral.

La réplication qui se déroule dans la cellule en phase S peut être séparée en trois étapes (Tattersall et Cotmore, 1990):

1-la conversion de l'ADN monocaténaire parental en une forme répllicative ("RF") bicaténaire monomérique, par la synthèse du brin complémentaire.

2-l'amplification de la "RF" monomérique en dimère puis multimères, a lieu en fin de phase S.

3-le déplacement qui permet la dissociation des multimères en forme monocaténaire encapsidable, encapsidation qui dépend de la présence de capsides intègres (Richards et al., 1977; Muller et Siegl, 1983; Merchlinsky, 1984).

Toute réplication d'ADN fait nécessairement intervenir une matrice, une amorce, et l'enzyme effectrice: l'ADN polymérase. Lors de la réplication, les palindromes sont indispensables puisqu'ils servent d'amorce et de matrice à l'ADN polymérase. Ce type de séquence/structure est conservé chez tous les Parvovirus: AAV (Srivasta et al., 1983), Densovirus (Nakagi et Kawase, 1980) et B19 (Astell et Blundel, 1989). L'unique particularité des Parvovirus Autonomes dont H-1 et MVM (B19 excepté) à ce sujet, réside en le fait qu'ils possèdent des séquences palindromiques terminales 3' et 5' distinctes, par opposition aux ITR des autres Parvovirus. Le modèle de "modified rolling hairpin" (Astell et al., 1979; 1985; Astell, 1990), explique les différentes structures de l'ADN observées au cours du cycle viral: mono et bicaténaire, mono et multimérique, inversion de séquence au niveau du palindrome 5'. Ce modèle implique d'abord la copie, puis le réarrangement des séquences palindromiques terminales (Figure 8). Selon cette hypothèse l'extrémité 3' gauche du brin parental viral servirait d'amorce aux ADN-polymérases cellulaires (α ou γ) pour initier la synthèse du brin complémentaire (Cotmore et Tattersall 1987), conduisant à la formation de la "RF" monomérique (plus longue de dix-huit

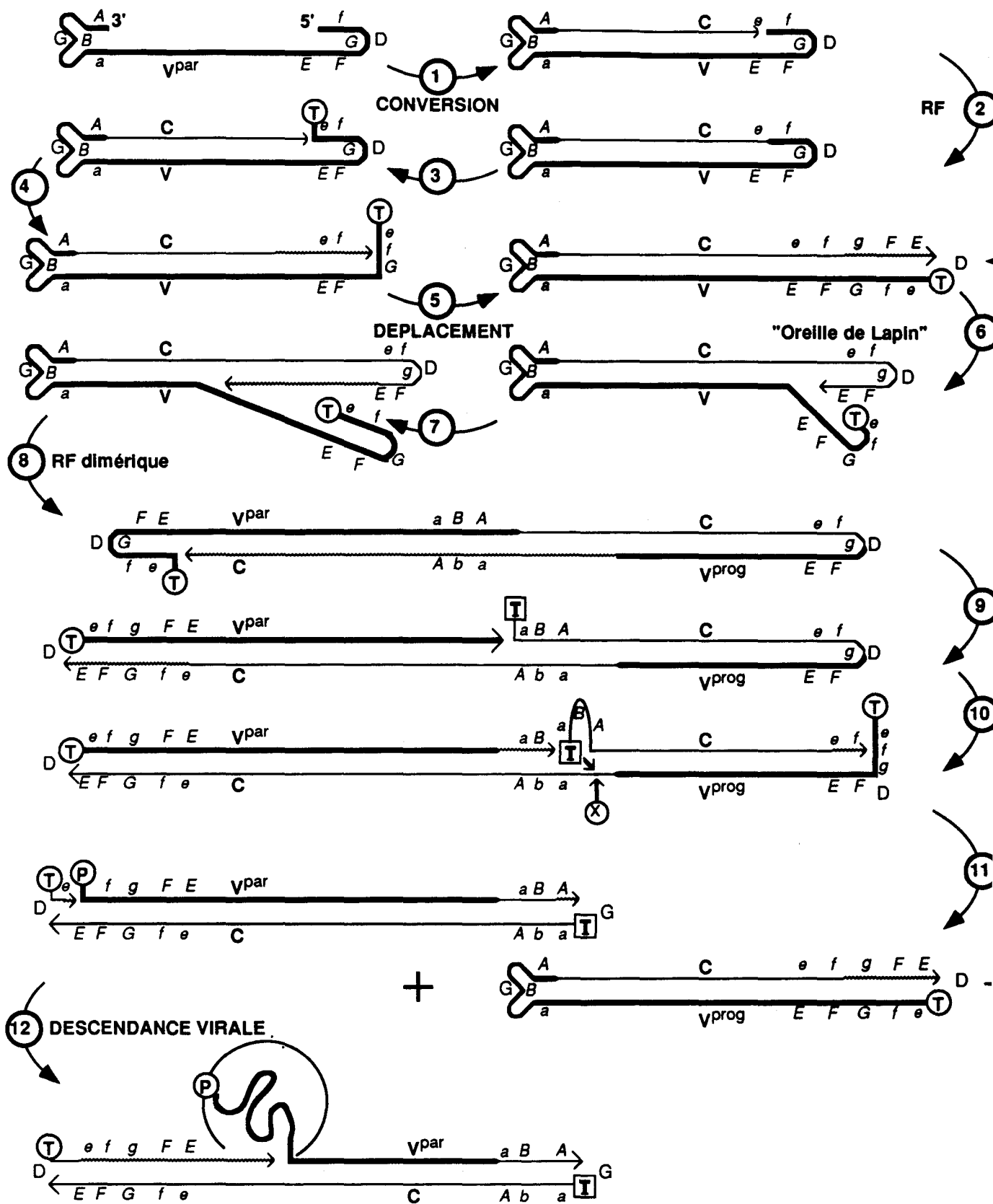


Figure 8: Réplication de l'ADN de MVMp: modèle de "modified rolling hairpin" Astell, 1990.

nucléotides), dont les deux extrémités gauches sont liées covalamment (Astell et al., 1985). C'est l'étape 1. A la fin de cette synthèse les extrémités 5' et 3' se retrouvent soudées l'une à l'autre (Cotmore et al., 1989). C'est l'étape 2. Ce duplex transitoire est clivé dix-huit nucléotides en amont de l'extrémité 5' du brin viral par une protéine terminale T d'origine virale - probablement NS1 - (Cotmore et Tattersall, 1988; Gunther et Tattersall, 1988; Tattersall et Cotmore, 1990). C'est l'étape 3. La protéine T reste liée covalamment à l'extrémité 5'. L'extrémité 3' dégagée par ce clivage sert alors d'amorce pour la synthèse par déplacement d'un nouveau brin d'ADN (étapes 4 à 8), formant une nouvelle "RF" dimérique de 10kb terminée à ses deux extrémités par le palindrome 5' apparié et ne possédant qu'une seule copie du palindrome 3' située en son milieu. La formation de ce dimère passe par la duplication du palindrome 5', puis son auto-hybridation en une structure dite en "oreilles de lapin" (étapes 5 et 6). L'extrémité 5' coiffée est déplacée et l'ADN Polymérase utilise alors comme amorce l'extrémité 5' non coiffée et prend pour matrice la première copie (étape 7), synthétisant une "RF" dimérique (étape 8). Par dépliage de l'extrémité 5' coiffée, l'ADN Polymérase termine la synthèse donnant une "RF" multimérique possédant le palindrome 5' apparié à droite et deux autres copies non appariées à gauche, ainsi qu'une copie du palindrome 3' en son milieu. Cette "RF" est clivée en monomère à l'extrémité gauche de chaque "dimer bridge" (palindrome central) par une topoisomérase terminale agissant sur le brin viral parental (étape 9), formant un monomère dépourvu de palindrome 5' et un dimère ne possédant qu'une seule copie du palindrome 3'. Une ADN polymérase synthétise les palindromes absents des deux monomères à partir de chaque extrémité droite. Un clivage opéré à droite du "dimer bridge" permet la séparation du dimère en deux monomères complets et un nouveau dimère par soudure sur l'extrémité droite restante (étape 10) (Cotmore et Tattersall, 1989). Ce clivage ou résolution est catalysé par la topo-isomérase et la soudure se réalise en présence d'une protéine X. Le nouveau dimère formé correspond à celui obtenu à l'étape 5, présentant un palindrome 3' apparié et deux copies du palindrome 5' non appariées, dont une coiffée par la protéine terminale. Au cours de cette étape 11, deux monomères sont aussi produits, qui seront séparés pour être encapsidés. L'encapsidation a lieu par l'intermédiaire d'une protéine P liée à l'extrémité 3' gauche du brin viral, qui dirige l'encapsidation progressive du brin néoformé. La maturation du brin néoformé se fait par la fixation d'une protéine terminale sur l'extrémité 5' sur un site spécifique situé à dix-huit nucléotides de l'extrémité gauche (étape 12). Ce fragment de dix-huit nucléotides permet la réinitiation de la synthèse d'un nouveau brin viral ainsi que le déplacement d'un brin viral néoformé.

L'analyse des séquences sur lesquelles sont fixées les différentes protéines semble démontrer qu'il s'agit d'une seule et même protéine multifonctionnelle (Astell et al., 1985; Tattersall et Cotmore, 1990). D'autre part, le fait que NS1 se lie covalamment à l'extrémité 5' des formes répliquatives des brins d'ADN néosynthétisés et apparaît à la surface de la capsid (Cotmore et Tattersall, 1989; Faust et al., 1989), suggère qu'elle serait cette protéine multifonctionnelle remplissant à la fois les rôles de nickase, topo-isomérase, et protéine terminale dans le processus de réplication (Cotmore et Tattersall, 1988; 1989; Gunther et Tattersall, 1988; Wilson et al., 1991). Les derniers résultats de Cotmore et Tattersall (1992) confirment ces hypothèses: NS1 est en effet impliquée à tous les niveaux de la réplication.

Le rôle de NS2 fut longtemps considéré comme mineur dans les processus de cytotoxicité et d'infection. Cependant, Naeger et al. (1990) ont démontré récemment que NS2 participait au processus de réplication. NS2 serait essentiel dans les cellules de souris, c'est à dire dans l'hôte naturel, où des virus portant un gène NS2 muté sont incapables de se répliquer. Cependant il semble que toutes les protéines virales soient impliquées dans la réplication. Afin d'évaluer cette hypothèse, Clemens

et al. (1990) ont construit une série de clones exprimant NS2, ou VP1 ou VP2, afin d'étudier les fonctions de chaque protéine.

Il faut noter que le modèle de "modified rolling hairpin" ne s'applique pas aux autres Parvovirus Autonomes. En effet H-1, Lu-III et B19 diffèrent par la nature des brins encapsidés; respectivement - brin négatif exclusivement, brin négatif ou positif aléatoire -, ainsi que par la nature des structures palindromiques - 3' et/ou 5' flip et/ou flop - (Astell, 1990). Bates et son groupe tentent d'homogénéiser toutes ces données en un modèle unique général aux Parvovirus Autonomes, qui tiendrait compte de la cinétique des variations des différentes formes répliquatives (Chen et al., 1989; Tyson et al., 1990; Chen et al., 1993).

2.4.3. La synthèse protéique.

La traduction des protéines non structurales NS1 et NS2 est précoce, dès 6 heures p.i., à partir des messagers transcrits sous le contrôle du promoteur P₄. La synthèse des protéines de capsides est plus tardive, car elles sont traduites à partir des messagers dont la transcription est contrôlée par le promoteur P₃₈, activé par NS1 (Tattersall et Gardiner, 1990) (cf. § I/2.2.1.1. et § I/2.2.1.2., p.8). La traduction a lieu dans le cytoplasme cellulaire, et, en fin de synthèse, les protéines migrent dans le noyau où elles sont assemblées en capsides.

2.4.5. Assemblage et maturation des virions.

Ces deux étapes du cycle viral ont lieu entre 20 et 30 heures après l'infection. Les mécanismes de l'assemblage des protéines de capside et leur organisation en capside restent hypothétiques. Toutefois, l'assemblage semble être indépendant de la présence ou non de l'ADN viral répliqué, comme le suggère le nombre important de virions non-infectieux (capsides vides). La nature des modifications de structure accompagnant la maturation des virions reste inconnue. Quant à l'encapsidation, elle-même assez complexe, elle semble impliquer des protéines virales et/ou cellulaires (Ward et Tattersall, 1982; Muller et Siegl, 1983; Cotmore et Tattersall, 1987), et notamment NS1 liée à l'extrémité 5' de l'ADN (Cotmore et Tattersall, 1988; Tattersall et Cotmore 1990), qui dirige l'encapsidation et qui reste présente à l'extérieur des capsides (Cotmore et Tattersall, 1989; Faust et al., 1989). A ce sujet, d'ailleurs, il faut noter deux points susceptibles de nous renseigner plus amplement sur le rôle joué par NS1 et les protéines virales ou cellulaires:

1-l'existence d'un nombre relativement important de particules virales défectives (MVM) qui ne contiennent que l'extrémité 5' du génome viral lié à NS1 - (Tattersall et Cotmore, 1990) sous-entend un rôle très probable des structures primaire et secondaire de l'ADN de cette extrémité (Tattersall et Cotmore, 1990).

2-l'encapsidation quasi exclusive du brin négatif (99%) chez MVM et H-1 (Cotmore et Tattersall, 1984; Tattersall et Cotmore, 1990).

L'assemblage des virions induit un changement morphologique observable du noyau cellulaire. Des modifications du matériel nucléaire ont été aussi décrites pour le Parvovirus H-1, mais peuvent être généralisées aux différents Parvovirus de rongeurs, dont MVMp. En effet, Rhode (1973) a mis en évidence une condensation de l'hétérochromatine et de la chromatine du nucléole intervenant dès 12 heures p.i., suivie de la désorganisation des fibres ribonucléoprotéiques du nucléole entraînant la formation de vacuoles nucléolaires, réceptacles de

l'accumulation des capsides néoformées (Moen et al., 1990). La phosphoprotéine majeure du nucléole, la nucléoline (p102), connue pour ses fonctions dans la synthèse des ARN ribosomiques et dans l'organisation de la chromatine, est associée à l'ADN viral (Avalosse et al. 1989; Barrijal et al., 1992). Cette protéine se lie systématiquement à l'extrémité 3' du brin négatif des ADN viraux néoformés (nucléotides 412-633 de NS1), mais son rôle dans la réplication virale est encore hypothétique. Les travaux de Bodnar et al. (1989) ont aussi montré que les extrémités 5' des "RF" sont associées à des "sites de liaison" de la matrice nucléaire aux temps précoces de l'infection (jusqu'à 20 heures p.i.). Plus précisément il s'agirait d'interactions entre l'ADN cellulaire et les palindromes 5', via la protéine terminale NS1. Ces interactions seraient cruciales tant pour la réplication de l'ADN viral que pour la transcription. Vers 30 heures p.i. un phénomène généralisé de marginalisation de la chromatine et de boursoufflement de la membrane nucléaire est observé, qui coïncide avec l'expulsion des virus dans le cytoplasme lui aussi désorganisé.

3. Activité anti-néoplasique des Parvovirus H-1, MVM et AAV.

Depuis leur découverte, dans les années 1960, les Parvovirus ont toujours été associés au cancer. Parce qu'isolés de tumeurs (Siegl, 1984), ils furent décrits comme potentiellement oncogènes (Tattersall et Ward, 1978; Bantel-Schaal et zur Hausen, 1984). Tous les travaux ultérieurs montrent, au contraire, que l'occupation tumorale par les Parvovirus n'est en aucun cas corrélée avec un risque accru de cancer (Toolan, 1967; Rommelaere et Tattersall, 1990; Rommelaere et Cornelis, 1991). La présence de virions dans les tumeurs est opportuniste et non causale. En effet, les Parvovirus ont un nombre limité de gènes et dépendent de leur hôte pour leur réplication. Les cellules transformées sont un milieu favorable à la réplication parvovirale (Rommelaere et Tattersall 1990), et leur cycle lytique est totalement subordonné à des fonctions cellulaires dépendantes de la prolifération et de la différenciation (Cotmore et Tattersall, 1987; cf. § 1/2.1., p. 6; § 1/2.3.1., p. 15).

3.1. Oncotropisme parvoviral.

Le besoin de fonctions cellulaire ou virale (virus "helper" des AAV) pour permettre leur réplication restreint considérablement le type de cibles potentielles des Parvovirus. Outre la présence de récepteur spécifique permettant l'adsorption virale, le contenu intracellulaire est l'élément limitant pour la réalisation d'un cycle viral complet. C'est de ce dernier que dépend la permissivité cellulaire (cf. § 1/2.3.1., p. 15). C'est ainsi que les Parvovirus infectent de nombreux types cellulaires mais se répliquent de manière sélective dans les cellules complétant leurs fonctions déficientes, les cellules transformées. Cet "oncotropisme" est confirmé par le fait que, jusqu'ici, aucun isolement de Parvovirus à partir de tissus normaux n'a été concluant (Kilham et Olivier, 1959; Rommelaere et Tattersall, 1990), exceptés pour H-1 et H-3 isolés de foetus humains ne présentant aucune pathologie particulière (Toolan, 1961).

Avec l'oncotropisme, la notion d'oncosuppression s'est aussi développée, suggérant que les Parvovirus interfèrent avec le développement tumoral, et impliquant que la transformation des cellules de mammifères, en particulier humaines, s'accompagne d'une sensibilité accrue à l'attaque parvovirale.

3.2. Oncosuppression parvovirale.

Les propriétés oncosuppressives sont reconnues aussi bien aux Parvovirus de rongeurs MVMp et H-1 qu'aux virus Adéno-Associés humains AAV1, 2, 3 ou 5 (Rommelaere et Tattersall, 1990). L'oncosuppression peut se présenter en six ou sept paragraphes rendant compte des mécanismes impliqués (Rommelaere et Tattersall, 1990; Rommelaere et Cornelis, 1991).

3.2.1. Persistance, latence et activation des Parvovirus.

La plupart des études qui ont permis d'attribuer aux Parvovirus et AAV un rôle anti-néoplasique, font état d'une infection persistante ou/et latente, vraisemblablement entrecoupée par des phases de production (Rommelaere et Tattersall, 1990). Même si aucun des travaux réalisés depuis 1959 (Kilham et Olivier) n'établit précisément s'il s'agit de persistance ou de latence, l'étude sérologique des animaux infectés suggère que le processus normal d'infection passe par l'une ou/et l'autre de ces deux possibilités (Rommelaere et Tattersall, 1990). En effet, on observe la production continue et à faible taux, d'anticorps dirigés contre les Parvovirus pendant une très longue durée et sans pathologie détectable. Le système immunitaire de l'hôte serait donc incessamment stimulé par les antigènes viraux présents à faible taux, ce qui empêcherait la neutralisation et l'éradication des virus. Cette hypothèse est étayée par plusieurs observations (Rommelaere et Tattersall, 1990):

1-l'isolement de particules infectieuses à partir de tissus chez des animaux endémiquement infectés présentant des taux significatifs d'anticorps anti-parvovirus.

2-la présence d'anticorps circulants à un taux appréciable est détecté durant toute la vie des animaux après la primo-infection.

3-la non-pathogénicité des infections chroniques latentes, sauf dans le cas de l'ADV (Aleutian Disease Virus) qui provoque une immunodéficience chez le vison.

4-l'intégration des AAV dans le génome cellulaire, où le provirus silencieux peut être activé par infection avec un virus "helper" (Hoggan et al., 1973; Handa et al., 1977; Walz et Schlehofer, 1989; Carter et al., 1990). Cette caractéristique est propre aux AAV et ne s'applique pas aux Parvovirus Autonomes pour lesquels il n'a jamais été mis en évidence de provirus intégré dans le génome hôte. La faculté d'intégration des AAV est probablement due à leurs structures terminales (ITR) très différentes de celles des Parvovirus Autonomes (palindromes).

5-l'apparition de différentes souches de Parvovirus de rat (RV) infectieux dans des animaux à priori exempts (non détectables) de ces virus, à la suite de la réactivation, par des traitements carcinogènes, de virus endogènes latents.

Ainsi, la persistance des Parvovirus Autonomes dans une population cellulaire résulterait soit en la restriction de leur multiplication au sein d'un réservoir de cellules sensibles constamment renouvelé, soit en l'établissement d'un mode de production non lytique.

Tableau 2: Effet inhibiteur des Parvovirus sur l'induction de tumeurs.

TRAITEMENT CANCÉROGENE	HOTE	AGENT ANTI Parvovirus Autonomes	-CANCÉREUX AAV	RÉFÉRENCES
<u>VIRUS TUMORIGENES^a</u>				
Adenovirus (Ad12, Ad31)	Hamster	+(H-1)	+(AAV-1 & AAV-2)	Kirschstein <u>et al.</u> 68 Toolan <u>et al.</u> Ledinko Mayor <u>et al.</u> 73. de la Maza <u>et al.</u> 81 Siegl. 84. Mayor <u>et al.</u> 73. Bergs. 69.
Papovavirus SV40	Hamster	+(H-1)	-(AAV-1)	
Rétrovirus (MoMuLV)	Rat	+(RV)	NR	
<u>CARCINOGENES CHIMIQUES^a</u>				
7, 12-DMBA	Hamster	+(H-1)	NR	Toolan <u>et al.</u> 88.
<u>CELLULES (tumorigènes) GREFFEES^b</u>				
Cellules de Hamster transformées par: - Adenovirus 5 ou 12	Hamster	NR	+(AAV-2)	Ostrove <u>et al.</u> 81. Cukor <u>et al.</u> 75. Blacklow <u>et al.</u> 78.
- Herpes simplex type 2	Hamster	NR	+(AAV-1)	
- Papovavirus SV40	Hamster	NR	-(AAV-1)	Cukor <u>et al.</u> 75. Blacklow <u>et al.</u> 78. Ostrove <u>et al.</u> 81.
- 9, 10 DMBA	Hamster	NR	-(AAV-2)	
- dimethylnitrosamine	Hamster	NR	-(AAV-1)	Cukor <u>et al.</u> 75. Blacklow <u>et al.</u> 78. Guetta <u>et al.</u> 86.
Cellules ascites d'Ehrlich	Souris	[MVM(p)]	NR	
Cellules NIH-3T3 transformées par l'oncogène c-Ha-ras activé	Souris	NR	+(AAV-2)	Katz <u>et al.</u> 86.
Cellules de sarcome veneral de chien.	Chien	+(FPV, CPV)	NR	Yang. 87.
Cellules humaines transformées par SV40	Souris Nude	+(H-1)	NR	Dupressoir <u>et al.</u> non publié

+: ≥ 50% inhibition de la tumorigénèse

- : sans effet significatif

NR : non reporté

^a : Parvovirus inoculé aux animaux nouveaux nés, avant ou au moment du traitement cancérogène

^b : Parvovirus inoculé aux cellules tumorales avant leur implantation ou dans l'animal au moment de leur implantation

3.2.2. Surveillance anti-néoplasique.

L'étude des effets de l'infection parvovirale persistante a permis de proposer que les Parvovirus protégeraient contre la tumorigenèse spontanée ou induite. Les premiers travaux réalisés par Toolan (1967) ont montré que des hamsters infectés chroniquement par des virus de rat H-1 et H-3 développaient 5 à 25 fois moins de tumeurs spontanées que leurs congénères non infectés. Ultérieurement il a été démontré que la surveillance parvovirale était aussi effective dans le cas de cancers induits par différents traitements (Tableau 2). Ainsi l'injection de MVMP empêche la croissance de tumeurs Ascitiques d'Ehrlich préétablies dans l'animal (Guetta et al., 1986). De la même façon, H-1 inhibe la croissance de xénogreffes de tumeurs mammaires humaines dans la souris nue (Dupressoir et al., 1989).

En outre, les analyses épidémiologiques menées sur la population humaine infectée par des Parvovirus humains AAV2/3/5, B19 (Sprecher-Golderberger et al., 1970; 1971; Mayor et al., 1976; Cukor et al., 1984; Georg-Fries et al., 1984; Myint et al., 1990) et murin H-1 (Siegl, 1984; Cotmore et Tattersall, 1987) ont montré qu'il y avait une corrélation inverse entre la séropositivité et le risque de cancer. Cependant l'homme peut développer un cancer malgré l'infection par des Parvovirus. Cet échappement à la surveillance parvovirale a été démontré tant par des études épidémiologiques que par des travaux *in vivo* qui ont montré qu'il y a parfois une incompatibilité entre le tropisme tissulaire du virus et la tumeur. Autant il est aisé d'observer une oncosuppression sans défaut *in vitro* dans des systèmes cellulaires parfaitement connus, autant la tumeur, résultant d'un processus multi-étapes et multifactoriel, est un tissu où il est difficile de prévoir si des Parvovirus auront un effet lytique. A cette restriction qualitative, s'ajoute une restriction quantitative mettant en jeu la quantité de virus susceptible de se répliquer librement ou non.

Les mécanismes par lesquels les Parvovirus s'opposent au développement de cancers, sont une "boite noire". Toutefois, cette "protection" n'empêche pas la réplication et la production de virus infectieux. Ces interactions virus-cellules permettant la production virale sont démontrées par les observations suivantes:

- les empreintes parvovirales (ADN et protéines) sont détectées dans les tumeurs en régression (Dupressoir et al., 1989). De plus, il y a un taux sérique important (par Western blot) d'anticorps anti-VP (Dupressoir, T., communication personnelle).

- la propagation virale se fait essentiellement dans les cellules transformées ou cellules immatures engagées sur une certaine voie de différenciation (Spalholz et Tattersall, 1983; Guetta et al., 1986; Mousset et al., 1986; Avalosse et al., 1987).

Pour résumer, la surveillance anti-cancéreuse, qui s'accompagne de la réplication parvovirale, se traduit par une sensibilité accrue des cellules transformées à l'action lytique parvovirale. Cette augmentation de sensibilité entraînant la mort cellulaire est qualifiée d'oncosuppression parvovirale (cf. § 1/2.3.1., p. 15).

3.2.3. Toxicité directe des Parvovirus sur les cellules (pré)néoplasiques.

Les deux principales exigences permettant la réplication (phase S et état de différenciation) sont retrouvées lors de la transformation cellulaire. En effet, la synthèse de la forme répliquative est dépendante de facteurs cellulaires présents durant la phase S du cycle cellulaire, et les cellules transformées "cyclent" de manière continue (Wolter et al., 1980). Quant à l'état de différenciation, qui définit la permissivité ou la production de virions, il est aussi spécifique de la transformation avec blocage

Tableau 3a: Sensibilité des cellules humaines au Parvovirus.

TYPE CELLULAIRE	ORIGINE	AGENT TRANSFORMANT	SENSIBILITÉ À H-1	PRODUCTION VIRALE	RÉFÉRENCES
Fibroblaste	prépuce rein poumon foie embryon fibrosarcome	SV40 SV40 SV40 / rayon gamma 4-NQO rayon gamma	++ +++ ++ / ++ + +++ ++	++ +++ + / ++ +++ - ++	Chen <i>et al.</i> 86. Cornelis <i>et al.</i> 88.
Cellule épithéliale	peau sein carcinome mammaire	EJ-Ha- <i>ras</i> +/- SV40 SV40	+ / +++ + +	ND / +++ +++ -	Chen <i>et al.</i> 89. Dupressoir <i>et al.</i> 88.

- <1 ; + <10 ; ++ <100 ; +++ >100 ; ND: non déterminé
4-NQO: 4-Nitroquinoline-1-Oxyde

Tableau 3b: Effet inhibiteur des Parvovirus sur la transformation cellulaire in vitro.

TRAITEMENT CANCÉROGENE	ALTÉRATIONS	CELLULE HOTE	AGENT ANTI-CANCEREUX	RÉFÉRENCES
Adenovirus (Ad5, Ad12, SiAd) Papovavirus (SV40, BPV-1) Oncogène <i>c-Ha-ras</i>	Foyers Ancrage libre Saturation à haute densité	Rongeur	AAV1, AAV2, MVMp	Ostrove <i>et al.</i> 81. Katz <i>et al.</i> 86. Hermonat <i>et al.</i> 89. Casto <i>et al.</i> 72. Mousset <i>et al.</i> 82; 8
Papovavirus SV40 Origine carcinomateuse	Ancrage libre	Humaine	H-1	Dupressoir <i>et al.</i> 89 Su <i>et al.</i> 88.

dans un état donné de différenciation, car tous les tissus à renouvellement rapide ne permettent pas la réplication des Parvovirus (Tattersall et Ward, 1978; Ward et Tattersall, 1982). La réplication parvovirale est dépendante de l'expression de gènes spécifiquement exprimés au cours de la multiplication et de la différenciation cellulaire, et l'absence d'expression d'un des gènes impliqués dans ces processus entraînerait le blocage de la réplication (Ward et Tattersall, 1982; Spalholz et Tattersall, 1983). Par ailleurs, l'apparition de phases de sensibilité au Parvovirus au cours du développement embryonnaire confirme la spécificité des facteurs requis (Siegl, 1984; Tattersall et Ward, 1978; Spalholz et Tattersall, 1983). Ainsi les similitudes entre le développement ontogénique normal et l'oncogenèse, suggèrent que les changements du programme d'expression génique induits par la transformation sont nécessaires à la réplication parvovirale. En effet, la transformation est associée à la réactivation de gènes dont l'expression est spécifique du développement embryonnaire, et qui sont silencieux à l'état adulte (cf. § II/4., p. 32).

3.2.3.1. Action lytique des Parvovirus Autonomes.

En 1982, Mousset et Rommelaere ont proposé l'hypothèse d'oncosuppression sélective parvovirale, selon laquelle la transformation maligne augmentait la permissivité cellulaire au Parvovirus (cf. § I/2.3.1., p.15). En effet, leurs travaux montraient que l'infection par le Parvovirus MVMP réduisait et parfois abolissait le pouvoir transformant du papovavirus SV40 dans les cellules PVR (variant de Balb/c 3T3 transformée par SV40). Une telle inhibition *in vitro* serait due à l'action lytique de MVMP sur ces cellules. Alors qu'à l'état non transformé ces cellules ne sont pas permissives pour MVMP, elles le deviennent sous l'effet de la transformation par SV40. D'autres systèmes cellulaires étudiés dans notre laboratoire confirment ces résultats princeps en les élargissant aux cellules humaines (Mousset et al., 1986; Cornelis et al., 1988a; Chen et al., 1986). Ainsi, la transformation par SV40 de cellules de mammifères s'accompagne de l'acquisition de la permissivité et de l'accroissement de la sensibilité (Chen et al., 1989; Cornelis et al., 1988a; Van Hille et al., 1989). Cette sensibilité dépendante de la transformation n'est pas exclusive à SV40, mais peut être généralisée à de nombreux systèmes cellulaires murins et humains quelque soit le mode de transformation (Mousset et al., 1986, Van Hille et al., 1989; Cornelis et al., 1988b) (Tableaux 3a, 3b).

Actuellement, il n'existe pas de schéma général expliquant précisément cette "sensibilité transformation-dépendante". Toutefois, toutes les analyses montrent que l'adsorption virale a lieu sur les cellules qu'elles soient normales ou transformées (Chen et al., 1986; Cornelis et al., 1988a; Chen et al., 1989; Dupressoir et al., 1989). Par contre, la synthèse des protéines, la réplication de l'ADN et la production de virus infectieux semblent être spécifiques des cellules transformées (Singer et Rhode, 1978; Cornelis et al. 1988a, 1988b; Chen et al., 1989; Dupressoir et al., 1989). Cependant, l'effet toxique des Parvovirus peut être dissocié de la production de particules virales infectieuses (Guetta et al., 1990) (Tableau 3a). Autrement dit, la toxicité serait d'avantage due aux produits viraux qu'à la libération des virus par lyse cellulaire. Ainsi certaines cellules transformées accumuleraient une quantité létale de produits viraux (Rhode, 1987), alors que d'autres seraient capables d'une certaine façon de les "détoxifier" (Salomé et al., 1989). Ce dernier point concerne essentiellement les cellules transformées échappant à l'oncosuppression parvovirale. En somme, le degré de transformation plus que l'état de transformation influencerait sur le pouvoir lytique des Parvovirus, permettant ainsi toute une gamme de réponses: cytotoxicité ou non accompagnée ou pas de production virale (Mousset et

Tableau 4: Facteurs parvoviraux interférant avec le métabolisme cellulaire.

PERTURBATION CELLULAIRE	EFFECTEURS PARVOVIRAUX	ORIGINE DES CELLULES	RÉFÉRENCES
EFFETS DIRECTS			
Inhibition de l'induction de l'amplification de l'ADN	Séquences terminales de l'ADN (AAV-2, -3; -5) Protéines non structurales REP (AAV2)	Hamster Hamster	Bantel-Schaal et Zur Hausen, 8
Inhibition de l'expression commandée par les promoteurs hétérologues	Protéines non structurales REP (AAV2); NS (H-1, MVMp)	Homme, Souris	Heibronn <u>et al.</u> , 89.
Inhibition de la transformation stable par de l'ADN exogène	Protéines non structurales REP (AAV2); NS (H-1, MVMp, B19)	Homme, Rongeurs	Labow <u>et al.</u> , 87. Rhode et Richard, 87. Brandenburger <u>et al.</u> , 90.
Inhibition de la transformation oncogène in vitro	Protéines non structurales REP (AAV2)	Souris	Labow <u>et al.</u> , 87. - Rhode, 87. Brandenburger <u>et al.</u> , 90. Ozawa <u>et al.</u> , 88.
Effet cytotatique	Composants du virion AAV2	Homme, Hamster	Winocour <u>et al.</u> , 87.
Effet cytocide	Protéines non structurales NS (MVMp)	Homme, Souris	Brandenburger <u>et al.</u> , 89. Naeger <u>et al.</u> , 89
EFFETS INDIRECTS			
Inhibition de la capacité des cellules néoplasiques à métastaser	Antigènes de l'AAV-1	Hamster	Blacklow <u>et al.</u> , 78.
Acquisition par les cellules tumorales d'un pouvoir "vaccinant" contre des réimplantations ultérieures	Antigènes de MVMp	Souris	Guetta <u>et al.</u> , 86.

Rommelaere, 1988) (Tableau 3a). Ce degré de transformation implique nécessairement la présence ou l'absence des facteurs spécifiques indispensables au cycle viral.

3.2.3.2. Les Virus Adéno-Associés (AAV).

De même que les Parvovirus Autonomes, les virus Adéno-Associés, quoique non lytiques, sont capables de détruire spécifiquement les cellules transformées (Schlehofer, 1994). Ceci est d'autant plus remarquable que c'est sur des tumeurs induites par les virus "helper" que le pouvoir anti-tumoral des AAV a été démontré (Kirschtein et al., 1968; Mayor et al., 1973; Cukor et al., 1975; De la Maza et Carter, 1984). Les travaux ultérieurs montrèrent que les AAV inhibent l'amplification de l'ADN de SV40 induite par des carcinogènes initiateurs (Schlehofer et al., 1983).

3.2.4. Interférence parvovirale avec le métabolisme cellulaire.

Le mode d'action des protéines cytotoxiques NS (Parvovirus Autonomes) et Rep (AAV) reste encore mystérieux, mais leurs effets sur les cellules transformées sont tout à fait clairs (Figure 5A; Tableau 4). Responsables de nombreuses perturbations dans le métabolisme cellulaire, les protéines Rep et NS ont essentiellement un effet négatif sur le fonctionnement de promoteurs hétérologues (Labow et al., 1987; Rhode et Richards, 1987; Brandenburger et al., 1990). Cette régulation négative serait probablement à l'origine de tous les autres effets observés, inhibition de l'induction d'amplification de l'ADN, inhibition de la transformation stable par un ADN exogène, et inhibition de la transformation oncogène *in vitro* (Rommelaere et Cornelis, 1991) (Tableau 4). Mais les protéines non-structurales ne sont pas seules responsables de ce dérèglement cellulaire, car les protéines de capsides de l'AAV2 provoquent, au moment de l'infection, un effet cytostatique (Winocour et al., 1988).

Outre les protéines virales, des séquences d'ADN, notamment les ITR des AAV, empêchent aussi l'induction de l'amplification de l'ADN (Bantel-Schaal et zur Hausen, 1988). Il semblerait, d'ailleurs, que les palindromes de MVMP et H-1 aient une action similaire. En fait, les extrémités de l'ADN parvoviral portant les signaux d'initiation de la réplication et de la transcription, sequestrent une grande partie des facteurs cellulaires nécessaires à l'induction de l'amplification de l'ADN (Rommelaere et Cornelis, 1991).

Il faut encore noter que l'infection par les AAV sensibilise les cellules néoplasiques aux radiations (Walz et al., 1992; Walz et Schlehofer, 1992) et aux traitements chimiothérapeutiques (Klein-Bauernschmitt, P., communication personnelle) *in vitro*, de même qu'*in vivo* en déclenchant l'apoptose (Walz et Lavi, 1993). Là encore, les mécanismes engendrant cette sensibilisation sont obscurs, toutefois, outre l'hypothèse précitée concernant l'ADN d'AAV, les travaux de Waltz et al. (1992) montrent que dans certains cas, il y a expression des protéines Rep (cf. § II/3.2.6., p. 25).

Enfin, les Parvovirus semblent diminuer la formation de métastases. En effet, bien que les Parvovirus soient peu immunogènes, des déterminants antigéniques viraux sont présentés à la surface des cellules tumorales (cf. § I/3.2.1., p. 21), favorisant ainsi leur reconnaissance par le système immunitaire (Rommelaere et Tattersall, 1990; Rommelaere et Cornelis, 1991). Cette composante immunitaire n'est pas à négliger car des animaux pré-traités par ces cellules cancéreuses infectées par le Parvovirus

Tableau 5: Réponses spécifiques des cellules transformées à l'infection par les Parvovirus H-1 et MVMp.

CELLULES	AGENT TRANSFORMANT	RENFORCEMENT DE EFFETS PARVOVIRAUX DANS LES CELLULES TRANSFORMÉES PAR RAPPORT AUX CELLULES NORMALES	RÉFÉRENCES
Fibroblastes, Cellules épithéliales et Lymphoïdes humaines ou murines	Oncogènes viraux ou cellulaires Carcinogène chimique Radiation Origine tumorale (fibrosarcome, carcinome, leucémie)	+ / - : Réplication de l'ADN parvoviral + : Augmentation du taux de transcription et de l'expression des gènes parvoviraux + / - : Production de parvovirus infectieux + : Effet oncolytique in vitro, lyse cellulaire	Toolan et Ledinko, 65. Bass et Hetrick, 78. Mousset et Rommelaere, 82. Guetta <i>et al.</i> , 86; 90. - Walton <i>et al.</i> , 89. Cornelis <i>et al.</i> , 88a; 88b. - Salomé <i>et al.</i> , 89; 90. Van Hille <i>et al.</i> , 89. - Dupressoir <i>et al.</i> , 89. Chen <i>et al.</i> , 86; 89. - Faisst <i>et al.</i> , 89. Rhode et Paradiso, 89.
Fibroblastes de rat FR3T3	BPV-1	- : Réplication de l'ADN parvoviral, expression des gènes parvoviraux, production de parvovirus infectieux, lyse cellulaire	Salomé <i>et al.</i> , 90.
	c-Ha-ras +/- BPV-1	- : Réplication de l'ADN parvoviral + : expression des gènes parvoviraux, production de parvovirus infectieux, lyse cellulaire	Salomé <i>et al.</i> , 90.
Cellules de rat NRK	c-Ha-ras	- : Réplication de l'ADN parvoviral, expression des gènes parvoviraux, production de parvovirus infectieux, lyse cellulaire	Van Hille <i>et al.</i> , 89.

seraient "vaccinés" contre la métastase ou une seconde implantation de cellules tumorales (Rommelaere et Cornelis, 1991).

3.2.5. Lyse préférentielle par H-1 et MVMP des cellules transformées.

L'analyse des interactions des Parvovirus H-1 et MVMP avec des cellules en culture a révélé que de nombreuses lignées transformées de fibroblastes, de cellules épithéliales, et de cellules lymphoïdes d'origine humaine ou murine sont plus sensibles à l'infection que les cellules normales dont elles dérivent (Rommelaere et Cornelis, 1991) (Tableau 5). Cette sensibilité est directement liée à la transformation cellulaire *in vitro*, et varie avec l'oncogène utilisé, cellulaire ou viral, le carcinogène appliqué et le degré de transformation (Mousset et Rommelaere, 1988; Rommelaere et Cornelis, 1991). Les travaux de Salomé et al. (1989) ont confirmé ces "hypothèses" en utilisant des cellules transformées par l'oncogène *src* thermosensible, et en montrant que la sensibilité à MVMP suivait cette transformation conditionnelle (dépendante de la température).

C'est pour ces raisons que le Parvovirus H-1 a pu être utilisé comme agent sélectif pour isoler des variants "normalisés" au sein d'une population transformée (Su et al., 1988; Rommelaere et Cornelis, 1991), ou des lymphoblastes humains transformés (Telerman et al., 1993). De la même façon, MVMP a été utilisé pour sélectionner des "révertants normalisés", obtenus par transfection d'ADN humain, dans des cellules de souris transformées par BPV (Bovine Papilloma Virus) (Schlehofer, J.R., communication personnelle).

3.2.6. Réversion du phénotype transformé par les AAV.

L'infection par AAV ne donne lieu à une production virale qu'en présence de virus auxiliaire (cf. § I/1.1., p. 3) (Berns et Bohenzky, 1987). Cependant, de nombreuses lignées transformées sont capables d'exprimer les gènes AAV sans répliquer l'ADN viral. L'expression des protéines Rep n'est semble-t-il pas toxique, mais par contre provoque la suppression des caractères de transformation (Tableau 6). Ainsi, l'expression des gènes de l'AAV2 est associée à la "normalisation" des fibroblastes de hamster transformés par l'Ad5, en inhibant la production de l'antigène 58K codé par le gène E1B du virus transformant (Ostrowe et al., 1981). Il est probable que les protéines Rep soient impliquées dans ce mécanisme, puisque *in vitro* elles inhibent la transformation cellulaire (Hermonat, 1989; Casto et Goodheart, 1972; Labow et al., 1987). Cependant, outre les protéines Rep, l'ADN des AAV ainsi que les extrémités terminales provoquent l'inhibition de l'induction de l'amplification de l'ADN et ont un effet cytocide (Bantel-Schaal et zur Hausen, 1988). Il semblerait même que les ITR soient plus efficaces que l'ADN total, indiquant que seules des séquences particulières sont requises pour cet effet (Rommelaere et Tattersall, 1990). Les particules défectives d'AAV inhibent aussi la transformation (De la Maza et Carter, 1981; Carter, 1984), ce qui suggère que des composants du virion interfèrent avec le métabolisme cellulaire (Winocour et al., 1987). Toutefois, les mécanismes par lesquels les AAV induisent la réversion de la transformation sont inconnus. Cependant, l'AAV2 est capable d'induire la différenciation non seulement des cellules transformées (Klein-Bauernschmitt et al., 1992), mais aussi de cellules embryonnaires normales (Botquin et al., soumis a). Ces effets sur la différenciation sont observés avec l'AAV2 entier, l'ADN et les ITR, qui mimeraient l'effet de l'acide rétinoïque, i.e. l'induction de la différenciation vers l'endoderme (Strickland et Mahdavi, 1978) avec l'activation de l'expression de *c-fos* et l'inhibition de l'expression de *c-myc* (Botquin et al., soumis a).

Tableau 6: Réponses spécifiques des cellules infectées par les AAV.

ORIGINE DES CELLULES	PRODUITS PARVOVIRAUX	PERTURBATION CELLULAIRE	RÉFÉRENCES
<p>Fibroblastes de hamster transformés par Ad5</p> <p>Cellules de souris transformées par BPV</p> <p>Cellules humaines, de rongeurs transformées par divers oncogènes cellulaires ou viraux, carcinogènes physico-chimique, radiation, poxvirus, HSV</p> <p>Cellules humaines transformées (Hela)</p>	<p>Transcrits (AAV-2)</p> <p>Protéines Rep (AAV-2)</p> <p>Formes répliquatives de l'ADN et protéines Rep (AAV-2,-3,-5)</p> <p>AAV2 entier</p>	<p>Inhibition de la transformation, inhibition de la production de l'antigène tumoral 58K</p> <p>Inhibition de la transformation <i>in vitro</i></p> <p>Inhibition de l'amplification de l'ADN Effet cytocide</p> <p>Augmentation de la sensibilité des cellules infectées au traitement par les rayons γ</p>	<p>Ostrowe <u>et al.</u>, 81.</p> <p>Hermonat, 89.</p> <p>Bantel-Schaal et Zur Hausen, 88. Schlehofer <u>et al.</u>, 83; 86. Schmitt <u>et al.</u>, 89. Heibronn <u>et al.</u>, 84.</p> <p>Walz <u>et al.</u>, 92.</p>
<p>Cellules humaines: leucémie, kératinocytes immortalisés</p> <p>Cellules embryonnaires indifférenciées de souris, tératocarcinome murin et humain</p>	<p>AAV-2 entier, ADN de l'AAV-2</p> <p>AAV-2 entier, ADN de l'AAV-2</p>	<p>Différenciation cellulaire, baisse de synthèse de <i>c-myb</i>, <i>c-myc</i>, <i>Rb</i>, augmentation des transcrits <i>c-fos</i></p> <p>Différenciation cellulaire, augmentation des transcrits <i>c-myb</i>, <i>c-fos</i>, <i>p53</i></p>	<p>Bauernschmitt <u>et al.</u>, 92.</p> <p>Botquin et Schlehofer submitted</p>

4. Mécanismes possibles de l'oncosuppression: "qui fait quoi?".

En résumé, il est impossible de restreindre à un seul mécanisme l'effet "oncosuppressif" des Parvovirus, et il est probable que cet effet est la conséquence de l'activité de plusieurs effecteurs viraux, i.e. les capsides, l'ADN, les transcrits et les protéines.

Il faut souligner qu'il existe quand même un consensus pour "qui fait quoi?". Le premier paramètre parvoviral qui varie en fonction de la transformation est la transcription. Dans tous les cas, la sensibilisation à l'effet toxique des Parvovirus est corrélée par une augmentation de la quantité des transcrits R1 et R2 (protéines non-structurales), mais sans augmentation du taux d'expression de la protéine NS1 (Cornelis et al., 1988b; 1990; Guetta et al. 1990). Ceci implique que le promoteur P₄ est plus actif que le promoteur P₃₈ dans les cellules transformées (Spegelaere et al., 1991; Vanacker et al., soumis). Cette activation transformation-dépendante du promoteur P₄, est induite probablement par la fixation, autour et sur le promoteur, de protéines spécifiques, inactives ou absentes dans les cellules normales (Faißt et al., soumis), suggérant que la transformation module l'expression de facteurs de transcription qui activent le promoteur P₄. Cependant, NS1, et les protéines non-structurales en général, ont un effet inhibiteur de la transformation (Tableaux 4; 6), et la "dissection" de la protéine NS1, a permis de localiser dans la région C-terminale le domaine effecteur. En conclusion provisoire, on peut proposer que l'oncosuppression est indissociable de la modulation transcriptionnelle et la cytotoxicité de NS1. Donc, qui fait quoi:

- NS1 est responsable de la cytotoxicité, et peut être en association avec NS2
- NS1 possède une action inhibitrice sur les promoteurs hétérologues et son effet cytotoxique pourrait être dû à une altération de certaines fonctions de la cellule
- NS1, pour être exprimée, nécessite que le promoteur P₄ soit actif, et ce promoteur monopolise peut-être trop de facteurs de transcription qui seraient indispensables à la survie de la cellule transformée.

II

A PROPOS DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

II. A PROPOS DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE.

1. Introduction.

Les cellules transformées diffèrent des cellules normales par leur capacité à se diviser de manière continue, et par leur absence de réponse aux signaux contrôlant la division cellulaire. Des changements de type morphologique et biochimique les caractérisent. La désorganisation du cytosquelette et de la matrice cellulaire sont associés à l'arrondissement de la cellule et à une diminution de leur adhérence au support. La composition en glycolipides et glycoprotéines de la membrane plasmique se trouve altérée et l'on voit apparaître de nouveaux antigènes de surface. Ces perturbations morphologiques et structurales sont associées à la perte d'inhibition de contact, qui se caractérise aussi par une croissance anarchique et accélérée, permettant la formation de foyers tridimensionnels et de colonies isolées en milieu semi-solide (agar). Ce type de multiplication cellulaire est aussi caractérisé par des besoins très réduits en facteurs de croissance ou en hormones exogènes. Au niveau génique, il y a activation de la transcription avec, souvent, une stabilisation des transcrits et une forte synthèse en protéines normalement absentes dans la cellule non transformée.

Classiquement, deux types de transformations peuvent être distingués, en une ou plusieurs étapes: la cancérisation rapide, due aux virus transformants, rétrovirus ou certains virus à ADN (cf. § II/2. et II/4., p. 32), et les cancers non-viro-induits, ou spontanés, qui apparaissent avec un délai plus long, à la suite de l'altération de la fonction de "proto-oncogènes" et/ou "d'anti-oncogènes" (cf. § II/3.-6., p. 29-33).

2. Les virus transformants.

Les virus transformants sont de deux types:

1-les virus à ADN tels que l'Adénovirus, le virus du papillome bovin, les papovavirus (SV40 et du polyome).

2-des virus à ARN ou rétrovirus, dont la réplication passe par la conversion, par la rétro-transcriptase virale, de l'ARN monocaténaire en ADN monocaténaire puis bicaténaire. Les oncovirus, inducteurs de cancers, sont divisés en deux sous-groupes: les ALV (Associated Leucosis Virus) peu oncogènes et les DLV (Defective Leukemia Virus) très tumorigènes (pour revue: Saule, 1988).

Les ALV diffèrent des DLV par leur contenu génétique. L'ARN génomique des ALV contient les informations permettant l'expression des protéines de structure (gag),

une réverse-transcriptase (pol) assurant la conversion de l'ARN en ADN, et des protéines d'enveloppe (env). Cet ARN débute et finit par deux séquences 5' R-U5---U3-R 3', formant les LTR (Long Terminal Repeat) dans l'ADN proviral, LTR qui regroupent d'une part les sites d'initiation de la transcription et leurs éléments régulateurs, et d'autre part les sites de polyadénylation. Les DLV sont défectifs pour la réplication car, dans leur ARN génomique, des séquences nécessaires à leur propagation ont été remplacées par des séquences, *v-onc*, d'origine cellulaire qui sont responsables de leur pouvoir transformant. Leur multiplication nécessite un virus ALV "helper" qui apporte les fonctions nécessaires à leur réplication. Il existe une exception à cette règle: le Virus du Sarcome de Rous qui possède, outre l'oncogène *v-src*, un génome ARN complet.

Les DLV oncogènes ont transduits des séquences cellulaires, qui par analogie avec *v-onc*, ont été dénommées proto-oncogènes ou *c-onc* (pour revue: Saule et Leprince, 1988; Stehelin et Martin, 1988). La transduction de ces séquences peut probablement se faire de deux façons:

- au niveau ADN, par recombinaison, lorsque le virus se trouve sous forme d'ADN bicaténaire intégré dans le génome de la cellule .

- au niveau de l'ARN, lors de la rétro-transcription, où l'enzyme du "helper" utiliserait un ARN cellulaire comme matrice. Le gène cellulaire transduit est alors plus ou moins modifié lors de son intégration dans le génome viral et/ou lors de la propagation du virus.

Le gène cellulaire transduit confère au rétrovirus des propriétés tumorigènes en interférant avec la transmission des signaux de contrôle de la mitose et la différenciation cellulaire (pour revue: Montarras et Saule, 1988).

3. Les gènes cellulaires à potentialité "oncogène" ou proto-oncogènes.

Le premier proto-oncogène, *c-src*, équivalent cellulaire du gène *v-src* du Virus du Sarcome de Rous, a été identifié par Dominique Stehelin en 1976. Depuis, les gènes cellulaires homologues à chacun des *v-onc* ont été identifiées chez tous les vertébrés testés, ainsi que des gènes cellulaires dont l'expression et/ou le produit sont altérés spécifiquement dans des tumeurs et pour lesquels aucun *v-onc* n'est connu. Leur conservation phylogénétique est remarquable, de la levure aux mammifères, suggérant l'importance de leur fonction dans la vie cellulaire normale. Quoique leurs produits soient différents par leur nature et leur fonction, les proto-oncogènes sont apparentés par leur effet mitogène.

3.1. Classification et fonctions.

Les gènes à potentialité oncogène ont été regroupés en différentes classes caractérisées par la fonction de leur produit (Bishop, 1987), et selon l'étape à laquelle ces produits agissent dans le système de signalisation qui contrôle la prolifération et la différenciation cellulaire (Figure 9). Les produits des proto-oncogènes sont soit:

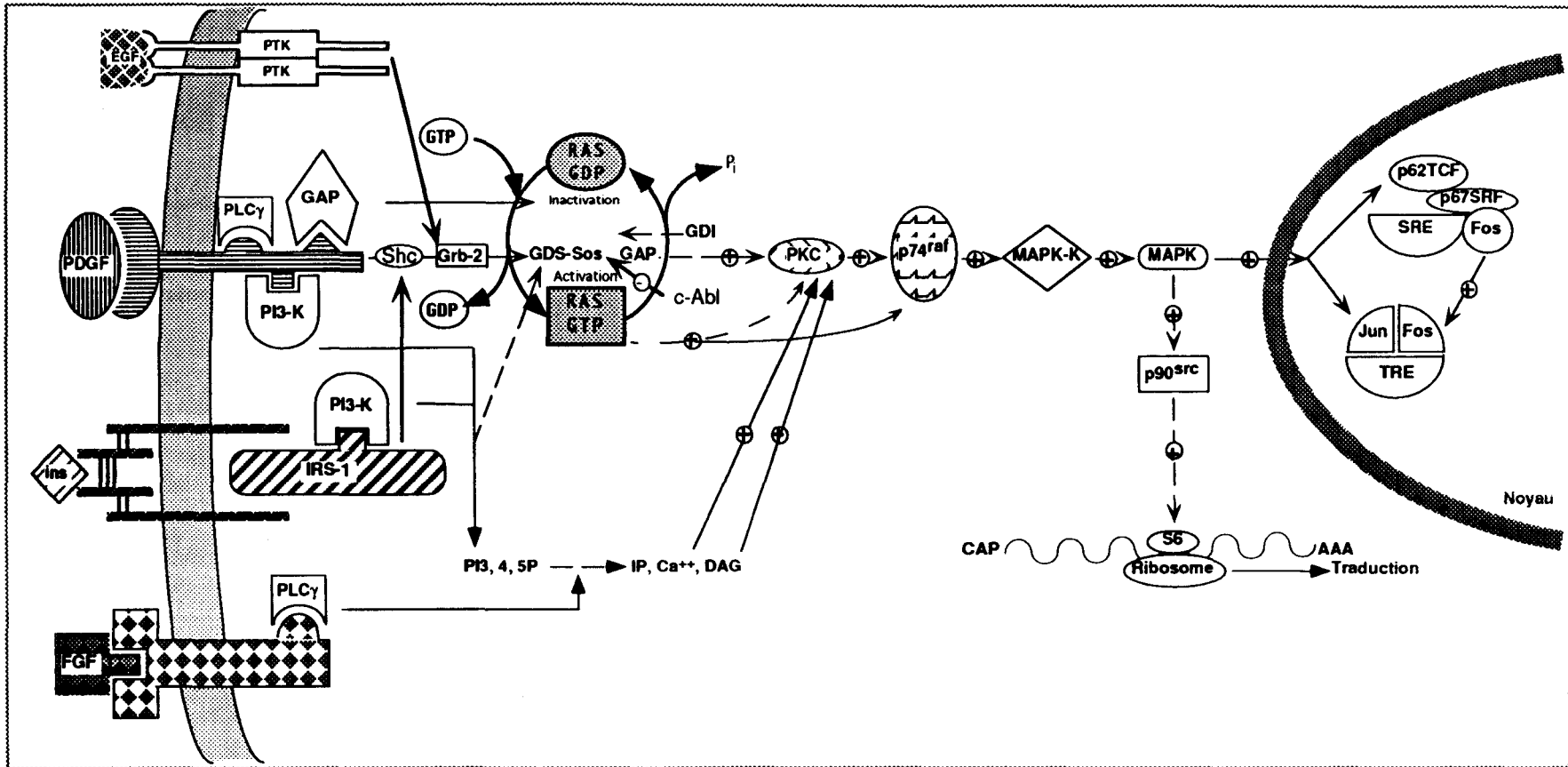


Figure 9: Schéma de transmission du signal passant par Ras.
 Kahn, 1992; Marshall, 1993; McCormick, 1993; Schlessinger, 1993.

- | | |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| PDGF: Plateled-Derived Growth Factor | PTK: Protein Tyrosine Kinase (autophosphorylation) |
| FGF: Fibroblast Growth Factor | GDS: Guanine-nucleotide Dissociation Stimulator-protein (mSos1,2) |
| EGF: Epidermal Growth Factor | Grb2: SH2/SH3 adaptator protein |
| ins: Insuline | MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase |
| GAP: GTPase Activating Protein (p120) | MAPK-K: MAPK Kinase |
| PLy: Phospholipase C γ (p85) | p62TCF: Transcription Factor (p62) |
| PI3K: Phosphatidyl Inositol Phosphatase | S6: Kinase ribosomique |
| TRS: Tyrosine Kinase/Recepteur (p185) | TRE: TPA Response Element |
| PKC: Proteine Kinase C | SRE: Serum Response Element |

1-des facteurs de croissance: c'est le cas de *c-sis* qui code pour la sous-unité β du PDGF (Platelet Derived Growth Factor).

2-des récepteurs membranaires: *c-erbB1* et *c-fms* codent respectivement le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) et du facteur de croissance des macrophages M-CSF.

3-des protéines sous-membranaires ou cytosoliques ayant pour fonction la transmission vers le noyau cellulaire du signal généré par l'association à la membrane des facteurs de croissance avec leurs récepteurs. C'est le cas de Ras, homologue fonctionnel des protéines G (cf. § II/3.2.1., p. 30-31), et de nombreuses protéines à activité tyrosine-kinase. Les voies empruntées pour transmettre le signal mitogène mettent en jeu, tant en amont qu'en aval de Ras, des tyrosine- et serine-threonine-kinases ainsi que des phosphatases. La phosphorylation des tyrosines - événement rare dans une cellule normale (0,1% des phosphorylations) - est déclenchée par la fixation de certains facteurs de croissance à leur récepteur spécifique. Elle constitue le premier événement dans la transmission du signal mitotique (pour revue Kahn, 1992; Juliano et Haskill, 1993)

4-des protéines nucléaires: c'est le cas notamment du produit de *c-ErbA* qui est le récepteur des hormones thyroïdiennes et un facteur de transcription dépendant de son ligand pour activer les gènes cibles. C'est le cas aussi de *c-Fos*, *c-Jun*, *c-Myb*, *c-Myc* qui, se liant à des séquences d'ADN spécifiques sur leurs gènes cibles, en modulent la transcription. *c-Fos* et *c-Jun* s'associent en complexe pour former le facteur de transcription AP1/PEA1.

3.2. Les gènes *ras*.

L'oncogène *ras* a été caractérisé chez deux virus hautement tumorigènes, Harvey (Ha) et Kirsten (Ki), qui ont transduit les gènes respectivement les cellulaires *c-Ha-ras* (Harvey, 1964) et *c-Ki-ras* (Kirsten et al., 1967). Un troisième gène, *N-ras*, caractérisé dans un neuroblastome humain (Shimizu et al., 1983), n'a pas d'équivalent viral connu. Ces gènes dérivent probablement tous d'un même gène ancestral, et codent pour des protéines de 21kDa connues sous le nom générique de p_{21} Ras, ayant des propriétés et fonctions similaires. Elles sont associées à la face interne de la membrane plasmique où elles fixent et hydrolysent le GTP. Les propriétés biologiques de ces protéines ont été conservées au cours de l'évolution, car elles fonctionnent dans des systèmes hétérologues. La protéine Ras de levure est essentielle pour la croissance et la survie des cellules, suggérant que dans les cellules de mammifères les protéines Ras exercent des fonctions fondamentales dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Barbacid, 1987). Dans les paragraphes suivants nous parlerons sans distinction de gène *ras* et de p_{21} Ras.

3.2.1. Rôle et propriétés biochimiques des p_{21} Ras.

Leur rôle est supposé être équivalent à celui des protéines G, avec qui elles ont des homologies significatives de séquence en acides aminés. Les protéines G, sous l'effet d'effecteurs extra-cellulaires transmettent des signaux mitogènes au travers de la membrane plasmique. Elles inhibent la phospholipase C et contrôlent le métabolisme de l'adénylate cyclase qui, en réponse à des stimuli β -adrénergiques, déclenche la synthèse du médiateur cellulaire AMPc responsable de l'activation de certaines kinases cellulaires. La localisation membranaire de la p_{21} Ras est essentielle à son activité biologique. C'est une modification post-traductionnelle - acylation de la

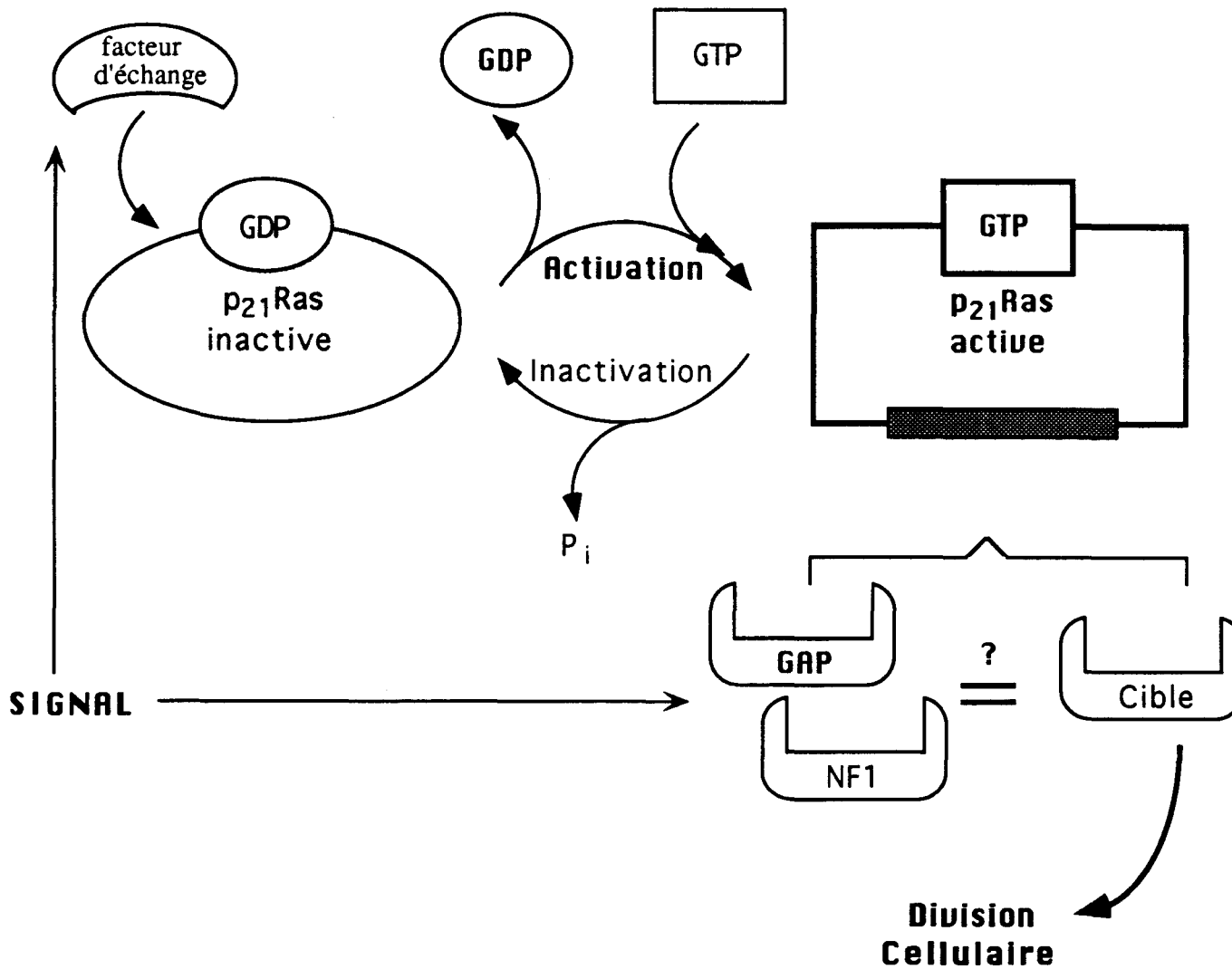


Figure 10: Modèle de régulation de la p21 Ras.
Lowy et al, 1991.

Cys₁₈₆ par l'acide palmitique - qui permet son ancrage dans la face interne de la membrane.

Les protéines Ras ont un domaine "GDP/GTP Binding" (acides aminés (aa) 59-63) ainsi qu'une activité GTPasique. Quatre domaines effecteurs discontinus et de nature hydrophobe localisés entre les aa 5-63, 77-92, 109-123 et 139-165, portent les fonctions biologiques, et un domaine très hydrophile (aa 30-42) est impliqué dans leur interaction avec les cibles cellulaires des p₂₁Ras actives (Barbacid, 1987).

Le modèle de fonctionnement actuellement accepté (Spandidos, 1989; Lowy et al., 1991) est fondé sur l'équilibre intracellulaire entre la p₂₁Ras-GDP inactive et la p₂₁Ras-GTP active (Figure 10). Le passage de la forme inactive à celle active dépend d'un stimulus qui induit le remplacement du GDP par le GTP. Ce stimulus qui peut être la liaison d'un facteur de croissance (PDGF, EGF, M-CSF) à son récepteur spécifique (Figure 9), stimule les propriétés d'autophosphorylation et tyrosine kinase du récepteur qui active, en la phosphorylant (résidus tyrosines), la protéine Shc. Cette protéine se fixe alors spécifiquement au domaine SH2 (Src Homology 2) de Grb2 (protéine adaptatrice SH2/SH3) qui se lie, par ses domaines SH3, à GDS-mSos1,2. GDS catalyse l'échange du GDP par le GTP, qui active la p₂₁Ras. Le signal se propage ensuite par une cascade de phosphorylations impliquant les kinases PKC-Raf-MAPKK-MAPK. Enfin, MAPK active à la fois la traduction (Rsk-S6) et la transcription via Jun/Fos et SRE (Figure 9) (pour revue Feig, 1993; Marshall, 1993; McCormick, 1993; Polakis et McCormick, 1993; Schlessinger, 1993).

Les protéines Ras ont une demi-vie très longue (> 24 heures) et sont donc sujettes à une régulation importante. La fonction biologique de Ras - transmission du signal mitogène- est régulée négativement par la protéine GAP. GAP se lie sur un domaine effecteur de p₂₁Ras-GTP (aa 59-65) et accélère l'hydrolyse du GTP, déclenchant un arrêt du signal mitogène et le retour à la forme inactive. La protéine NF1 (Recklinghausen neurofibromatosis) homologue à GAP aurait les mêmes fonctions (Lowy et al., 1991) (Figure 9).

3.2.2. La transformation par le produit du gène *ras* .

3.2.2.1. La transformation spontanée.

Les hypothèses qui pourraient expliquer la transformation par les protéines Ras impliquent soit une perte d'activité GTPase favorisant la persistance de la une p₂₁Ras active, soit sur une augmentation de l'affinité pour le GTP au détriment du GDP.

Un certain nombre de mutations des protéines Ras ont été retrouvées dans les tumeurs non-viro-induites. Les mutations, qui affectent les domaines effecteurs de Ras sont transformantes alors que les mutations affectant le domaine "GDP/GTP Binding" ne le sont pas. Les mutations essentielles sont dans les codons 12, 13, 59, 61, où Gly₁₂, Gly₁₃, Ala₅₉, Gln₆₁ substitués par n'importe quel autre acide aminé, rendent la protéine transformante. La mutation provoquée *in vitro* des codons 116, 119 est aussi transformante. A ce sujet, il faut noter que le gène *c-ras* est la cible des cancérigènes chimiques (DMBA, NMU, TNM) et physiques (rayons X), qui induisent des mutations dans les codons 12, 13 et 61.

La mutation de l'acide aminé Gly₁₂ est transformante, qu'elle soit substitution, délétion, ou addition à droite ou à gauche. Il en est de même pour Gln₆₁.

Toutes deux ont pour conséquence la persistance d'une p₂₁Ras-GTP constitutionnellement active, n'étant plus régulée par GAP. L'affinité de la protéine GAP pour la p₂₁Ras-GTP mutée n'est pas modifiée, mais la protéine GAP n'accélère plus l'hydrolyse du GTP. GAP a des fonctions essentielles, non seulement dans la régulation de l'activité de Ras, mais aussi par sa faculté à empêcher la transformation - la surexpression de GAP étant à même d'inhiber la transformation par *v-src* (Lowy et al., 1991).

La substitution de l'Ala₅₉ par une Thréonine confère à la p₂₁Ras une activité autophosphorylante inconnue. La Thr₅₉ contacterait le γ P du GTP (Barbacid, 1987).

3.2.2.2. La transformation virale.

L'oncogène *v-ras* est muté sur le codon 12 (Gly₁₂ > Val₁₂). La protéine *v-Ras* mutée fixe le GTP mais ne l'hydrolyse plus, probablement parce que la protéine GAP n'a plus qu'une faible affinité pour la p₂₁*v-Ras*, et elle reste alors sous forme de complexe p₂₁*v-Ras*-GTP constitutivement actif pour la transmission des signaux mitogènes. D'autres mutations, aux acides aminés 59 et 61 conduisent aussi à l'activité constitutionnelle de la p₂₁*v-Ras* par la perte de son activité GTPasique.

4. Différences entre proto-oncogènes cellulaires et oncogènes viraux.

Les proto-oncogènes sont non-tumoraux et leurs fonctions sont très spécifiques au cours du cycle cellulaire. Cependant, à la suite de leur transduction par des rétrovirus, ils acquièrent généralement un fort pouvoir transformant. Deux différences majeures non exclusives mutuellement sont responsables de ce pouvoir tumorigène.

La première quantitative (effet de dose) est directement liée au mode d'expression des oncogènes viraux: expression à taux élevé dans de nombreux tissus, alors que l'expression des proto-oncogènes est physiologique et limitée dans un espace de lieu et de temps.

La seconde qualitative, lie le pouvoir transformant acquis par les oncogènes viraux, à des modifications telles que des mutations ponctuelles, des délétions, des additions, ou des substitutions.

Les oncogènes viraux ont été répertoriés, selon leur fonctions, en quatre classes de la même manière que les proto-oncogènes cellulaires (cf. § II/3., p. 29).

5. Cancérisation par activation de gènes cellulaires à potentialité oncogène.

Les étapes de la cancérogénèse "spontanée" ont été définies expérimentalement (Namba et al., 1988), et sont au nombre de quatre: l'initiation, la promotion, la progression et l'invasion (métastase). L'initiation, silencieuse phénotypiquement, est caractérisée par la mutation, spontanée ou induite par des agents chimiques ou physiques, de gènes cellulaires. La promotion est caractérisée par l'activation, réversible, de gènes dont la régulation est changée par translocations chromosomiques, intégration d'élément de régulation en cis ou par amplification de séquences. Toutefois, l'activation d'un seul gène n'est pas suffisante, il faut un second gène activé pour que la transformation soit effective (progression?).

6. Cancérisation par perte ou mutation "d'anti-oncogène".

L'existence des gènes "suppresseurs de tumeurs" ou "anti-oncogènes", a été postulée dès 1970 par A.G. Knudson, puis par R. Sager en 1986 (Weinberg, 1988). Ce n'est qu'en 1988 que l'équipe de W.H. Lee a isolé et démontré le rôle du gène *Rb* impliqué dans des tumeurs de l'enfant: rétinoblastome, ostéosarcome, et certaines tumeurs du foie et du rein....(Su Huang et al., 1988). En 1989, Noda et al. ont isolé le gène "suppresseur" des tumeurs induites par le produit du gène *ras*, *K-rev1*. Depuis d'autres "anti-oncogènes" ont été découverts dont *rrg* et le gène *p53* qui fut longtemps considéré comme un oncogène. De même que pour les oncogènes, on note une remarquable conservation phylogénétique - de la drosophile aux mammifères -. Contrairement aux proto-oncogènes dont les mutations activatrices sont dominantes, celles affectant les "anti-oncogènes" sont récessives - somatiques ou germinales - et impliquent donc les deux allèles du gène. De ce fait, la mutation d'un allèle d'un gène "suppresseur de tumeur" est en général invisible phénotypiquement, et devient un gène de prédisposition au cancer (rétinoblastome familial). La maladie progresse lorsqu'il y a mutation des deux allèles du gène (tumeur de Wilms: disparition d'un gène sur le chromosome 11; cancer canalaire du sein: délétion sur le ch.13; cancer du poumon à petites cellules: perte sur le ch.3).

Le mode d'action des anti-oncogènes est encore imparfaitement défini. On observe toutefois que:

- la surexpression de la protéine K-Rev1/Rap1A permet de bloquer l'effet de p_{21} Ras (Noda et al., 1989). A l'inverse, sa mutation par substitution dans le domaine d'homologie avec p_{21} Ras (32-44) la rend transformante (Marshall, 1993).

- la disparition du gène *Rb* ou sa mutation bi-allélique entraîne la transformation cellulaire et, *in vitro*, la du gène normal permet le retour à la normalité (Su Huang et al., 1988).

La plupart des hypothèses va dans le sens d'une régulation négative des protéines "anti-oncogènes" par des protéines à potentialités oncogènes.

7. Réversion de la cancérogénèse.

7.1. Des drogues anti-cancéreuses.

La recherche d'agents anti-cancéreux, a permis d'identifier un certain nombre de substances ayant un effet de "réversion" de la cancérisation.

Ainsi, l'acide rétinoïque qui induit la différenciation de certaines cellules transformées (Strickland et Mahdavi, 1978), induit aussi des caractères de normalité (pour revue Parker et Sherbet, 1992; Edward, 1992).

L'interféron α (ou β) est capable de "réverter" la transformation de cellules par différents agents tels que, le produit du gène *ras* (Samid et al., 1984; 1985a, 1985b; 1987), le virus du sarcome murin et SV40 (Chany et Vignal, 1970; Hicks et al., 1981; Brouty-Boye et al., 1984), le méthylcholanthrène (Brouty-Boye et al., 1984). L'interféron type I, IFN α ou β , est généralement produit par les cellules en réponse à l'infection virale, tandis que l'IFN type II γ est synthétisé par les lymphocytes suite à une stimulation mitogène ou antigénique. Les récepteurs et les voies empruntés par les deux types d'IFN sont distincts. Le mode d'action de l'IFN I est encore mal défini, toutefois, il active la transcription des gènes ISG (Interferon Stimulated Genes) probablement par l'intermédiaire d'un second messenger, la protéine kinase C (PKC) (Pfeffer et Tan, 1991). Quoiqu'il en soit, son activité de "réversion" s'exerce par la méthylation *de novo* de l'ADN (Samid et al., 1987).

Les analogues d'acide aminés tels que l'hydroxyproline peuvent aussi réverter le phénotype transformé. En fait, l'hydroxyproline (CHP : cis-4-hydroxy-L-proline) ne peut être réellement considérée comme substance "normalisante". Bien que les auteurs fassent état de "réversion" de phénotype transformé (Yanagihara et al., 1990), la CHP aurait plutôt pour effet la sélection au sein d'une population transformée de cellules engagées sur la voie de "détransformation" spontanée.

Récemment un autre analogue d'acide aminé a été décrit pour sa propriété à réverter la transformation par le produit du gène *ras*. En 1989, l'équipe de Nishimura a décrit que l'Azatyrosine (AzTyr) - {L- β -(5-hydroxy-2-pyridyl)-alanine} un antibiotique isolé de *Streptomyces chibanensis* - "détransformait" les cellules humaines et murines transformées par les oncogènes *v-ras*, *c-Ha-ras*, *raf*, *erbB2* (Shindo-Okada et al., 1989a, 1989b; Kyprianou et Taylor-Papadimitriou, 1992). Cette "réversion" phénotypique a été démontrée par la ré-acquisition des caractères de normalité tels que: l'inhibition de contact, la non clonogénicité en milieu semi-solide (agar), et la non-tumorigénicité chez la souris nue. Cependant, dans la cellule "révertée", le gène *c-Ha-ras* est toujours activé et la p_{21} Ras mutée est exprimée au même taux que dans la cellule transformée (Shindo-Okada et al., 1989a, 1989b; Krzyzosiak et al., 1992). Outre l'effet de "réversion", qui concerne principalement la transformation induite par les oncogènes de la famille *ras*, l'AzTyr est toxique pour la plupart des cellules transformées par d'autres oncogènes, dont *hst*, *ret*, *src*, *SV40* (Shindo-Okada et al., 1989a, 1989b). De plus, elle inhibe la tumorigénèse induite par le DMBA (Izawa et al., 1992). Ce résultat a été obtenu sur des souris transgéniques porteuses du gène *c-Ha-ras* humain. Le DMBA est un des mutagènes classique du gène *ras*, dans lequel il cause la mutation des codons 12 ou 61 (Barbacid, 1987; Lowy et al., 1991). Izawa et al.

Tableau 7: Comment cibler les drogues: toxigènes utilisés et leurs effets

TOXIGÈNE-TOXINE	PROMOTEUR SPÉCIFIQUE	CIBLE	EFFETS	RÉFÉRENCES
DT-A: Toxine diphtérique	/	cellule cancéreuse humaine	inhibition de la synthèse protéique, suivie de mort cellulaire	Maxwell et al., 1986
	metallothioneine humaine	pancreas: souris transgénique	pancréas anormal: structure et fonction	Palmiter et al., 1987
	gamma 2 cristalline	yeux: souris transgénique	microphthalmie et cataracte: cornée absente ou anormale	Breitman et al., 1987
	hormone de croissance	nanisme: souris transgénique	nanisme	Behringer et al., 1988
R-A: Ricin (lectine)	gamma 2 cristalline	yeux: souris transgénique	microphthalmie: cornée anormale	Landel et al., 1988
HSV1-TK: Thymidine Kinase +ACV: Acyclovir ou analogues: +GCV: Gancyclovir +FIAU	/	cellules porteuses de <i>tk</i>	réplication de l'ADN stoppée, suivie de mort cellulaire	Furman et al., 1980
	IgG	Lymphocytes et organes lymphoïdes: (souris transgénique)	atrophie du thymus (83%) et de la rate (57%), perte massive voire déplétion totale en lymphocytes Tet B	Borelli et al., 1988 Heyman et al., 1989
	hormone de croissance prolactine	nanisme (souris transgénique) glandes pituitaires	nanisme /	Borelli et al., 1989
	vecteur rétroviral (transfectant stable)	Lymphome induit par l'ALV (Abelson Leukemia Virus)	non-développement ou régression des tumeurs	Moolten et Wells, 1990 Moolten et al., 1990
	Adenovirus + HIV1-LTR (recombinant non-replic.)	cellules humaines exprimant HIV1-Tat	réduction massive de l'expression de Tat + mort cellulaire	Venkatesh et al., 1990
	LTR MoMLV (recombinant non-replic.)	Glioblastome de rat (souris nude)	non-développement ou régression des glioblastomes	Ezzeddine et al., 1991
HIV1-LTR (transfectant stable)	cellules humaines infectées par HIV1	élimination des cellules infectées	Caruso et Klatzmann, 1992	

(1992) ont montré que le traitement par le DMBA suivi par l'AzTyr empêchait la tumorigénèse dans ces souris. Par contre, dans le même système, il s'est avéré que des tumeurs préétablies et induites par c-Ha-ras muté n'étaient pas curables par l'AzTyr (Nishimura, S., communication personnelle).

Tentant d'expliquer le mode d'action de l'AzTyr, Fujita-Yishigaki et al. (1992) ont montré que l'AzTyr inhibait la différenciation des cellules nerveuses PC12 (tumeur indifférenciée d'origine neurale), induite par la p₂₁Ras mutée (indépendante de l'induction par NGF). En outre, par analogie avec les travaux de Contente et al. (1990), Krzyzosiak et al. (1992) ont proposé que l'action de l'Azatyrosine passait par l'activation de *rrg* (ras-related-gene) et de *k-rev1*. Rrg (lysyl oxidase) est impliqué, de par son taux d'expression, dans la conservation de la "normalité" ou de la "réversion", en revanche un taux élevé d'expression de Rrg ne suffit pas à empêcher la transformation (Samid et al., 1987; Contente et al., 1990; Kenyon et al., 1991). Quant à *k-rev1*, il a été identifié par Noda et al. (1989) comme un "anti-oncogène" dont le produit est capable de contrecarrer l'effet transformant de la protéine p₂₁Ras (cf. § II/6., p. 33).

Aujourd'hui le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) l'Azatyrosine "réverte" la transformation par le produit du gène *ras*, ne sont toujours pas élucidés même si les derniers travaux de Krzyzosiak et al. (1992) montrent une réorganisation du cytosquelette et de la matrice cellulaire impliquant l'activation des gènes *rhoB* et *collagène de type III*.

7.2. Le ciblage des drogues.

Parallèlement à la chimiothérapie, le transfert de gènes à visée thérapeutique est développé, permettant, outre la complémentation de la fonction des gènes mutés, le ciblage de drogues anti-cancéreuses (Evans, 1989).

Le "la" a probablement été donné en 1986 par Maxwell et al., qui ont posé les bases de la stratégie de "genetic ablation", qui consiste à cibler la mort cellulaire en plaçant un gène tueur sous promoteur "tissu-spécifique". Depuis, de nombreuses équipes ont entrepris la construction de vecteurs porteurs de gènes toxiques (Tableau 7).

Les travaux de l'équipe d'Evans (Borelli et al. 1988, 1989; Heyman et al., 1989) ont ouvert la voie de l'utilisation du gène de la Thymidine kinase de l'Herpès Virus Simplex type 1 (HSV1-*tk*) comme gène "tueur" conditionnel. Lors de l'infection par HSV1, la TK virale phosphoryle la Thymidine (T) en Thymidine-mono-phosphate (TMP). La TMP est ensuite transformée en TDP puis TTP par les kinases cellulaires, substrat de l'ADN Polymérase virale. Ce mode de synthèse de la TTP est unique au virus de l'Herpès, puisque chez les mammifères il n'existe pas d'enzyme analogue. La voie normale de synthèse de la TTP se fait par conversion de l'UDP (uridine-di-phosphate) en TDP puis TTP. Cependant, il existe un système "SOS" par lequel une Thymidine kinase animale convertit la Thymidine en TTP lorsque la voie normale de synthèse est bloquée. Cette Thymidine kinase animale possède peu d'homologie de séquence avec celle de HSV1 (< à 30% chez l'homme et la souris). L'enzyme spécifique de HSV1 qui joue un rôle essentiel dans la réplication virale, est utilisée pour transformer un analogue structural de la guanosine: l'Acyclovir (ACV), en agent antiviral (Shaeffer et Beauchamp, 1977) (Figure 11). Depuis la découverte de l'ACV et son utilisation classique en thérapie anti-herpétique sous le nom de Zovirax

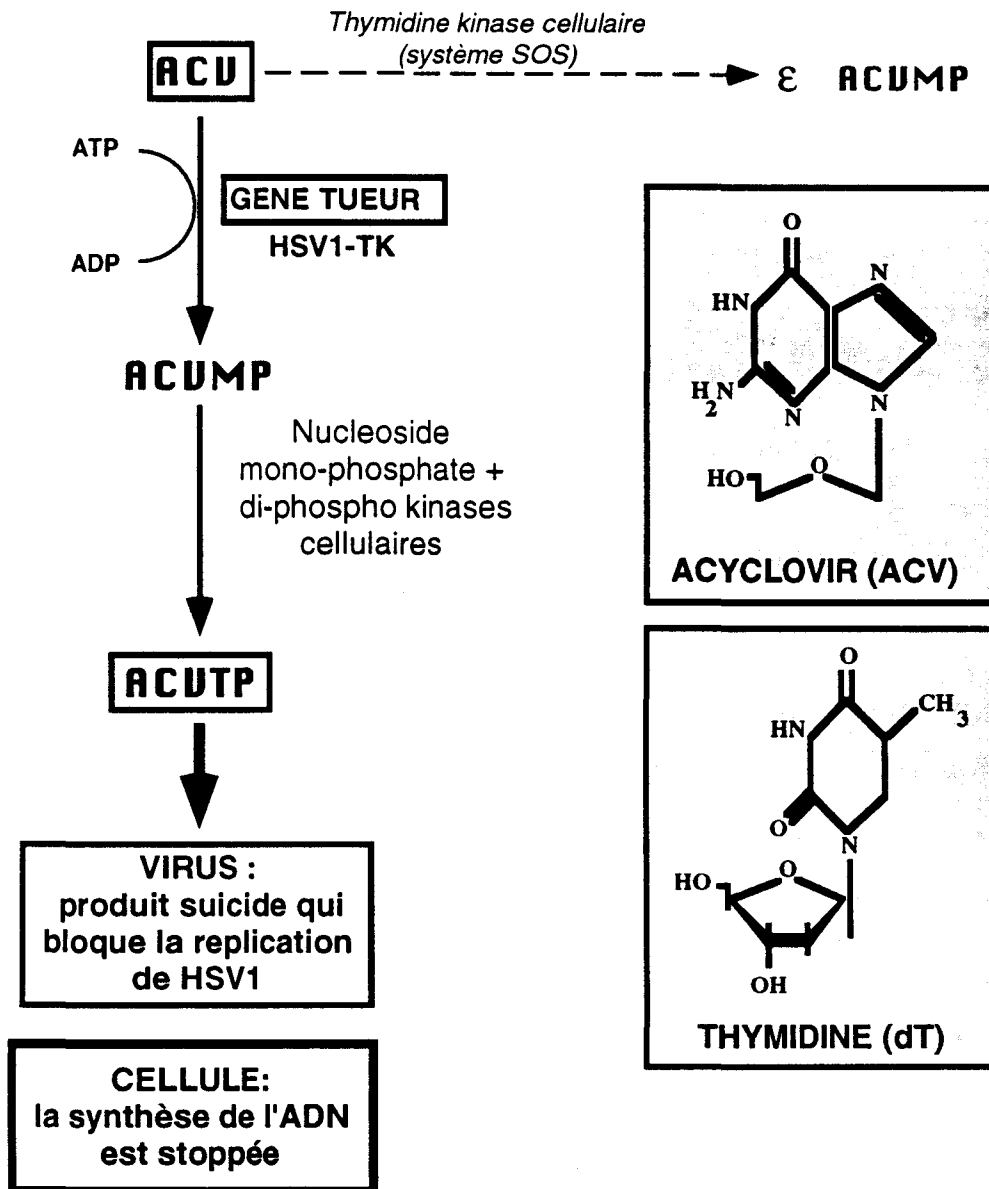


Figure 11: Mode d'action de l'enzyme TK et l'Acyclovir.

(Laboratoires Wellcome), d'autres analogues ont été synthétisés et utilisés, tels que le Gancyclovir (GCV) et le FIAU [1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabino-furanosyl)-5-iodouracil]. L'originalité des travaux de l'équipe d'Evans a été de placer le gène HSV1-*tk* sous le contrôle du promoteur "cellule" spécifique des IgG (P_{IgG} -TK). Des souris transgéniques porteuses de P_{IgG} -TK et traitées par l'ACV, ont une déplétion totale en lymphocytes B ainsi qu'une sévère hypotrophie des organes lymphoïdes (Borelli et al., 1988; Heyman et al., 1989). Depuis, d'autres équipes ont utilisé le couple HSV1-*tk*+ACV, en plaçant *tk* sous le contrôle de promoteurs inductibles ou tissu-spécifiques (Borelli et al., 1989; Moolten et Wells, 1990; Venkatesh et al., 1990; Brady et Dzierzak, 1991; Ezzeddine et al., 1991; Caruso et Klatzmann, 1991, 1992) (Tableau 7). Dans tous ces cas, le traitement par l'ACV, par ailleurs non toxique pour les cellules ne possédant pas HSV1-*tk*, aboutit à la mort cellulaire. Ce phénomène est décrit sous le nom de TKO pour Thymidine Kinase Obliteration.

III**STRATÉGIES ANTI-CANCÉREUSES:
DES VECTEURS PARVOVIRAUX....**

III. STRATÉGIES ANTI-CANCÉREUSES: DES VECTEURS PARVOVIRAUX....

1. Le concept.

Le concept de transfert de gènes dans un but thérapeutique est né il y a une vingtaine d'années. Alors que je commençais ma thèse au laboratoire, c'était "la chose" dont on parlait, frappée d'interdit dans ses applications (NIH, U.S.A.; Comité d'éthique, France) jusqu'en 1990 (première autorisation de traitement des mélanomes par des TIL transgéniques pour le TNF, NIH, U.S.A.). Durant vingt ans ce concept a évolué, considérablement et a accompagné le développement de la biologie moléculaire.

Ainsi, a-t-on assisté à l'émergence de nombreuses techniques, où de nouveaux protocoles résolvaient le(s) problème(s) posé(s) par les précédents.

2. Les techniques: de la transfection au vecteur viral.

L'application suppose, d'abord de pouvoir faire entrer l'ADN exogène dans la cellule animale, puis de l'y maintenir et de préférence en état de fonctionnement. La méthode de transfection, décrite en premier par Graham et van der Eb (1973), s'est améliorée, au fil des ans, en fonction des types cellulaires à traiter (Calcium, DEAE-dextran, liposomes, électroporation). Cependant, certaines cellules s'avèrent intransfectables quelque soit la méthode employée. Il est alors possible de contourner le problème en microinjectant l'ADN, opération délicate mais réalisable (Stacey et Allfrey, 1976).

Il est évident que dans le cas de la thérapie génique, ces opérations ne peuvent s'effectuer sur l'individu. Il faut donc prélever des cellules, les établir en culture, les maintenir, parvenir à les transfecter, sélectionner les transfectants, les amplifier, et enfin les réintroduire dans l'individu. Loin d'être aisé, de telles manipulations sont lourdes en temps et en matériel. Et même si toutes les étapes *in vitro* peuvent être réalisées avec plus ou moins de succès, la réintroduction *in vivo* pose souvent problème. Car forcément, une boîte de plastique et du milieu nutritif ne sont en rien comparables à l'organisme vivant, et une cellule "acclimatée" *in vitro*, peut avoir perdu des propriétés importantes pour sa survie dans l'organisme. Il faudrait donc traiter les cellules au sein même de l'organisme... Comment? La réponse se trouve dans la nature: "quel organisme est capable de se propager facilement et rapidement au sein des cellules eucaryotes?" - un virus!

Un virus est capable d'infecter spécifiquement certaines cellules ou d'exprimer des gènes sélectivement dans certaines cellules, représentant une efficacité de transfert d'ADN et un ciblage largement supérieurs à toute autre méthode. Mais là n'est pas le seul intérêt des vecteurs viraux. Deux aspects, au moins, les rendent particulièrement attirants. Les virus possèdent en général des systèmes de transcription très efficaces (promoteur fort), assurant l'expression des transgènes. De plus, certains virus sont capables de s'intégrer au sein du génome cellulaire sous forme de provirus, pérennisant le système d'expression tout en échappant au système immunitaire. Evidemment, utiliser les virus pour transférer un gène suppose que l'on possède un clone moléculaire que l'on puisse manipuler génétiquement, mais surtout un système de cellule "emballeuse" apte à produire le virus recombinant souvent rendu défectif pour la réplication. Car, manipuler le virus revient à remplacer des séquences virales - en général protéines de capsides ou d'enveloppe - par le gène à transférer.

Ainsi de nombreux virus ont été testés pour leur aptitude à remplir les fonctions de vecteur:

- le papovavirus SV40 fut le premier à être utilisé (Mulligan et al., 1979)
- les rétrovirus qui possèdent outre des promoteur-enhancers très actifs (LTR), la capacité de s'intégrer dans les chromosomes (Shimotohno et Temin, 1982)
- l'Adénovirus, dont le promoteur tardif est très fort (Van Doeren et al., 1984)
- BPV qui se maintient sous forme épisomale ou s'intègre (Sarver et al., 1981)
- l'Herpès (Kowy et Frenkel, 1984)
- le virus de la Vaccine, dont la réplication n'est pas nucléaire mais cytoplasmique (Mackett et al., 1982)

Avec les vecteurs viraux, le problème de l'accessibilité a été résolu. Cependant restent ceux du ciblage et de la pathogénicité, car il convient de traiter spécifiquement le tissu-cible et non pas tout l'organisme.

3. Le ciblage.

Le problème de ciblage, dans le cas de transfert de gènes toxiques pour les cellules tumorales, peut être résolu en utilisant les Parvovirus Autonomes (H-1 et MVMP). En effet, même si ces virus sont capables d'infecter toutes les cellules, ils ne peuvent exprimer leurs protéines et répliquer leur ADN que dans les cellules permissives, les cellules transformées. A ce titre d'ailleurs, le promoteur P₄ comme le promoteur P₃₈ peuvent être considérés comme transformation-dépendants, directement et indirectement respectivement. Rappelons que, les exigences de P₄ pour son fonctionnement dépendent de l'état de la cellule et, celles de P₃₈ dépendent de NS1, donc aussi de P₄. Vu sous cet angle, P₄ et P₃₈ pourraient être utilisés pour diriger la synthèse de molécules à vertus thérapeutiques, que nous appellerons TOX et dont la nature serait variée (anti-oncogènes, toxigènes, cytokines...). L'idée d'un Parvovirus recombinant portant la mort aux cellules transformées est née de ces considérations.

4. Comment réaliser un vecteur parvoviral?

D'un point de vue pratique les choses sont facilitées par les faits suivants:

- l'organisation génétique des Parvovirus est relativement simple,
- la séquence en est connue,
- les clones moléculaires de MVMp et H-1 sont disponibles.

Les contraintes:

Au nombre de deux, elles concernent la taille du recombinant et les palindromes. La taille encapsidable se situe entre 2-3kb et 6kb. En effet, il a été montré que les ADN défectifs de petite taille et que les ADN de taille supérieure de 10-20% à la taille de l'ADN génomique étaient encapsidés (Tattersall et Cotmore, 1990). Quant aux palindromes, rappelons que ce sont des structures indispensables, devant obligatoirement encadrer l'ADN recombinant pour permettre sa répllication et sa production. A contrario, les protéines NS et VP peuvent être apportées par complémentation d'une cellule productrice ou d'un vecteur d'expression.

Le choix du promoteur:

Deux cas de figures peuvent être proposés quelque soit le promoteur utilisé. Le premier qui consiste à utiliser un seul promoteur, P₄ ou P₃₈, sans aucune autre séquence parvovirale que les palindromes, permet de cloner un gène de taille importante voisine de 5kb, mais nécessite forcément la complémentation en NS et VP. Le second cas préserve les séquences en amont si P₃₈ est utilisé, ou en aval si le choix s'est porté sur P₄, et ne requiert donc que l'apport des protéines pour lesquelles le recombinant est défectif. Ainsi, conservant P₃₈-VP, la taille d'un gène remplaçant les NS sous promotion P₄ ne pourra pas excéder 2,5kb. En revanche le clonage sous promotion P₃₈ préservant donc P₄-NS, permet d'insérer 3,5kb. Le choix entre ces deux types de recombinant sera fonction de la taille du gène à cloner mais aussi, nous le verrons plus tard, de la possibilité d'établir un système de complémentation efficace.

Outre l'aspect méthodologique, il faut aussi considérer l'aspect sécurité. Cloner TOX sous promotion P₃₈, tout en conservant les séquences P₄-NS, constitue le système idéal car il présente un cran de sûreté supplémentaire: la régulation par NS1. Ceci revient à instaurer un système à deux vitesses où le Parvovirus recombinant pourrait exercer son activité cytotoxique intrinsèque via NS1, et tuer les survivants par l'activation de P₃₈-TOX par NS1. Le choix du promoteur P₄ est contestable dans la mesure où il est impossible d'exclure une activité basale de ce promoteur dans des cellules non-permissives, qui leurs serait fatale si un recombinant de type P₄-TOX était utilisé. Le risque est faible pour P₃₈, puisqu'à priori il s'agit d'un promoteur activable par NS1. Cependant, on doit considérer la possibilité d'une activité constitutive faible de ce promoteur. Pour contourner ce risque potentiel, il suffit d'utiliser une toxine conditionnelle, c'est à dire un gène non toxique intrinsèquement, mais dont le produit transformerait une substance non toxique en un puissant poison. Un tel système a déjà été décrit (cf. § II/7.2., p. 35), il est constitué par le gène HSV1-*tk* et l'Acyclovir. Son intérêt réside dans le fait qu'il est possible de jouer sur la dose d'ACV, et ainsi de limiter les effets éventuels d'un taux basal d'activité du promoteur.

L'avantage des Parvovirus Autonomes est certain, et MVMp a déjà été utilisé. En effet, Russel et al., (1992) ont cloné le gène de l'IL-2 (Interleukine 2) sous le contrôle de P₃₈, et leurs résultats sont encourageants *in vitro*. Cependant, pour une éventuelle

Tableau 8: Parvovirus recombinants et leur système de complémentation.

TYPE DE RECOMBINANT	CARATÉRISTIQUES	COMPLÉMENTATION: vecteur d'expression cellule "emballeuse"	STATUT DE NS1	EVENTUELS PROBLÈMES	SOLUTION
<i>pal P₄ TOX pal</i>	toxicité liée à TOX	vecteur d'expression VP + NS cellule productrice VP + NS	exogène endogène	risque de toxicité avant fin du cycle viral Expression constitutive cytotoxique de NS1 ne permet pas l'établissement d'une cellule "emballeuse"	Contrôle de l'expression: NS1 inductible
<i>pal P₃₈ TOX pal</i>	activation de P ₃₈ par NS1	vecteur d'expression VP + NS cellule productrice VP + NS	exogène endogène	id id	id
<i>pal P₄ NS P₃₈ TOX pal</i>	double toxicité NS1 + TOX sécurité :activation de P ₃₈ par NS1	vecteur d'expression VP cellule productrice VP	exogène endogène	risque de toxicité avant la fin du cycle liée au recombinant	sans solution
<i>pal P₄ TOX P₃₈ VP pal</i>	toxicité liée à TOX	vecteur d'expression NS cellule productrice NS	exogène endogène	id aux deux premiers cas	Contrôle de l'expression: NS1 inductible

thérapie humaine, H-1 reste le candidat idéal parce que contrairement à MVMP il est capable d'infecter l'Homme.

5. Comment produire un vecteur parvoviral?

S'il paraît simple de construire un Parvovirus recombinant, il est moins facile de le produire pur avec un titre infectieux élevé. Pour cela, il faut établir un système de cellule "emballeuse", qui pourrait compléter le virus recombinant défectif en protéines VP et/ou NS, et assurer sa réplication et sa production. Pour résumer, il faudrait une cellule permissive dont la particularité serait de résister à l'effet cytotoxique de NS1. Or, ce type de cellule est rare, car souvent les cellules permissives sont sensibles à l'effet de NS1. En plus du problème de la sensibilité, la cellule productrice de VP et/ou de NS, doit impérativement ne présenter aucune séquence susceptible de recombiner avec le vecteur, ceci afin d'éviter la co-production de virus sauvage et recombinant. Il est, de ce point de vue, essentiel de ne transférer que VP et/ou NS sans autre séquences parvovirales flanquantes, voire sous promotion hétérologue.

Néanmoins, le problème permissivité/sensibilité reste primordial. Dans tous les cas de figure (cf. Tableau 8), puisque la production nécessite la permissivité, l'apport de NS endogène ou exogène est risqué. Il est cependant concevable d'envisager le cas d'une cellule permissive, insensible ou peu sensible, pourvu que sa capacité à produire soit importante. Toutefois, s'il s'agit d'une cellule transformée, il faudra veiller à ce que l'agent transformant ne soit pas un virus oncogène.

Le modèle idéal serait une cellule permissive, insensible à l'effet toxique de NS1 et de capacité productrice élevée. Nous avons isolé une telle cellule, non transformée, insensible à l'effet toxique de NS1 et qui produit des virions sans être lysée.

6. A propos des AAV.

Différents des Parvovirus Autonomes, les AAV peuvent faire d'excellents vecteurs (Carter, 1990; Ohi et al., 1990), pour les raisons suivantes (pour revue Samulski, 1993):

-en absence de virus "helper", ils s'intègrent dans le génome cellulaire sans en perturber le métabolisme (Handa et al., 1977) - l'intégration spécifique n'ayant lieu qu'en présence des protéines Rep (Walz et Schlehofer, 1989, 1992; Urcelay et al., 1993; Weitzman et al., 1993) -.

-ils sont jusqu'à présent non pathogènes pour l'Homme. Mais récemment il a été montré qu'ils provoquaient l'avortement chez la souris gravide (Botquin et al., a soumis), et ils pourraient potentiellement être impliqués dans les avortements humains. En effet, la présence d'AAV a été mise en évidence dans le placenta à la suite d'avortements spontanés humains (Tobiasch et al., soumis). Dans certains cas, outre la présence d'ADN intégré, l'expression des protéines Rep a été observée, suggérant la réactivation du virus, spontanément, sans virus "helper" détectable. Cette réactivation d'un AAV latent pourrait être due à une induction hormonale (Tobiasch et al., soumis).

Outre le fait que les AAV possèdent des propriétés anti-tumorales, lorsqu'ils infectent en même temps qu'un virus "helper" des cellules transformées (Schlehofer, 1994), leur inconvénient reste leur absence d'oncotropisme, et à ce titre ils ne peuvent être utilisés comme vecteurs en thérapie anti-tumorale. Toutefois, il y a une situation où cette possibilité est envisageable. En effet, il semblerait que la protéine NS1 et que même le virus MVMP soient capables de lever la répression s'exerçant sur l'AAV intégré (Botquin et al., b soumis), de telle sorte que l'AAV pourrait alors se répliquer et exprimer ses fonctions anti-tumorales. MVM ou H-1 jouant le rôle de virus "helper", on peut penser que la co-infection AAV-Parvovirus Autonomes serait plus efficace en terme d'oncosuppression. Ceci reste à démontrer, mais étant donné la présence fréquente des AAV chez l'Homme, l'agent thérapeutique clé pourrait alors être constitué par le virus H-1 peu répandu dans la population.

IV**CONCLUSION PRÉLIMINAIRE****OU****INTRODUCTION A CE QUI SUIT**

IV. CONCLUSION PRÉLIMINAIRE: OU INTRODUCTION À CE QUI SUIT

Depuis plus de trente ans, la lutte contre le cancer est engagée, et la complexité des mécanismes de tumorigenèse la rend difficile. Mais, au fil des ans, des mécanismes ont été partiellement élucidés permettant de trouver des protocoles chimiothérapeutiques moins lourds, plus rapides et plus efficaces. Si bien qu'actuellement, près d'un cancer sur deux peut être guéri, ce qui n'est pas encore satisfaisant.

De nouvelles perspectives ont été ouvertes avec les progrès réalisés dans la compréhension moléculaire des mécanismes de transformation, et on parle aujourd'hui de vaccin anti-cancer et de médecine moléculaire. Utiliser (TIL, NK) et stimuler les défenses immunitaires naturelles (TNF, IFN, IL-2, IL-4...) sont les bases de l'immunothérapie cancéreuse. Déjà testés par voie générale, ces nouveaux traitements ont trouvés très vite leurs limites, par exemple les difficultés de ciblage tissulaire.

De l'utopie, le ciblage est pourtant passé à la réalité avec le transfert de gènes dans un but thérapeutique (pour revue, Kahn, 1993). L'idée d'utiliser des gènes comme médicaments est née de la connaissance des maladies génétiques héréditaires, pour lesquels la médecine n'apporte que des traitements de confort. Dans ce cas précis, la thérapie génique offre la possibilité de compléter l'anomalie génétique, donc d'améliorer ou de guérir la maladie associée.

S'il est vrai que différents virus pourraient être utilisés comme vecteurs pour transférer des gènes, deux problèmes majeurs restent cependant posés:

-l'inocuité du vecteur, car même privé de son pouvoir pathogène, qu'advient-il d'un vecteur rétroviral, adénoviral ou herpétique lors de l'infection naturelle par le virus sauvage...

-le ciblage tissulaire

Le bon vecteur doit être non pathogène et doit infecter les cellules appropriées. Dans le cas de cellules tumorales, les Parvovirus Autonomes H-1 ou VMp, à priori non-pathogènes mais "oncotropes" pourraient très bien convenir. Le système que nous avons étudié a permis de vérifier que la construction d'un Parvovirus recombinant, qui exprime le gène HSV1-*tk*, était possible et pouvait avoir un effet létal sur les cellules tumorales en présence d'Acyclovir.

La mise au point et l'étude d'un tel système font l'objet de la publication I présentée dans ce mémoire.

Ces résultats déjà satisfaisants ont été prolongés par la caractérisation d'un système cellulaire susceptible de produire des virus recombinants avec un titre infectieux élevé, et sans particules interférentes.

Ce travail a fait l'objet de la publication II présentée dans ce mémoire.

Parallèlement à ce travail, nous avons confirmé l'effet "normalisant" de l'antibiotique Azatyrosine (AzTyr), surtout connu pour "réverter" la transformation de cellules par le produit de l'oncogène *ras*. Cette étude nous a permis de vérifier que la "normalisation" s'accompagnait de la réacquisition de résistance au Parvovirus VMp, mais aussi que l'action "normalisante" de l'AzTyr ne se limitait pas exclusivement à la transformation induite par le produit de l'oncogène *ras*. Nous avons, en effet, montré

qu'il était possible de "réverter" vers la "normalité", des cellules de rat transformées spontanément, mais aussi que l'action de AzTyr pouvait s'exercer dans une moindre mesure (réversion partielle) sur une population de cellules humaines transformées par SV40 (résultats annexes).

Ce travail a fait l'objet de la publication III présentée dans ce mémoire.

I

ARTICLE I

**INDUCED EXPRESSION OF THE CONDITIONALLY CYTOTOXIC
HERPES SIMPLEX VIRUS THYMIDINE KINASE BY MEANS OF A
PARVOVIRAL REGULATORY CIRCUIT.**

HUMAN GENE THERAPY

1. Introduction.

Les propriétés les plus singulières mais aussi les plus intéressantes des Parvovirus Autonomes sont l'oncotropisme et l'oncosuppression-oncolyse.

L'oncotropisme n'est pas un tropisme exclusif des Parvovirus Autonomes pour les cellules transformées, mais reflète leur réplication spécifique dans ces cellules. L'oncolyse est due à la toxicité de la protéine NS1, qui induit la mort des cellules avant que n'ait lieu la production virale.

Si l'oncotropisme est la règle, l'oncosuppression-oncolyse n'est pas systématique. L'idéal serait évidemment que les Parvovirus protègent les humains contre le développement de tumeurs. Pour ce faire, nous avons imaginé "d'aider" le virus à lyser plus efficacement les cellules transformées, en lui donnant un pouvoir toxique supplémentaire.

2. Résumé.

La connaissance des modes de fonctionnement et de régulation du Parvovirus nous ont permis de construire un vecteur plasmidique pour exprimer une fonction toxique inductible. En effet, nous avons placé le gène HSV1-*tk* (dont le produit rend toxique l'ACV), sous le contrôle du promoteur P₃₈, dont nous savons qu'il est activé en trans par la protéine non-structurale NS1. Théoriquement, des cellules transformées résistantes à l'effet cytopathique de NS1 seraient automatiquement tuées par la toxine exprimée sous contrôle de P₃₈. Le recombinant pP₃₈TK a été transfecté dans des cellules semi-permissives NIH3T3TK⁻. Dans un premier temps, nous avons sélectionné les transfectants stables ne contenant qu'une seule copie du transgène pP₃₈TK, la multi-copie entraînant un taux basal d'expression trop important pour pouvoir ultérieurement détecter la transactivation de P₃₈ par NS1. Ensuite nous avons:

- déterminé la sensibilité des cellules au Parvovirus MVMP,
- vérifié l'innocuité de l'ACV et caractérisé une dose sub-optimale toxique pour les cellules ne possédant pas pP₃₈TK, et aussi, démontré que ni MVMP ni l'ACV n'étaient capables de tuer plus de 10-20% des cellules porteuses du transgène.

Enfin, nous avons:

- testé l'effet de NS1 sur l'induction de l'activité P₃₈-TK (NS1 étant fournie par l'infection par MVMP) en mesurant la mortalité cellulaire induite par MVMP et l'ACV,
- démontré qu'il y avait bel et bien synergie fonctionnelle entre les effets cytotoxiques de NS1 et l'ACV modifié, à savoir que NS1 activait, via P₃₈, la synthèse de TK qui métabolisait l'ACV de manière à ce qu'il soit incorporé à la place de la TTP dans l'ADN cellulaire en cours de réplication.

**INDUCED EXPRESSION OF THE CONDITIONALLY CYTOTOXIC HERPES
SIMPLEX VIRUS *thymidine kinase* BY MEANS OF A PARVOVIRAL
REGULATORY CIRCUIT.**

**CATHERINE ELAINE KOERING^{1*}, THIERRY DUPRESSOIR¹, SERGE PLAZA¹,
DOMINIQUE STEHELIN¹ AND JEAN ROMMELAERE^{1,2}**

* corresponding author

¹ Unité d'Oncologie Moléculaire, Institut Pasteur de Lille, Centre National de la
Recherche Scientifique URA 1160, BP 245, 59019 Lille Cedex, France
Phone: (+33)/20.87.77.29.
Fax: (+33)/20.87.79.08.

² Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung 0610 and Unité INSERM 375, Im
Neuenheimer Feld 242, D-69120 Heidelberg, Germany

Human Gene Therapy

EDITORIAL OFFICE

National Institutes of Health
National Heart, Lung and
Blood Institute
Bldg. 10, Room 7D18
Bethesda, MD 20892
(301) 496-5844
FAX (301) 496-9985

EDITOR-IN-CHIEF

W. French Anderson, M.D.
University of Southern California
School of Medicine
Norris Cancer Center, NOR 612
1441 Eastlake Avenue
Los Angeles, CA 90033
(213) 224-6423
FAX (213) 224-6457

ASSOCIATE EDITOR

A. Dusty Miller, Ph.D.
Fred Hutchinson Cancer
Research Center
1124 Columbia Street
Seattle, WA 98104
(206) 667-2890
FAX (206) 667-6523

EUROPEAN EDITOR

Claudio Bordignon, M.D.
H.S. Raffaele
Gene Therapy Program
Service of Hematology
via Olgettina 60
20132 Milano, Italy
39-2-26432351/26432357
FAX 39-2-26432285

Dr. Catherine E. Koering
Unité d'Oncologie Moléculaire
Institut Pasteur de Lille
Centre Nationale de la Recherche Scientifique
URA 1160 BP 245
59019 Lille Cédex
France

Fax: 0033-20 87 79 08

Milan, December 17th 1993

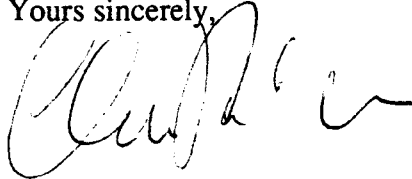
Dear Dr. Koering,

I am pleased to inform you that your manuscript number **93-26 S** entitled "Induced Expression of the Conditionally Cytotoxic Herpes Simplex Virus Type 1 thymidine kinase by means of a Parvoviral Regulatory Circuit" is now accepted for publication in **Human Gene Therapy**. You will be contacted by the publisher shortly.

Thank you for modifying the manuscript accordingly to the reviewers' suggestions. The reviewers are now satisfied with the present version of the manuscript.

Thank you for submitting your important work to **Human Gene Therapy**.

Yours sincerely,



Claudio Bordignon, M.D.
European editor

Mary Ann Liebert, Inc.  publishers

ABSTRACT

As a step towards the achievement of targeted expression of toxic genes, we have established a model system using the selective transactivation of the late promoter P₃₈ of Minute Virus of Mice (MVMp) by the parvoviral non-structural protein NS-1. The conditionally toxic herpes simplex virus type 1 *thymidine kinase* gene (HSV1-*tk*) was cloned under the control of the P₃₈ promoter and transfected into NIH3T3 TK⁻ cells. Treatment of the stably transfected cells with acyclovir (ACV) followed by infection with MVMp reduced cell survival by 3.5- to 5- fold compared to the toxic effects of ACV or MVMp alone. These results indicate that it should be possible to combine the genuine cytopathic action of parvoviruses with a specific activation of toxic genes driven by parvoviral promoters, to achieve the targeted destruction of parvovirus-expressing (in particular tumor) cells.

OVERVIEW SUMMARY

Parvoviruses are oncotropic agents that are considered as potential vectors for the delivery of toxic genes into tumor cells. The HSV1-*tk* gene which is toxic when expressed in the presence of the nucleoside analog acyclovir (ACV), was placed under the control of the structural genes promoter (P₃₈) of parvovirus Minute Virus of Mice (MVMp). Cells that were stably transfected with this construct were killed when concomitantly treated with ACV and MVM. Since P₃₈ is transactivated by the parvoviral regulatory proteins, these observations suggest that parvovirus-based vectors may be used to target a toxic phenotype in cells that are competent for parvovirus gene expression, which include more particularly transformed cells.

INTRODUCTION

Parvoviruses are small (20nm in diameter) single-stranded DNA (5kb) viruses that infect a wide variety of animal species, including humans (Siegl, 1984). Because of their genetic simplicity, these viruses are dependent, for their replication, on cellular factors that are expressed as a function of proliferation (S-phase of the cell cycle) and differentiation (Cotmore and Tattersall, 1987).

Many studies have demonstrated the ability of parvoviruses to interfere with the development of spontaneously occurring and virus- or chemical carcinogen-induced tumors, as well as with the formation of tumors from transformed cells inoculated in laboratory animals (Dupressoir *et al.*, 1989; Guetta *et al.*, 1986; Rommelaere and Cornelis, 1991; Toolan *et al.*, 1982). The parvoviruses H-1 and Minute Virus of Mice (prototype strain, MVMP) are cytopathogenic for transformed lines of human and murine fibroblastic and epithelial cells (Chen *et al.*, 1986; Cornelis *et al.*, 1988; Rommelaere and Cornelis, 1991), but not, or to a lesser extent, for their normal counterparts (Cornelis *et al.*, 1990; Cornelis *et al.*, 1988; Mousset and Rommelaere, 1982; Mousset *et al.*, 1986; Toolan *et al.*, 1982). Cytotoxicity could be dissociated from the formation of progeny virus particles, suggesting that the parvoviral products responsible for cell killing are not necessarily linked to virus production (Guetta *et al.*, 1990). It was shown that cytotoxicity is mediated by the major non-structural viral protein NS-1, the expression of which was found to be enhanced in transformed cells (Caillet-Fauquet *et al.*, 1990; Cornelis *et al.*, 1988). In the viral replication cycle, NS-1 transactivates the late promoter P₃₈ of H-1 and MVMP parvoviruses (Rhode, 1985; Rhode and Richard, 1987). Altogether, these properties should allow the use of MVMP as a vector to target transformed cells for the expression of foreign (e.g. toxic) genes. The potential use of parvoviruses as gene therapy vectors has recently been exemplified for adeno-associated viruses (Flotte *et al.*, 1993; Walsh *et al.*, 1992) as well as for autonomous parvoviruses (Russel *et al.*, 1992).

Thymidine kinase encoded by the herpes simplex virus type 1 (HSV1-TK) is involved in HSV1 replication but does not interfere with cellular replication (Schaeffer *et al.*, 1978). However, cells that express HSV1-*tk* are preferentially killed in the presence of nucleoside analogs such as acyclovir (ACV) or gancyclovir, which are incorporated into replicating DNA (Borrelli *et al.*, 1988; Heyman *et al.*, 1989; Molten and Wells, 1990; Molten *et al.*, 1990; Venkatesh *et al.*, 1990). The HSV1-*tk* gene was placed under the control of the MVMP promoter P₃₈ which is transactivated by the early parvoviral non-structural (NS) products. Transfection of this construct into NIH3T3 TK⁻ cells offered the opportunity to study the effects of parvovirus infection on TK/ACV-mediated cytotoxicity. This system takes advantage of the high activity, in NIH3T3 TK⁻ cells, of the parvoviral P₄ promoter which drives the NS transcription unit. Thus, infection of NIH3T3 TK⁻ cells with MVMP leads to the production of NS proteins that transactivate the constitutively weak promoter P₃₈ (Rhode, 1985; Rhode and Richard, 1987), triggering the expression of the transfected HSV1-*tk* gene placed under the control of this promoter. The results presented below indicate that the conditionally toxic HSV1-*tk* gene was induced in cells supporting parvovirus early gene expression. Hence, the combination of parvoviral NS and HSV1-TK/ACV effectors may be used to target a synergistic toxic effect in cells that are prone to express parvoviral genes, in particular neoplastic cells.

MATERIALS AND METHODS

Subcloning of the HSV1-*tk* gene under control of the P₃₈ promoter of MVMP.

pULB3545 is a pBR322-based molecular clone of the P₃₈ promoter region of MVMP (HaeIII₁₈₅₃-PstI₂₁₂₉) and was kindly provided by P. Spegelaere (ULB, Rhode St-Genèse, Belgium). Plasmid pP38-TK was constructed by insertion of a BglII-NcoI fragment (1475 nt.), carrying the HSV1-*tk* coding region (1335 nt.) and excised from plasmid pFG5 (Colbère-Garapin *et al.*, 1979), at the XhoI site located downstream from promoter P₃₈ in plasmid pULB3545. The P₃₈-*tk* fragment (KpnI-HindIII) was subcloned at the BamHI site of plasmid pSV2-neo (Southern and Berg, 1982), generating pTK-neo (see Fig. 1). Enzymes and buffers were used according to Sambrook *et al.* (1989).

Selection of the cell clones used in this study.

NIH3T3 TK⁻ cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal calf serum (GIBCO, Scotland), 1% non-essential amino-acids, 1% Glutamine and 12 µg/ml Gentamycin. Cultures (5x10⁵ cells per 100 mm-dish) were transfected with 20 µg of pTK-neo, using the calcium-phosphate method (Chen and Okayama, 1987), and stable cell transformants were selected by incubation for 20 days in medium containing 400 µg/ml of Geneticin (GIBCO). Neo^R clones were further tested for their ability to grow in HAT (Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine) medium (Sigma Chemical, England) or in the presence of various concentrations of ACV (kindly provided by Laboratoires Wellcome, France), as described in the main text.

MVMP infection.

MVMP was propagated and plaque-titrated in A9 cells (Mousset *et al.*, 1986), and purified as described by Tattersall *et al.* (1976). Exponentially growing cultures (10⁶ cells) were inoculated with MVMP at various multiplicities of infection (MOI), by incubation for 1 h with virus suspensions in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 9 mM CaCl₂ and 5 mM MgCl₂.

Preparation of NS1-specific antiserum.

The XhoI₂₀₆₆-StuI₂₃₉₇ MVMP DNA fragment coding for the carboxy-terminal region of NS-1 was subcloned between the BamHI and HincII sites of the pUC8 vector. The XhoI-HindIII fragment was excised and inserted between the BamHI and HindIII sites of the pPLC24 vector (Maniatis *et al.*, 1982). After transfer into E.Coli and induction of the PL promoter at 42°C for 3 h, the bacteria were boiled and proteins fractionated by 15% SDS-PAGE. The MS2-NS-1 fusion polypeptide band (21KDa) was cut out from the gel and prepared for immunisation of rabbits according to Ghysdael *et al.* (1986).

Production and quantitation of viral proteins: NS-1 immunoprecipitation and gel electrophoresis.

At 18-24 h post-infection (p.i.), MVM (MOI=5 plaque-forming units [PFU]/cell) and mock-treated cultures (1.5x10⁶ cells per 100 mm-dish) were metabolically labeled with 200 µCi of [³⁵S]methionine (800 Ci/mmol; Amersham Corp., England). Cells were lysed in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X100, 0.5% sodium desoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 0.5% Aprotinine. After clarification by centrifugation (15000 g) at 4°C, lysate samples containing equal amounts of trichloroacetic acid-precipitable radioactivity (10⁷ cpm) were immunoprecipitated using specific rabbit anti-NS-1 polyclonal antibodies and protein A-Sepharose, and fractionated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The gels were treated with Amplify (Amersham), dried and autoradiographed using X-OMAT S films (Kodak).

Southern blot analysis.

Genomic DNA was isolated using standard protocols and digested with various restriction enzymes. Fragments were separated by 1% agarose gel electrophoresis and blotted onto a Nylon membrane (Amersham). Blots were hybridized with a *tk* probe (fragment used for the cloning process) previously labeled with [³²P]dCTP by means of the Megaprime DNA labeling system (Amersham), and autoradiographed using X-OMAT K films (Kodak).

Measurement of the survival of MVMp and ACV-treated cells.

Cell survival was determined from the ability of treated versus control cells to form colonies on plastic. Cells were trypsinized 4 h after MVMp or mock infection, and replated at low densities (500 to 2000 cells) onto 60 mm-dishes in culture medium supplemented with ACV at concentrations ranging from 0 to 25 µg/ml. Colonies were fixed and stained with methanol/1% methylen blue, 6-8 days p.i.

Radioalabeled ACV incorporation in MVMp-infected and mock-treated cells.

MVMp (MOI=10 PFU/cell) and mock-infected NIH3T3 TK⁻ cultures and HSV1-*tk* transfectants (3x10⁵ cells per 35 mm-dish) were metabolically labeled for 1 to 48 h in 0.5 ml of medium supplemented with 25 µCi of [³H]Acyclovir (20 Ci/mmol; Moravek Biochemicals, USA). At intervals, cultures were extensively rinsed with PBS and trypsinized. Radioactive ACV was quantified in the medium, rinses and collected cells by liquid scintillation spectrometry. The total radioactivity was similar for all cultures. The cell-associated radioactivity was taken as evidence of HSV1-*tk* gene expression, given the need of ACV phosphorylation for the intracellular retention of the drug and its incorporation into DNA (Schaeffer *et al.*, 1978). The HSV1-TK activity was determined from the radioactivity incorporated by HSV1-*tk*-transfected cells over the background level detected in parental NIH3T3 TK⁻ cells.

RESULTS

Establishment of a cellular system containing the HSV1-*tk* gene under parvoviral control.

NIH3T3 TK⁻ cells are competent for MVMP DNA replication and expression, while being weakly sensitive to the parvoviral killing effect (Mousset *et al.*, 1986). These cells were stably transfected with pTK-neo, a recombinant plasmid that was constructed as shown in Fig. 1A and harbours the *neo* and *tk* genes in opposite orientations and under control of SV40 early and MVMP P₃₈ promoters, respectively. The procedure used for the isolation of stable cell transfectants is depicted in Fig. 1B. Cultivation in the presence of geneticin (400 µg/ml) for 20 days led to the selection of several hundred resistant (Neo^R) clones (Southern and Berg, 1982), among which eleven were isolated and characterized.

These Neo^R clones all proved to exhibit a TK⁺ phenotype allowing them to grow in HAT medium, whereas untransfected NIH3T3 TK⁻ cell cultures were totally destroyed within less than 4 days under these conditions. In order to discard transfectants that constitutively expressed the transferred *tk* gene at a high level (e.g. as a result of the presence of multiple inserts and/or their integration in the vicinity of cellular enhancer sequences) and to increase the signal/noise ratio during NS-1 transactivation, we selected subclones that produced a low enough TK level to allow them to resist a moderate dose of ACV. Although cytopathic effects were visible, all Neo^R TK⁺ clones continued to proliferate in medium containing 5-20 µg/ml of ACV. When the ACV concentration was raised to 25 µg/ml, extensive cell death took place. Yet a number of ACV (25 µg/ml)-resistant subclones could be isolated from some of the Neo^R TK⁺ lines. These subclones were likely to retain the transferred *tk* gene and to express it at a basal level, since they were killed at the higher ACV doses tested (100 µg/ml or more), whereas parental NIH3T3 TK⁻ cells resisted ACV concentrations up to 800 µg/ml.

Subclones that survived 25 µg/ml of ACV were further analyzed for their resistance to the killing effect of MVMP in the absence of ACV. The cytopathic effect of MVMP was assayed by measuring the ability of infected cells to form colonies on plastic. 96% of NIH3T3 TK⁻ cells and 78-95% of transfected cells survived MVMP infection at an MOI of 10 PFU per cell. The plating efficiency of uninfected cells was around 40%. As illustrated in Fig. 2A, two independent subclones (designated to as TK⁺100 and TK⁺101) were especially resistant to MVMP (95 and 90% survival, respectively) and were further analysed for the presence of the *tk* gene and the production of NS-1 proteins after MVMP infection. Southern blotting experiments, using the *tk* fragment (excised from pFG5) as a probe, revealed a single site of HSV1-*tk* gene insertion in the genome of both TK⁺100 and TK⁺101 cells (data not shown). It is worth mentioning that three ACV (25 µg/ml)- sensitive Neo^R TK⁺ clones were also tested in this respect and found to contain multiple inserts of the transfected DNA, which may lead to a constitutive TK activity responsible for their killing by the drug. NS-1 protein expression was also detected by immunoprecipitation in both TK⁺100 and TK⁺101 subclones after MVMP infection. The TK⁺ cells studied accumulated about 20% more NS-1 proteins than the parental TK⁻ line (data not shown).

Effect of MVMP infection on cell sensitivity to ACV.

The cytotoxic actions of ACV and MVMP were assayed by measuring the residual ability of treated cells to form colonies on plastic. This was first assessed for the total Neo^R cell population recovered as a whole after removal of the eleven Neo^R TK⁺ clones mentioned above. Cells were exposed, or not, to the isolated or combined

treatment with ACV (5-25 $\mu\text{g/ml}$) and MVMP (MOI=2 PFU/cell). As shown in Table 1, MVMP infection aggravated the genuine toxic activity of ACV. At the higher ACV concentrations tested (15 and 25 $\mu\text{g/ml}$), MVMP and ACV appeared to act synergistically, although the intrinsic toxicity of ACV did not allow a firm conclusion to be drawn.

Therefore, this question was further investigated, using the TK⁺100 and TK⁺101 subclones that have been selected for their high resistance to either treatment with MVMP or ACV (up to 25 $\mu\text{g/ml}$) alone. ACV was tested for its effect on the cloning efficiency of these cells in the absence (Fig. 2B) or presence (Fig. 2C) of NS-1 proteins provided through MVMP infection. After virus inoculation, cells were incubated for 6-8 days in culture medium containing ACV at concentrations ranging from 0 to 25 $\mu\text{g/ml}$. MVMP infection (Fig. 2A) or ACV treatment (Fig. 2B) each alone caused only a slight reduction of colony formation, whereas both agents combined proved to be lethal for about 80% of TK⁺100 and TK⁺101 cells (Fig. 2C). Thus, MVMP and ACV had a synergistic cytotoxic activity, in agreement with the expected inducing effect of NS-1 proteins on the production of HSV1-TK that converts ACV into a potent toxin. It should also be stated that the 20% of cells from the two clones which overcame the combined toxic effect of ACV and MVMP did not represent an intrinsically resistant subset of the original population but rather survived by chance. Indeed, after being expanded, survivors were still found to be killed at more than 80% by the 25 $\mu\text{g/ml}$ of ACV plus MVMP infection regimen (data not shown).

In order to ascertain that the TK activity was indeed elevated in the presence of NS-1 proteins, [³H]ACV was added to the culture medium at 1 h after MVMP infection, and the kinetics of drug incorporation was determined at 3-6 h intervals, during 48 h (corresponding to 2.5 cell doubling times). No incorporation of ACV could be detected in parental NIH3T3 TK⁻ cells, irrespective of whether they were infected or not (Fig. 2D). In contrast, MVMP infection greatly increased the low basal level of ACV incorporation in TK⁺100 and TK⁺101 cells (Fig. 2E and 2F). The incorporation curve had a bimodal shape. Since the accumulation of NS-1 is coupled with the progression of both the cell and virus cycles and was reported to follow a similar kinetics in semi-permissive cells (Rhode and Paradiso, 1989; Cornelis *et al.*, 1990), this pattern may be ascribed to the expected induction of TK activity by the parvoviral polypeptide. The reason for the leakage of incorporated ACV with time is presently unclear but may tentatively be ascribed to the instability or catabolism of the modified nucleotide (De Miranda and Good, 1992) and/or to its nucleasic removal from blocked cellular or viral DNA replicative intermediates. Since the HSV1-*tk* cassette was placed under the control of the NS-1-inducible parvoviral promoter P₃₈, the enhanced metabolism and toxicity of ACV in infected TK⁺ cells was very likely to reflect the NS-1-mediated transcriptional activation of the transfected gene. However, additional level(s) of TK activity modulation by MVMP infection could not be ruled out.

DISCUSSION

A major challenge encountered in anti-cancer therapy is the specificity of the treatment for tumor cells. One such strategy would consist of using oncotropic vectors to deliver genes coding for "therapeutic" molecules (cytokines, anti-oncogenes, toxins) into cancer cells (Evans, 1989). Parvoviruses are promising vectors in this respect (Russell *et al.*, 1992; Maxwell *et al.*, 1993), given their preferential replication and cytopathic effect in many transformed versus parental normal cells (Cornelis *et al.*, 1990). Though variable in extent from one system to the other, this enhanced susceptibility to parvovirus infection was found to concern most of the transformants tested so far, raising hopes of using recombinant parvoviruses to target toxic phenotypes in these cells. Yet, it remains to be determined whether the selectivity of parvoviral attack also applies to tumour cells *in vivo*.

Among anti-cancer agents, conditionally active toxins are especially interesting in that their toxic effect can be modulated by means of an exogenous drug. This provides an additional experimental control over the time-course and magnitude of the induced toxicity, besides the specificity achieved at the gene expression level. Such a double check is important from both efficacy and safety points of view, and was validated in various systems (Borrelli *et al.*, 1988; Venkatesh *et al.*, 1990; Caruso and Klatzman, 1992). The HSV1-*tk* gene is especially interesting in this respect since its product is toxic for cells only in the presence of its substrate analogs acyclovir (ACV) or gancyclovir (Borrelli *et al.*, 1988; Heyman *et al.*, 1989; Molten and Wells, 1990; Molten *et al.*, 1990; Venkatesh *et al.*, 1990). It has been reported that human brain tumor cells are accessible *in vivo* to the combined treatment with HSV1-*tk* and gancyclovir (Blaese, 1992; Thompson, 1992).

It was recently shown that autonomous parvoviruses can be used as vectors to deliver and transiently express heterologous genes in appropriate hosts cells (Russell *et al.*, 1992; Maxwell *et al.*, 1993). Recombinant parvoviruses in which the transgene substitutes for (part of) the structural transcription unit and is brought under control of the viral P₃₈ promoter (i.e. [P₄NS-P₃₈transgene] constructions) fulfil all *cis* and *trans* conditions for efficient replication and expression in target cells. In particular, recombinant vectors of this type retain the parvoviral P₄NS cassette, the expression of which is required for DNA amplification and transactivation of promoter P₃₈ (Rhode and Paradiso, 1989). The question then arises whether a P₃₈-programmed HSV1-*tk* gene is toxic to cells that are competent for MVMP gene expression, in the presence of NS proteins and ACV. The present work is a preliminary step towards the validation of this approach. Given the low titers of recombinant parvoviruses achieved by means of the encapsidation systems available to date (Russell *et al.*, 1992), a two-stage procedure was used instead of a straight infection with [P₄NS-P₃₈*tk*] vectors. Cells from an established line capable of expressing parvoviral genes, were first stably transfected with a P₃₈*tk* cassette, after which they were infected with wild-type MVMP virions to bring about P₄-directed NS production. Our results indicate that a toxic phenotype could indeed be targeted in these cells and required the administration of both MVMP and ACV. The ACV concentrations used in the present work (up to 1.2x10⁻⁴M) were in the range of the Gancyclovir or ACV doses reported in the literature for target cell obliteration *in vitro* and *in vivo* (0.9x10⁻⁶M to 0.6M) (Borelli *et al.*, 1988; Caruso and Klatzman, 1992; Heyman *et al.*, 1989; Molten and Evans 1990; Molten *et al.*, 1990; Venkatesh *et al.*, 1990).

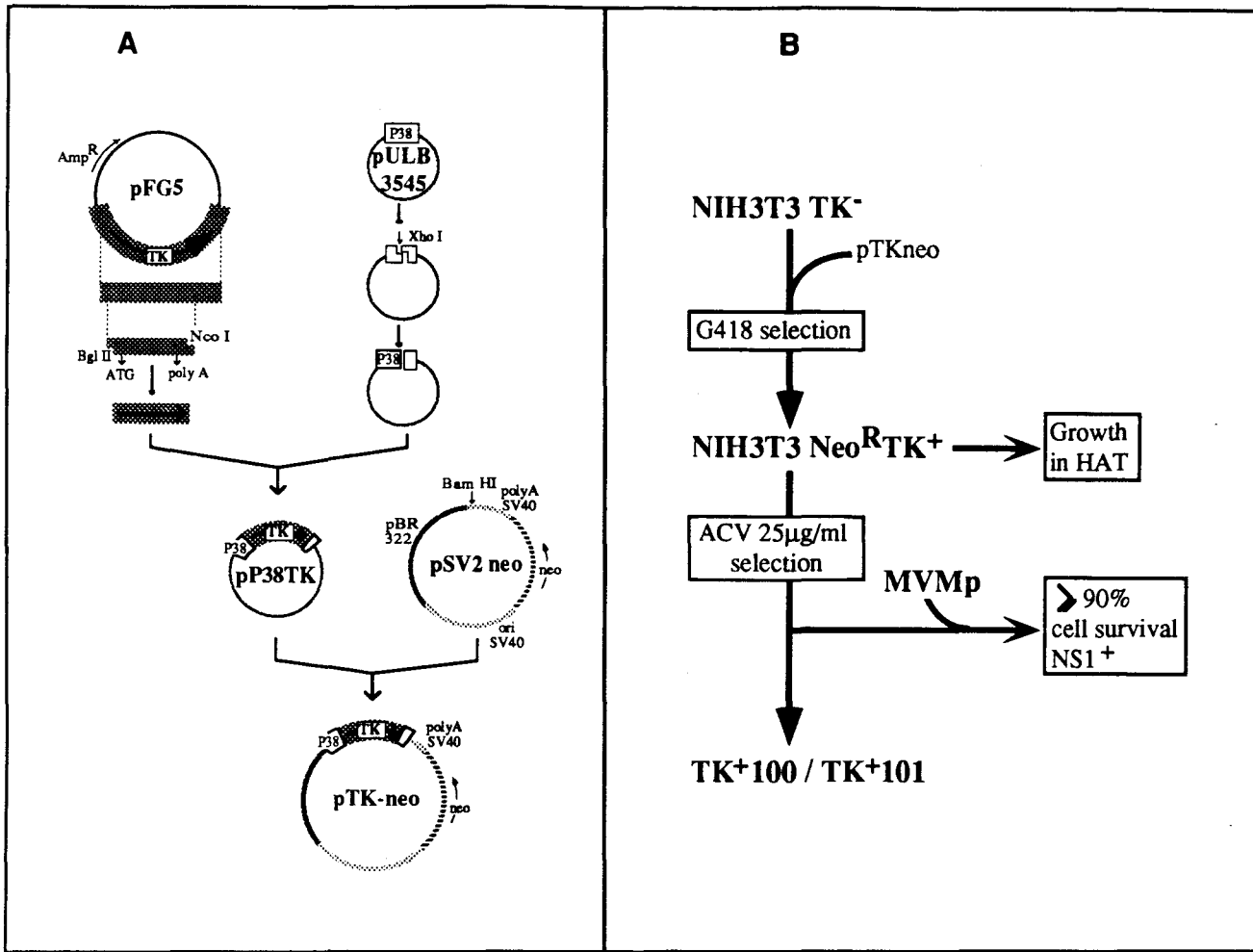
Altogether, our data give credence to the further elaboration and use of conditionally cytotoxic recombinant parvoviruses that would both deliver heterologous

genes and preferentially express them in target cells. These may include more particularly transformed cells, in view of their usually enhanced capacity for parvovirus replication. Hence, the construction designed in this study placed the *tk* gene under the control of a regulatory circuit which was triggered by the parvoviral NS proteins known to be overproduced in a number of transformed cells (Rommelaere and Cornelis, 1991). Expression of toxic transgenes from replication-competent parvoviral vectors would offer the additional advantage of bringing about the intrinsic cytotoxic effect of the NS proteins (Caillet-Fauquet *et al.*, 1990). This would be especially relevant to a transformed cell population, a variable fraction of which was found to escape the genuine parvoviral cytopathic effect (Rommelaere and Cornelis, 1991). Infection with a recombinant parvovirus harbouring a NS-inducible deleterious transgene should allow the heterologous toxin to take over from NS proteins and synergistically achieve a more efficient oncolytic action.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank P. Spegelaere (Rhode St-Genèse) for the gift of the pULB3545 plasmid, J. Ghysdael (Orsay) for providing the NIH3T3 TK⁻ cell line and Laboratoires Wellcome S.A. (Paris) for giving ACV. We are greatly indebted to A. Begue for technical assistance and to J.R. Schlehofer for stimulating and helpful discussions. We are grateful to J.R. Schlehofer, S. Saule and K. MacLeod for critical reading of the manuscript.

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Recherche Médicale et de la Santé and the Institut Pasteur de Lille, and by fellowships from the Institut Pasteur de Lille (to C.E.K. and S.P.) and the Conseil Régional Nord-Pas de Calais (to C.E.K.).



KOERING
Figure 1

LEGENDS

Figure 1. Outline of the experimental system.

(A) Subcloning of the HSV1-*tk* gene under control of the P₃₈ promoter of MVMP. The pSV-TK plasmid was obtained by subcloning the P₃₈-*tk* fragment from plasmid pP38-TK within the BamHI site of plasmid pSV2-neo.

(B) Cell selection procedure. NIH3T3 TK⁻ were transfected with 20 µg of pTK-neo and stable cell transformants were selected by incubation in the presence of 400 µg/ml Geneticin for 20 days. Neo^R clones proved to be TK⁺, on the basis of their ability to grow in HAT (Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine) medium. Cell clones expressing a constitutive TK level that was low enough to allow their growth in the presence of 25 µg/ml of ACV were further selected. Among these, two clones (TK⁺100/TK⁺101) were chosen for their high survival and ability to produce NS-1 proteins after infection with MVMP.

Figure 2. Effect of MVMP and ACV on TK⁺100 and TK⁺101 cells.

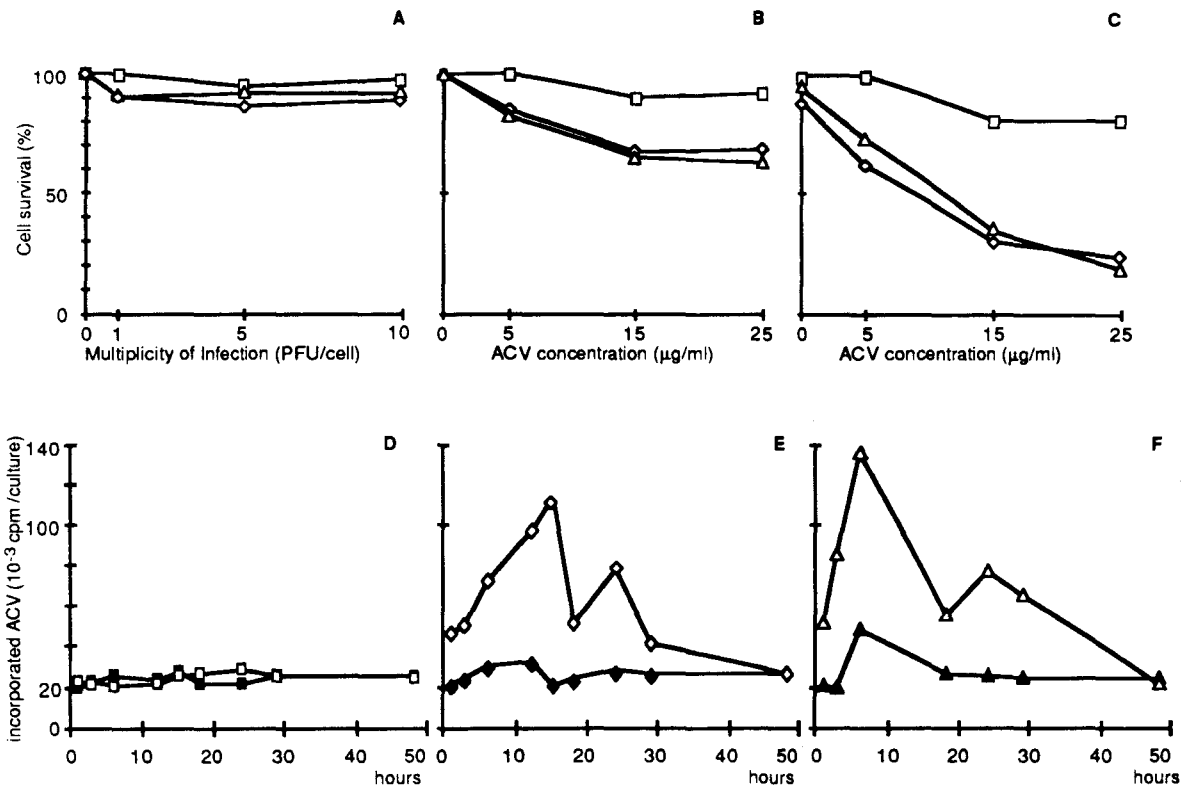
(A-C) Cell survival after treatment with MVMP alone (A), ACV alone (B) or both agents (C). Cell survival was determined as the ability of treated, versus control cells to form colonies on plastic. Exponentially growing cultures (10⁶ cells) were infected with MVMP by incubation for 1 h with virus suspensions in PBS supplemented with 9 mM CaCl₂ and 5 mM MgCl₂. The MOI was variable (A) or 10 PFU/cell (C). Cells were trypsinized 4 h after MVMP or mock infection, and replated at low densities (500 to 2000 cells) onto 60 mm-dishes in culture medium containing ACV at concentrations ranging from 0 to 25 µg/ml. Colonies were fixed and stained with methanol/1% methylen blue, 6-8 days p.i.

□ NIH3T3 TK⁻ cells, ◇ TK⁺ clone 100, △ TK⁺ clone 101

(D-F) Incorporation of radioactive ACV in MVMP-infected and mock-treated controls. MVMP (MOI=10 PFU/cell) and mock-infected NIH3T3 TK⁻ (D), TK⁺100 (E) and TK⁺101 (F) cultures (3x10⁵ cells per 35 mm-dish) were metabolically labeled for 1 to 48 h in 0.5 ml of medium supplemented with 25 µCi of [³H]Acyclovir. At intervals, the culture medium, buffer rinses and trypsinised cells were collected, and radioactive ACV was quantified in each fraction by liquid scintillation spectrometry. The total radioactivity was similar for all cultures. Cell-associated radioactivity is shown. Open symbols: MVMP-infected cells; closed symbol: mock-treated cells.

Data shown are average values from 11 quadruplicate (A-C) and 6 triplicate (D-F) independent experiments (standard deviation less than 15%).

KOERING



KOERING
Figure 2

Table 1: Killing effect of MVMp and ACV on the total Neo^R population of pTKneo-transfected cells.

ACV ($\mu\text{g/ml}$)	Cell survival (%) ^a	
	- MVMp	+ MVMp
0	100	76
5	71	54
15	62.5	32
25	15	3.5

^a Cells were exposed to ACV and/or MVMp (MOI=2 PFU/cell), and their residual colony forming ability was measured in quadruplicate relative to that of mock-treated cultures. (average of 6 independent experiments, standard deviation less than 20%).

REFERENCES

- BLAESE, M. (1992). Congress communication and report. Les Conférences Lilly, Paris-La Vilette.
- BORRELLI, E., HEYMAN, R., HSI, M., and EVANS, R.M. (1988). Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **85**, 7572-7576.
- 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 non-structural proteins. EMBO J. **9**, 2989-2995.
- CARUSO, M., and KLATZMANN, D. (1992). Selective killing of CD4+ cells harboring a human immunodeficiency virus-inducible suicide gene prevents viral spread in an infected cell population. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**, 182-186.
- CHEN, C., and OKAYAMA, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. Mol. Cel. Biol. **8**, 2745-2752.
- CHEN, Y.Q., de FORESTA, J., HERTGOTHS, 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.
- COLBÈRE-GARAPIN, F., CHOUSTERMANN, S., HORODNICEANU, F., KOURILSKY, P., and GARAPIN, A.C. (1979). Cloning of the active *tk* gene of HSV type 1 in E. Coli K12. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **76**, 3755-3759.
- CORNELIS, J.J., BECQUART, P., DUPONCHEL, N., SALOMÉ, N., AVALOSSE, B.L., NAMBA, N., and ROMMELAERE, J. (1988). Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen or SV40 correlates with an increase in susceptibility to the parvoviruses H-1 virus and Minute Virus of Mice. J. Virol. **62**, 1679-1686.
- 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.
- CORNELIS, J.J., SPRUYT, N., SPEGELAERE, P., GUETTA, E., DARAWSHI, T., COTMORE, S.F., TAL, J., and ROMMELAERE, J. (1988). Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by the parvovirus Minute Virus of Mice correlates with an increase in viral gene expression. J. Virol. **62**, 3438-3444.
- COTMORE, S.F. and TATTERSALL, P.J. (1987) The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. Adv. Virus Res. **33**, 91-174.
- DE MIRANDA, P. and GOOD, S.S. (1992). Species differences in the metabolism and disposition of antiviral nucleoside analogues : 1. Acyclovir. Antiviral Chem. and Chemother. **3**, 1-8.

- 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.
- EVANS, G.A. (1989). Dissecting mouse development with toxigenics. *Genes & Dev.* **3**, 259-263.
- FLOTTE, T.R., AFIONE, S.A., SOLOW, R., DRUMM, M.L., MARKAKIS, D., GUGGINO, W.B., ZEITLIN, P.L., and CATER, J.B. (1993). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J. Biol. Chem.* **268**, 3781-3790.
- GHYSDAEL, J., GEGONNE, A., POGNONEC, P., DERNIS, D., LEPRINCE, D., and STEHELIN, D. (1986). Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a c-ets oncogene encoded Mr 54,000 cytoplasmic protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 1714-1718.
- 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**, 1177-1780.
- GUETTA, E., MINCBERG, M., MOUSSET, S., BERTINCHAMPS, C., ROMMELAERE, J., and TAL, J. (1990). The selective killing of transformed rat cells by Minute Virus of Mice does not require infectious virus production. *J. Virol.* **64**, 458-462.
- HEYMAN, R., BORELLI, E., LESLEY, E., ANDERSON, D., RICHMAN, D.D., BAIRD, S.M., HYMAN, R., and EVANS, R.M. (1989). Thymidine kinase obliteration: Creation of transgenic mice with controlled immune deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 2698-2702.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., and SAMBROOK, J. (1982). In *Molecular cloning: a laboratory manual*. First Ed. Cold Spring Harbor Laboratory press.(CHS, New York), p. 424.
- MAXWELL, I.H., MAXWELL, F., RHODE, S.L., CORSINI, J. and CARLSON, J.O. (1993). Recombinant Lull1 autonomous parvovirus as a transient transducing vector for human cells. *Hum. Gene Ther.* **4**, 441-450
- MOLTEN, F., and WELLS, J.M. (1990). Curability of tumors bearing Herpes Thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 297-300.
- MOLTEN, F., WELLS, J.M., HEYMAN, R.A., and EVANS, R.M. (1990). Lymphoma regression induced by ganciclovir in mice bearing a herpes thymidine kinase transgene. *Hum. Gene Ther.* **1**, 125-134.
- MOUSSET, S., and ROMMELAERE, J. (1982). Minute Virus of Mice inhibits cell transformation by Simian Virus 40. *Nature* **300**, 537-539.
- MOUSSET, S., CORNELIS, J.J., SPRUYT, N., and ROMMELAERE, J. (1986). Transformation of established murine fibroblasts with an activated cellular Harvey Ras oncogene or the polyoma virus middle T gene increases cell permissiveness to parvovirus minute of mice. *Biochimie* **68**, 951-955.

- RHODE, SL 3D. (1985). Trans-Activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *J. Virol.* **55**, 886-889.
- RHODE, SL 3D., and PARADISO, P.R. (1989) Parvovirus replication in normal and transformed cells correlates with the nuclear translocation of early protein NS1. *J. Virol.* **63**, 349-355.
- RHODE, SL 3D., and RICHARD, S. M. (1987). Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J. Virol.* **61**, 2807-2815.
- ROMMELAERE, J., and CORNELIS, J.J. (1991). Antineoplastic activity of parvoviruses. *J. Virol. Methods* **33**, 233-251.
- RUSSELL, S.J., BRANDENBURGER, A., FLEMMING, C.L., COLLINS, M.K.L., and ROMMELAERE, J. (1992). Transformation-dependent expression of interleukin genes delivered by a recombinant parvovirus. *J. Virol.* **66**, 2821-2828.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T. (1989). In *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second Ed. Cold Spring Harbor Laboratory press. (CHS, New York).
- SCHAEFFER, H.J., BEAUCHAMP, L., De MIRANDA, P., and ELION, G.B. (1978). 9-(2-Hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature* **272**, 583-585.
- SIEGL, G. (1984). Biology and pathogenicity of autonomous parvoviruses. In *The Parvoviruses*. Berns, K.I. ed. (Plenum press, New York), pp. 297-362.
- SOUTHERN, P.J., and BERG, P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Gen.* **1**, 327-341.
- TATTERSALL, P., CAWTE, P.J., SHATKIN, A.J., and WARD, D.C. (1976). Three structural polypeptides coded for by minute parvovirus of mice, a parvovirus. *J. Virol.* **20**, 273-289.
- THOMPSON, L. (1992). At age two, gene therapy enters a growth phase. *Science* **258**, 744-746.
- TOOLAN, H.W., RHODE III, 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.
- VENKATESH, L.K., ARENS, M.Q., SUBRAMANIAN, T., and CHINNADURAI, G. (1990). Selective induction of toxicity to human cells expressing human immunodeficiency virus type 1 tat by a conditionally cytotoxic adenovirus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 8746-8750.
- WALSH, C.E., LIU, J.M., XIAO, X., YOUNG, N.S., NIENHUIS, A.W., and SAMULSKI, R.J. (1992). Regulated high level expression of a human gamma-globin gene introduced into erythroid cells by an adeno-associated virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 7257-7261.

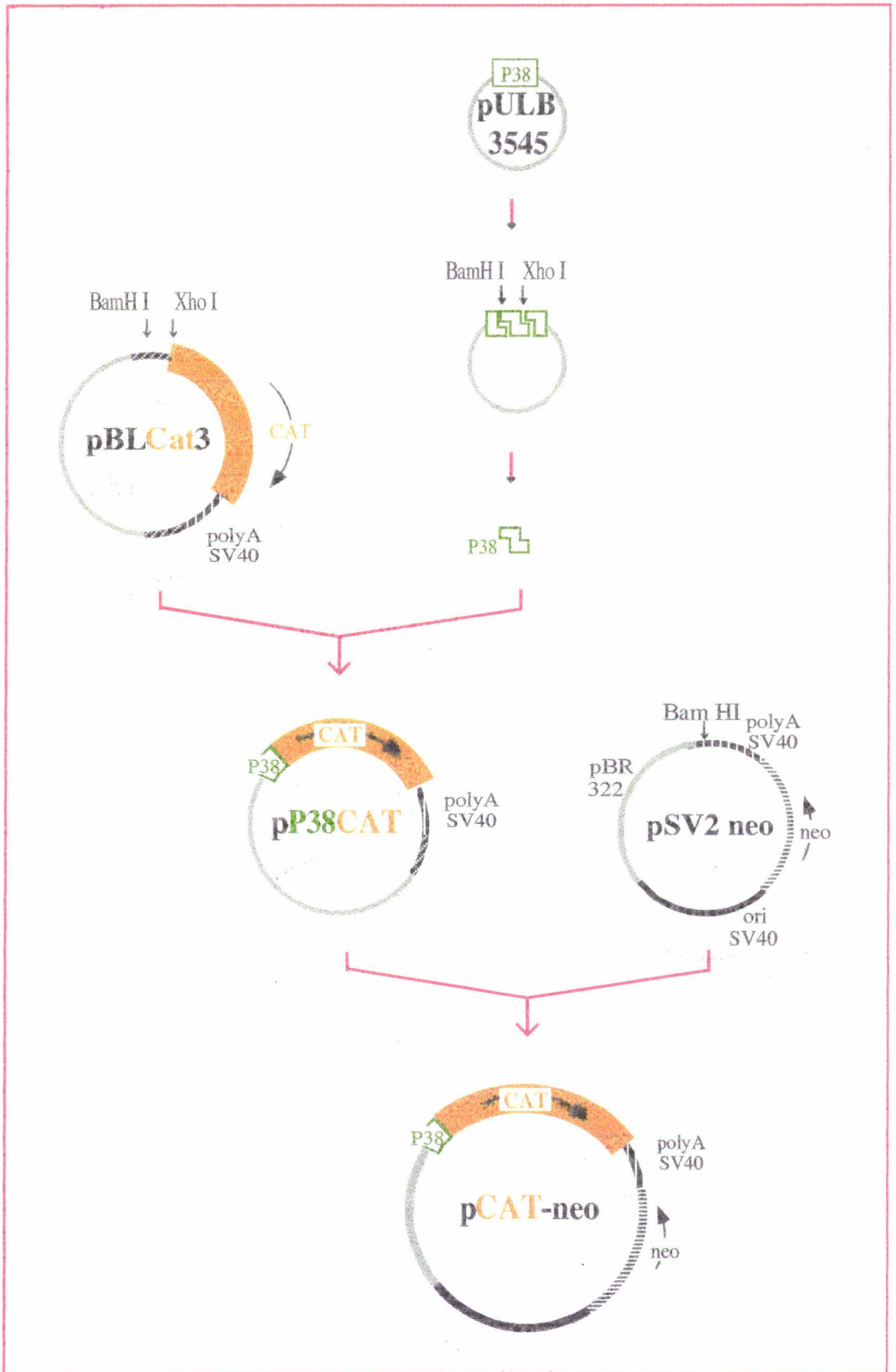


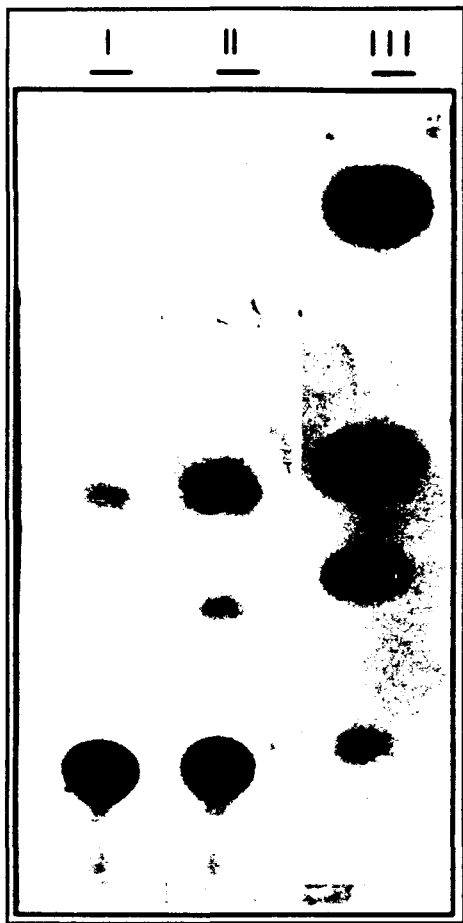
Figure 12: Clonage du gène reporter CAT.

3. Résultats annexes.

Le promoteur P₃₈min que nous avons utilisé dans la construction pTK-neo contenait les séquences HaeIII₁₈₅₃-XhoI₂₀₇₀, soit 580bp de moins que celui utilisé dans les travaux de Cornelis et de Spegelaere (en cours), pour doser la transactivation par NS1 dans différents types cellulaires (P₃₈Max, HaeIII₁₈₅₃-HindIII₂₆₅₀). De plus, Anat Krauskopf a décrit que des signaux de régulations de P₃₈ (activation et répression) étaient présents en aval, dans la région 2287-2652, soit justement celle qui manquait dans nos constructions (Krauskopf et al., 1990a, b). Afin de savoir si le promoteur P₃₈min était réellement transactivable par NS1, nous avons placé le gène reporter CAT sous contrôle du promoteur P₃₈min (Figure 12). Les résultats obtenus en "CAT-assay", et présentés dans la Figure 13, montrent que le promoteur P₃₈min est activable par NS1. Il faut toutefois préciser que ce test n'a qu'une valeur qualitative, et non quantitative. En effet, le seul moyen d'étalonner notre "CAT-assay" était de co-transfecter un plasmide pRSV-βGal comme étalon interne. Or il a été démontré ultérieurement par Vanacker et al. (soumis) que NS1 inhibe le promoteur RSV. Quoiqu'il en soit, pour pallier à cet inconvénient, les "CAT-assays" ont été étalonnés par référence au nombre de cellules.

Enfin, l'analyse fine du promoteur P₃₈ a confirmé que la région 1860-1985 était essentielle à la transactivation par NS1 (Lorson et al., 1993).

Les données bibliographiques (Post et al., 1981; Marsden et al., 1983; Haar et al., 1985) laissaient supposer que le fragment *tk* cloné permettait l'expression de 3 protéines TK actives, de tailles fort peu différentes, et stables (Haar et Flatmark, 1987). Ainsi, la transfection de cellules NIH3T3TK⁻ avec le plasmide pTK-néo (cf. article I), ne devait permettre de montrer l'activité de TK qu'en présence de la protéine NS1, dans les clones G418 résistants, en les cultivant (en parallèle) dans le milieu de sélection HAT (Hypoxanthine-Aminoptérine-Thymidine). Cependant, alors que les clones G418 résistants étaient capables de pousser en milieu HAT sans apport de NS1, les cellules déficientes pour *tk* étaient tuées par ce milieu. Ce test simple nous prouvait non seulement la fonctionnalité du système, mais fait plus gênant une expression de TK quasi constitutive. L'analyse des Southern Blots effectués avec l'ADN génomique a révélé qu'il y avait, dans certains clones plusieurs sites d'insertion, tandis que d'autres n'en présentaient qu'un seul, mais avec un nombre indéfinissable de copies du transgène. Il est évident que de multiples copies de pTK-néo expliquent un taux d'expression de TK élevé, et donc la résistance en milieu HAT, et les rendant inutilisables pour l'induction par NS1. Aussi nous fallut-il sélectionner des clones qui ne possédaient qu'un seul insert de pTK-néo. Notre méthode de sélection fut fondée sur l'ACV. A des concentrations d'ACV inférieures à 25µg/ml, toutes les cellules transfectées poussaient "normalement", et si mort il y avait, elle n'était pas suffisante pour assurer l'émergence de clones. 25µg/ml fut la dose critique, et permit d'isoler un petit nombre de clones, alors qu'au-delà de cette concentration tous les transfectants mouraient. Il faut noter que pour les cellules NIH3T3TK⁻ déficientes pour les *tk* virale et endogène, les doses d'ACV ne furent toxiques qu'au-delà de 800µg/ml. Les clones isolés en ACV 25µg/ml étaient toujours résistants au G418 (G418^R) mais étaient sensibles au milieu HAT (HAT^S). Il était donc possible que ces clones ne possèdent plus qu'une seule copie du transgène. En effet, *neo* étant sous promotion forte (promoteur-enhancer SV40), la résistance se manifestait normalement, tandis que *tk* cloné sous le promoteur faible et inductible (P₃₈) n'était pas exprimé à un taux



- I : P38Max^{CAT}
- II : P38Max^{CAT} + NS1-NS2 (vecteur d'expression)
- III : P38Max^{CAT} + pMM984 (clone moléculaire de MVMp)

- A : P38CAT
- O : P38CAT + pMM984 (clone moléculaire de MVMp)
- B : P38CAT + NS2 (vecteur d'expression)
- C : P38CAT + NS1-NS2 (vecteur d'expression)
- D : pCAT-neo
- E : pCAT-neo + NS1 (vecteur d'expression)
- F : pCAT-neo + MVMp (infection)

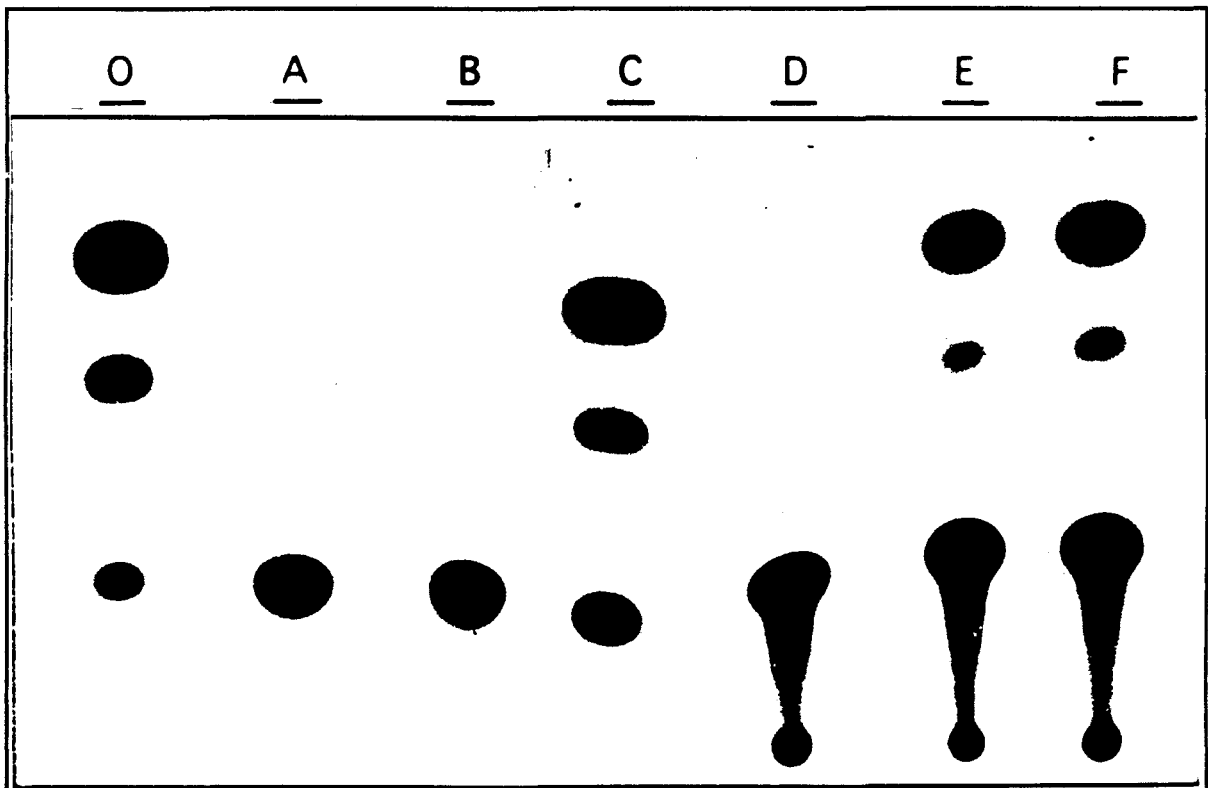


Figure 13: CAT assays.

suffisant (sans NS1) pour permettre la résistance en milieu HAT. D'autre part, les marqueurs *neo* et *tk* étant portés par le même plasmide, il semblait peu probable que le gène *neo* soit maintenu et le gène *tk* perdu (cela évidemment ne préjugeant pas d'une mutation inactivant la protéine TK).

L'hypothèse de simple copie fut confirmée par Southern Blot. Par contre, jamais aucun insert *tk* ne fut trouvé dans les cellules co-tansfectées par pSV2-néo et pP38TK (cf. article I, intermédiaire de construction) qui de G418^R et HAT^R devinrent HAT^S après sélection par l'ACV à 25µg/ml, suggérant dans ce cas précis la perte du plasmide pP38TK.

Sur cette base, plusieurs clones ont été retenus pour tester leur survie à l'infection par MVMP et parmi ceux-ci, 2 clones particulièrement résistants à NS1, ont été retenus pour la suite du travail.

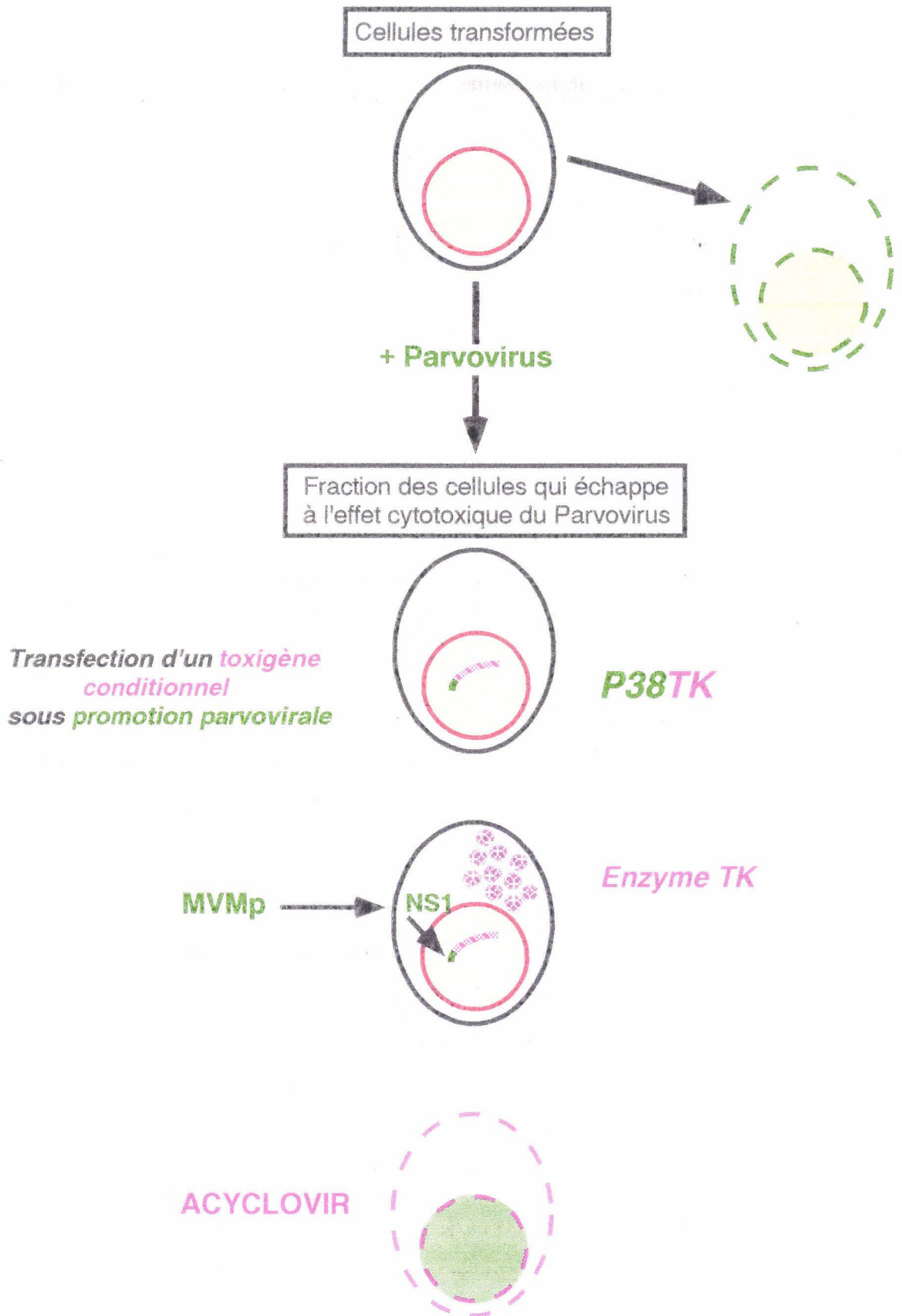


Figure 14: Système.

4. Discussion.

Nos résultats démontrent que le promoteur P₃₈min est transactivable par NS1 et qu'il est possible d'obtenir la synergie des effets cytotoxiques de MVMp et de TK/ACV. Si l'activation de P₃₈ par NS1 est clairement établie, on ne peut négliger l'hypothèse, d'un effet de MVMp sur l'expression de TK. Plusieurs contrôles différents auraient été utiles pour exclure l'hypothèse d'une activation non-transmise par NS1.

Par exemple nous aurions pu transférer un plasmide permettant l'expression de NS1 au lieu d'infecter par MVMp, et mieux encore, l'expression de NS1 aurait pu être sous contrôle d'un promoteur inductible. Mais dans ce cas le système est complexe et les effets de l'inducteur, de NS1 et de l'ACV les uns sur les autres devaient être contrôlés.

Nous aurions aussi pu cloner *tk* sous le contrôle d'un promoteur non-inductible par NS1. Cependant, NS1 réprimant les promoteurs hétérologues testés, un promoteur neutre est encore à identifier.

Enfin, la meilleure construction était peut-être le recombinant pal-P4-NS-P38-*tk*-pal. Mais il est vrai que le but de ce travail était justement de savoir si ce type de recombinant était fonctionnel.

Un autre point peut prêter à discussion et concerne le choix de la lignée cellulaire. Dans la mesure où notre but initial était de détruire la fraction de cellules transformées qui échappait à l'effet cytopathique de NS1, le choix de la lignée NIH3T3 (TK⁻) pour valider cette hypothèse peut être considéré comme inadéquat (Figure 14). En effet, la lignée NIH3T3 (TK⁻) n'est pas considérée, du moins dans la littérature, comme transformée (sauf dans un cas: Rubin et al. 1992). Nous émettons cette restriction parce que nos expériences montrent que l'injection de 1 million de cellules dans la souris nue (athymique) permet le développement d'une tumeur en 21 jours. Au demeurant, il est des cellules qui nécessitent plus de 21 jours et qui sont considérées comme tumorigènes... Nous n'allons pas dissenter ici sur le cas de la transformation ou non de la cellule NIH3T3 (TK⁻), mais exposer les avantages qui ont motivés le choix de cette cellule:

- le premier, sans conteste, est le fait que cette cellule soit TK⁻, et que par conséquent ceci nous permet de connaître rapidement (milieu HAT) l'efficacité de notre construction.

- le second, tient à la semi-permissivité pour MVMp de cette cellule, qui permet l'expression des protéines virales, et notamment de NS1 à un taux suffisant pour activer P₃₈.

- le troisième avantage, et non le moindre, est qu'elle soit très résistante (80-95%) et donc permet de visualiser un différentiel même faible entre l'action séparée de MVMp et de l'ACV et leur effet synergique.

Pour ces raisons donc, le choix de la lignée NIH3T3 (TK⁻) est parfaitement justifié. Constatation intéressante: des cellules qui survivent au premier traitement conjoint par MVMp et l'ACV (20%, Figure 2C article I) ne survivent pas à un second traitement.

II

ARTICLE II

**CHARACTERIZATION OF A NORMAL VARIANT OF FISHER
RAT FIBROBLAST (FR3T3) CONSTITUTIVELY PRODUCING
MINUTE VIRUS OF MICE WITHOUT CELL LYSIS.**

Manuscrit en préparation

1. Introduction.

L'utilisation de Parvovirus recombinant en thérapie anti-cancéreuse implique la possibilité de produire celui-ci en quantité et pureté suffisantes. Il convient en outre de pouvoir disposer d'une cellule "emballeuse" qui soit apte à compléter les fonctions d'un virus rendu défectif.

Cette cellule "emballeuse" doit être permissive au Parvovirus et résistante à l'effet potentiellement toxique de NS1, de manière à ce que le cycle viral puisse être complet. Cela va à l'encontre de l'hypothèse d'oncolyse sélective parvovirale, puisque les cellules permissives pour la réplication ne sont que très rarement résistantes à la cytotoxicité médiée par NS1. Toutefois, des cellules transformées, partiellement résistantes/sensibles à NS1, pourraient éventuellement convenir (Russel et al., 1992). Mais dans ce cas la question de l'agent transformant reste cruciale car il n'est pas acceptable que cet agent soit un virus oncogène. En outre, si la production virale pouvait se réaliser sans lyse de la cellule, cela permettrait de cultiver les cellules en fermenteur et de récupérer le virus sécrété dans le milieu. Ceci paraît impossible, étant donné le cycle lytique du Parvovirus. Enfin, l'idéal serait que cette cellule produise aussi bien MVMP que H-1.

2. Résumé.

Ces travaux décrivent un variant spontané de la lignée FR3T3 normale (Fisher Rat fibroblast), dont les caractéristiques exceptionnelles permettaient d'en faire une cellule productrice et une cellule "emballeuse". L'étude de ce variant (FR3T3C) a d'abord porté sur les paramètres parvoviraux classiques:

- résistance/sensibilité à l'infection par MVMP, et à la toxicité de NS1,
- réplication de l'ADN viral,
- quantification de la descendance virale produite et vérification de son pouvoir infectieux.

Cette étude a montré que, contrairement à la cellule dont il dérive - résistante à MVMP et non-permissive -, ce variant était permissif, c'est à dire permettait le cycle viral complet, avec une résistance remarquable à l'effet toxique de la protéine NS1 (caractère inchangé par rapport à la cellule FR3T3).

Ces premiers résultats nous ont amenés à "confectionner", par infections successives à MOI=10 puis 100 (MOI: "Multiplicity of Infection"), une population résistante (R100FR3T3C). L'étude détaillée de ces cellules a révélé que MVMP y était maintenu (sans dilution au cours des passages) et produit en quantité importante, mais surtout, que le cycle viral était non lytique. La microscopie électronique a suggéré une voie particulière de transit du virus (noyau -> cytoplasme -> milieu), sans dommages visibles pour la cellule.

**CHARACTERIZATION OF A NORMAL VARIANT OF FISHER RAT
FIBROBLASTS (FR3T3) CONSTITUTIVELY PRODUCING MINUTE VIRUS
OF MICE WITHOUT CELL LYSIS**

Catherine Elaine KOERING^{1*}, Maurice GEUSKENS³, and Jean ROMMELAERE^{1,2}.

* corresponding author

1 Unité d'Oncologie Moléculaire, Institut Pasteur de Lille, Centre National de la Recherche Scientifique URA 1160, BP 245, 59019 Lille Cedex, France
Phone: (+33)/20.87.77.29.
Fax: (+33)/20.87.79.08.

2 Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung 0610 and Unité INSERM 375, Im Neuenheimer Feld 242, D-69120 Heidelberg, Germany

3 Département de Biologie Moléculaire, Université Libre de Bruxelles, rue des Chevaux 67, B-1640 Rhode St-Genese, Belgium

ABSTRACT

The lytic replication of the parvoviruses H-1 and MVMP is in most cases restricted to transformed cells, while most of the normal cells are not able to sustain their replication cycle (non-permissivity). We isolated from the normal, resistant, semi/non-permissive cell line FR3T3 (Fisher Rat Fibroblast) a permissive population (FR3T3C) which emerged spontaneously and was found to produce infectious MVMP virions without being lysed. Furthermore, when repetitively infected with MVMP, this variant generated a persistently infected population (R100FR3T3C). Our investigations showed that this cell population harbours episomal infectious parvovirus MVMP and supports non lytic replication cycles. Electron microscopy analysis of R100FR3T3C cells confirmed the non-lytic production of virions and revealed a very peculiar nuclear morphology for both FR3T3C and R100FR3T3C cells. Examination of karyotypes also showed an abnormal number of chromosomes in both cell lines. In addition, in R100FR3T3C an increase in NS-2 protein expression and stability was found by quantification of viral proteins and transcripts, suggesting its possible role in MVMP persistence and production. These variant cell lines may be usefull to produce constitutively MVMP.

INTRODUCTION

The autonomous parvoviruses H-1 and/or MVMP are small (20nm) single-stranded DNA (5kb) viruses which infect a wide variety of animal species, including humans (1, 36). Because of their small size and their genetic simplicity, these viruses are very dependent for their replication on cellular factors which are more specific of proliferating (S-phase of cell cycle) or differentiating cells (37, 39, 46). *In vitro* transformation of a number of human or rodent fibroblasts and epithelial cells correlates with an increase in their sensitivity to both replication and lytic effect of parvoviruses H-1 or MVMP (10, 12, 13, 23, 24, 30, 32, 41). Cell killing can be dissociated from the formation of progeny particles, suggesting that specific parvoviral products are responsible for cytotoxicity (16). This cytotoxicity is driven by the major non structural protein NS-1, the expression of which is often enhanced upon transformation of host cells (4, 5, 13, 30, 41). However, there is no absolute correlation between susceptibility to the toxic protein NS-1 and transformation, since a few stably transformed cells proved to escape from the parvoviral oncolytic effect (5, 32, 41). In contrast, there is a close link between transformation and ability to support parvoviral replication cycle (permissivity).

In this report we present a normal variant of FR3T3 cell line which is resistant to the lytic effect of NS1 protein but permissive for replication of MVMP parvovirus (FR3T3C), spontaneously emerged from the resistant semi-permissive FR3T3 (Fisher Rat Fibroblast) cell line (20, 32, 33, 41). FR3T3C when compared to FR3T3 were found to produce infectious virions. When repeatedly infected with MVMP, FR3T3C cells gave rise to a persistently infected cell population (R100FR3T3C), which was shown to support non-lytic productions of infectious MVMP virions. The episomal persistence of MVMP in this population, as well as its non-lytic production are associated to an altered nuclear morphology, a peculiar karyotype and the preferential expression of NS-2 proteins.

MATERIALS AND METHODS

Cells:

All cells (see below) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% foetal calf serum (FCS) (GIBCO, Renfrewshire, Scotland), 1% glutamine, 12µg/ml gentamycin, in 5% CO₂ at 37°C.

Cells: FR3T3 (Fisher Rat Fibroblast), FREJ cells clone 4 referred to as FREJ4 (32) (FR3T3 cells transformed with the plasmid pSVEJ carrying the c-Ha-ras gene presenting a mutation in the codon 12 (38)), FR3T3C cells (variant of FR3T3) and A9 cells (variant of mouse L cells) were used in the experiments.

MVMp infection and measurement of cell survival after MVMp infection:

MVMp (prototype strain) was propagated and plaque-titrated in A9 cells (31), then purified as described (40). Exponentially growing cultures (5x10⁵ cells per 60mm-dish) were infected with MVMp at various multiplicities of infection (MOI=1, 10, 100 pfu (plaque forming unit) per cell), with virus suspensions in PBS supplemented with 9mM CaCl₂ and 5mM MgCl₂. After a 1h adsorption, cells were rinsed with PBS and fresh culture medium was added. Cells were trypsinized 4h after mock- or MVMp-infection, and replated at low densities (250 to 500 cells) onto 60mm-dishes. Cell survival was determined by measuring the ability of MVMp- vs. mock-infected cells to form colonies on plastic. Colonies were fixed and stained with methanol/ 1% methylen blue, 5-7 days post-infection (p.i).

Parvoviral life cycle parameters:

(i) Viral DNA amplification:

Total intracellular viral DNA produced during the first viral cycle was measured in whole cell lysates by dispersed cell assay (DCA) (45). Cultures (5x10⁵ cells per 60mm-dish) were infected with MVMp at various MOIs, incubated for 2h and 30h, respectively, harvested, and trapped on BA85 nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). BA85 filters were processed as described (33). As a probe for MVMp, a 5kb BamHI fragment excised from pMM984 (22) was radiolabeled with ³²P-dCTP using the Megaprime DNA labelling system (kit Amersham, Amersham, Les Ulis, France). Hybridized radioactivity was quantified by liquid scintillation spectrometry.

(ii) Production of infectious virus:

Cultures (5x10⁵ cells) were infected at MOIs ranging from 0,1 to 10 pfu per cell. For the determination of infectious virus production after the first viral cycle (36 h p.i.), cultures were processed as described (33), and the released particles were plaque titrated on A9 cells (p.a.) (23).

Infected A9 (MOI= 5x10⁻³) and FR3T3C (MOI= 5x10⁻³, 10) cells were compared quantitatively for their production of infectious virus, by using standard method of propagation (31). Productions were purified (40) and plaque-titrated on A9 cells (31). Besides this plaque-titration, we compared the infectivity of MVMp viruses produced in FR3T3C cells to a MVMp standard stock (viruses produced in A9 cells) by measuring the ability to form colonies on plastic (see Survival after MVMp infection) of infected vs. control A9 and FREJ4 cells (*ras*-transformed (38) FR3T3C cells, previously shown to be highly sensitive (32, 41))

(iii) Establishment of an MVMp-resistant cell population:

Cultures (FR3T3C and FR3T3, 5×10^5 cells) were infected at MOI=10 and cell mortality has been evaluated 2 days p.i. The MVMp-resistant cell population was further cultured for 15 days and infected a second time at an MOI=100. MVMp-resistant cell population were named "R100", where 100 stands for MOI 100 (e.g. R100FR3T3C, R100FR3T3).

(iv) Infectious centers assay:

To determine infectious centers, appropriate numbers of persistently infected R100FR3T3C and virus-infected (MOI=1, 10) A9 and FR3T3C cells were treated as described (33). The proportion of productively infected cells was determined 6 days later (about 5 viral cycles), from the fraction of seeded cells producing plaques.

(v) Modified plaque assay:

MVMp-resistant cells (R100FR3T3C) containing MVMp DNA were checked for their capacity to produce infectious virus. A9 cultures (3×10^5 cells) were infected with 0.5ml of filtrated (Minisart NML 0.20 μ m pore size, Sartorius GmbH, Göttingen, Germany) supernatants of MVMp DNA positive cells. The production of infectious viruses in A9 cells was detected 30h p.i. (1 viral cycle) by modified plaque assay on BA85 filters, as described (19).

(vi) Quantization and analysis of replicative forms (RF) by the "Hirt method":

Viral DNA was isolated from MVMp (MOI=10, 40h p.i.) and persistently infected cultures as described (21). Episomal DNA containing RFs and single-stranded MVMp DNA were separated by electrophoresis through an 1% agarose gel and blotted onto Nylon membrane (Amersham). The Blots were hybridized with the MVMp radiolabeled probe and autoradiographed using Hyperfilm-MP (Amersham).

Analysis of MVMp persistence:**(i) Southern Blot and 2D-Southern Blot analysis:**

Genomic DNA from R100FR3T3C and infected A9 (MOI=1, 40h p.i.) cells were isolated using standard protocols and digested with the restriction enzymes (BamHI, EcoRV and XbaI, used as recommended by the supplier (Boehringer, Mannheim, Germany)) for classical Southern Blot. For 2D-Southern Blot, genomic DNA from R100FR3T3C cells was digested with several non-cutting enzymes (NotI, NotI+Scal, NotI+Scal+BamHI). Fragments were separated by electrophoresis through an 1% agarose gel and 2D-electrophoresis were processed using 0,4% and 0,7% agarose gels as described (34). Gels were blotted onto Nylon membrane (Amersham). The Blots were hybridized with the MVMp radiolabeled probe and autoradiographed using Hyperfilm-MP (Amersham).

(ii) NS-1, NS-2, VP-1 and VP-2 immunoprecipitation and gel electrophoresis:

Persistently infected R100FR3T3C cells, MVMp (MOI=5, 26h p.i.) and mock infected cultures ($1,5 \times 10^6$ per 100mm-dish) were metabolically labeled for 1 and 2h with 200 μ Ci of $\{^{35}\text{S}\}$ methionine and processed for immunoprecipitation as described (18). A pulse chase was performed during 6h at 30min to 1h intervals. Viral proteins were detected by using specific Rabbit anti-NS-1 (18), anti-NS-2 and Hamster anti-VPs polyclonal antibodies (kindly provided by S. Plaza) on 10% SDS-polyacrilamide gels for NS-1 and VPs, and 15% gels for NS-2. Gels were treated as described (18). Immunoprecipitated viral proteins were quantified by liquid spectrometry scintillation.

(iii) Northern Blot analysis:

RNA from R100FR3T3C, infected FR3T3C, FR3T3 (MOI=10) and FREJ4 (MOI=1) cells were extracted at 12h and 18h p.i., using RNA-SR-200 as recommended by the supplier (Biogenesis, Bournemouth, England), and separated on 1,2% agarose gels. Gels were blotted and hybridized as described above (see Southern Blot analysis).

(iv) Electron Microscopy:

A9 cells infected for 35, 50, 60 and 73h (MOI=5x10⁻³), FR3T3 infected for 40h (MOI=10), FR3T3C infected for 35, 50, 60 and 73h (MOI=10), R100FR3T3C cells persistently producing virus and mock infected cells were cultivated in 30mm dishes and treated as described (21). Ultrathin sections cut parallel to the growth plate were stained with uranyl acetate and lead citrate before being observed in a AEI 6 B electron microscope at 60kV acceleration voltage.

(v) Karyotypes: preparation of Metaphases:

Semi-confluent monolayers of A9, FR3T3C, R100FR3T3C and FR3T3 cells were growth-arrested by colcemide (Gibco-BRL) at a final concentration of 0,06µg/ml of medium for 4h. Cells were treated and processed for R Banding (RHG) as described (14).

Chromosomal analysis were done on photographed metaphases. Five to ten spreads were analyzed per cell line, and 25 cells were examined for total chromosome number in each spread.

RESULTS

Characterization of FR3T3C cells:

FR3T3C cells emerged spontaneously from a culture of FR3T3 cells (Fisher Rat Fibroblast).

FR3T3 normal cells which are known to be resistant to MVMP (32, 41) showed 65.4% surviving cells at MOI=10, whereas the spontaneous variant FR3T3C were found to be much more resistant (95.8% at MOI=10, Fig.2) and more than 87% at MOI=100 (data not shown). In contrast fully permissive cells such as A9 transformed cells are highly susceptible to MVMP cytotoxic effect (0% surviving cells at MOI=10, Fig.2).

In contrast to FR3T3, FR3T3C cells exhibited an abnormal karyotype (see below). In addition, FR3T3C cells were not able to adhere on plastic in DMEM without FCS and died within 20h. However, they were indistinguishable from FR3T3 in terms of morphology, doubling time and inability to grow in semi-solid medium or as tumors in nude mice (19).

Because of their survival to MVMP infection, it was possible to establish cultures of FR3T3C and FR3T3 cells resistant to MOI=100 (R100FR3T3C and R100FR3T3). These selected R100 populations were analyzed for MVMP presence and/or production at different passages (subcultures after infections) (see below). In contrast no resistant cultures or clones were obtained with A9 cells.

Parvoviral life cycle parameter:

Total intracellular viral DNA produced during the first viral cycle was measured in whole cell lysates by dispersed cell assay (DCA). Surprisingly, FR3T3C cells were found to amplify viral DNA similarly to permissive A9 cells, whereas FR3T3 cells were not able to amplify viral DNA (Fig.3). In view of these results, we analyzed the capacity of FR3T3C to produce infectious virions.

The proportion of productively infected (36h p.i) cells was determined by measuring their ability to initiate plaque formation in A9 indicator cultures. The results presented in Table I (see (b)) demonstrate the ability of FR3T3C to produce infectious viruses after the first viral cycle. When compared, the titer of viruses produced standardly (after 6 days) by A9 cells (MOI=5x10⁻³) and those produced by FR3T3C (MOI=10) was similar (Table I, see (c)), strongly suggesting that FR3T3C cells produce viruses similarly to fully permissive cells. However, it must be mentioned that in FR3T3C cells a higher MOI (at least 10pfu/cell) was required to produce infectious virions. Indeed, FR3T3C infected with only 5x10⁻³pfu/cell did not produce detectably infectious virions (data not shown). This observation was confirmed by infectious centers assays showing that only small amounts of infectious particles could be detected (after 6 days) when cells were infected at MOI=1 (Table I, see (a)).

For control purposes, the infectivity of MVMP virions produced in FR3T3C cells was compared to that of viruses produced in A9 cells, by measuring cell survival of A9 and FREJ4 (*ras*-transformed FR3T3, previously shown to be highly sensitive (32, 41)) cells. No difference in killing effect could be detected between MVMP produced by FR3T3C and wild type MVMP produced by A9 cells (data not shown).

As DCA (measuring viral amplification) does not discriminate between complete DNA replicative form (RF) and defective DNA RFs, we isolated, using the Hirt method, the replicative forms of viral DNA produced by MVMP-resistant cultures (R100) and infected cells (40h p.i., 1 viral cycle). Figure 4a shows that single-stranded, RF1 and RF2 are normally produced by R100FR3T3C as well as by FR3T3C but no defective forms were detected. In contrast, no viral DNA could persistently be replicated in

R100FR3T3 cells while FR3T3 cells were able to amplify viral DNA, at least after one viral cycle.

Since R100FR3T3C cells produce infectious virions, we looked whether the production was lytic or not. No dead cells were detected in R100FR3T3C cultures, suggesting that these cells were able to produce infectious particles without being lysed. Furthermore, infection of A9 indicator cells with the filtrated supernatants of R100FR3T3C cultures (*modified plaque assay*) showed that independently of the number of passages, infectious MVmp viruses were produced by R100FR3T3C. These results suggest both the persistence and the non-lytic production for MVmp infectious virions in R100FR3T3C cells. This last hypothesis was later confirmed by electron microscopy observations (see below).

Analysis of the MVmp persistence mode:

Electron microscopy observations

A general morphological description of cells from the different lines used will not be presented, only the observations in relation with virus production and more particularly its passage into cytoplasm will be mentioned.

A9 cells: in sections, the cytoplasm of uninfected cells contained, in addition to mitochondria, round "grey bodies" about 600nm in diameter with a single limiting membrane (Fig.5a, below). They seemed to originate from dilated cisternae of agranular endoplasmic reticulum (er) as that shown in the upper part of the same figure. The content of this cisterna has the same aspect as that of the adjoining cisternae partially covered with ribosomes, except for a denser region whose aspect is more similar to the constitutive material of the grey body. The cytoplasm of infected cells (60 or 73h p.i.) contained numerous grey bodies showing often peripheral virus particles. Some cytoplasmic structures which probably correspond to early stages in the formation of such bodies are shown in Fig.5b-e. In Fig.5b, some small vesicles in the Golgi region contain virus-like particles (arrow heads). In Fig.5c, a cisterna with a few peripheral virions shows a dense central region of possibly unorganized viral material. In the lower part of Fig.5d, the dense cisterna containing virus particles is in continuity (arrow head) with the perinuclear space. Intact (Fig.5f) or sometimes disrupted grey bodies were observed in the dispersed cytoplasm of lysed cells whose nucleus was not filled with virions.

FR3T3 cells: the nucleus of a few infected cells (40h p.i.) contained a large number of mostly empty virus particles (Fig.6a). The cytoplasm of all infected cells contained dispersed inclusion bodies with particles having the size of parvovirus (about 20nm), often organized in a row at their periphery, between two unit membranes (Fig.6b, arrow heads). The center of these bodies might be encumbered with membranes whorls. Some of these bodies surrounded by a thin layer of cytoplasm might become expelled into the medium (Fig.6c).

FR3T3C cells: frequent close contacts between mitochondria and the rough er cisternae were observed. Dilated er cisternae, sometimes without attached ribosomes, were also seen. In infected cells, inclusion bodies with an heterogenous content including virus particles (Fig.7d) were dispersed in the cytoplasm. A possible relationship between dilated er cisternae and cytoplasmic bodies with virus particles and a progressively more heterogenous contents in cells infected from 35 to 60h, is illustrated in Fig.7a-d.

R100FR3T3C cells: these constitutively virus-producing cells were characterized by a highly developed Golgi apparatus (Fig.8a). Virions were observed in the nucleus of several cells. Nuclei with highly convolute contour leading probably to detachment of nuclear fragments (Fig.8b) and an anarchic er (loops, vesicles) in continuity or close to

the nuclear envelope were observed. Convolutions of the nuclear envelope with attached ribosomes on the external side of the outer membrane encircled virus particles (Fig.8c) and lead probably to the development of virus-containing cytoplasmic bodies. A lot of more or less spherical cisternae generally without attached ribosomes, containing an amorphous material similar to that present in the er cisternae, were observed close to these abnormal nuclei; some of them seemed to originate from the nuclear envelope (Fig.9a, large arrow head). It is tempting to imagine that a relationship exists between perinuclear er cisternae and the cytoplasmic bodies containing virions, becoming progressively more heterogenous in contents and encumbered with membrane whorls; this relationship is tentatively illustrated in the sequence of organelles with increasing numbers in Fig.9a and 9b. Some small vesicles located close to elements of the Golgi complex contained also a few dense particles with the dimensions of parvovirus. No lysed cells were observed.

Karyotypes have been made in order to find some differences able to explain the permissivity of this interesting variant. FR3T3C cells and the persistently infected R100FR3T3C cells both contained an unusual number of chromosomes, 72 and 68, respectively, instead of 42 chromosomes. FR3T3 cells had a normal rat cell karyotype (42 chromosomes). A9 mouse cells had 47 chromosomes, instead of 40 found in normal mouse cells (Table I). Such a great number of chromosomes might probably be related to the nuclear structure which was observed by electron microscopy in FR3T3C and R100FR3T3C, but not in FR3T3 cells.

More precise analysis of these abnormal karyotypes might clarify the permissivity, persistence and non-lytic viral cycle in R100FR3T3C. At this stage, we have not been able to localize any translocation or chromosomal rearrangement (data not shown), but some indications have to be noticed. Indeed, instead of owning 22 *metacentric* (or submeta-, subtelo-) and 18 *acrocentric* (or -telo) chromosomes (40 *autosomes* + 2 *heterosomes*), FR3T3C has 32 *metacentric* and 40 *acrocentric* chromosomes and R100FR3T3C has 32 *metacentrics* and 36 *acrocentrics*. That means that variant cells carry about 1,5 times more *metacentric* and 2 times more *acrocentric* chromosomes. The differences may be due either to Robertsonian fission (47, 48) or more probably to duplication of the chromosomes followed by the loss of some of them. It must be mentioned that such karyotypes were (i) very uniform, i.e. no metaphase with 42 chromosomes could be detected and (ii) stable along time, i.e. 50-100 passages, suggesting a steady state.

Another possibility to explain the mode of MVMP persistence in R100FR3T3C might be that it is integrated. Although parvoviruses are known as non-integrating viruses, we cannot exclude this eventuality. However, the episomal persistence of MVMP in host cells has not been described, yet. To test this possibility, 2-D Southern Blots of genomic DNA from R100FR3T3C digested with non-cutting enzymes were performed. As shown in Figure 4b the same RF and viral forms were found as with the *Hirt method*, 20, 15, 10, 5, 2,6kb (Fig.4b ou data not shown). These preliminary results suggesting the episomal persistence of MVMP were then confirmed by Southern Blots. Comparison of genomic DNA from infected (36h p.i.) A9 and R100FR3T3C cells digested with the non-cutting enzyme BamHI and the one-cutting enzymes XbaI, EcoRV revealed normal patterns (5, 4.7, 4.3kb, respectively, Fig.4c). Altogether, these results suggested that R100FR3T3C is containing episomal persistent MVMP viruses.

In order to correlate the persistence of MVMP in R100FR3T3C with the pattern of viral proteins expressed, we compared the amounts of viral proteins present in infected (26h p.i.) FR3T3C, FREJ4 (as permissive cell control (32, 41)) and persistently infected R100FR3T3C cells. Liquid scintillation spectrometry was used to quantify viral proteins.

As shown in Table II, R100FR3T3C cells express 20 times more NS-2 than NS-1, whereas other cells showed equivalent ratio of NS2, i.e. 3.85 to 7.14. This strongly suggest that NS-2 may be responsible for establishment and/or viral persistence, suggesting unusual transcription and/or translation pathways.

In order to confirm this hypothesis we checked the stability by pulse chase of both NS-1 and NS-2 proteins in infected (24h p.i.) and persistently infected cells. Our results showed that NS-2 proteins were stably expressed to the same level at least during 8h in R100FR3T3C, whereas NS-2 expression decreased in infected cells (24h p.i.) after a pulse chase of 2-4h (Table II). Northern Blots analysis showed that R1 RNA were present in great amounts in FREJ4 infected cells, whereas R2 RNA were almost not detectable. In contrast, R100FR3T3C, infected FR3T3C or FR3T3 showed very low level of both RNA (18h p.i., data not shown), suggesting that the permissivity of FR3T3C or persistence in R100FR3T3C are more linked to modification of translation pathway than to an increase of their capacity to transcript viral DNA.

DISCUSSION

We described here the characterization of a spontaneous variant of FR3T3 cells (FR3T3C) which surprisingly proved to support the replication of the parvovirus MVMP. This variant was undistinguishable from its normal counterpart FR3T3 in terms of morphology, doubling time, inability to grow in semi-solid medium or as tumors in nude mice. However, FR3T3 and FR3T3C differed by their serum dependence, their properties versus MVMP replicative cycles and their karyotypes. Accordingly to their serum dependence, the "spontaneous" emergence of FR3T3C from FR3T3 could be induced by cultivation procedures, where medium culture might act as a selective agent.

The "spontaneous" emergence of such an intriguing variant required to ascertain its cellular origin. Indeed, as already published (33), NRK rat cells transformed with *src^{ts}* displayed similar characteristics. Our results showed that FR3T3C or R100FR3T3C displayed exactly the same mitochondrial DNA (coding for RNA 12S) RFLPs patterns (Restriction Length Fragment Polymorphism, (15, 44)) and RAPDs (Random Amplification Polymorphism DNA, (17, 43)) as FR3T3 (data not shown). Moreover, as shown previously BPV-transformed FR3T3 clones (FRBP, (41)) had also partially the same properties as FR3T3C cells. It was therefore necessary to know whether FR3T3C contained BPV sequences. In addition to BPV-transformation, we also controlled by Southern Blotting the status of following plasmids (41): pSVEJ (*ras*), pZipNeoSV40 (LTSV40), MMCVneo (*v-myc*) and M-*src* (*v-src*). Southern Blots hybridized with each specific probe demonstrated that this cell was not transformed by any of these oncogenes (data not shown). Altogether, these results confirmed that FR3T3C (R100FR3T3C) was a normal variant of FR3T3 cells.

It is noteworthy that this variant shown to be untransformed, non-tumorigenic in nude mice, almost more normal than FR3T3 cells on the basis of serum dependence, exhibits some duality for properties related to MVMP infection. Indeed, FR3T3C cells display resistance linked to normality but also permissivity which is usually correlated to transformation. Another specificity is that R100FR3T3C did not withstand the transformation by *ras*. It was not possible to obtain persistently infected clones expressing Ras protein from R100FR3T3C cells transfected with pSVEJ (38) and selected by G418 (data not shown). These last results, in accordance with all previous works, demonstrate that cells are sensitized to MVMP lytic effect by transformation.

Our results showed that in contrast to FR3T3C, FR3T3 cells were not able to replicate MVMP, although they were previously shown to be semi-permissive (32, 41). Screening for possible mechanisms explaining the differences (permissivity and the non-lytical way of MVMP production) between these two cell lines, we must stressed the fact that in three independent FR3T3 cultures we have underscored differences between karyotypes which apparently lead to different MVMP DNA amplification capabilities. Indeed, the cells having 42 chromosomes (statistically pure) does not amplify the viral DNA, whereas a culture presenting almost an equal mixture of cells with 42 and 68-74 chromosomes (statistically about 50/50) has a significant ability to replicate DNA (data not shown, 41). Finally, derivating spontaneously from the latter, FR3T3C cells having 72 chromosomes (statistically pure) can amplify viral DNA as well as produce non-lytically infectious viruses.

Electron microscopy studies were performed in order to clarify (i) how parvoviruses are transported from nucleus to cytoplasm, and (ii) the lysis and non-lysis phenomena.

There is a general agreement that parvovirus replicate in cell nucleus and that virions assemble there. To our knowledge, no evidence of any virus-specific transport process from the nucleus to the cytoplasm or out of the cell has been reported from electron microscopy observations. Parvoviruses are supposed to be expelled from the nucleus by a process including margination of the chromatin and blistering of the nuclear membrane, while dispersion of the viruses into the medium would occur during cell desintegration (29). Early observations by Chandra and Toolan (7) concerning the H-1 virus favoured the idea that development of the virus was cytoplasmic and that "grey bodies", possibly of mitochondrial origin, were involved in the synthesis of new virus. The observation by other authors (3) that the H-1 virus was present only in the nucleus of other cells cultivated *in vitro* led to consider that the assembly of full and empty virions like MVMp was exclusively nuclear (42). This view implies that viral mRNA are transported from nucleus to the cytoplasm, the site of protein synthesis, and that viral proteins thereafter proceed from the cytoplasm to the nucleus. In cells from the different lines studied here (A9 MVMp-sensitive and productive cells; FR3T3 MVMp-resistant and non-productive cells, at least after the first cycle of viral replication) as well as the newly-isolated variants (FR3T3C MVMp-resistant and productive cells; R100FR3T3 MVMp-resistant and constitutively producing cells), cytoplasmic bodies containing spherical particles having the size of parvovirus (about 20nm in diameter) were observed in cells with an intact nucleus, without accumulation of virus particles. We propound that part of virus DNA molecules can proceed from nucleus to the *er* cisternae, through the inner membrane of the nuclear envelope and that virions could assemble in these cisternae in addition to the nucleus.

Type A particles (RNA enveloped oncornavirus) were also frequently observed in the *er* cisternae of A9 cells; the budding of these particles from the inner surface of the *er* cisternae is well known (2).

Er intracisternal space is in continuity with that located between the inner and the outer nuclear unit membranes; margination of the chromatin along the inner membrane could facilitate the passage of single-stranded virus DNA molecules into the *er* intracisternal space. Viral mRNA and proteins would, as postulated, cross the nuclear envelope in inverse order through its pores, leading also to nuclear assembly of virions. Our ultrastructural observations, combined with results concerning the killing of cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins (5) are in favour of the hypothesis that cytotoxic parvoviral proteins are involved in the lysis of permissive cells. Cell lysis would not result first from the accumulation of virions mostly segregated in cytoplasmic bodies. Moreover, virus-containing bodies may develop into autophagic vacuoles and residual bodies and allow the cell to escape the parvoviral cytopathic effect and lysis. Residual bodies can persist in the cytoplasm or more rarely be eliminated by excretion as previously observed in NRK rat cells displaying temperature-sensitive transformed phenotype when cultivated at a restrictive temperature (39.5°C) (33); such elimination of virus-containing bodies was also observed here in FR3T3C infected cells. In A9 virus-sensitive cells, the dense cytoplasmic bodies containing virions do not become encumbered with membrane whorls and myelinlike structures characteristic of a residual bodies; such intact bodies are dispersed in the medium after cell lysis. The lysis results from the rupture of the plasmic membrane whereas the nuclear envelope remained intact (at least internal membrane).

Besides the persistent heterogenous virus-containing bodies in their cytoplasm, R100FR3T3C cells are morphologically characterized by a development of the Golgi complex indicative of high glycoprotein synthesis. The abnormal perinuclear *er* including the convolute nuclear envelope and adjacent agranular *er* cisternae as well as the nuclear accumulation of virus particles were observed in some cells only, whereas cytoplasmic virus-containing bodies were observed in all cells.

The problem of the mode of virus dispersion in the medium by R100FR3T3C cells, which are highly virus-productive, has not been resolved by electron microscopy observations. No lysed cells, as in the case of A9-infected cells, were observed. Some cells with a highly abnormal nucleus could eliminate virus together with chromatin masses or virus-containing organelles could be eliminated from the cytoplasm, but we had not the chance to observe such phenomena. Some cytoplasmic globules were observed in the vicinity of the cells; they did not contain obvious virus particles, but they could result from the apoptotic death of a limited number of cells in the culture, leading to dispersion of virions.

One important question is if and how - both being probably linked - the peculiar karyotype is linked to the property of FR3T3C cells to sustain the viral cycle (permissivity) in a non-lytic way and to keep the virus persistent. So far, it has not been demonstrated that a normal cell was permissive. Another eventuality to explain permissivity would be the differentiation of FR3T3C cells - linked or not to the karyotype -. However, we did not observe any significant difference between FR3T3C and FR3T3 cells in terms of actin, fibronectin or cytokeratin 10 patterns. Since it is difficult to find specific differentiation markers for rat fibroblasts, we could not confirm this hypothesis, which has however to be kept in mind. At the cellular level, we can therefore only assume that the FR3T3C specific karyotype, nuclear structure (multi-nucleus) and maybe plasmic membrane differences (on the basis on serum dependance) are responsible for these properties versus MVMp non-lytic production.

From our results we could speculate that FR3T3C cells could play the role of a "tank" cell in the animal, allowing the endemic persistence of the parvovirus. Indeed, the virus persists and maintains in an episomal state and this is accompanied by a change of the normal equilibrium of non-structural proteins. Until now, in permissive (transformed) cells the NS-1 concentration was higher than NS-2 whereas at the RNA level the reverse was observed (8, 9, 28, 35), suggesting a specific translation regulation. Thus, the predominance of NS-2 expression in the infected R100FR3T3C cells could be considered as responsible for establishing and/or maintaining the persistence. Although, the real function of NS-2 in viral replication is not yet known, some authors proposed two roles, one in replication and one in cytotoxicity. NS-2 synergizes the toxic action of NS-1 in different cellular types, but different from the natural host (4, 5). NS-2 proves also to be essential for MVMp replication in its host cells, because its inactivation by mutation would stop the normal process of the viral cycle (6, 11, 25, 26, N. Salomé personal communication). However, these results have been obtained with transformed cellular systems and therefore they cannot be extrapolated as such to the FR3T3C cell. In conclusion, NS-2 is likely to play an important role in the persistence, and possibly involved in the absence of lysis.

We describe here for the first time a normal rat cell line which is resistant to lysis and permissive for replication of MVMp parvovirus. Furthermore, this cell line which proved to be able to sustain non-lytic viral cycles would be useful to produce virions. It is noteworthy that besides classical viral production (on dishes) we have performed continuous production in spinner (using cytodex 1) and recovered viruses from culture medium. This has been possible because R100FR3T3C proved to be very adherent. Because of its particular properties this cell may also be used as a packaging cell in order to elaborate recombinant parvoviruses.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank S. Plaza (Lille) for the gift of NS-2 and VPs antibodies. With our grateful thanks to M. Venin-Fikry, F. Gross, N. Provost, and D. Guittard for technical assistance and to J. Coll, C.Hänni, V. Laudet, A. Mahe and N. Salomé for stimulating and helpful discussions. We are grateful to C. Sutter, J.R. Schlehofer, and for critical reading of the manuscript.

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Recherche Médicale et de la Santé and the Institut Pasteur de Lille, and by fellowships from the Institut Pasteur de Lille and the Fondation des Treilles (to C.E.K.), and by fellowships from Belgian National Fund for Scientific Research (to M.G.).

Cells	Origin	Karyotype number of chromosomes	Infectious Centers (a)	Production (b) (c)
A9	derived from mouse L cells	47	0,27 (0,29)	9.5x10 ⁹ (b) 1.9x10 ⁹ (c)
FR3T3	Fisher Rat Fibroblast	42	nd	nd
R100FR3T3	FR3T3 resistant to repetitive infections with MVMp	nd	0	nd
FR3T3C	FR3T3 variant	72	0,02 (0,28)	6.9x10 ⁶ (b) 2.5x10 ⁹ (c)
R100FR3T3C	FR3T3C resistant to repetitive infections with MVMp	68	0,21*	0.6x10 ⁶ - 1.6x10 ⁸ #

(a) number of plaque/ theoretical titer of the stock of virus used to infect at MOI1 (MOI10) - * estimated like an infection at MOI1
(b) p.a.: quantitation of infectious viruses in infected (36h p.i.) cells lysates - (c) standard production (6 days p.i.) pfu/ml
estimated by survival of A9 and FREJ4 cells infected with filtrated culture medium

TABLE I

Cells	NS-2/NS-1	VP-2/VP-1	NSs/VPs	TIME of STABILITY	
				Pulse chase	Time of maximum accumulation
FREJ4	1.98	6.25	0.31	NS1: 1.5h NS2: 4h	2h 4h
FR3T3	0.16	nd	nd	NS1: 1h NS2: 6h	1h 6h
FR3T3C	3.60	7.69	0.46	NS1: 4h NS2: 6h	4h 6h
R100FR3T3C	20.00	5.88	0.59	NS1: 4h NS2: 6h	4h 6h

TABLE II

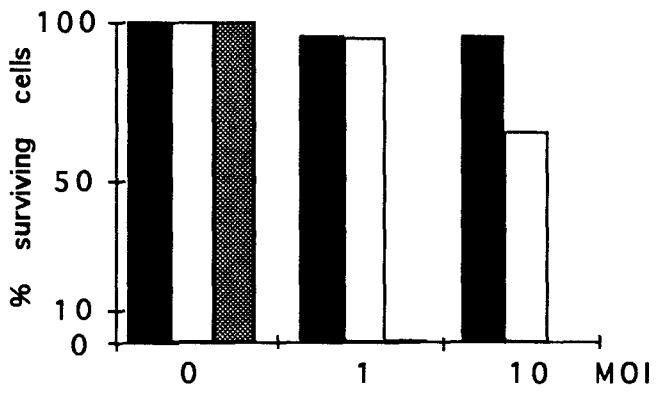


Figure 2

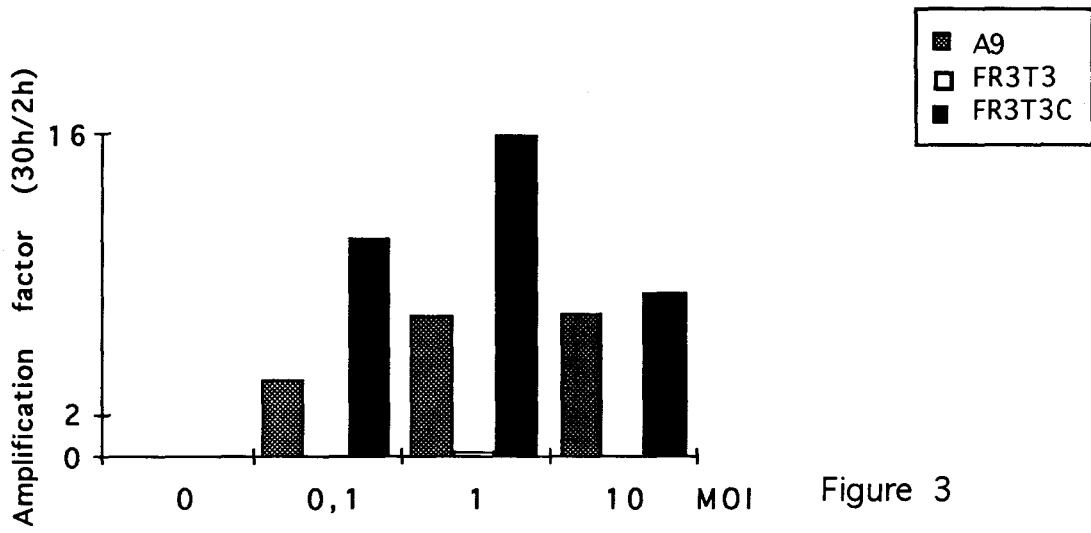


Figure 3

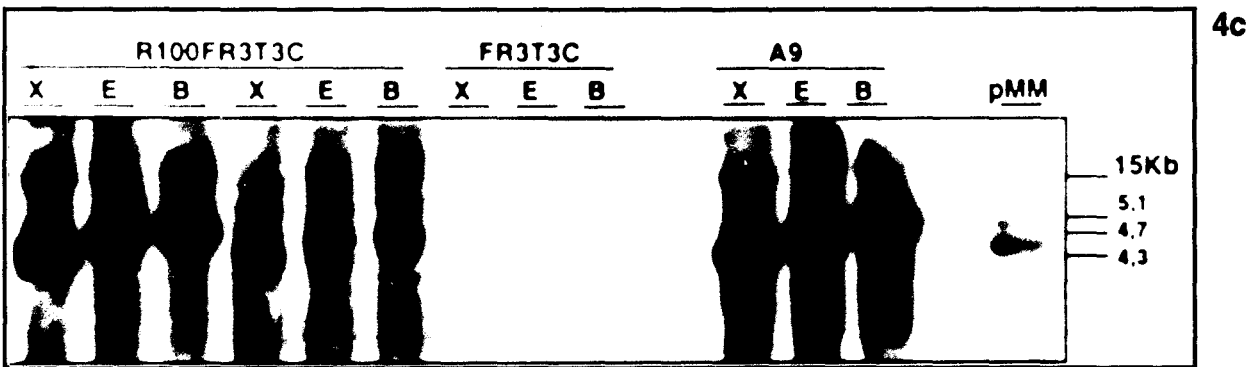
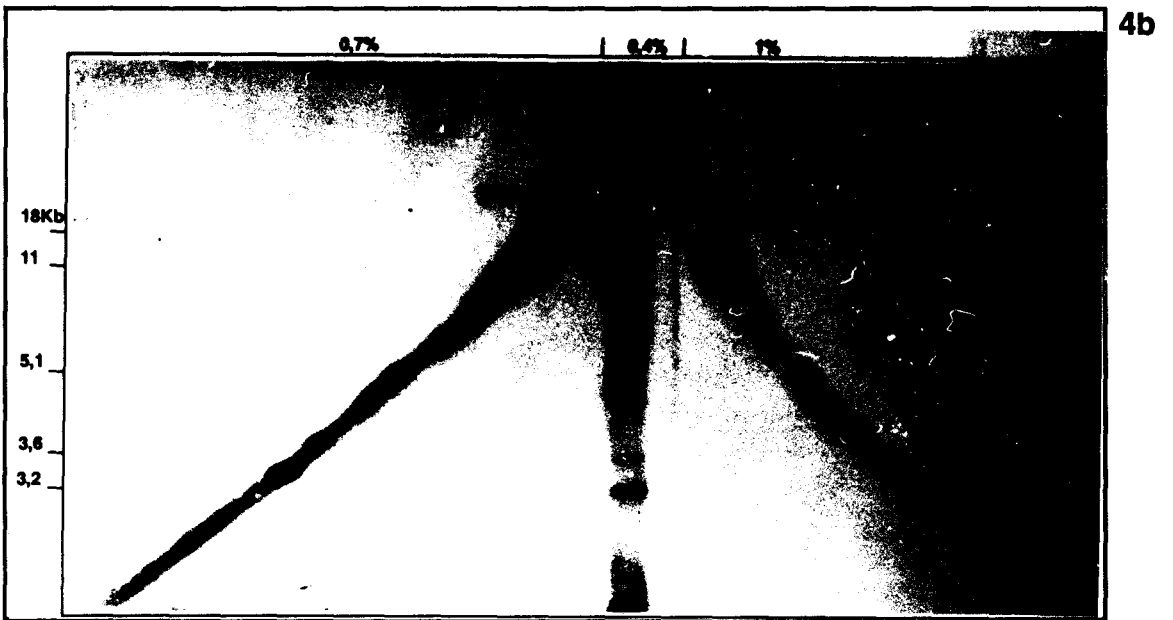
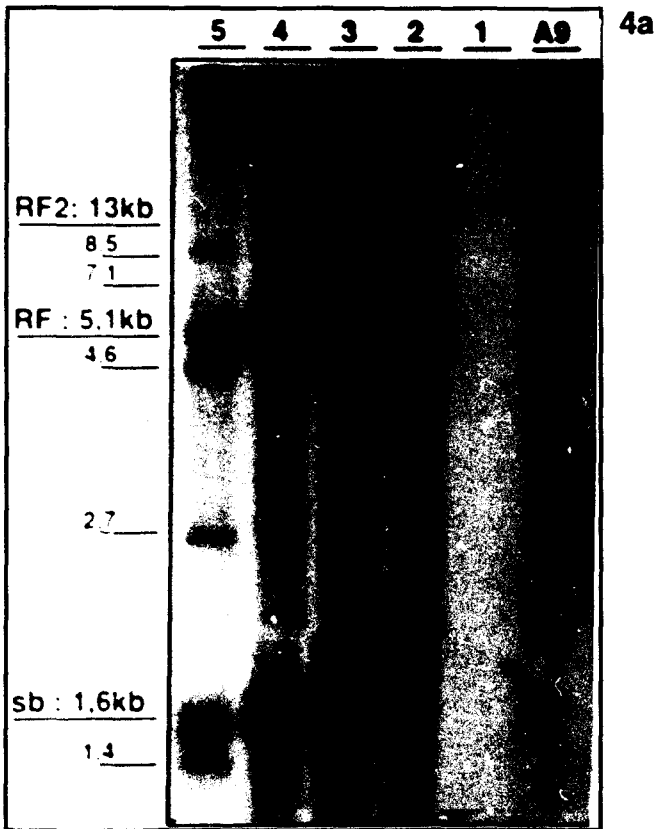


Figure 4

LEGENDS

Table 1 : Summary of the results concerning the origin of the cells studied, their karyotype and the quantification of their viral production.

Table 2 : Summary of the results concerning the equilibrium of viral proteins in infected cells.

Cultures ($1,5 \times 10^6$ per 100mm-dish) were metabolically labeled and processed for immunoprecipitation. A pulse chase was performed during 6h at 30min to 1h intervals. Viral proteins were detected by using specific Rabbit anti-NS-1, anti-NS-2 and Hamster anti-VPs polyclonal antibodies, on 10% SDS-polyacrilamide gels for NS-1 and VPs, and 15% gels for NS-2. Gels were treated and immunoprecipitated viral proteins were quantified by liquid spectrometry scintillation.

Figure 2 : Cell survival after infection with MVMp.

Cell survival was determined as the ability of treated, versus control cells to form colonies on plastic. Exponentially growing cultures (10^6 cells) were infected with MVMp by incubation for 1 h with virus suspensions in PBS supplemented with 9 mM CaCl_2 and 5 mM MgCl_2 . The MOI was variable 1 or 10 pfu/cell. Cells were trypsinized 4 h after MVMp or mock infection, and replated at low densities (250 to 500 cells) onto 60 mm-dishes in culture medium. Colonies were fixed and stained with methanol/1% methylen blue, 5-7 days p.i.

Figure 3 Viral DNA amplification.

Total intracellular viral DNA produced during the first viral cycle was measured in whole cell lysates by dispersed cell assay (DCA). Cultures (5×10^5 cells per 60mm-dish) were infected with MVMp at various MOIs, incubated for 2h and 30h, respectively, harvested, and trapped on BA85 nitrocellulose membranes hybridized with an MVMp probe and quantified by liquid scintillation spectrometry.

Figure 4:

4a: Quantization and analysis of replicative forms (RF) by the "Hirt method":

Viral DNA was isolated from MVMp (MOI=10, 40h p.i.) and persistently infected cultures as described by Hirt. Episomal DNA containing RFs and single-stranded MVMp DNA were separated by electrophoresis through an 1% agarose gel and blotted onto Nylon membrane.

1: FR3T3 (MOI=10), 2: R100FR3T3, 3: FR3T3 (MOI=10), 4: R100FR3T3C, 5: R100MixRA

4b: 2-D Southern blot

Genomic DNA from R100FR3T3C cells was digested with several non-cutting enzymes (NotI, NotI+Scal, NotI+Scal+BamHI). Fragments were separated by electrophoresis through an 1% agarose gel and 2D-electrophoresis were processed using 0,4% and 0,7% agarose gels.

4c: Southern blot

Genomic DNA were isolated and digested with the restriction enzymes (B: BamHI, E: EcoRV and X: XbaI). Fragments were separated by electrophoresis through an 1% agarose gel.

Gels were blotted onto Nylon membrane. The Blots were hybridized with the MVMp radiolabeled probe.

Electron microscopy:Figure 5 : A9 cells

5a/ Uninfected cell. At the top of the figure, a round agranular cisternae is located between two er cisternae partially covered with ribosomes; the denser region in this cisterna is similar in aspect to the constitutive material of the grey body visible in the lower part of the figure.

5b/ Small vesicles (arrow heads) and a large organelle containing virus-like particles are observed near the Golgi complex (G)

5c/ a cisterna with an electron-dense central region and a few virus-like particles at its periphery is visible near the nucleus (N) where the virus is not detected.

5d/ two grey bodies containing virus particles; the lower one is connected (arrow head) with an er cisterna covered with ribosomes.

5e/ a grey body and a cisterna containing virus-like particles are observed near the nucleus (N) where virions are not visible; the internal spaces of virus-containing cisterna and of the nuclear envelope are apparently in continuity (arrow head).

5f/ lysed cell. The nucleus (N) has lost its outer unit membrane. A dilated mitochondria (m) and a grey body with a few virus-like particles (arrow head) are visible in the dispersed cytoplasm.

x 56.000

Figure 6 : FR3T3 infected cells (40h p.i., MOI=10).

6a/ intranuclear region filled with mostly empty virions (v). ch: chromatin. x 80.000

6b/ dense cytoplasmic bodies containing virions mostly located at their periphery, between two unit membranes (arrow heads). x 60.000

6c/ Inclusion body containing virions (arrow heads) and membrane whorls, surrounded by thin layer of cytoplasm, expelled from the cell. x 39.000

Figure 7 : FR3T3C cells.

7a/ infected for 35h. A cisterna of the rough er with a dilated region containing more dense amorphous material.

7b/ infected for 50h. An isolated, dilated cisterna of the rough er with a dense content.

7c/ infected for 60h. Two cytoplasmic grey bodies containing virus-like particles, near a mitochondria (m).

7d/ infected for 50h. Two cytoplasmic bodies with an heterogenous content including mostly empty virus particles. x 52.000

Figure 8 : R100FR3T3C cells.

8a/ the Golgi complex (G) is highly developed near the nucleus (N). Several bodies containing virions at their periphery are visible in the cytoplasm. x 26.000

8b/ nuclear fragments (n) near the main nucleus (N). x 21.000

8c/ three er cisternae partially overed with ribosomes surround cytoplasmic regions rich in virions in the proximity of a nucleus with a convolute envelope. x 62.000

Figure 9 : R100FR3T3C cells.

9a/ the nuclear envelope cut tangentially shows pores (small arrow heads) and an associated cisterna (1). A few cisternae are visible near the nucleus (N); one of them contains peripheral virions (3).

9b/ cytoplasmic bodies containing more or less numerous membrane whorls and virus particles are visible near the nucleus (N). m: mitochondria.

A sequence in the development of these virus-containing cytoplasmic inclusions is tentatively illustrated by numbers 1 to 6 in both parts of the figure. x 52.000



Figure 5



Figure 6



Figure 7

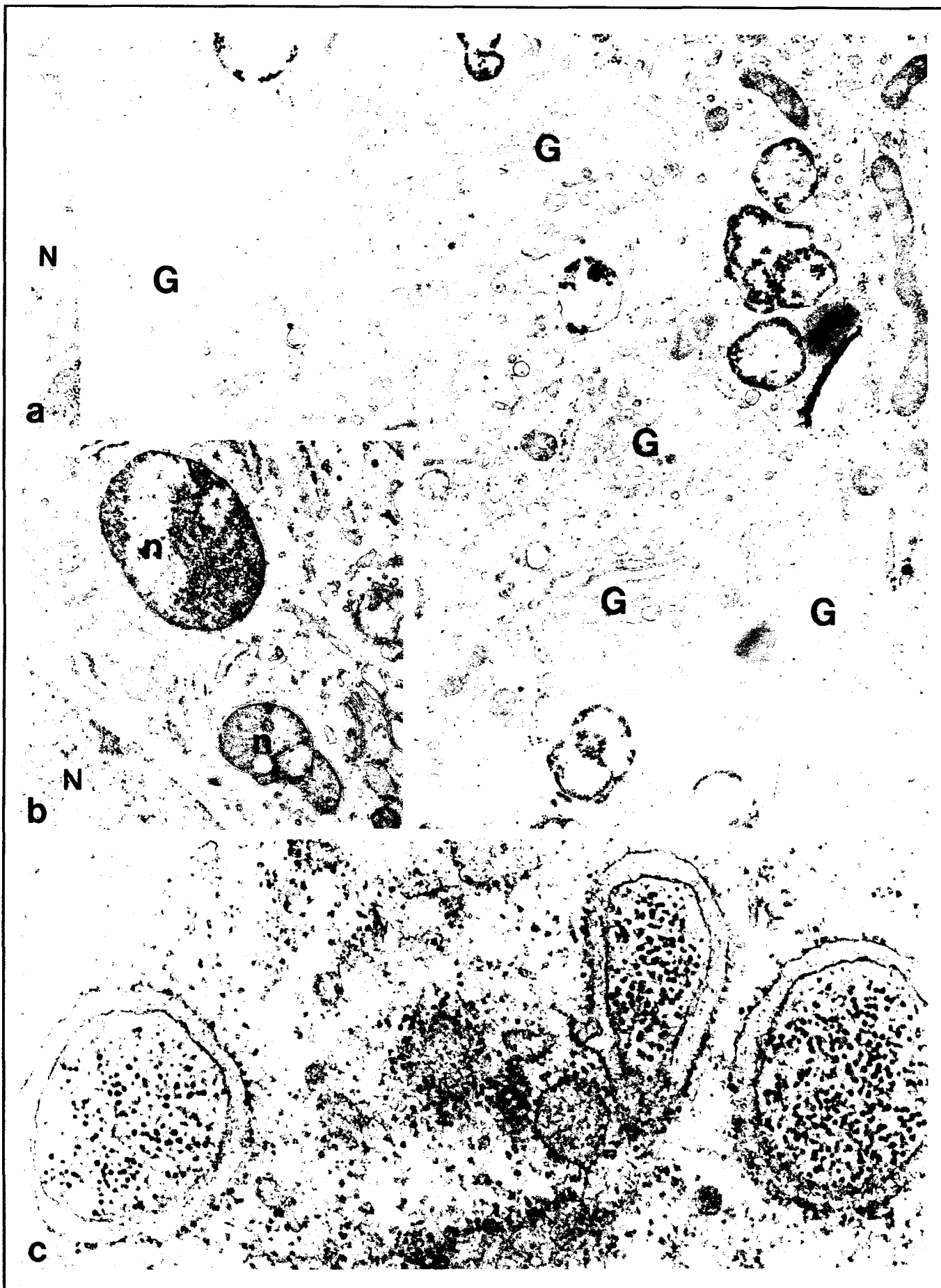


Figure 8

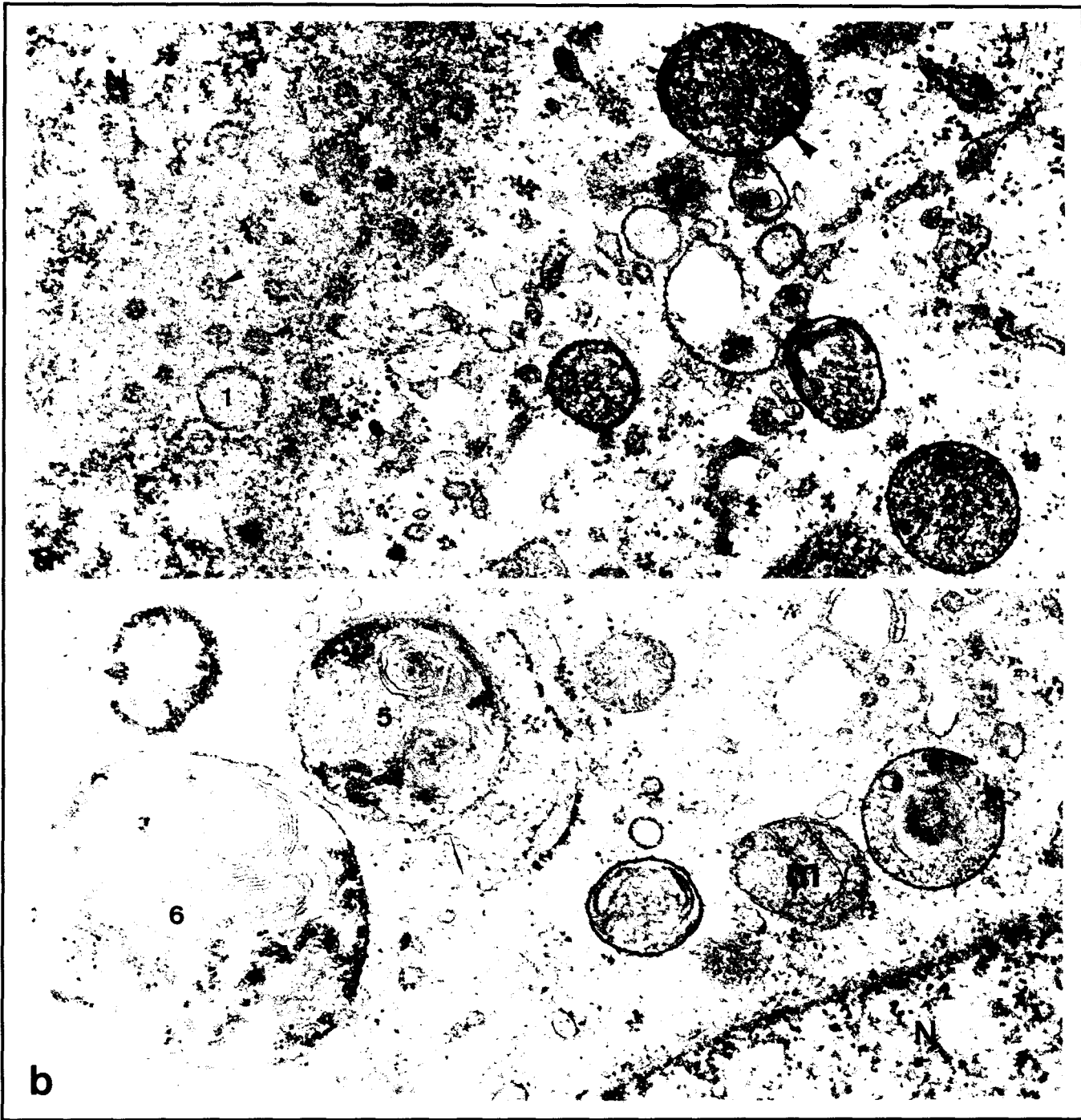


Figure 9

REFERENCES

- 1 **Anderson, M.J., and Pattison, J.R.** (1984) The human Parvovirus. Brief review. *Arch. Virol.* **82**: 137-148.
- 2 **Bernhard, W.** (1973) Oncornavirus. 2 Type A and C particles in murine and other mammalian leukemias and sarcomas. In *ultrastructure of animal viruses and bacteriophages: an Atlas*. Academic press, New York & London. 283-305.
- 3 **Bernhard, W., Kasten, F.H., and Chany, C.** (1963) Etude cytochimique et ultrastructurale de cellules infectées par le virus K du rat et le virus H-1. *C.R. Acad. Sci. Paris* **257** : 1566-1569.
- 4 **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.
- 5 **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 non-structural proteins. *Embo J.* **9** : 2989-2995.
- 6 **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.
- 7 **Chandra, S., and Toolan, H.W.** (1961) Electron microscopy of the H-1 virus. Morphology of the virus and a possible virus-host relationship. *J. Natl. Canc. Inst.* **27** : 1405-1459.
- 8 **Cotmore, S.F.** (1990) Gene expression in autonomous Parvoviruses. In (Tijssen, P. ed.), "Handbook of Parvoviruses". CRC Press Inc, Boca Raton, FL U.S.A. vol I : **9** : 141-154.
- 9 **Cotmore, S.F., and Tattersall, P.** (1990) Alternate splicing in a parvoviral non-structural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics. *Virology* **177** : 477-487.
- 10 **Chen, Y.Q., de Foresta, F., Hertoghs, 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.
- 11 **Clemens, K.E., Cerutis, D.R., Burger, L.R., Yang, C.Q., and Pintel, D.J.** (1990) Cloning of Minute Virus of Mice cDNAs and preliminary analysis of individual viral proteins expressed in murine cells. *J. Virol.* **64** : 3967-3973.
- 12 **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.

- 13 **Cornelis, J.J., Spruyt, N., Spegelaere, P., Guetta, E., Darawshi, T., Cotmore, S.F., Tal, J., and Rommelaere, J.** (1988b) Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus MVM correlates with an increase in viral gene expression. *J. Virol.* **62**: 3438-3444.
- 14 **Dutrillaux, B., and Couturier, J.** *Technique de laboratoire, pratique de l'analyse chromosomique.* Ed. Masson, p. 40-45, 1981.
- 15 **Ferris, S.D., Sage, R.D., and Wilson, A.C.** (1982) Evidence from mtDNA sequences that common laboratory strains of inbred mice are descended from a single female. *Nature* **295** : 163-165.
- 16 **Guetta, E., Mincberg, M., Mousset, S., Bertinchamps, C., Rommelaere, J., and Tal, J.** (1990) The selective killing of transformed rat cells by Minute Virus of Mice does not require infectious virus production. *J. Virol.* **64**: 458-462.
- 17 **Hadrys, H., Balick, M., and Schierwater, B.** (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* **1**: 55-63.
- 18 **Koering, C.E., Dupressoir, T., Plaza, S., Stehelin, D., and Rommelaere, J.** (1994) Induced expression of the conditionally cytotoxic Herpes Simplex Virus thymidine kinase by means of a parvoviral regulatory circuit. *Human Gene Therapy* in press
- 19 **Koering, C.E., Venin-Fikry, M., Dupressoir, T., Rommelaere, J., Schlehofer, J.R., and Stehelin, D.** (1993). Azatyrosine-mediated phenotypic reversion of transformed FR3T3 cells abrogates sensitivity to the Parvovirus Minute of Mice (MVMp). submitted
- 20 **Legrand, C., Mousset, S., Salome, N., and Rommelaere, J.** (1992) Cooperation of Oncogenes in Cell Transformation and Sensitization to Killing by the Parvovirus Minute Virus of Mice. *J. Gen. Virol.* **73**: 2003-2009.
- 21 **McMaster, G.K., Beard, P., Engers, H.D., and Hirt, B.** (1981) Characterization of an immunosuppressive parvovirus related to the Minute Virus of Mice. *J. Virol.* **38** : 317-326.
- 22 **Merchinsky, M.J., Tattersall, P., Leary, J.J., Cotmore, S.F., Gardiner, E.M., and Ward, D.C.** (1983) Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus Minute Virus of Mice. *J. Virol.* **47**: 227-232.
- 23 **Mousset, S., Cornelis, J.J., Spruyt, N., and Rommelaere, J.** (1986) Transformation of established murine fibroblasts with an activated cellular Harvey ras oncogene or the polyoma virus middle T gene increases cell permissiveness to parvovirus Minute Virus of Mice. *Biochimie* **68**: 951-956.
- 24 **Mousset, S., and Rommelaere, J.** (1982) Minute Virus of Mice inhibits cell transformation by Simian Virus 40. *Nature* **300**: 537-539.
- 25 **Naeger, L.K., Cater, J., and Pintel, D.J.** (1990) The small non-structural 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.

- 26 **Naegar, Clemens, K.E., Tullis, and Pintel, D.** (1989) Analysis of the role of the small non-structural proteins (NS2) of MVMP during infection. IIIrd EMBO Parvovirus Workshop, Ma'ale Hachamisha (Israel).
- 27 **Nelson-Rees, W.A., and Flandermeyer, R.R.** (1977) Inter and intra-species contamination of human breast tumor cell lines HBC and BrCa5 and other cell cultures. *Science* **185** : 1343-1344.
- 28 **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.
- 29 **Richards, R., Linser, P., and Armentrout, R.W.** (1977) Kinetics of assembly of a parvovirus, Minute Virus of Mice, in synchronized rat brain cells. *J. Virol.* **22** : 778-793.
- 30 **Rommelaere, J., and Cornelis, J.J.** Antineoplastic activity of parvoviruses. *J. of Virol. Methods* **33** : 233-251.
- 31 **Rommelaere, J., Vos, J.M., Cornelis, J.J., and Ward, D.C.** (1981) U.V.-enhanced reactivation of Minute Virus of Mice: stimulation of late step in the viral life cycle. *Photochem. Photobiol.* **33**: 845-854.
- 32 **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**: 123-130.
- 33 **Salome, N., Hille B. van, M. Geuskens, and J. Rommelaere.** (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**: 4797-4807.
- 34 **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.
- 35 **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.
- 36 **Siegl, G.** (1984) Biology and pathogenicity of autonomous Parvoviruses. In (Berns, K.I. ed.) "The Parvoviruses". New York: Plenum press.
- 37 **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.
- 38 **Tabin, C.J., Bradley, S.M., Bargmann, C.I., and Weinberg, R.A., Papageorge, A.G., and Scolnick, E.M., Dhar, R., Lowy, D.R., and Chang, E.H.** Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature*, **300**: 143-149, 1982.

- 39 **Tattersall, P.** (1978) Susceptibility to Minute Virus of Mice as a function of host-cell differentiation. In (Ward, D.C. and Tattersall, P. eds-) "Replication of mammalian Parvoviruses", Cold Spring Harbor: 131-149.
- 40 **Tattersall, P., Cawte, P.J., Shatkin, A.J., and Ward, D.C.** (1976) Three structural polypeptides coded for by minute parvovirus of mice, a parvovirus. *J. Virol.* **20**: 273-289.
- 41 **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.
- 42 **Ward, D.C., and Tattersall, P.** (1982) Minute Virus of Mice. In (Academic press, Inc.), "The mouse in biochemical research". **11** : 313-334.
- 43 **Welsh, J., Petersen, C., and McClelland, M.** (1991) Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse : application to strain identification and genetic. *Nucl. Ac. Res.* **19** : 303-306.
- 44 **Welsh, J., and McClelland, M.** (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Ac. Res.* **18** : 7213-7218.
- 45 **Winocour, E., and Keshet, I.** (1980) Indiscriminate recombinant in Simian virus 40-infected monkey cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77** : 4861-4865.
- 46 **Wolter, S., Richards, R., and Armentrout, R. W.** (1980) Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute virus of mice, a parvovirus. *Biochim. Biophys. Acta* **607**: 420-431.
- 47 **Yosida, T.H.** (1973) Evolution of karyotypes and differentiation in 13 *Rattus* species. *Chromosoma* **40**: 285-297.
- 48 **Yosida, T.H., Kato, H., Tsuchiya, K., Moriwaki, K. Ochiai, Y., and Monty, J.** (1979) Mauritius type black rats with peculiar karyotypes derived from robertsonian fission of small metacentrics. *Chromosoma* **75**: 51-62.

A. Rattus Norvegicus (Yosida, 1973; Cytogenet. Cell Genet. 12, 1973)

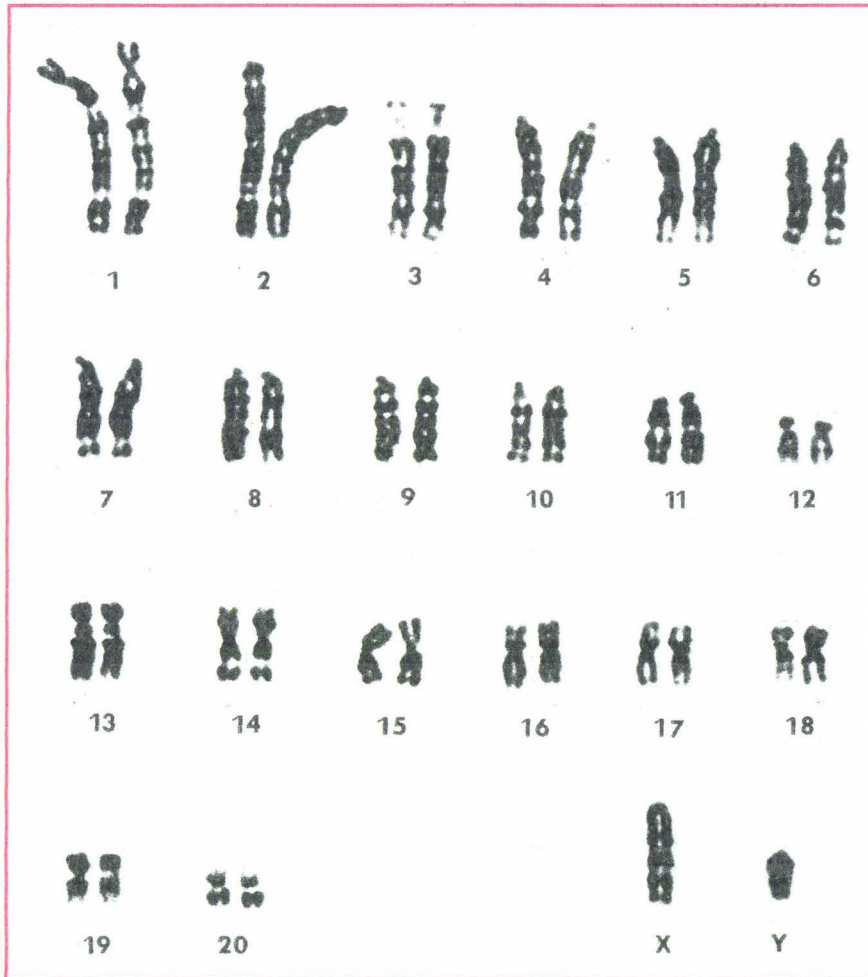
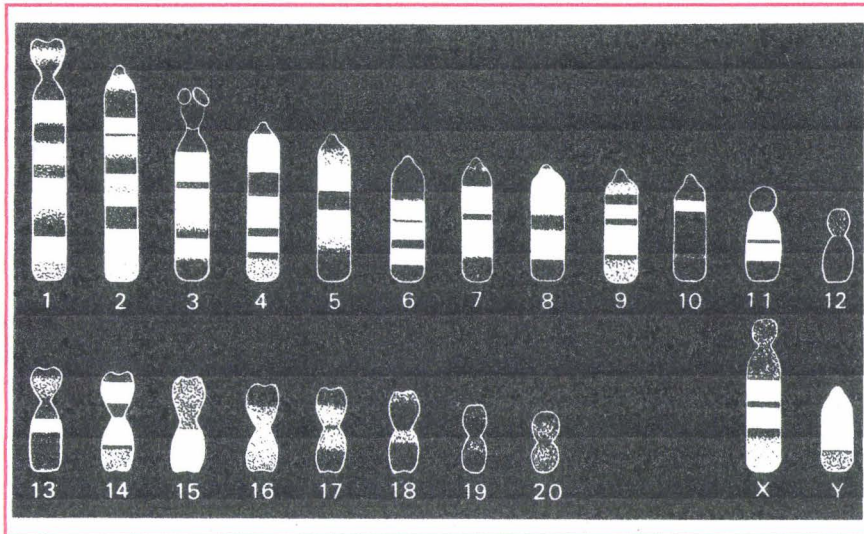
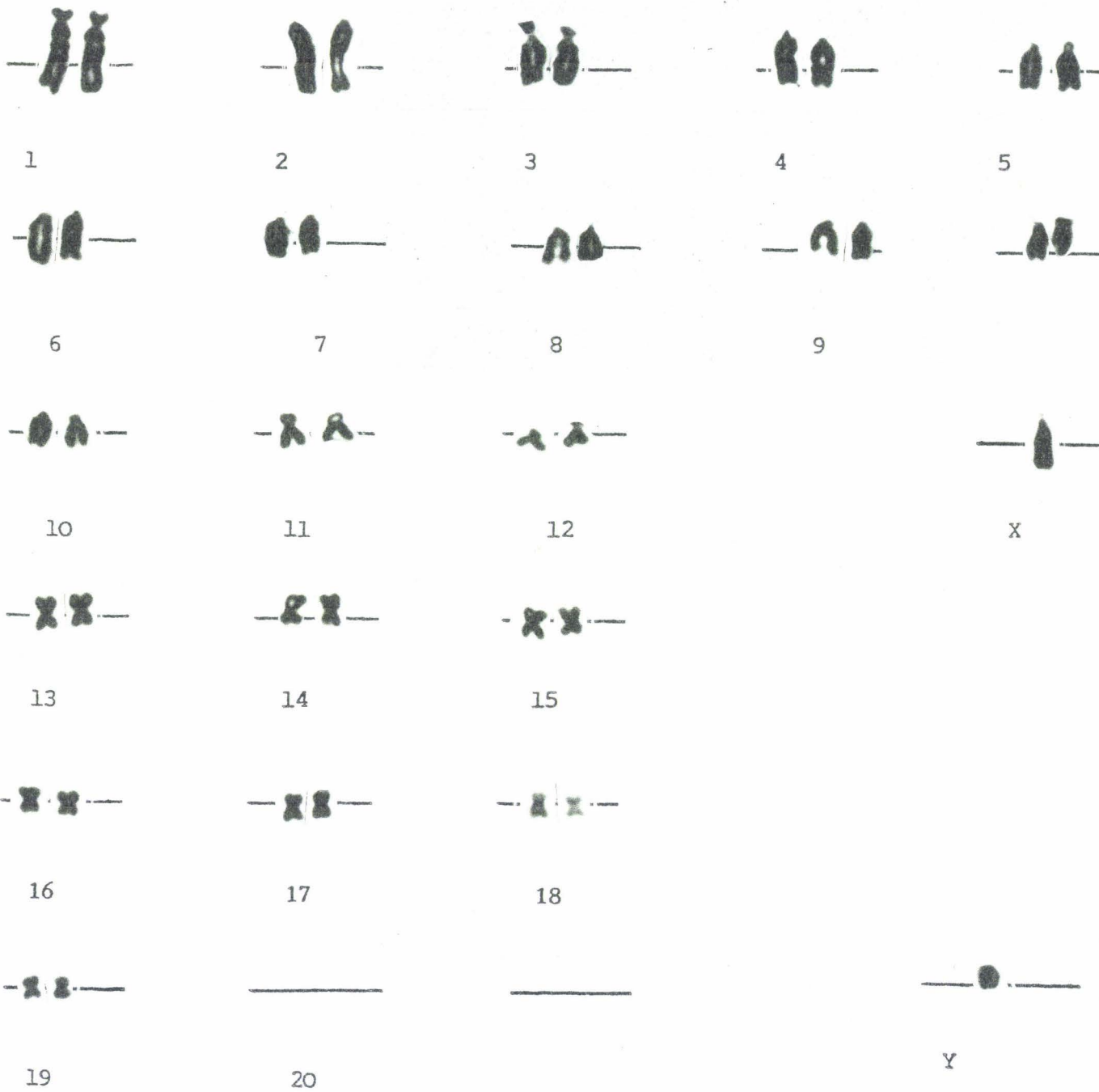


Figure 15: Comparaison des caryotypes:
A. *Rattus Norvegicus* (Yosida, 1973; Cytogenet. Cell Genet. 12, 1973)
B. FR3T3 (Fisher Rat Fibroblast, non-permissif)
C. FR3T3C (variant de FR3T3, permissif)
D. R100FR3T3C (FR3T3C infecté de manière persistante)

B. FR3T3 (Fisher Rat Fibroblast, non-permissif)



CONCLUSION :

42 Chromosomes
 18 Acrocentrics
 14 Metacentrics
 8 Submetacentrics
 + X } acrocentric
 Y }

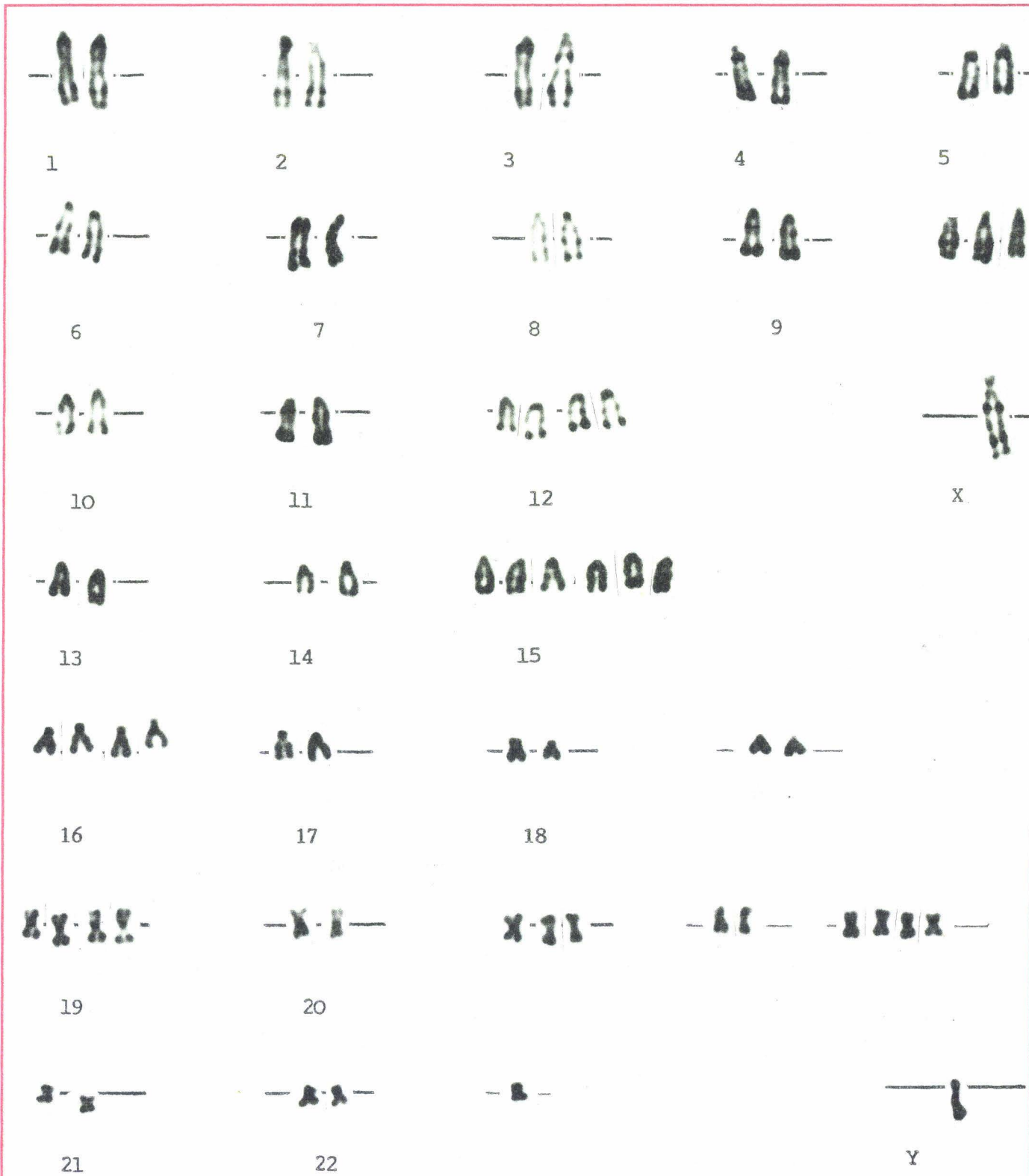
C. FR3T3C (variant de FR3T3, permissif)



CONCLUSION :

46 Chromosomes 38 Acrocentrics (cont x,y)
 23 Metacentrics
 10 Submetacentrics

D. R100FR3T3C (FR3T3C infecté de manière persistante)



CONCLUSION :

71 Chromosomes

37 Acrocentrics

19 Metacentrics

14 Submetacentrics

3. Résultats annexes.

Caractérisation du variant:

Le variant FR3T3C a été obtenu après la mise en culture d'une ampoule de cellules FR3T3. Les cellules FR3T3 (qui nous servaient alors de témoins dans nos expériences de sensibilité à MVMp, d'amplification ou de production virales) ont curieusement montré des caractéristiques différentes de celles connues jusqu'alors: la capacité à répliquer l'ADN viral au même taux que les cellules A9 productrices ou FREJ4 (dérivé de FR3T3 transformé par *ras*, Van Hille et al., 1989) et à produire MVMp en quantité importante. Ces premiers résultats furent ensuite confirmés par l'étude de la population résistante R100, obtenue par infections répétitives des cellules à MOI=10 puis MOI=100 (MOI: "Multiplicity of Infection"). Les cellules R100 contenaient une quantité importante (non diluable au cours des passages) de génomes viraux (Southern) et produisaient des particules infectieuses (tests biologiques). En outre, toutes nos observations sur cette population R100 suggèrent que la production virale pouvait être non-lytique. Or, jusqu'ici les cellules FR3T3 passaient pour être non-permissives, c'est à dire incapables de produire du virus infectieux (Van Hille et al., 1989; Salomé et al., 1990; Spegelaere et al., 1991; Legrand et al., 1992).

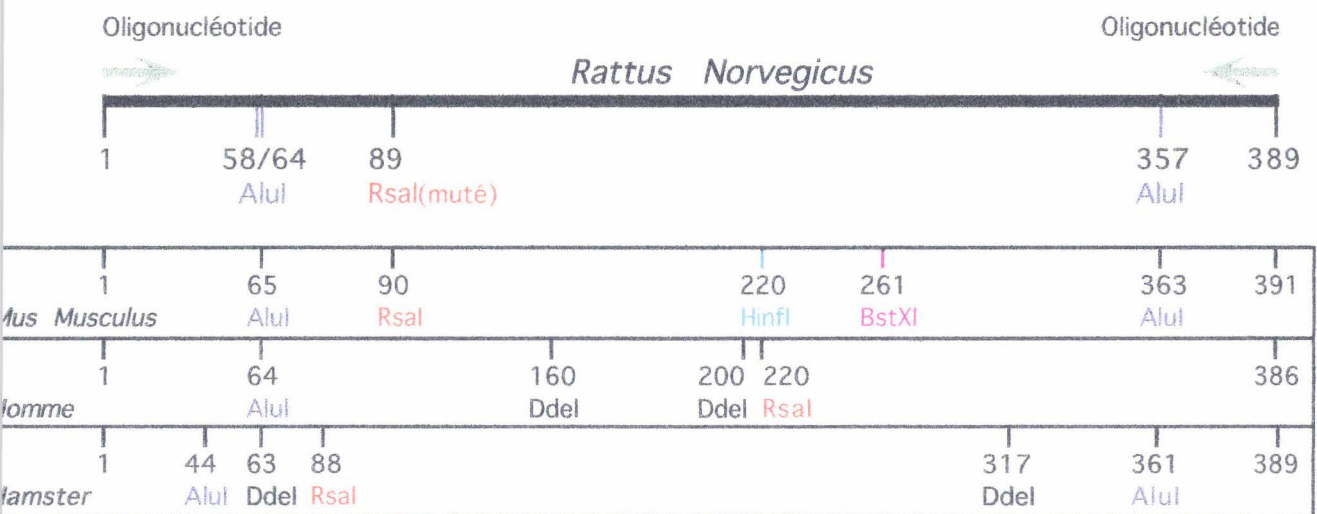
Ces cellules FR3T3, à priori normales, résistantes mais permissives et productrices, ont été dénommées FR3T3C (R100FR3T3C: cellules infectées de manière persistante). Avant même d'essayer d'expliquer les résultats obtenus, outre l'identité des cellules FR3T3C (espèce, type cellulaire), il était nécessaire de vérifier qu'elles n'étaient pas transformées.

L'examen du caryotype des cellules a montré que les FR3T3 référencées ont 42 chromosomes, soit le nombre normal de chromosomes répertoriés chez le rat, alors que les FR3T3C ont 72 chromosomes (Figure 15).

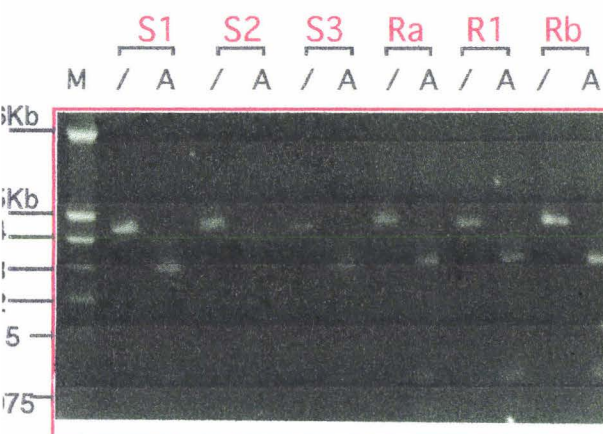
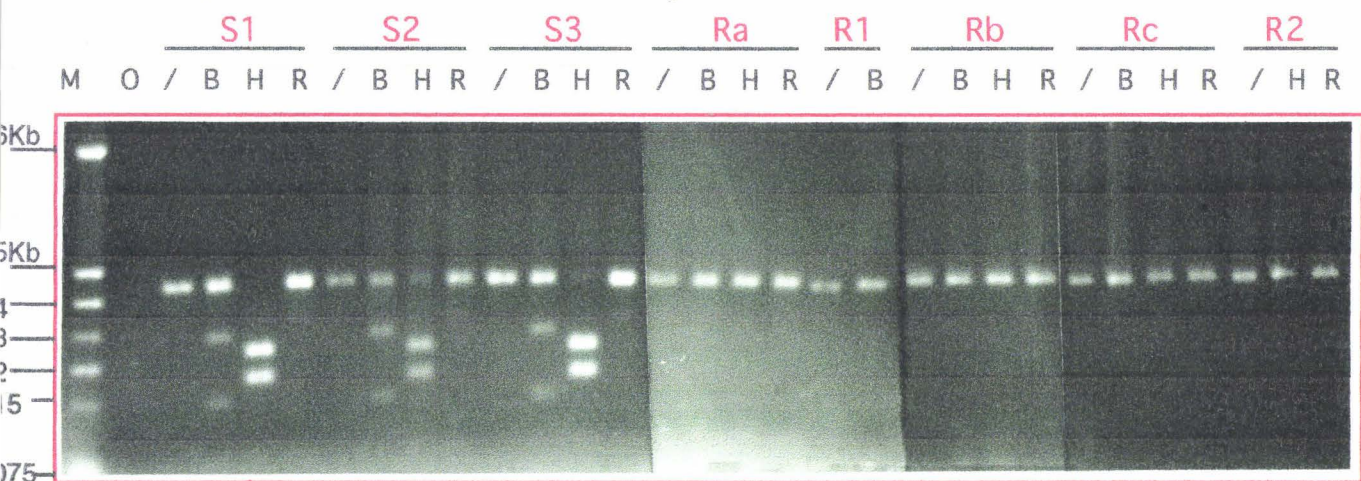
Le problème de l'espèce pouvait se poser, étant donné les espèces cellulaires couramment cultivées dans le laboratoire (homme, rat, souris, hamster, poulet...), car une contamination est toujours possible (Nelson-Rees et Flandermeyer, 1977). L'analyse par RFLP de l'ADN mitochondrial (Restriction Fragments Length Polymorphism; Ferris et al., 1982; Welsh et McClelland, 1990) permettait, à condition d'effectuer les digestions discriminatoires (espèces spécifiques), de démontrer l'appartenance à une espèce. Les profils obtenus ont confirmé que la cellule FR3T3C était une cellule de rat (Figure 16). Ces premiers résultats ont ensuite été confirmés par le séquençage des fragments amplifiés.

Il fallait aussi connaître le type cellulaire, puisque quelques années auparavant Salomé et al. (1989) montraient qu'une cellule de rat NRK (New born Rat Kidney) avait un comportement vis à vis de MVMp similaire à celui de la cellule FR3T3C. Aussi avons nous utilisé une technique nouvelle, les RAPD (Random Amplification Polymorphism DNA; Welsh et al., 1991; Hadrys et al., 1992) qui est utilisée couramment pour étudier la ségrégation chez les plantes (Mahé, A., communication personnelle) et qui permet de différencier les individus à l'intérieur d'une même espèce. Une PCR (Polymérase Chain Reaction) effectuée à basse température avec un seul oligonucléotide (10-15 mer) aléatoire, suivie d'une électrophorèse, permet d'établir un profil individuel de fragments d'ADN amplifié. L'inconvénient majeur de cette technique est que, pour chaque série de PCR (même effectuée dans des conditions de programme, réactifs identiques...), des profils différents sont obtenus. Aussi, faut-il comparer les profils des échantillons et des témoins à l'intérieur de la même expérience. Les résultats de RAPD (Figure 17) ont permis d'affirmer que la cellule FR3T3C était de nature fibroblastique.

Séquence de l'ADN mitochondrial 12S amplifié et oligonucléotides flanquants



RFLP de l'ADN amplifié (/: non digéré, A: AluI, B: BstXI, H: HinI, R: RsaI)



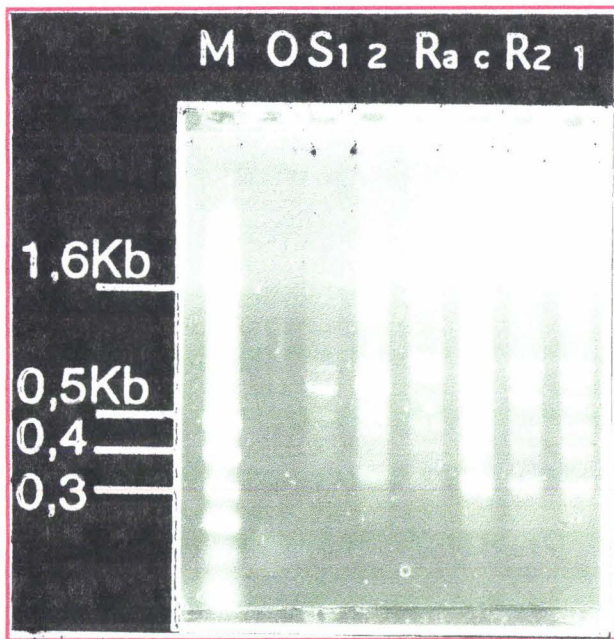
- M : Marqueur de taille (pKH/HinI)
- O : pcr témoin (H₂O)
- S1 : Témoin Souris 1: NIH3T3
- S2 : Témoin Souris 2: NIH3T3/ras (passage x)
- S3 : Témoin Souris 3: NIH3T3/ras (passage y)
- R1 : Témoin Rat 1: FR3T3/ras
- R2 : Témoin Rat 2: FR3T3
- Ra : FR3T3C (passage 17)
- Rb : FR3T3C (passage 50)
- Rc : R100FR3T3C

Figure 16: Restriction Fragment Length Polymorphism.

A. Oligonucléotide aléatoire:

$_1$ AACTGACCAACCTGTG $_{16}$

B. Profils de RAPD:



- M : Marqueur de taille (pKH/Hinfl)
- O : pcr témoin (H₂O)
- S1 : Témoin Souris 1: NIH3T3
- 2 : Témoin Souris 2: NIH3T3/ras (passage x)
- 1 : Témoin Rat 1: FR3T3/ras
- R2 : Témoin Rat 2: FR3T3
- Ra : FR3T3C (passage 17)
- c : R100FR3T3C



- M : Marqueur de taille (pKH/Hinfl)
- O : pcr témoin (H₂O)
- S1 : Témoin Souris 1: NIH3T3
- T : Témoin Rat: NRK
- R1 : Témoin Rat 1: FR3T3/ras
- Ra : FR3T3C (passage 17)

Figure 17: Rapid Amplification Polymorphic DNA:
A. Séquence de l'oligonucléotide aléatoire utilisé
B. Profils des ADN amplifiés

Handwritten text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is illegible due to extreme fading and low contrast.

Handwritten text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is illegible due to extreme fading and low contrast.

Nous avons aussi vérifié la "normalité" des cellules FR3T3C, bien qu'elles résistaient au Parvovirus MVMP et ne poussaient pas en milieu semi-solide (cf. article III, p. 96). En effet, dans le laboratoire des clones dérivés de FR3T3 transformés par différents oncogènes (*ras*, *myc*, TSV40, virus BPV) portés par des plasmides étaient couramment cultivés. Ces cellules ont une sensibilité-résistance au Parvovirus et une clonabilité en agar mou très variables (Van Hille et al., 1989; Salomé et al., 1990). Nous avons donc vérifié et confirmé par Southern blots qu'aucun de ces plasmides était présent dans l'ADN des cellules FR3T3C.

La cellule FR3T3C est donc un variant de FR3T3 ayant émergé spontanément. Il s'agit d'un fibroblaste de rat normal (au sens transformation oncogénique) bien que son caryotype soit anormal. Cependant, il nous faut préciser ici que la cellule FR3T3C (72 chr.) est incapable de pousser en milieu sans sérum et meurt une vingtaine d'heures plus tard, alors que la cellule FR3T3 (42 chr.) peut même se diviser dans ces conditions. Ces observations suggèrent que la cellule FR3T3C est plus "normale" (se rapprochant d'avantage d'une cellule primaire) que la cellule FR3T3 (cf. Tableau 9).

L'émergence des FR3T3C: un avantage sélectif peut-être?

Nous avons décongelé plusieurs ampoules de FR3T3 (initialement cultivées par différentes personnes), et avons trouvé, après analyse du nombre de chromosomes, une culture FR3T3 de cellules à 42 chromosomes (statistiquement pûre), une population présentant un mélange (50/50 environ) de cellules à 42 et à 68-74 chromosomes (baptisée MixRA) et enfin, issue d'une ampoule de MixRA la population à 72 chromosomes (FR3T3C).

L'émergence des FR3T3C pourrait alors s'expliquer comme suit. Les cellules FR3T3 sont cultivées en MEM, sodium pyruvate (1%), NaHCO₃ (3,7g/l), sérum de veau Donor (10%), alors que les cellules MixRA ont été cultivées pendant deux ans au moins (entre-coupés par des congelations/décongelations) en DMEM, D-biotine (1µg/ml), acides aminés non-essentiels (1%), NaHCO₃ (2g/l), sérum de veau foetal (20%) avant qu'elles ne deviennent FR3T3C. Il est donc possible que le milieu de culture et surtout le sérum aient permis l'émergence, à partir de la culture MixRA, d'une population stable à 72 chromosomes (FR3T3C). L'âge réel (nombre de passages) de ces cellules est inconnu, un n° de passage leur a été attribué arbitrairement lorsque nous les avons reçues. Les études caryotypiques réalisées sur des passages précoces (<15) et tardifs (>50) n'ont décelé aucune dérive du nombre de chromosomes - toujours équivalent à 68-72 -. Il s'agit là uniquement de déductions, car nous n'avons pas refait l'expérience de cultiver des cellules MixRA pendant quelques années afin de voir apparaître des cellules FR3T3C.

Caryotype et permissivité au Parvovirus:

Afin d'éclaircir le mystère de la permissivité des cellules FR3T3C, nous avons poursuivi nos investigations sur les trois populations pré-citées. L'analyse de leurs comportements face au Parvovirus MVMP a permis de dégager un certain nombre de corrélations entre caryotype et capacité à amplifier l'ADN viral (cf. Figure 4a, article II). Cette étude a clairement montré une capacité à répliquer l'ADN viral liée au nombre de chromosomes (cf. Tableau 10). Ces derniers résultats ont confirmé ceux déjà obtenus par deux de nos collègues (Van Hille et al., 1989; Salomé et al., 1990). En effet, si les cellules FR3T3 n'avaient pas fait l'objet de publications récentes, la population MixRA, en revanche, avait été étudiée - à titre de contrôle, sous le nom

Tableau 9: Comparaison des cellules FR3T3 et FR3T3C sur les critères de normalité.



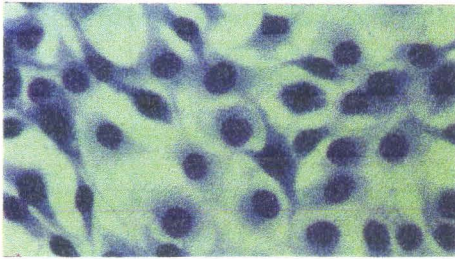
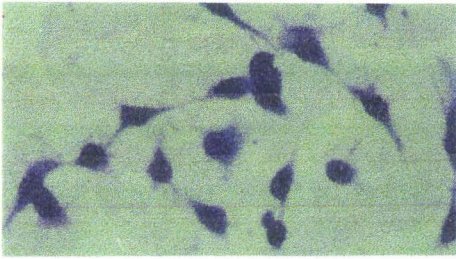
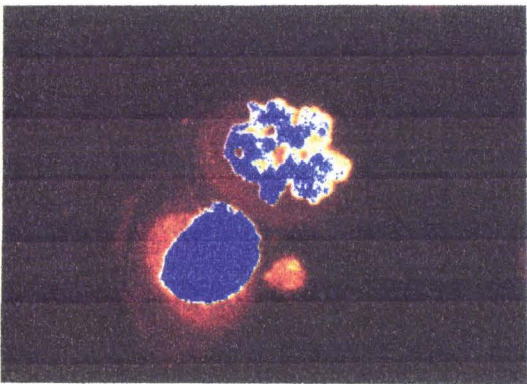
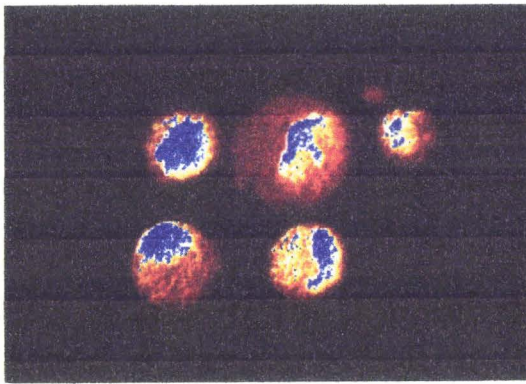
CELLULE	FR3T3	FR3T3C
MORPHOLOGIE		
Contraste de phase		
Coloration May-Grünwald-Giemsa		
Lazer		
	Plate, grande, adhérente majorité de cellules à noyau simple	Plate, grande, adhérente majorité de cellules à noyau multi-lobé
Dépendance au Sérum	-	+
Clonabilité en Milieu Semi-Solide	2,5%	0,05%
Tumorigénicité en Souris Nude	- (aucune tumeur après 2 mois)	- (aucune tumeur après 2 mois)
CARYOTYPE	42	72

Tableau 10: Comparaison des cellules FR3T3, MixRA et FR3T3C pour leurs comportements face au parvovirus MVMp.

CELLULE	FR3T3	MixRA	FR3T3C
CARYOTYPE	42	42 + 68-74 (mélange 50/50)	72
Survie (MOI=10)	64,5%	88,7%	95,8%
Amplification (MOI=10)	0,09	2,44	8,17
Production	0%	45%	100%
FORMES RÉPLICATIVES (1 cycle viral) simple brin	-	+	+
RF1	+	+	+
RF2	+	+	+
défective	-	+	-
FORMES RÉPLICATIVES (+ cycles viraux: R100) simple brin	-	+	+
RF1	-	+	+
RF2	-	+	+
défective	-	+	-

générique FR3T3 (Van Hille et al., 1989; Salomé et al., 1990) -, et montrait une semi-permissivité, soit une capacité non négligeable à amplifier l'ADN parvoviral.

De la culture en masse:

L'intérêt des cellules R100FR3T3C réside dans leur capacité à produire constitutivement et de façon non-lytique le Parvovirus MVMP, et pourraient fort bien être utilisées, à la place des A9 (cellules indicatrices, productrices, sensibles) pour la production parvovirale. En effet, la production et purification de virus à partir de cellules A9 est longue, fastidieuse et coûteuse et donc, d'un point de vue pratique et économique l'utilisation des cellules R100 paraît séduisante.

Dans cette optique, nous avons adapté les cellules R100FR3T3C à la culture en spinner ("mini-fermenteur"), en tirant profit de leur très forte adhérence au substrat. Cette étude a été réalisée avec un microporteur standard (Cytodex 1, Pharmacia; Gross, F., communication personnelle) en spinner de 250-1000ml (Figure 18A-B). Afin de quantifier le virus présent dans le milieu de culture du spinner (nombre de pfu: "plaque unit forming"), nous avons établi des courbes étalon en infectant les cellules indicatrices A9 à différentes MOI par un stock de virus MVMP de titre connu. Deux méthodes différentes ont été utilisées:

- la clonogénicité sur plastique, mesurant la survie des cellules A9
- la mesure de l'amplification virale après un cycle de réplication.

En parallèle, nous avons infecté les cellules A9 par un volume connu de surnageant filtré. Ainsi, nous avons évalué la quantité de virus contenue dans le spinner (Figure 18C), les deux types d'expérience ayant donné des résultats sensiblement identiques.

Il faut noter que ces résultats sont en accord total avec ceux présentés dans l'article II (production sur boîtes selon le protocole classique), et montrent, tant l'importance, que la qualité de la production virale obtenue.

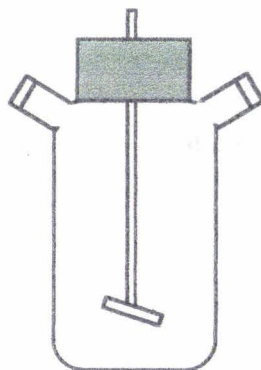
Avant de conclure...

Nous avons voulu savoir si les cellules FR3T3C/R100FR3T3C (Figure 18D) qui produisent MVMP de manière non-lytique (article II) pouvaient aussi produire le Parvovirus H-1.

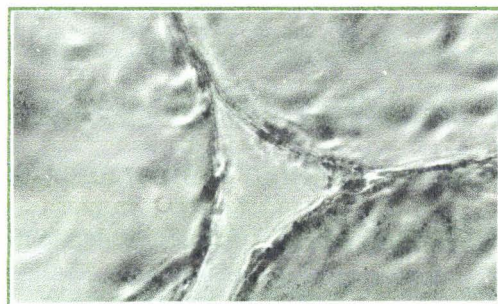
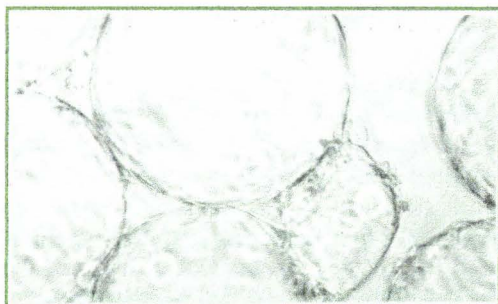
La survie des cellules FR3T3C à l'infection par H-1, mesurée par clonogénicité sur plastique, a permis de définir une résistance de 62,5% à MOI=10. Cependant, l'établissement d'une culture résistante à H-1 a été moins facile que pour MVMP, car les cellules infectées ont poussé plus lentement dans les deux premiers mois suivant l'infection (temps de doublement considérablement augmenté: 2 à 3 fois plus).

L'observation de la culture R(H-1)FR3T3C a montré, outre des cellules mortes (10-20%, estimation *de visu*), des cellules à multiples vésicules susceptibles d'héberger du virus. Les résultats de dot-blots ont révélé la présence de l'ADN parvoviral en quantité importante (Figure 19A). L'analyse de l'ADN épisomal a montré la présence des formes répliquatives RF1, RF2 et de l'ADN simple brin sans formes défectives décelables, suggérant ainsi la capacité des cellules FR3T3C à répliquer le génome du Parvovirus H-1 (Figure 19B). Afin de savoir si du Parvovirus infectieux H-1 était produit par ces cellules, nous avons infecté les cellules indicatrices NBE par (i) le milieu de culture filtré des cellules R(H-1)FR3T3C (ii) le lysat de ces mêmes cellules. Les résultats de "plaque assay" modifiés ont montré que le lysat des cellules R(H-1)FR3T3C renfermait du virus H-1 infectieux capable de se répliquer dans les cellules NBE.

A. Spinner:



B. R100FR3T3C adhérantes au Cytodex 1:



grossissement x400

C. Evaluation de la concentration de virus MVMp produits en spinner:

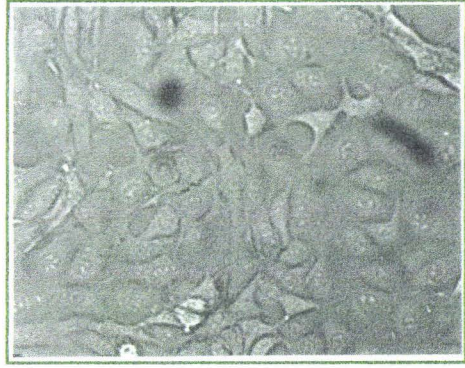
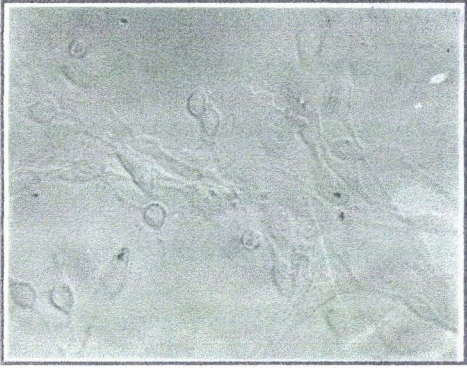
CELLULES	A9 infectées	R100FR3T3C
nb de cellules à confluence	150.10 ⁶	600.10 ⁶
production (pfu)	10 ⁸ -10 ⁹	10 ⁷ -10 ⁸
temps de culture (jours)	7	10
quantité de milieu (l)	1-1,5 (50 boîtes)	0,25 (1 spinner)
virus nécessaire	x fois 5.10 ⁻³	/

Figure 18: Adaptation des cellules R100FR3T3C à la culture en spinner:
A. Spinner
B. R100FR3T3C adhérant aux billes de Cytodex 1
C. Comparaison des modes de production

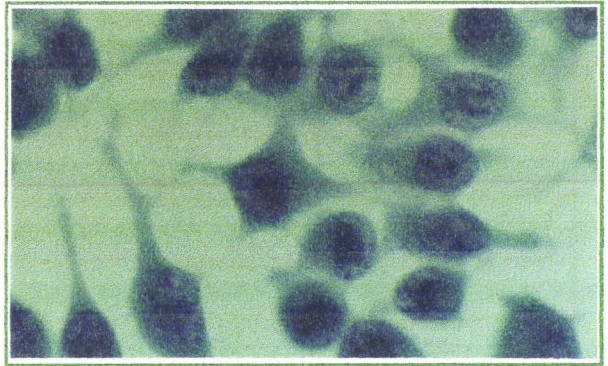
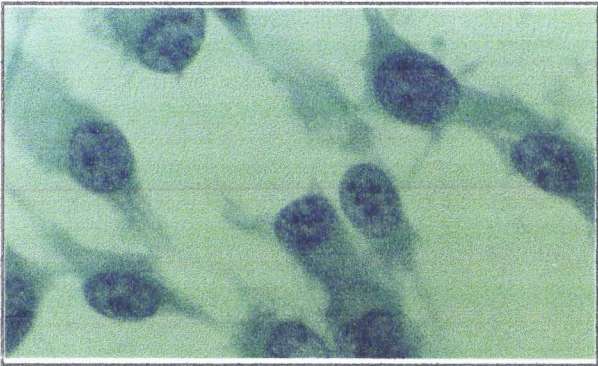
FR3T3C

R100FR3T3C

a.



b.



c.

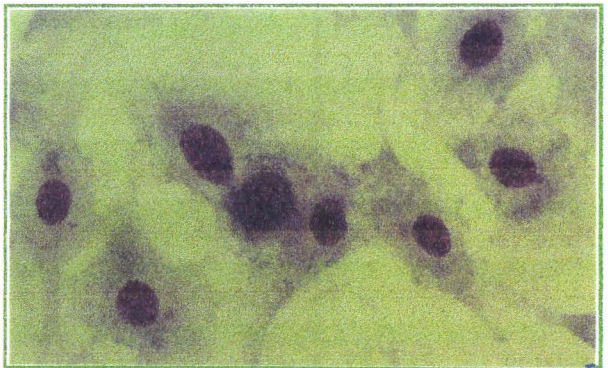
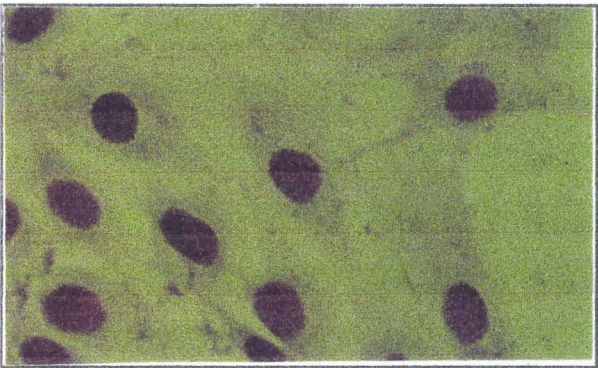
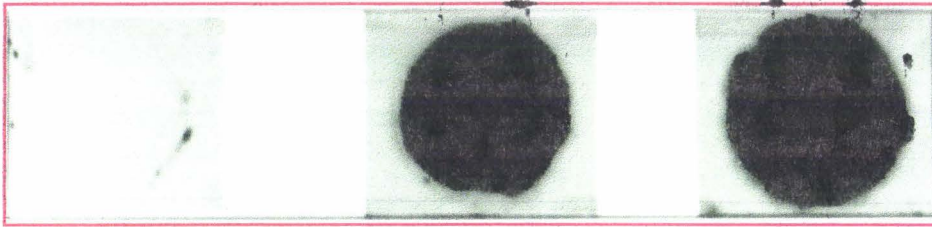


Figure 18D: Colorations des cellules FR3T3C et R100FR3T3C
a. contraste de phase
b. coloration Papanicolaou
c. coloration Bleu Giemsa.

A. Détection de la présence d'ADN (H-1) dans les cellules R(H-1)FR3T3C



témoin non-infecté	R100FR3T3C	R(H-1)FR3T3C	
0	888,1	2549,8	cpm/10 ⁶ cellules %
0	100	287	

B. Détection des formes répliquatives de H-1 dans les cellules R(H-1)FR3T3C (Hirt).

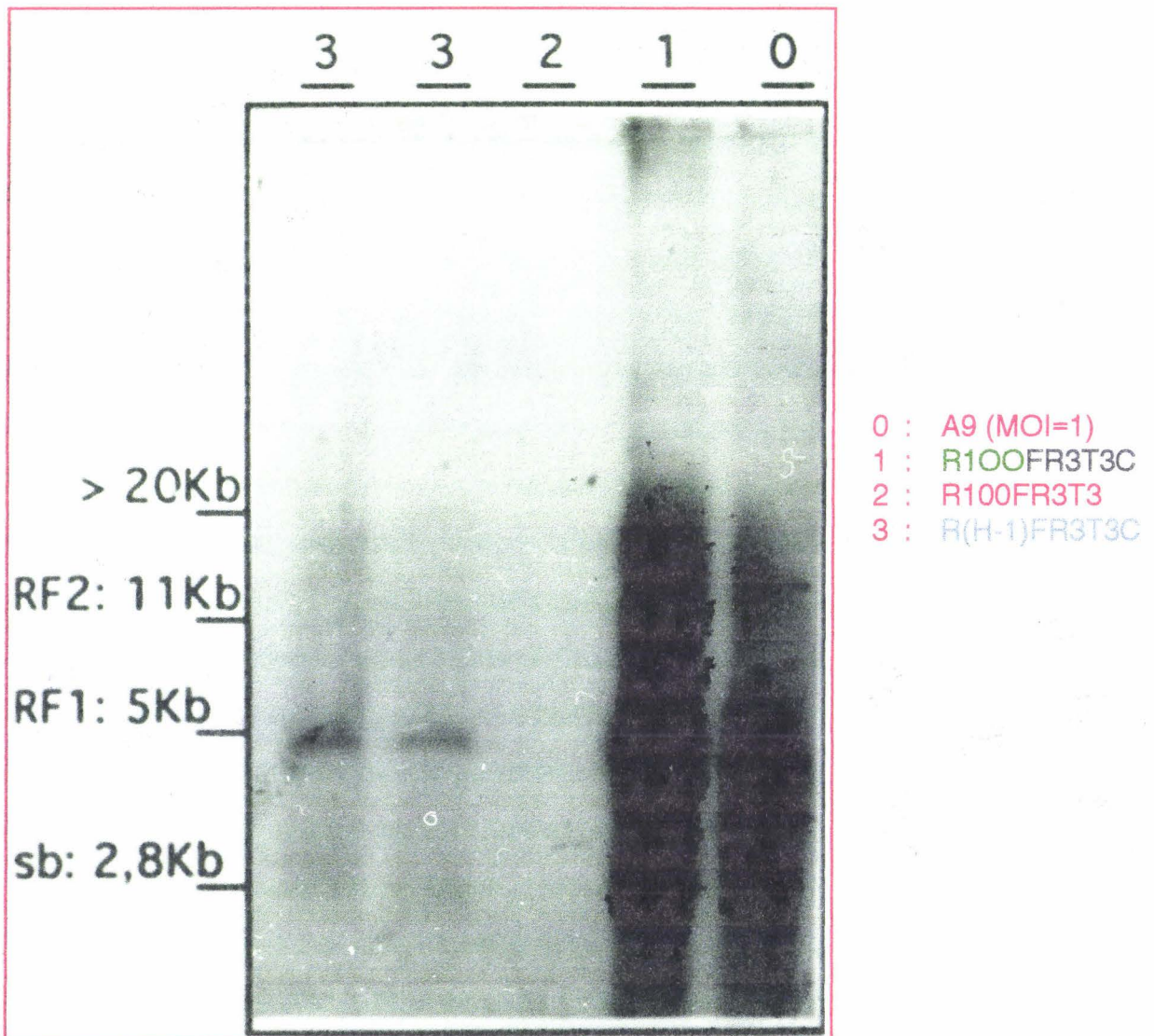


Figure 19: Détection de la présence de H-1 dans les cellules R(H-1)FR3T3C.

4. Discussion.

Une partie de nos travaux a été faite afin d'éclaircir les phénomènes observés, i.e. la persistance de l'ADN, sa multiplication, et la production non-lytique de virions.

Les cellules FR3T3C (et R100FR3T3C) et les cellules FR3T3 diffèrent par leur caryotype, leur structure nucléaire, et leur dépendance vis à vis du sérum. Cependant, ces différences n'expliquent pas les propriétés différentes des cellules FR3T3C et FR3T3 vis à vis de MVMP.

Mais, le fait que le Parvovirus H-1 puisse aussi persister (réplication d'ADN) et se multiplier dans la cellule FR3T3C (ces deux caractéristiques n'étant pas forcément liées, cf. résultats annexes article III, p. 113) indique que la compétence de ces cellules est une propriété caractéristique. Il est d'ailleurs possible d'imaginer que des cellules de même "type" puissent assumer la fonction de réservoir au sein de l'animal, et ainsi expliquer la persistance parvovirale (cf. § I/3.2.1., p. 21) (Rommelaere et Tattersall, 1990; Gaertner et al., 1993).

NS2 est détectée en quantité importante dans les cellules infectées de manière persistante (R100FR3T3C). Ceci est probablement dû à une longue demi-vie (8h) supérieure à celle décrite dans d'autres systèmes cellulaires généralement inférieure (3h; cf. § I/2.2.1.2., p. 8). Cependant bien que la stabilité de NS-2 soit augmentée dans les cellules R100FR3T3C, rien ne permet d'associer de manière causale l'accumulation de NS2 et la production non-lytique de MVMP par ces cellules.

III

ARTICLE III

**AZATYROSINE-MEDIATED PHENOTYPIC REVERSION OF
SPONTANEOUS TRANSFORMATION ABROGATES THE
SENSITIVITY OF RAT FIBROBLASTS TO THE PARVOVIRUS
MVMP.**

Soumis à CANCER RESEARCH

1. Introduction.

L'Azatyrosine, un antibiotique analogue de la tyrosine, est capable de produire la "réversion" vers un phénotype normal de cellules murines et humaines transformées par les produits des oncogènes *ras*, *raf*, *erbB2*. Outre son "pouvoir révertant", l'Azatyrosine (AzTyr) est toxique pour les cellules transformées par les produits des oncogènes *hst*, *ret*, *src*, ou par SV40. Les études portant sur les mécanismes d'action de l'AzTyr localisent ses cibles potentielles dans la cascade de transmission du signal en aval des protéines Ras/Raf. Loin de nous impliquer dans l'étude des mécanismes moléculaires de l'action de l'AzTyr, il nous a semblé intéressant de vérifier si une cellule transformée sensible et permissive au Parvovirus, devenait, lorsqu'elle était traitée par l'AzTyr, résistante et non-permissive, donc "normalisée". Cette approche parvovirale de la "réversion" AzTyr-induite devait permettre de vérifier et d'évaluer le degré de "normalisation".

2. Résumé.

Afin de mesurer le "pouvoir révertant" de l'AzTyr, nous avons choisi d'étudier le système FR3T3C (fibroblaste de rat normal (cf. article II, p. 68)) et des dérivés spontanément transformés, FRST-. A titre de contrôle nous avons utilisé le système FR3T3/FREJ4 (fibroblaste de rat normal et son dérivé transformé par *c-Ha-ras*).

L'originalité de ces travaux repose sur les points suivants:

- l'utilisation de cellules de rat,
- la comparaison des effets de l'AzTyr sur des transformants spontanés ou induits par l'oncogène *ras*, tumorigènes et sensibles à MVMp,
- l'utilisation du Parvovirus MVMp comme sonde pour estimer le degré de "normalisation".

Dans un premier temps, nous avons observé les effets de l'AzTyr sur les cultures, en mesurant leur survie au traitement et en notant les éventuels changements de morphologie ou de croissance des cellules. Ces critères, déjà étudiés dans les travaux précédents, étaient considérés par leurs auteurs comme preuve de l'action de l'AzTyr.

Dans une seconde partie, nous avons comparé la capacité à pousser en milieu semi-solide ("soft-agar") et la tumorigénicité en souris athymique des cellules traitées et non-traitées.

Nous avons montré que la réversion morphologique globale d'une culture de transformants spontanés (FRST-) s'accompagnait de l'abolition totale de leur tumorigénicité en souris nue. Par contre, il n'a pas été possible d'obtenir la réversion morphologique totale d'une culture de cellules FREJ4 (transformées par le produit du gène *ras*), mais la diminution de leur capacité à croître en "soft-agar" semblait indiquer qu'une partie de la culture était révertée.

L'approche parvovirale a confirmé les résultats précédents, en démontrant que la "réversion" de la transformation des cellules FRST- s'accompagnait de la

réacquisition de résistance à MVMP, et que la réversion partielle des FREJ4 (observée agar mou) était proportionnelle à l'acquisition d'une résistance partielle au virus.

Nous avons donc montré que la "réversion" de la transformation induite par l'AzTyr était caractérisée par la récupération de critères de "normalité" dont la résistance à MVMP, ces critères étant perdus lors de la transformation. Ainsi, si la transformation est en général associée à la sensibilité au Parvovirus, la "réversion" de la transformation s'accompagne d'un retour à la résistance, caractère de cellule non-transformé. L'étude du système FRST- prouve aussi que l'action de l'AzTyr n'est pas limitée à la transformation par le produit du gène *ras*.

**AZATYROSINE-MEDIATED PHENOTYPIC REVERSION OF
SPONTANEOUS TRANSFORMATION ABROGATES THE
SENSITIVITY OF RAT FIBROBLASTS TO THE PARVOVIRUS
MVMP.**

C.E. KOERING^{1*}, M. VENNIN-FIKRY¹, T. DUPRESSOIR¹, J.R. SCHLEHOFER^{1,2}, J.
ROMMELAERE^{1,2}, and D. STEHELIN¹.

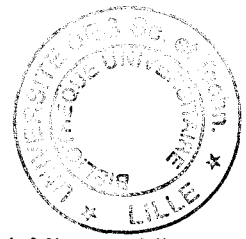
* corresponding author

¹ Unité d'Oncologie Moléculaire, Institut Pasteur de Lille, Centre National de la
Recherche Scientifique URA 1160, BP 245, 59019 Lille Cedex, France
Phone: (+33)/20.87.77.29.
Fax: (+33)/20.87.79.08.

² Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung 0610 and Unité INSERM 375, Im
Neuenheimer Feld 242, D-69120 Heidelberg, Germany

ABSTRACT

In contrast to normal cells, many transformed or tumorigenic cells of human or rodent origin are sensitive to the killing activity of the parvoviruses H-1 and MVMP. Previous studies have shown that Azatyrosine (AzTyr), an antibiotic, could revert *ras*-transformed murine or human cells to untransformed phenotype. We analysed whether such a phenomenon also applied to spontaneously-transformed rat cells, and whether reversion of the transformed phenotype resulted in resistance to parvovirus MVMP. Cells that went through the AzTyr treatment were found to be phenotypically reverted, i.e. they exhibited a reduced capacity to grow in semi-solid medium and a loss of tumorigenicity in nude mice. Revertants acquired resistance to the killing effect of MVMP infection, indicating that in this system, sensitivity to MVMP was a distinctive marker of transformed versus reverted cells.



INTRODUCTION

Autonomous parvoviruses, such as the H-1 virus and Minute Virus of Mice (MVM), are replicating lytically. The cytotoxic effect of these viruses is associated with the expression of their non-structural (NS) regulatory proteins (1, 2, 3). A number of transformed cells proved to be sensitive to parvovirus-induced killing, while corresponding normal cells were more or fully resistant to the viral cytopathic effect (1, 2, 4, 5, 6, 7). In addition oncogenic transformation of various human and murine fibroblastic and epithelial cells was shown to upmodulate the expression of parvoviral genes (1, 2, 3, 5). However, this correlation between cell susceptibility to parvoviruses and transformation appeared to be both cell- and oncogene-dependent (5, 6, 8, 9).

Since most of the transformed derivatives of FR3T3 rat fibroblasts studied so far were found to be highly sensitive to the lytic effect of MVMP (prototype strain of MVM) (1, 8, 10), we investigated whether a partial reversion of the transformed phenotype led to the development of resistance to this parvovirus.

Azatyrosine (AzTyr (11)), an {L- β -(5-hydroxy-2-pyridyl)-alanine} antibiotic isolated from *Streptomyces chibanensis* (12), has been reported (i) to kill cells transformed by the oncogenes *hst*, *ret*, or *src* (13), (ii) to revert to an "untransformed" phenotype *ras*-, *raf*- or *erbB2*-transformed NIH3T3 cells as well as human pancreatic adenocarcinoma PSN-1 cells (13), and *ras*-transformed MTSV1-7 human mammary epithelial cells (14). This reversion was stable after removal of the drug, and characterized by flat cells being contact inhibited, unable to grow in semi-solid medium and non-tumorigenic in nude mice. Interestingly, AzTyr-induced revertants of *ras*-transformed cells were found to express the mutant p21-Ras protein at comparable levels as the parental cells (13, 14). In addition, *in vivo* studies using transgenic mice harboring the human c-Ha-*ras* proto-oncogene showed that AzTyr inhibited tumour induction by chemical carcinogens (15). It was suggested that AzTyr may act by activating cellular genes such as *K-rev/Rap1A* (counteracting *ras* functions), *rrg*, *collagen* type III, *fibronectin* and *rhoB* (16).

In this report, we addressed the question whether the AzTyr-induced phenotypic reversion of transformation correlated with the suppression of cell sensitivity to the killing action of MVMP. To this end we used the FR3T3C cell line and spontaneously transformed subclones isolated as colonies growing in soft-agar. Although karyotypically abnormal (72 chromosomes instead of 42 (17, 18)), FR3T3C cells were morphologically normal, failed to form both colonies in soft-agar and tumours in nude mice, and were highly resistant to MVMP infection. As previously shown for FR3T3 cells stably transfected with specific oncogenes (8, 9), the spontaneous FR3T3C transformants could be distinguished from the parental line by their sensitivity to the cytopathic effect of MVMP.

The data presented in this paper indicate that AzTyr caused (i) reversion of spontaneous transformation of FR3T3C cells, (ii) loss of the transformed phenotype correlated with the recovery of cell resistance to MVMP infection.

MATERIALS AND METHODS

Cells:

FR3T3C is a spontaneously emerged variant of FR3T3 cells (8, 9) characterized by a normal morphology, high adherence to the substrate and low capacity for anchorage-independent growth. FR3T3C cells and transformed derivatives and FREJ4 cells (9) (c-Ha-ras-transformed (19) FR3T3 cells) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% foetal calf serum (FCS) (GIBCO, Renfrewshire, Scotland), 1% glutamine and, 12 μ g/ml gentamycin, in 5% CO₂ at 37°C.

Selection and establishment of spontaneously-transformed clonal derivatives of FR3T3C cells by semi-solid medium cloning:

Fifteen 60-mm dishes were seeded with 10⁵ FR3T3C cells each, in soft-agar medium as described (1). Cells were incubated for 3 weeks to allow colonies formation. Out of 15x10⁵ cells, twelve clones grew as small colonies and were picked out from the soft-agar medium, trypsinized and replated on 6-mm dishes in DMEM supplemented with 20% FCS. Five of these clones (FRSTA-E) were able to grow on plastic, and were further cultured in DMEM supplemented with 5% FCS. FRST cells were morphologically different from the parental FR3T3C line (very small size and rounded shape) showed no contact inhibition and a reduced adherence to the substrate and necessitated to be passaged before reaching confluence.

Azatyrosine (AzTyr) treatment:

FR3T3C and FRST cultures (10⁴ cells/35-mm dish) were incubated in medium supplemented with 500 μ g/ml of AzTyr during 9 days. AzTyr was reported to be stable under these conditions for at least 8 days (13). After removal of the medium, cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), and incubated with fresh culture medium without AzTyr. Cultures kept in this way were designated to as FR3T3C/azap or FRST/azap, with p indicating the number of passages after completion of the AzTyr treatment.

Eight passages after the first treatment, a second treatment with AzTyr was performed on FRSTE AzTyr-treated cells (FRST-E/aza). These twicely-treated cells were called FRST-E/aza2.

The morphology of AzTyr- versus mock-treated cells was analyzed all along the procedure by microscopic examination.

Measurement of cell survival after Azatyrosine treatment:

Cultures (10⁴ cells/35-mm dish) were incubated with AzTyr as described above. After treatment, the culture medium was removed, and adherent cells were harvested by trypsinization. Cells from both the medium and adherent population were collected and pooled, and the fraction of living cells was determined by the trypan blue exclusion method. Survival was expressed as percentage of living over total cell numbers, except for cells FRST-A and -B for which a few clones were isolated as survivors.

Karyotypes: preparation of Metaphases:

Semi-confluent monolayers were growth-arrested by colcemide (Gibco-BRL) at a final concentration of 0,06 μ g/ml of medium for 4h. Cells were treated and processed for R Banding (RHG) as described (20).

Chromosomal analysis were done on photographed metaphases. Five to ten spreads were analyzed per cell line, and 25 cells were examined for total chromosome number in each spread.

Colony formation in Soft-agar:

Cultures were seeded at a density of 10^3 and 10^5 cells/60-mm dish in soft-agar medium, as previously described (1). Cells were incubated for 10 days and colonies were counted. The anchorage-independent cloning efficiency was calculated from the number of colonies expressed as percentage of the number of seeded cells.

Tumorigenicity in Nude mice:

BALB/c-*nu/nu* mice (IFFA-CREDO) were maintained in a germ-free environment. Five 6-7 weeks-old female nude mice were injected subcutaneously (s.c.) with 10^6 cells in 200 μ l of DMEM. The neoplastic growth rate was determined by measuring tumour diameter at three days-intervals. When the tumour size reached approximatively 1.5 cm, all animals were sacrificed and checked for the presence of metastases.

MVMp infection:

MVMp was propagated and purified as described (21) and titrated by plaque assay (7). Exponentially growing cell monolayers were inoculated with MVMp at various multiplicities of infection (MOI), by incubation with virus suspensions in PBS supplemented with 9mM CaCl_2 and 5mM MgCl_2 . After 1h, cells were rinsed with PBS and fresh culture medium was added.

Measurement of cell survival and establishment of an MVMp-resistant cell population:

Exponentially growing cultures (10^6 cells) were infected with MVMp at various MOIs. Cells were trypsinized 4h after mock- or MVMp infection, and replated at low densities (250 to 1000 cells) onto 60mm-dishes. Colonies were fixed and stained with 1% methylen blue in methanol, 6-8 days post-infection (p.i). Cell survival was expressed as percentage of colonies formed by infected vs. control cells. Cultures (AzTyr-treated and non-treated, 5×10^5 cells) were infected at MOI=10, and the MVMp (MOI=10)-resistant cell population was cultured for further 15 days before a second infection at an MOI=100.

2-D protein electrophoresis:

Non-treated and AzTyr-treated cultures (1.5×10^6 cells/100mm-dish) were metabolically labeled with 200 μ Ci of [^{35}S]methionin + [^{35}S]cystein (800 Ci/mMol; ICN Biomedical) for 6h in 2ml of methionin-cystein-free DMEM (Flow Laboratories) supplemented with 5% dialyzed FCS. Cells were lysed in 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X100, 0.5% Na Desoxycholate, 0.1% SDS, 0.5% Aprotinin. After clarification by centrifugation at 15000g at 4°C, lysate samples matched to equal amounts of cells (10^6) were dried, treated and processed for 2-D gel electrophoresis as described (23).

RESULTS

Phenotypic effects induced by Azatyrosine on transformed cells :

To obtain phenotypic reversion, all non-transformed and transformed cells were treated with 500µg/ml AzTyr during 9 days (AzTyr is stable for at least 8 days (13)). Data obtained concerning the phenotypic characterisation of revertant cells are summarized in Table I.

FR3T3C is a variant of FR3T3, with 72 chromosomes (data not shown) compared to 42 in the FR3T3 line (17, 18)). Normal FR3T3C cells were confirmed to be insensitive to Azatyrosine, as shown in previous studies (13, 14, 16). No significant cell killing was induced by AzTyr treatment (91% surviving cells at the end of the treatment, respectively, Table I, FR3T3C/aza) and the treated cells were neither growth-arrested nor changed in morphology. Treated (FR3T3C/aza) and non-treated (FR3T3C) normal cells were poorly able to grow in semi-solid medium (Table I).

In contrast, spontaneously-transformed clones FRST-(A-E) derived from FR3T3C cells, growing efficiently in soft-agar medium (Table I), were found to be sensitive to AzTyr. An important cell death took place at the fourth day of treatment (Table I), in some cases accompanied by a reduced growth rate and/or morphological changes of the surviving cells and more or less reduced growing efficiency in soft-agar medium (Table I). Less than 1% of cells of the AzTyr-treated FRST-A clone survived the treatment giving rise to only 41 FRST-A/aza surviving clone cells (Table I), which were growth-arrested and morphology-changed. These surviving cells displayed a greater size than untreated FRST-A clone cells and a flatter shape (Fig. 1b), resembling FR3T3C parental cells (Fig. 1h). The same phenomena were observed with FRST-B clone during AzTyr treatment (FRST-B/aza, data not shown). The morphological changes of the treated cells FRST-A/aza and -B/aza were paralleled to a high decrease in soft-agar colony formation ability (less than 0.4% FRST-A/aza cells compared to more than 19% of non-treated FRST-A cells (Table I) and 0.6% FRST-B/aza cells compared to more than 74% of non-treated FRST-B cells (data not shown)).

Significantly more surviving cells were obtained from AzTyr-treated FRST-C clone (FRST-C/aza, 27% surviving cells at the end of the treatment, Table I). Only some of these cells were growth-arrested and changed in their morphology, i.e. FRST-C/aza cultures exhibited small, rounded, loosely adherent cells among flat shape cells, suggesting a heterogeneous population indicating reversion of only part of the cells (Fig. 1d). This was confirmed by soft-agar experiments showing that FRST-C/aza cells were still able to grow in soft-agar although with a slightly decreased efficiency (7.1% instead of 26.2% before treatment, Table I).

In contrast, cells of the spontaneously-transformed clones FRST-D and FRST-E were less affected by AzTyr treatment than FRST-(A-C) clones. Although cell killing was observed at the fourth day in AzTyr-treated FRST-D cells clone (56% surviving FRST-D/aza cells, data not shown) and in FRST-E cells clone (30% surviving FRST-E/aza cells, Table I), the surviving cells were neither growth-inhibited nor morphology-changed (Fig. 1f). FRST-D/aza fully kept its ability to grow in semi-solid medium (data not shown). In contrast, FRST-E/aza exhibited a decreased of soft-agar cloning ability along time (p2: 9.2%, p6: 6.1% and p21: 3.8% compared to 16.2% of non-treated FRST-E cells, Table I). Therefore, FRST-E/aza cells were subjected to a second treatment with AzTyr, eight passages after the first one (FRST-E/aza2). Onset of cell killing was earlier than after the first treatment, i.e. occurring from the first day of the second treatment (42% surviving FRST-E/aza2 cells at the end of the treatment, Table I). Under these conditions, cells stopped growing on the second day of treatment, but did not display morphological changes (Fig. 1g). Similarly to FRST-E/aza, in FRST-E/aza2 soft-agar cloning ability decreased during time (p2: 6.4% and p8: 2.4% compared to

16.2% of non-treated FRST-E cells, Table I) suggesting that a few cells had reverted and might emerge with time.

Similar results were obtained with the *ras*-transformed (17) FREJ4 cells (8, 16), when treated with AzTyr, displaying the same behaviour as FRST-E/aza cells (84% surviving FREJ4/aza cells, data not shown). FR3T3 normal cells were not affected by AzTyr treatment (88% surviving cell, data not shown). FREJ4/aza cells, which showed similar decreased ability of cloning in semi-solid medium as FRST-E/aza (Table I), were twicely treated with Azatyrosine as described above (FREJ4/aza2), but the surviving cells (42%, data not shown) did not stop growing, possibly indicating an uncomplete effect of AzTyr or a reversion of only a part of the cells (cf. above). FREJ4/aza2 showed similar results as FRST-E/aza2, i.e. decreasing during time in their ability to grow in semi-solid medium (data not shown).

During further passages after AzTyr treatment, AzTyr-treated FRST-C/aza, -E/aza, -E/aza2 as well as the AzTyr-treated *ras*-transformed FREJ4/aza, FREJ4/aza2 cultures displayed different cell behaviour: they did not acidify the culture medium when growing and were more adherent (more difficult to remove by trypsinisation) than non-treated cells. The doubling time of each type of treated cells was similar to that of the parental cells (data not shown).

Previous studies (13, 14, 16) did not report that AzTyr-induced reversion was accompanied by a pronounced cell killing. Since FR3T3C cells had an abnormal number of chromosomes (72 compared to 42 of FR3T3), we checked whether AzTyr would select for cells with a normal karyotype (42 chromosomes) rather than revert cells. Therefore, the FRST-A, -B, -E clones and their AzTyr-treated derivatives (FRST-A/aza, -B/aza, -E/aza) and FR3T3C/aza cells were analysed for chromosome numbers. All spontaneously-transformed clones had similar chromosome numbers (70-74), as had revertant cultures (66-74) (data not shown). These data proved that (i) AzTyr-treatment has not selected for a normal karyotype among cultures displaying abnormal number of chromosomes, (ii) AzTyr-treatment surviving cells were induced to reversion independent of their karyotypes. Similarly, no variation in chromosome numbers were observed for FREJ4/aza and FREJ4/aza2 cultures.

In order to correlate the changes of morphology and growth properties in culture with other transformation-associated-functions, cells and clones surviving to the AzTyr treatment were studied for their ability to grow in nude mice, and for their sensitivity to infection with MVMp.

Tumorigenicity in Nude mice:

All treated (FR3T3C/aza) or non-treated (FR3T3C) normal cells were not tumorigenic after injection into nude mice, i.e. no tumor could be detected within an observation period of 2 months (Table I). In contrast, all spontaneously-transformed FRST-(A-E) clones as well as *ras*-transformed FREJ4 were highly tumorigenic, i.e. tumors could be detected 3 to 7 days after injection of these cells (Fig. 2).

As expected from previous results (changes in morphology and in growth properties), FRST-A/aza and -B/aza cells were found to be non-tumorigenic (no tumors 2 months after injection, Table I, Fig. 2a, showing the tumorigenicity of FRST-A and -A/aza cells as an example). FRST-C/aza cells, considered as a heterogeneous population partially reverted on morphology and growth properties, were reduced in their tumorigenicity, i.e. showing a delay (of 3 days) of the appearance of tumors and tumors were smaller compared to tumors from non-treated FRST-C cells (Fig. 2b), confirming thus that a part of FRST-C/aza population had been reverted.

FRST-D/aza fully kept its tumorigenicity in nude mice, and thus were not reverted according to this criterion (data not shown). FRST-E/aza and -E/aza2 showed a noticeable delay in tumour appearance (Fig. 2c, tumorigenicity of FRST-E, -E/aza and -E/aza2 cells), in line with our previous results. However, FRST-E/aza, -E/aza2 have to be considered as not-fully reverted, since tumors generated by these cells reached at the end of the experiments the same growth kinetic and size than controls (Fig. 2c, tumorigenicity of FRST-E, -E/aza and -E/aza2 cells).

AzTyr *ras*-transformed cells, FREJ4/aza and FREJ4/aza2 showed similar results as FRST-E/aza and -E/aza2, i.e. exhibited smaller tumors in nude mice without retardation in growth kinetic (data not shown). On this basis, AzTyr-induced reversion of *ras*-transformed culture has to be considered as a failure.

These results demonstrate that AzTyr can revert to normal phenotype spontaneously-transformed rat cultures (independent of its lethal effect). Since sensitivity to MVMP limited to a transformed phenotype of cells, we tested whether sensitivity to MVMP was also a valuable marker to distinguish reverted cells from their transformed parents.

Sensitivity to MVMP and establishment of MVMP resistant cultures:

AzTyr-treated and non-treated cells were assayed (i) for their sensitivity to infection with MVMP at different MOIs (1, 10 or 100 PFU/cell, respectively) and (ii) for their ability to resist subsequent infections with MVMP (MOI=10 plus MOI=100).

As expected, FR3T3C and FR3T3 cells were highly resistant to MVMP, with 95.8% and 65.4% surviving cells, respectively, at MOI=10 (Table I). When treated with AzTyr, these cells did not show any significant change in resistance to the killing effect of MVMP (Table I). FR3T3C and FR3T3 repetitively infected with MVMP (MOI=10 plus MOI=100) gave easily rise to MVMP (MOI=100)-resistant cultures (Table I).

All spontaneously-transformed cells clones derived from FR3T3C were found to be highly sensitive to MVMP infection (0,6 to 25% surviving cell at MOI=10, Table I, Fig.3). Moreover, it was not possible to establish MVMP (MOI=100)-resistant cultures from the non-treated clones FRST-A, -B, -C. In contrast, the reverted FRST-A/aza, -B/aza, -C/aza cells had acquired resistance to MVMP infection and MVMP (MOI=100)-resistant cultures were readily established from these cells. FRST-A/aza and -B/aza cells were found to be reverted to a marked resistance (about 46% surviving FRST-A/aza cells at MOI=10 compared to 0.7% surviving A cells (Table I and Fig.3a) and 57% surviving FRST-B/aza cells at MOI=10 compared to 0.7% surviving B cells (data not shown)). FRST-C/aza were also resistant to MVMP (45.4% surviving cells at MOI=10 compared to 0.6% surviving FRST-C cells, Table I and Fig.3b). FRST-E/aza and -E/aza2 cells were reverted to resistance to MVMP (about 28-37% surviving FRST-E/aza and -E/aza2 cells at MOI=10 instead of 4.1% surviving non-treated FRST-E cells, Table I and Fig.3c) paralleling the decrease in soft-agar colony formation ability compared to non-treated FRST-E cells (Table I). In contrast, the sensitivity to MVMP of FRST-D/aza cells was not changed, as expected from the results with soft-agar cloning and tumorigenicity in nude mice.

In contrast to the experiments with the reverted spontaneously-transformed clones of FR3T3C, AzTyr-treated *ras*-transformed FREJ4/aza and FREJ4/aza2 did not show any significant reversion of sensitivity to MVMP (about 6-10% surviving FREJ4/aza and FREJ4/aza2 cells at MOI=10 compared to 3.8% surviving non-treated FREJ4 cells, Table I). However, it was possible to isolate 3 MVMP (MOI=10)-resistant clones from FREJ4/aza cells whereas no MVMP (MOI=10)-resistant culture was obtained from FREJ4 cells. From FREJ4/aza2 a thousand (MOI=10)-resistant clones grew out, but it was not possible to obtain long-term viable (MOI=100)-resistant culture.

2-Dimensional gels on cellular protein analysis:

In order to attempt to link the reversion phenomenon to changes in expression of specific cellular proteins in spontaneously-transformed cells clones we analysed 2-dimensional protein profiles. Preliminary results of differential analysis of 2-dimensional proteins patterns indicate that, among many discrete changes in expression levels, two proteins "disappeared" after AzTyr treatment. These 39kDa, pHi 5.5 and 5.8 proteins which are present in all spontaneously-transformed clones (Fig. 4c, 4e) were detected in a lesser amount in FRST-C/aza (Fig.4f) and -E/aza, -E/aza2 (data not shown) and seemed to be unchanged in -D/aza cultures (data not shown), whereas they were absent in FR3T3C (Fig.4a) and FR3T3C/aza cells (Fig.4b) and not detectable in the AzTyr-treated FRST-A/aza (Fig.4d) and -B/aza cultures (data not shown).

DISCUSSION

We analysed the influence of AzTyr treatment on normal rat cells and on spontaneously-transformed derivatives therefrom, with respect to different transformation criteria and resistance to the parvovirus MVMP. AzTyr treatment induced a more or less pronounced reversion to normal of the cellular phenotype which, in some instances, included loss of tumorigenicity of reverted cells in nude mice. The capacity of AzTyr-treated cell cultures to grow in semi-solid medium was reduced and this was paralleled by an increase of resistance of reverted cells to the killing effect of MVMP infection. Hence, AzaTyr-reverted cells were found to be able to resume, at least partially, "parental" (i.e. non-transformed) features, concerning phenotypic and growth characteristics as well as resistance to parvovirus infection. In addition, MVMP repetitive infection (*MOI=10 plus MOI=100*) of AzaTyr-treated (spontaneously) transformed rat cells gave rise to persistently infected cells, as has been observed in FR3T3C (parental) cells (#). Hence, in the rat cells system analysed in this work, gains of resistance to MVMP infection proved to be a valuable marker of phenotypic reversion of transformed cells including the capacity to sustain replication of persisting MVMP DNA (#).

Two out of the five transformed cell clones (FRST-A, -B), spontaneously emerged from FR3T3C cells, could be completely reverted to an apparently untransformed phenotype by AzaTyr treatment (FRST-A/aza, -B/aza) according to morphology, growth characteristics (in semi-solid medium and animals) and enhanced resistance to MVMP infection. Since AzTyr treatment killed more than 99% of these cell clones, we cannot exclude that AzTyr had selected for spontaneous revertants in the cultures. However, this seems to be unlikely in view of the results obtained with FRST-C/aza cultures which were less affected by the AzaTyr toxicity (survival = 27%) than FRST-A/aza, -B/aza reverted cultures, and gave rise to cell populations exhibiting a less complete reversion, i.e., a reduced but not completely abolished ability to grow in soft-agar and a reduced tumorigenicity in nude mice. The delay in the appearance of tumors (accompanied by significant smaller tumor size) of FRST-C/aza cells compared with non-treated cells may indicate that a few non-reverted cells present in the culture were able to grow *in vivo* and gave eventually rise to tumour formation in nude mice.

It is noteworthy that previous studies on cell reversion by AzTyr concerned only clones of treated (and reverted) cells and not a cell population (13, 14). Hence, the published data do not exclude that in cell populations, some cells may escape reversion by AzaTyr. This is further stressed by our results obtained with E/aza, which are not reverted by AzTyr. However, FRST-E/aza cells showed an evolution towards reversion when treated twice with AzTyr (FRST-E/aza²), as evident by a decreasing ability to grow in soft-agar and an increasing resistance to MVMP infection during passages. Similar results were obtained with the *ras*-transformed (19) FR3T3 cells FREJ4 cells (8, 9, 10), when these cells were treated once or twice with AzTyr (FREJ4/aza, FREJ4/aza²), i.e. they displayed the same behaviour as FRST-E/aza and -E/aza² cells. This suggests that, in a mixed population, reverted cells may emerge under certain conditions. It is interesting to note in addition to *ras*-transformed cells as reported in the literature (13, 14, 15, 16) also spontaneously-transformed could be reverted by AzTyr, suggesting that AzTyr-mediated phenotype-reversion is not restricted to interaction with mutated *ras* oncogene or *ras*-dependant pathways (25, 26).

Koering, C.E., et al. Characterization of a normal variant of Fisher Rat Fibroblasts (FR3T3) constitutively producing Minute Virus of Mice without cell lysis. *in preparation*

This work strengthens the correlated sensitivity to MVMp with the transformation of FR3T3 cells (8, 9) by showing the loss of both phenotypes in revertant cells. Recent studies concerning the cytotoxic effects of parvoviruses on transformed cells identified the non-structural NS-1 protein encoded by these viruses as essential for the killing effect in association with transformation-associated cellular factors (1, 2, 4, 5, 24). Expression of NS proteins may not be toxic by itself for normal cells (1, 2, 3, 5). Two reports (27, 28) have correlated the sensitization of transformed cells to parvovirus infection with differences between normal and transformed cells in their protein content. Preliminary data, obtained from two-dimensional polyacrylamide gel electrophoreses of protein extracts from both AzaTyr-treated and non treated FR3T3C and FRST-(A-E) cells, revealed two 39KDa major polypeptides (pI: 5.5 and 5.8 respectively) to be present in FRST-(A-E) spontaneously transformed clones but not in the parental normal (FR3T3C cells). These proteins were absent in cells treated with AzaTyr (A/aza and B/aza cells) or detected to a much smaller extent (FRST-C/aza, -E/aza cells). We are currently investigating whether these proteins are related to transformation and/or modulated by AzTyr treatment and/or are factors involved in sensitivity to the killing effect of parvoviral NS proteins for transformed cells.

In conclusion, this study describes for the first time that the antibiotic Azatyrosine induces spontaneously-transformed rat cells to revert to a normal phenotype, generalizing this way the normalizing action of this antibiotic. In addition, the results of this work confirm that sensitivity to MVMp appears to be a valuable marker to distinguish transformed from normal cells which holds true for transformed cells reverted to a normal phenotype.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank S. Nishimura (Japon) for the gift of Azatyrosine. We are greatly indebted to Dr. A-M Granier and I. Lestoille (Centre Oscar Lambret, Lille), F. Gross, N. Provost, P. Marquillies and D. Guittard for technical assistance and to J.M. Vanacker for stimulating and helpful discussions. We are grateful to Y. de Launoit, V. Laudet for critical reading of the manuscript.

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Recherche Médicale and by fellowships from the Institut Pasteur de Lille and the Fondation des Treilles (to C.E.K.).

Cells & clones	% surviving to AzTyr (s)	% clonogenicity in Soft-agar (c)	Tumorigenicity in nude mice	% surviving to MVMp MOI 10
FR3T3C		0,04	-	95,8
FR3T3C/aza	91	0,04	-	95,6
FRST-A		18,9	+	0,7
FRST-A/aza	0,03 (41 cells)	0,37	-	45,6
FRST-C		26,2	+	0,6
FRST-C/aza	27	7,1	+/- (t)	45,4
FRST-E		16,2	+	4,1
FRST-E/aza	30	p2: 9,2 (p) p6: 6,1 p21: 3,8	+	28,2 34,4
FRST-E/aza2	42	p2: 6,4 p8: 2,4	+	36,1 37,1

TABLE I Summary of the results of AzTyr-treatment of cells

% Surviving to AzTyr : (s): % surviving = (surviving cells /total cell number (dead and living cells))/100 for A/aza, % surviving = (number of survival clones/10⁴)/100

% Clonogenicity in Soft-agar : average of 3 independant quadruplicate experiments. (c): % clonogenicity = average of (number of colonies x10³/100) and (number of colonies x10⁵ cells/100). (p): passage after AzTyr treatment

Tumorigenicity in Nude mice : 5 nude mice per cell type. (t): see figure 3b: growth retardation

% Surviving to MVMp : average of 3 independant quadruplicate experiments. % survival to MVMp (surviving infected cells/ surviving mock-infected cells)/100. (p): passage after AzTyr treatment

LEGENDS to FIGURES

Figure 1: Light microscopy analysis of the morphological changes of AzTyr- and non-treated cells

1a: FRST-A, **1b:** FRST-A/aza

FRST-B and FRST-B/aza are not shown but behave as FRST-A and FRST-A/aza respectively

1c: FRST-C, **1d:** FRST-C/aza

1e: FRST-E, **1f:** FRST-E/aza, **1g:** FRST-E/aza2 (FRST-D and FRST-D/aza, FREJ4, FREJ4/aza and FREJ4/aza2 are not shown but behave as FRST-E, FRST-E/aza and FRST-E/aza2, respectively)

1h: FR3T3C parental cell

Figure 2: Tumour growth of AzTyr-treated and non-treated transformed cells in nude mice

2a: FRST-A, FRST-A/aza (FRST-B and FRST-B/aza are not shown but behave as FRST-A and FRST-A/aza respectively)

2b: FRST-C, FRST-C/aza

2c: FRST-E, FRST-E/aza, FRST-E/aza2 (FRST-D and FRST-D/aza, FREJ4, FREJ4/aza and FREJ4/aza2 are not shown but behave as FRST-E, FRST-E/aza and FRST-E/aza2, respectively)

Figure 3: Surviving to MVMp infection (MOI=10) of AzTyr-treated and non-treated transformed cells.

3a: FRST-A, FRST-A/aza (FRST-B and FRST-B/aza are not shown but behave as FRST-A and FRST-A/aza respectively)

3b: FRST-C, FRST-C/aza

3c: FRST-E, FRST-E/aza, FRST-E/aza2 (FRST-D and FRST-D/aza, FREJ4, FREJ4/aza and FREJ4/aza2 are not shown but behave as FRST-E, FRST-E/aza and FRST-E/aza2, respectively)

Figure 4: 2D-protein analysis of AzTyr-treated and non-treated normal and transformed cells.

4a: FR3T3C, **4b:** FR3T3C/aza

4c: FRST-A, **4d:** FRST-A/aza (FRST-B and FRST-B/aza are not shown but behave as FRST-A and FRST-A/aza respectively)

4e: FRST-C, **4f:** FRST-C/aza

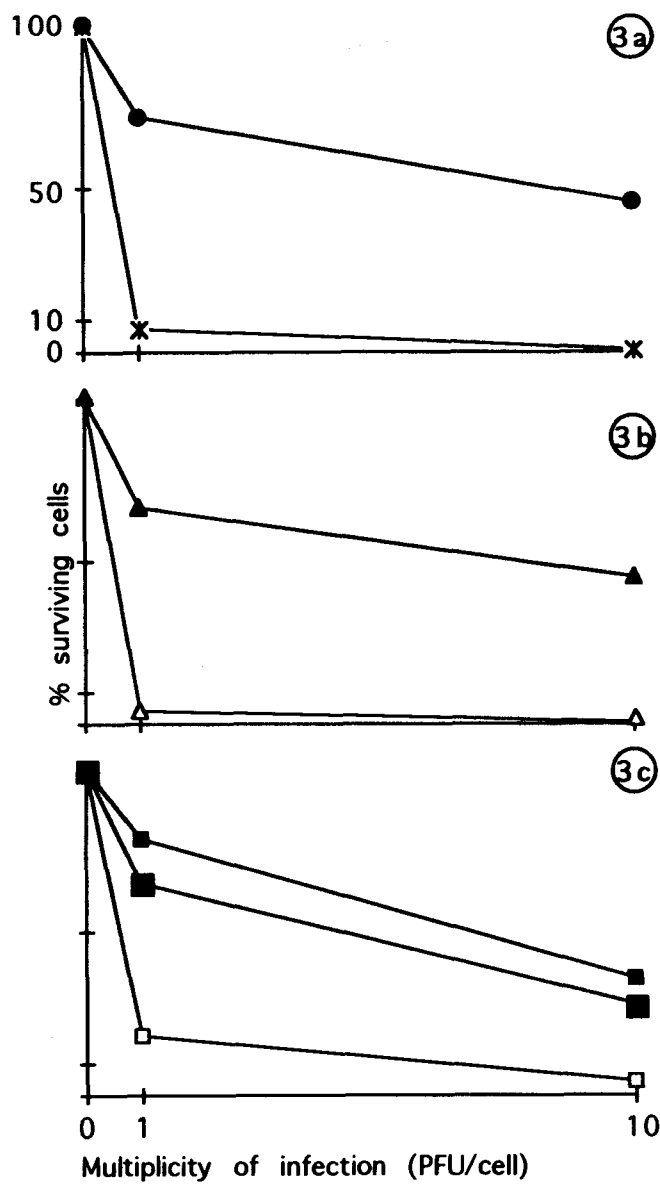


Fig. 3: RESISTANCE to MVMp INFECTION

x A ● A/aza Δ C ▲ C/aza

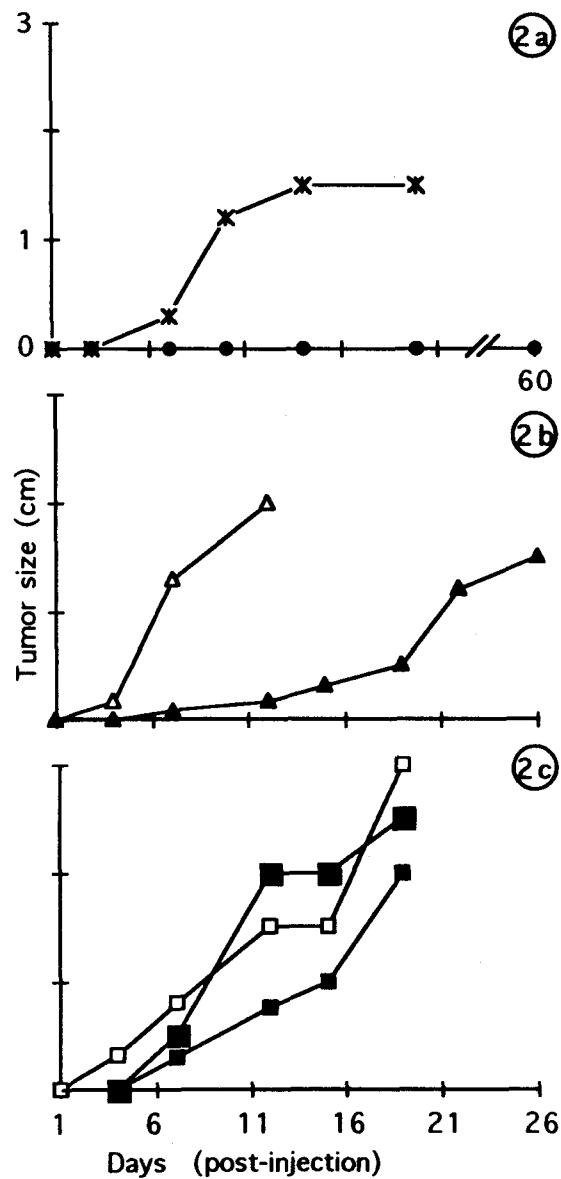


Fig. 2: TUMORIGENICITY in NUDE MICE

□ E ■ E/aza ■ E/aza2

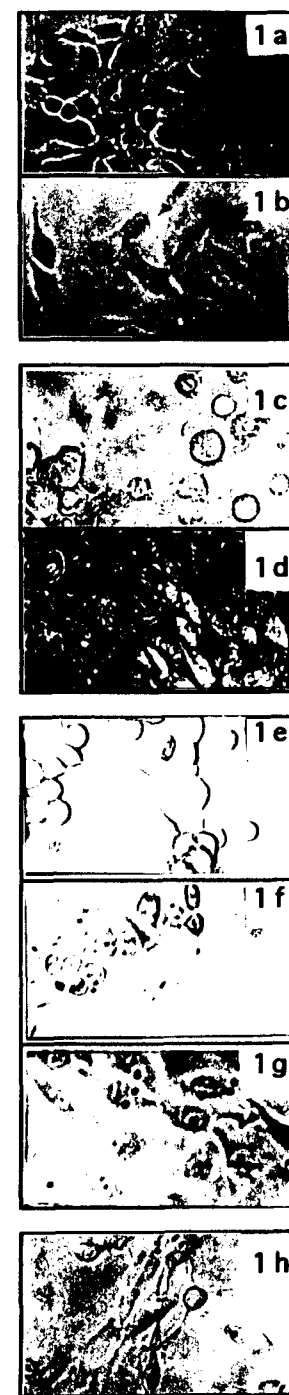


Fig. 1: CELL MORPHOLOGY

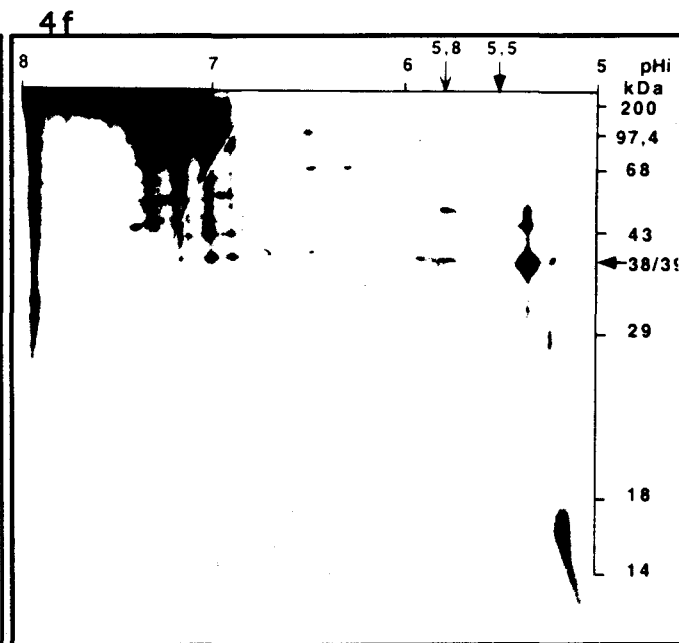
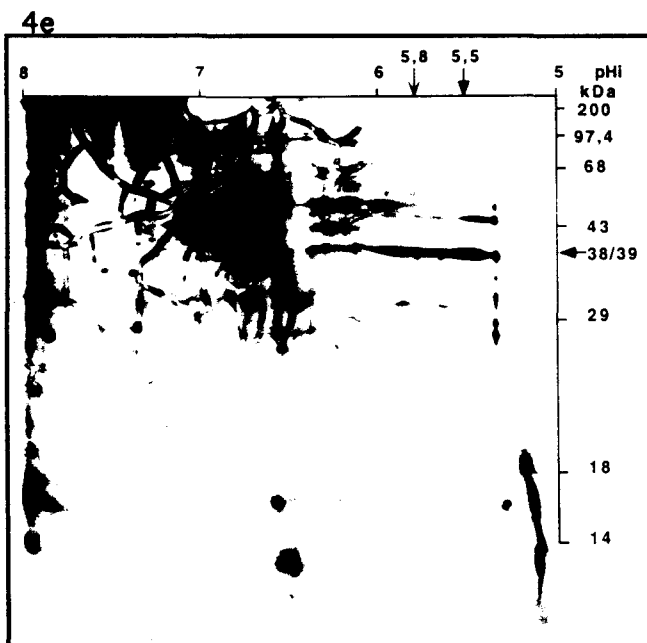
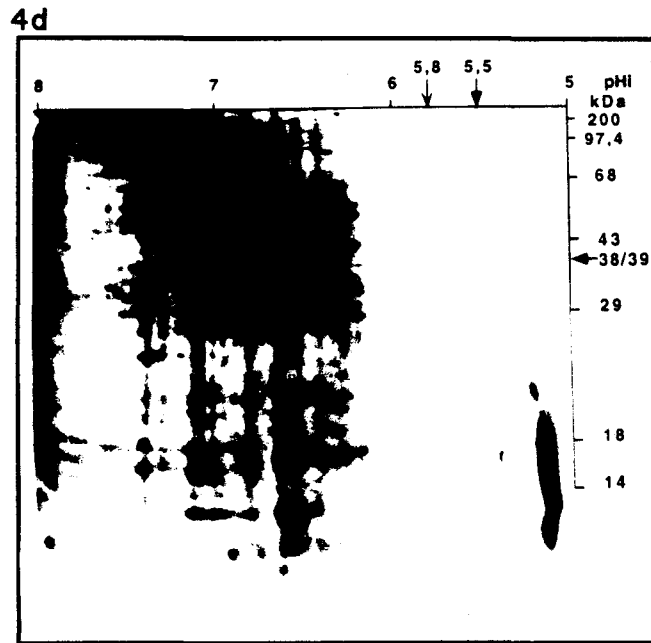
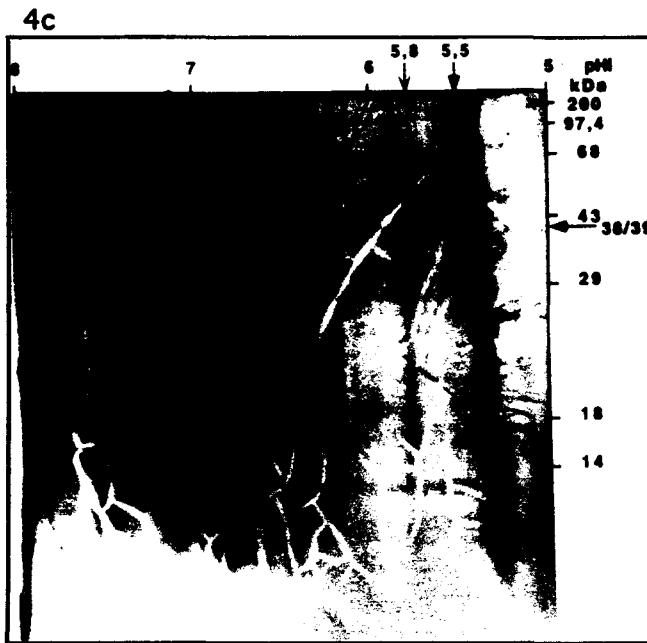
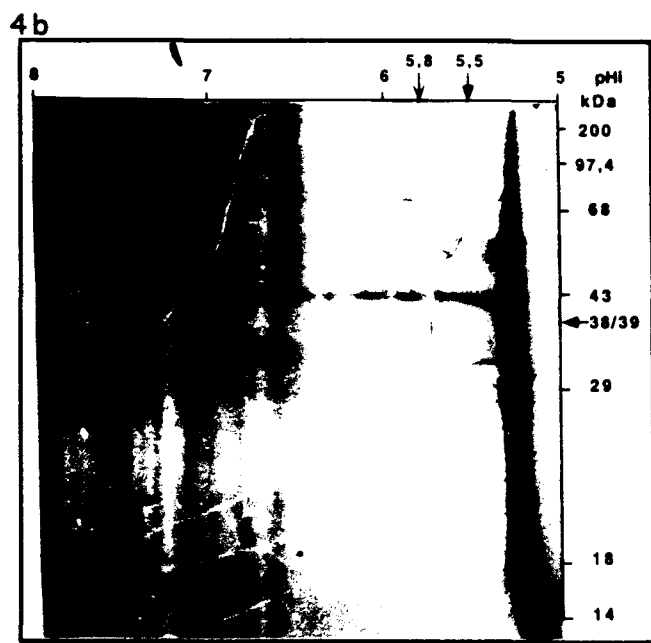
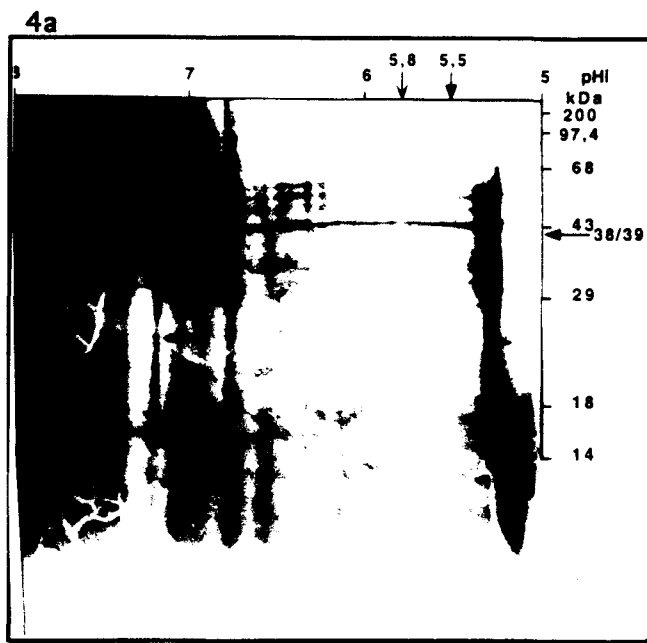


Fig. 4 : 2D-PROTEIN ANALYSIS of AZTYR-TREATED and NON-TREATED NORMAL and TRANSFORMED CELLS.

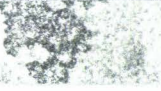

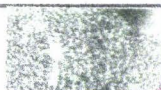




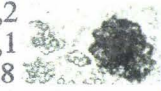

REFERENCES

1. **Cornelis, J.J., Spruyt, N., Spegelaere, P., Guetta, E., Darawshi, T., Cotmore, S.F., Tal, J., and Rommelaere, J.** Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by the parvovirus Minute Virus of Mice correlates with an increase in viral gene expression. *J. Virol.*, 62: 3438-3444, 1988.
2. **Cornelis, J.J., Chen, Y.Q., Spruyt, N., Duponchel, N., Cotmore, S.F., Tattersall, P., and Rommelaere, J.** 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, 1990.
3. **Caillet-Fauquet, P., Perros, M., Brandenburger, A., Spegelaere, P., and Rommelaere, J.** Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J.*, 9: 2989-2995, 1990.
4. **Rommelaere, J., and Cornelis, J.J.** Antineoplastic activity of parvoviruses. *J. of Virol. Methods*, 33: 233-251, 1991.
5. **Cornelis, J.J., Becquart, P., Duponchel, N., Salomé, N., Avalosse, B.L., Namba, N., and Rommelaere, J.** Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen or SV40 correlates with an increase in susceptibility to the parvoviruses H-1 virus and Minute Virus of Mice. *J. Virol.*, 62: 1679-1686, 1988.
6. **Mousset, S., and Rommelaere, J.** Minute Virus of Mice inhibits cell transformation by Simian Virus 40. *Nature*, 300: 537-539, 1982.
7. **Mousset, S., Cornelis, J.J., Spruyt, N., and Rommelaere, J.** 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: 951-956, 1986.
8. **Van Hille, B., Duponchel, N., Salome, N., Spruyt, N., Cotmore, S.F., Tattersall, P., Cornelis, J.J., and Rommelaere, J.** Limitations to the expression of parvoviral non-structural proteins may determine the extent of sensitization of EJ-*ras*-transformed rat cells to Minute Virus of Mice. *Virology*, 171: 89-97, 1989.
9. **Salome, N., Van Hille, B., Duponchel, N., Meneguzzi, G., Cuzin, F., Rommelaere, J., and Cornelis, J.J.** Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMP is restricted to specific oncogenes. *Oncogene*, 5: 123-130, 1990.
10. **Spegelaere, P., Van Hille, B., Spruyt, N., Faisst, S., Cornelis, J.J., and Rommelaere, J.** Initiation of transcription from the Minute Virus of Mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a c-Ha-*ras* oncogene. *J. Virol.*, 65: 4919-4928, 1991.
11. **Pincus, M.R., Chung, D., Brandt-Rauf, P., Weinstein, I.B., Yamaizumi, Z., and Nishimura, S.** Pathways for activation of the *ras*-oncogene-encoded p21 protein. *An. Clin. Lab. Sci.*, 22: 323-342, 1992.

12. **Inouye, S., Shomura, T., Tsuruoka, T. et al.** L- β -(5-hydroxy-2-pyridyl)-alanine and L- β -(5-hydroxyureido)-alanine from *Streptomyces*. *Chem. Pharm. Bull.*, 23: 2669-2677, 1975.
13. **Shindo-Okada, N., Makabe, O., Nagahara, H. and Nishimura, S.** Permanent conversion of mouse and human cells transformed by activated *ras* or *raf* genes to apparently normal cells by treatment with the antibiotic azatyrosine. *Molecular Carcinogenesis*, 2: 159-167, 1989.
14. **Kyprianou, N., and Taylor-Papadimitriou, J.** Isolation of azatyrosine-induced revertants from *ras*-transformed human mammary epithelial cells. *Oncogene*, 7: 57-63, 1992.
15. **Izawa M., Takayama S., Shindo-Okada, N., Doi S., Kimura M., Katsuki M. and Nishimura, S.** Inhibition of chemical carcinogenesis in vivo by treatment with the antibiotic azatyrosine. *Cancer res.*, 52: 1628-1630, 1992.
16. **Krzyzosiak, W.J., Shindo-Okada, N., Teshima, H., Nakajima, K. and Nishimura, S.** Isolation of genes specifically expressed in flat revertant cells derived from activated *ras*-transformed NIH3T3 cells on treatment with azatyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4879-4883, 1992.
17. **Vaithiling, G.D., et al.** Standard karyotype of Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Cytogenet.* 12: 199-205, 1973.
18. **Yosida, T.H.** Evolution of karyotypes and differentiation in 13 *Rattus* species. *Chromosoma*. 40: 285-297, 1973.
19. **Tabin, C.J., Bradley, S.M., Bargmann, C.I., and Weinberg, R.A., Papageorge, A.G., and Scolnick, E.M., Dhar, R., Lowy, D.R., and Chang, E.H.** Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature*, 300: 143-149, 1982.
20. **Dutrillaux, B., and Couturier, J.** Technique de laboratoire, pratique de l'analyse chromosomique. Ed. Masson, p. 40-45, 1981.
21. **Tattersall, P., Cawte, P.J., Shatkin, A.J., and Ward, D.C.** Three structural polypeptides coded for by minute parvovirus of mice, a parvovirus. *J. Virol.*, 20: 273-289, 1976.
22. **Faißt, S., Schlehofer, J.R., and Zur Hausen, H.** Transformation of human cells by oncogenic viruses supports permissiveness for H-1 propagation. *J. Virol.*, 63: 2152-2158, 1989.
23. **Garell, J.I.** *J. Biol. Chem.*, 254: 7961-7977, 1979.
24. **Legendre, D., and Rommelaere, J.** Terminal regions of the NS-1 protein of parvovirus MVMp are involved in cytotoxicity and promoter trans-inhibition. *J. Virol.* 166: 5705-5713, 1992.
25. **Barrett, C.B., Schroetke, R.M., Van der Hoorn, F.A., Nordeen, S.K., and Maller, J.L.** (1990) Ha-*ras*^{Val12, Thr59} activates S6 kinase and p34^{cdc2} kinase in *Xenopus* Oocyte: Evidence for c-mos^{xe}-dependant and independant pathways. *Mol. Cel. Biol.* 10 : 310-315.

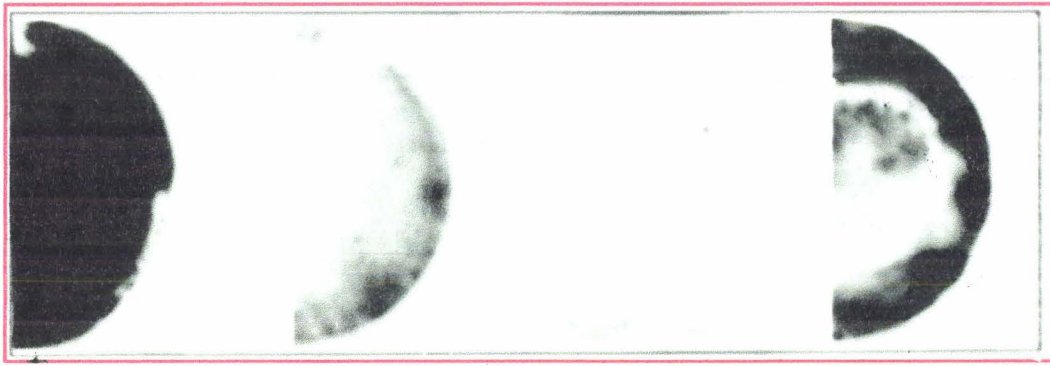
- 26 **Campa, M.J., Glickman, J.F., Yamamoto, K., and Chang, K.J.** (1992). The antibiotic azatyrosine suppresses progesterone or (Val 12)p21 Ha-ras/insuline-like growth factor I-induced germinal vesicle breakdown and tyrosine phosphorylation of *Xenopus* mitogen-activated protein kinase in oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** : 7654-7658.
27. **Barrijal, S., Perros, M., Gu, Z., Avalosse, B., Belenguer, P., Amalric, F., and Rommelaere, J.** Nucleolin forms a specific complex with a fragment of the viral (minus) strand of Minute Virus of Mice DNA. *Nucleic Acids Res.*, *20*: 5053-5060, 1992.
28. **Telerman, A., Tuynder, M., Dupressoir, T., Robaye, B., Sigaux, F., Shaulian, E., Oren, M., Rommelaere, J., and Amson, R.** A model for tumor suppression using H-1 parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *90*: 8702-8706, 1993.

Tableau 11: Résultats complets: systèmes FR3T3C/FRST- et FR3T3/FREJ4.

Cellules & Clones	Caryotypes	% survie AzTyr (s)	Morphologie	% clonogénicité en Soft-agar (c) / photo des colonies dans l'agar	Tumorigéni. en souris nude	% survie à MVMp moi10(moi1)	cultures résistantes	cultures avec ADN MVMp(m)
FR3T3C	72		Géante Plate Adherente	0,04	-	95,8 moi100: 87	+	100
FR3T3C/aza	72	91	Géante Plate Adherente	0,04	-	95,6	+	100
FRST-A	74		Petite Ronde non-adher.	18,9 	+	0,7 (6,7)	-	-
FRST-A/aza	74	0,03 (41)	Géante Plate Adherente	0,37	-	45,6 (71,5)	+	34
FRST-B	72		Petite Ronde non-adher.	73,8 	+	0,7 (4,3)	-	-
FRST-B/aza	72	0,05 (70)	Géante Plate Adherente	0,6	-	56,7 (90,3)	+	6
FRST-C	69		Petite Ronde non-adher.	26,2 	+	0,6 (3,9)	-	-
FRST-C/aza	nd	27	Géante hétérogène adhérente	7,1 	+/- (t)	45,4 (66,7)	+	47
FRST-D	70		Petite Ronde non-adher.	25,5 	+	5,9 (17,0)	nd	nd
FRST-D/aza	nd	56	Petite Ronde non-adher.	32,0 	+	9,2 (26,4)	nd	nd
FRST-E	70		Petite Ronde non-adher.	16,2 	+	4,1 (18,6)	nd	nd
FRST-E/aza	66	30	Small Round non-adher.	p2: 9,2 p6: 6,1 p21: 3,8 	+	28,2 (65,3) 34,4 (67,2)	nd	nd
FRST-E/aza2	72	42	Petite Ronde non-adher.	p2: 6,4 p8: 2,4 	+	36,1 (78,2) 37,1 (65,2)	nd	nd
FR3T3	42		Géante Plate Adherente	2,5	-	65,4 (94,7)	+	0
FR3T3/aza	42	77	Géante Plate Adherente	2,8	-	70,2 (79,5)	+	0
FREJ4	42		Petite Ronde non-adher.	33,7	+	3,8 (13,8)	-	0
FREJ4/aza	42	84	Petite Ronde non-adher.	p10: 26,3 p13: 19,0 p20: 17,0	+	3,2 (7,8) 5,9 (15,8)	-	0
FREJ4/aza2	nd	62	Petite Ronde non-adher.	10,6,	+	10,4 (16,4)	-	0

(s): survivantes/nombre total traitées; pour FRST-A/aza, -B/aza: % survie = (nombre de clones survivants/10⁴)/100. - (c): % clonogénicité=moyenne (nombre de colonies/10³, /10⁵) - p: passage. - (t): cf. fig. 2 article: retard de croissance des tumeurs. - % survie à MVMp=(infectées survivantes/non-infectées survivantes)/100 - (m): cpm standardisés en fonction du nombre de cellules et étalonnés par rapport à FR3T3C

A. Réplique sur nylon des cellules R100FRST-/aza



R100FR3T3C

R100FRST-A/aza

R100FRST-B/aza

R100FRST-C/aza

Dosage de l'ADN viral présent dans les cellules (réplique sur boîte)

100	34	6	47	%
-----	----	---	----	---

Dosage de la quantité de virus infectieux produite (plaque assay modifiée sur cellules A9)

100	1,8	0	1,8	%
-----	-----	---	-----	---

B. Détection des formes répliquatives de MVMp dans les cellules R100FRST-/aza (Hirt).

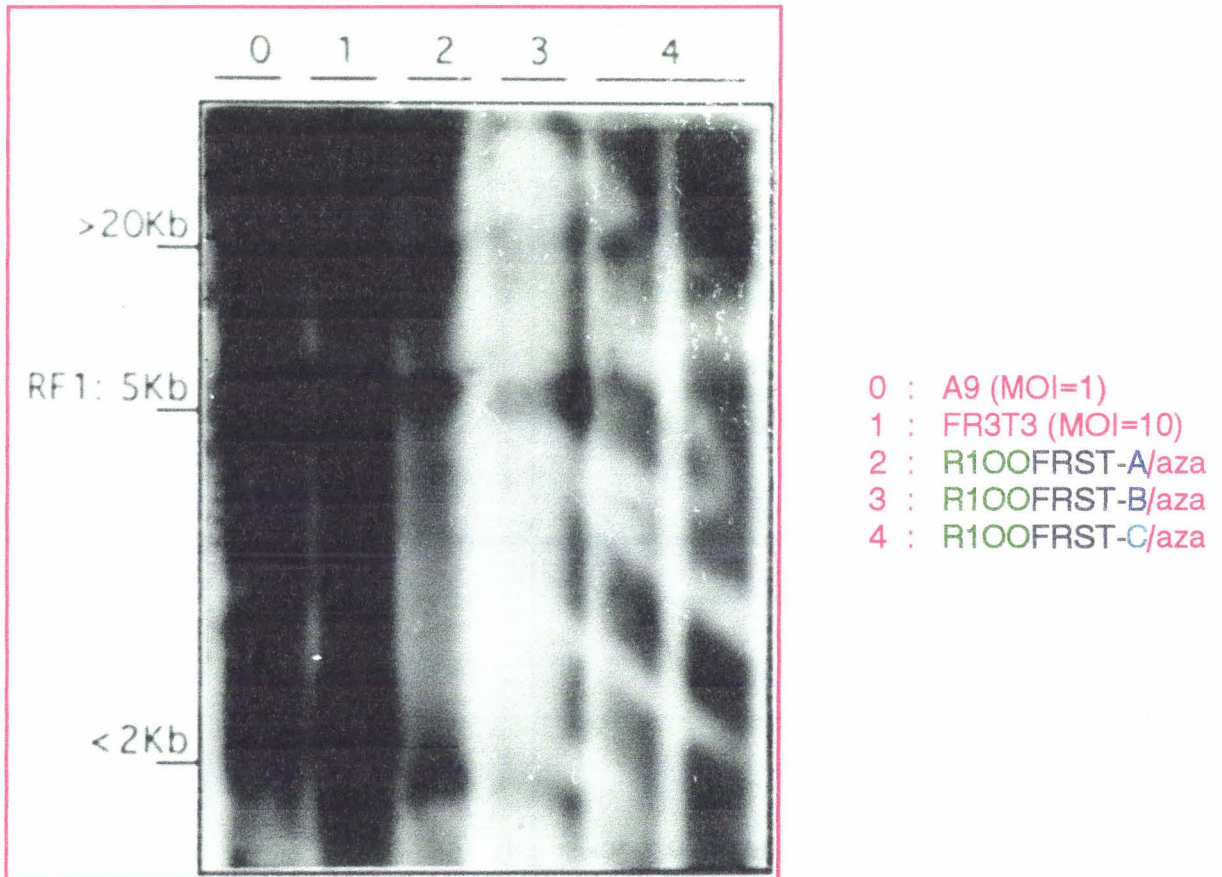


Figure 20: Détection de l'ADN de MVM dans les cellules révertées infectées par MVMp.

3. Résultats annexes.

Résultats complets: systèmes FR3T3C/FRST et FR3T3/FREJ4

Compléments au Tableau I de l'article III

Nous présentons ici les résultats obtenus sur les 5 clones spontanément transformés dérivés des cellules FR3T3C (FRST-), ainsi que ceux concernant le système FR3T3/FREJ4, notre "témoin" face aux travaux de Nishimura et coll. (cf. Tableau 11). Rappelons que les cellules FR3T3C et FRST- possèdent des propriétés particulières vis à vis du Parvovirus MVMP (cf. article II, p.70), tandis que les cellules FR3T3 et FREJ4 ont des caractéristiques standards.

Propriétés vis à vis de MVMP des cellules FRST-/aza:

Transformants spontanés des cellules FR3T3C résistantes, permissives et productrices (cf. article II, p. 70), les cellules FRST- ont perdu les caractéristiques de la cellule parentale. Les résultats décrits dans l'article III, concernant les révertants (FRST-/aza), ne font état que de la récupération de la résistance à MVMP consécutive au traitement par l'AzTyr, alors que les propriétés essentielles de la cellule FR3T3C sont sa capacité à garder l'ADN viral persistant et à produire du virus infectieux. Il était donc nécessaire de vérifier si les cellules révertées (FRST-/aza) étaient, elles aussi, capables ou non de produire constitutivement MVMP.

Les infections répétitives (MOI=10 puis MOI=100) des cellules FRST-/aza ont permis d'obtenir des populations résistantes (R100FRST-A/aza, -B /aza, C/aza), alors qu'aucun clone résistant n'a pu être isolé des cellules FRST- non-traitées par l'AzTyr. L'analyse des cellules R100 a montré que, dans tous les cas, l'ADN viral était persistant ("plaque assay" modifié) et répliqué (Hirt) dans ces cellules (Figure 20). Par contre, aucune production non-lytique (testée en utilisant le surnageant de ces cultures pour infecter des cellules indicatrices A9) n'a pu être mise en évidence. Malgré ces résultats négatifs, la production de virus infectieux dans ces cellules reste possible. En effet, seule une expérience de "plaque assay" (lysats cellulaires servant à infecter les cellules A9) permettrait de conclure sur leur faculté ou non à produire MVMP.

D'autres systèmes cellulaires...

Nos résultats sur les transformants spontanés traités par l'AzTyr (FRST-/aza, cf. Tableau 11), laissent supposer une action de l'AzTyr indépendante de la transformation par le produit de l'oncogène *ras*. Nous avons donc testé l'effet de l'AzTyr sur d'autres cellules, dont le choix était motivé dans un but précis, à savoir "normaliser" leur sensibilité au Parvovirus sans modifier leur permissivité. Hypothèse concevable, puisque dans les cellules FRST-/aza, l'AzTyr rétablissait non seulement la résistance à l'infection par MVMP, mais aussi l'aptitude de ces cellules à garder l'ADN parvoviral persistant et à le répliquer.

D'abord, nous avons traité les cellules A9 (variant de cellule L de souris) qui nous servent à produire MVMP, et qui sont extrêmement sensibles (cf. article II). Le traitement par l'AzTyr a tué près de 24% des cellules, sans qu'aucune modification morphologique ne puisse être observée sur la population survivante (A9/aza). Toutefois, nous avons remarqué une différence de comportement en culture

Tableau 12: Traitement AzTyr: systèmes souris (A9) et humain (NBE).

Cellules	Caryo types	% survie à l'AzTyr (s)	Morphologie	% clonogénicité en Soft-agar (c)	Tumorigénicité en souris SCID	% survie au parvovirus
A9	48		Petite Ronde non-adherente	43,3	-	0 moi10 0,47 (moi1) MVMp
A9/aza	52	76	Petite Ronde adherente	33,2	-	2,84 moi10 9,28 (moi1)
NBE	nd		Grande Ronde non-adherente	18,3	-	48,1 moi1 66,2 (moi0,1) H-1
NBE/aza	nd	78	Grande Ronde adherente	9,7	nd	49,1 moi1 86,6 (moi0,1)

(s): survivantes/nombre total traitées

(c): % clonogénicité=moyenne (nombre de colonies/10³, /10⁵)

% survie=(infectées survivantes/non-infectées survivantes)/100

semblable à celle déjà observée avec les FRST-C/aza, -E/aza, c'est à dire des cellules adhérant d'avantage au substrat et n'acidifiant plus le milieu de culture. Nos expériences ont ensuite montré que la culture de cellules A9/aza avait perdu en partie sa faculté à pousser en milieu semi-solide (x1,3) mais sa résistance à MVMP avait augmenté (x19,8 à MOI=1) (cf. Tableau 12). La capacité à amplifier l'ADN était sensiblement identique à celle des cellules non-traitées (x1,9 à MOI=1, x1,5 à MOI=10). Nos investigations se sont terminées là, puisque les cellules A9 étaient non-tumorigènes en souris SCID (Severe Combined Immuno Deficiency) et, il n'a donc pas été possible de compléter notre étude.

Ensuite, nous avons traité les cellules NBE (New Born human Embryonic kidney, transformées par papovavirus SV40 et le produisant) qui nous servent à produire le Parvovirus H-1. Les résultats furent semblables à ceux obtenus avec les cellules A9/aza: mortalité: 22,1%, morphologie inchangée de la population survivante (NBE/aza), comportement en culture modifié, baisse de la capacité à cloner en agar mou (x1,9) et augmentation de la résistance à H-1 (x1,3) (cf. Tableau 12).

Même si, statistiquement, les taux de réduction de clonabilité et d'augmentation de résistance sont non-significatifs, ces résultats restent en accord avec ceux obtenus sur FRST-C/aza ou FRST-E/aza, -E/aza². Dans leur ensemble, ces résultats montrent aussi que la baisse de clonabilité en agar mou s'accompagne toujours d'une acquisition de résistance au Parvovirus et que l'AzTyr agirait indifféremment du mode de transformation. Ils montrent encore que si l'AzTyr ne réverte pas toujours le phénotype transformé de toutes les cellules d'une population, que les cellules dont le phénotype est réverté sont susceptibles d'émerger au cours du temps, voire de devenir majoritaires.

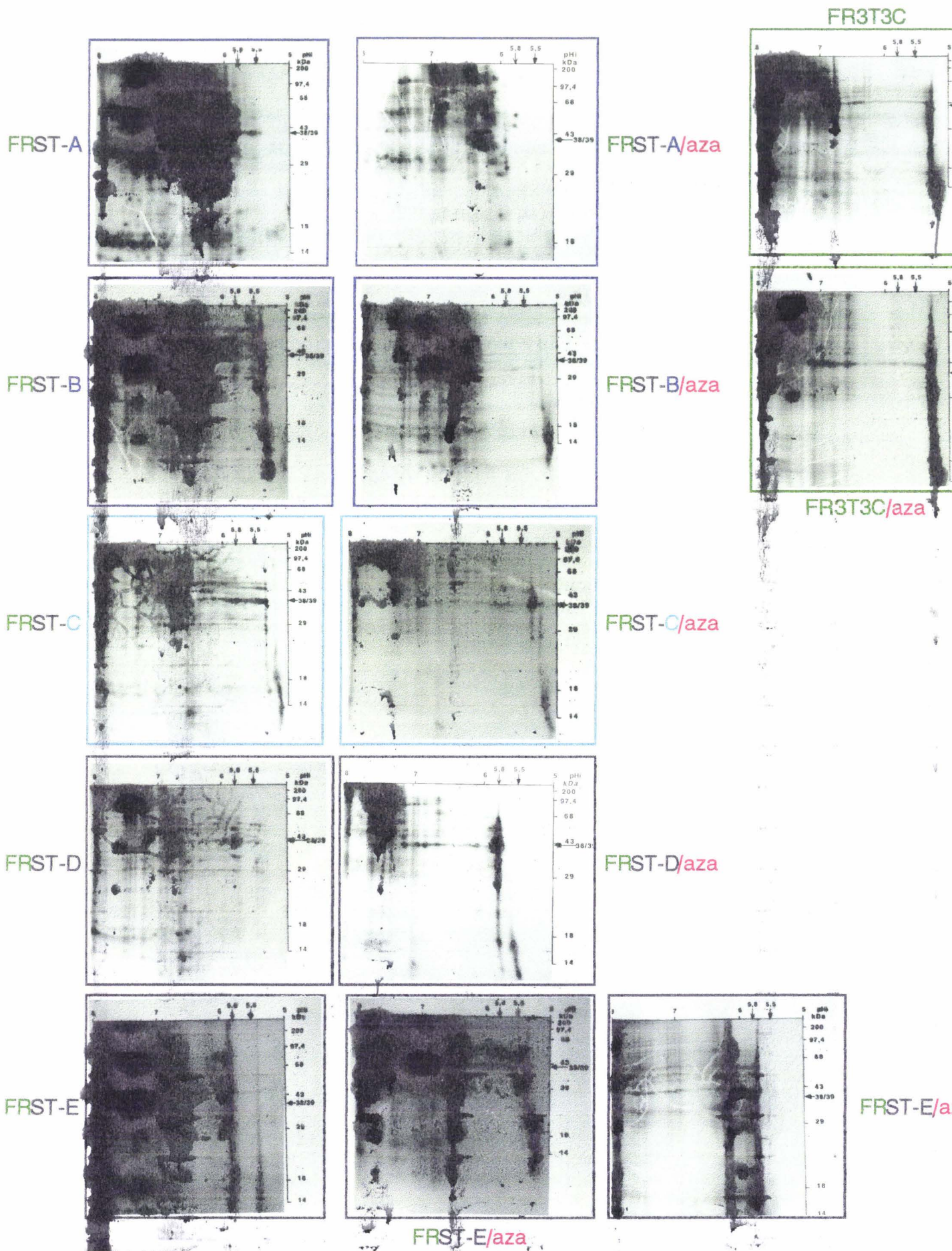


Figure 21: Analyse protéique bidimensionnelle.

4. Discussion.

L'intérêt essentiel de l'Azatyrosine est sa capacité à bloquer un ou plusieurs effecteurs dans la voie de transmission du signal mitogène, en aval des protéines Ras/Raf. En effet, l'équipe de Nishimura (Shindo-Okada et al., 1989; Fujita-Yoshigaki et al., 1992; Krzyzosiak et al., 1992) et ses collaborateurs (Chung et al. 1991; Campa et al., 1991, 1992; Picnus et al., 1992) ont cherché, grâce à cet antibiotique, à identifier les chaînons manquants de la voie de transmission du signal mitogène passant par Ras/Raf, et aussi à en découvrir d'éventuels antagonistes. L'essentiel des résultats a été apporté par l'étude du système de Xénope, où l'AzTyr bloque la maturation de l'oocyte induite par différents agents (Chung et al. 1991; Campa et al., 1992; Picnus et al., 1992). Les derniers résultats (Dent et al., 1993) désignent les MAPK comme cibles de l'AzTyr (Fig. 9) expliquant ainsi la possibilité de la "réversion" des "transformants *ras* ou *raf*" - accompagnée d'un taux inchangé de protéine transformante - mais aussi l'échec de la "réversion" des "transformants *src*". Cependant, les travaux de Campa et al. (1992) sur l'oocyte de Xénope montrent que l'AzTyr bloque aussi la transmission de signaux indépendante de la voie Ras/Raf, et que donc elle possède des cibles plus en aval, dont notamment le produit du gène *mos* (Barrett et al., 1990).

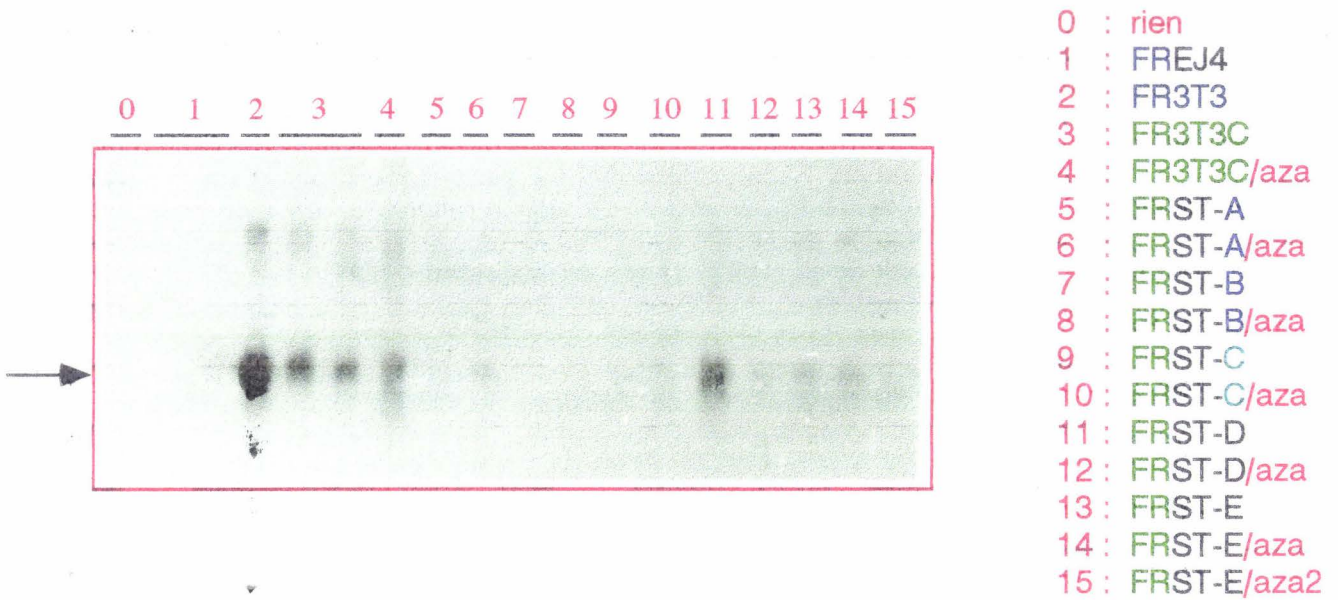
Malgré sa forte toxicité, l'AzTyr semble avoir un effet sur les transformants spontanés. Ainsi sur 5 clones traités, nous avons obtenu 2 "réversions totales" (FRST-A/aza, -B/aza), une "réversion moyenne" (-C/aza), une "partielle" (-E/aza, -E/aza2), et observé un échec (-D/aza). En revanche nos résultats sur les cellules transformées par le produit de l'oncogène *ras* (FREJ4/aza, FREJ4/aza2) sont assez décevants mais cependant comparables à ceux obtenus par Shindo-Okada et al. (1991) et Kyprianou et Taylor-Papadimitriou (1992) qui ont dû cloner les populations traitées pour en sélectionner les "révertants" (aucune donnée statistique publiée). D'après les travaux réalisés au laboratoire, utilisant le même système cellulaire que Nishimura (NIH3T3/*ras*), il a été possible d'estimer cette "réversion" à 10 voire 15% au mieux (Basuyaux, J.P., communication personnelle). Ces chiffres se rapprochent plus d'une réversion spontanée qu'induite!

L'hypothèse d'une réversion spontanée plutôt qu'induite par l'AzTyr reste donc envisageable même pour le système FR3T3C/FRST-, puisque les "révertants" furent isolés à la suite d'une très forte mortalité cellulaire. L'AzTyr aurait pu sélectionner, au sein de la population FRST-, des cellules déjà révertées ou en cours de réversion. Cependant, ce doute a été levé par l'observation du caryotype, l'étude bidimensionnelle protéique, et par l'analyse des transcrits des cellules, avant et après traitement par l'AzTyr.

Le caryotype des cellules révertées (FRST-/aza) était identique à celui des cellules transformées (FRST-), 68-72 chromosomes.

Les gels bidimensionnels ont mis en évidence la disparition ou l'atténuation de l'expression de deux protéines de poids moléculaire identique (38-39KDa) et de pH isoélectrique différents 5.5 et 5.8. Ces protéines apparaissant avec la transformation spontanée, disparaissaient lors de la réversion totale (FRST-A/aza, -B/aza) et leur taux diminuait dans les révertants partiels (FRST-C/aza, FRST-E/aza) (Figure 21). Nous n'avons pas identifié ces protéines, mais à l'aide d'une banque de données de protéines de cellules humaines (Celis et al., 1990, 1992) nous avons trouvé que Jun, Mos (39KDa, pHi inconnu), eIF-3 (Initiation factor 3, variant; 39KDa, pHi:5,4) ou les sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ des protéines G (39 et 38KDa, pHi:5,5), pouvaient leur correspondre. Aucune database n'existe pour les protéines de cellules de rat ou

A. Northern Blot



B. Détection des transcrits Clusterine dans les cellules traitées par l'AzTyr:

CELLULES	RNA ^{Clusterin}	CELLULES	RNA ^{Clusterin}
FR3T3C	+++	FR3T3	++++
FR3T3C/aza	+++	FR3T3/aza	non testé
FRST-A	-	FREJ4	-
FRST-A/aza	+	FREJ4/aza	-
FRST-B	-	FREJ4/aza2	traces
FRST-B/aza	++		
FRST-C	-		
FRST-C/aza	-		
FRST-D	-		
FRST-D/aza	-		
FRST-E	-		
FRST-E/aza	-		
FRST-E/aza2	-		

Figure 22: Détection des transcrits Clusterine dans les cellules révertées.

de souris (Celis, J.E., Vandekerckhove, J., communications personnelles). Les northern blots hybridés avec une sonde *jun* n'ont pas permis d'incriminer cet oncogène, mais la question n'est pas encore résolue pour *mos*, ou les sous-unités β des protéines G. Quoiqu'il en soit, des protéines absentes dans les cellules FR3T3C ou FR3T3C/aza sont présentes dans les transformants spontanés (FRST-) et absentes ou modifiées dans les cellules "révertées" par l'AzTyr (FRST-/aza).

Nous avons aussi trouvé, lors de l'étude des transcrits, que la clusterine était exprimée dans les cellules FR3T3C, absente dans les cellules FRST-, et exprimée dans les cellules FRST-/aza (collaboration avec Vanacker, J.M.). La clusterine est une glycoprotéine (hétérodimérique) très conservée, ubiquitaire et sécrétée dans le milieu par les cellules en différenciation lors de l'embryogenèse (French et al., 1993). L'expression de la clusterine est aussi augmentée en réponse à une modulation hormonale soit au cours de la différenciation, de la transformation, ou dans l'apoptose programmée ou induite par un poison (pour revue, Jenne et Tschopp, 1992). Elle est aussi responsable de l'aggrégation homotypique des cellules, c'est à dire qu'elle modifie leurs propriétés adhésives, permettant ainsi leur mouvance ou leur organisation en tissu. Bien que cela ne soit pas démontré, elle pourrait être un constituant membranaire (French et al., 1993). Toutes ces propriétés n'expliquent pas pourquoi nous trouvons une expression de la clusterine liée au phénotype normal ou réverté (Vanacker, J.M., communication personnelle, Figure 22). Cependant, compte-tenu de son implication dans la différenciation, il est possible de considérer, dans notre cas, la clusterine comme un éventuel marqueur de différenciation et non un marqueur de normalité/transformation.

Ces observations semblent indiquer que c'est le traitement par l'AzTyr qui a provoqué la "réversion" observée et qu'il ne s'agit pas d'une sélection.

C

CONCLUSION-EPILOGUE

CONCLUSION - EPILOGUE

Le travail que nous avons effectué avait pour but de concevoir le Parvovirus recombinant qui provoquerait l'oncolyse-oncosuppression, quelque soit la cellule tumorale infectée. Notre système a été conçu afin que le gène de la thymidine kinase (*tk*) du Virus Herpès Simplex 1 (HSV1), dont le produit rend toxique l'Acyclovir, soit uniquement transcrit dans les cellules permissives au Parvovirus. Grâce à ce système qui permet l'expression du gène HSV1-*tk*, placé dans un vecteur plasmidique sous le contrôle d'éléments régulateurs parvoviraux actifs uniquement en présence de la protéine virale NS1 (promoteur P₃₈), nous avons pu induire la mort de cellules par la synergie entre les effets cytotoxiques de NS1 et ceux de l'Acyclovir modifié.

Cependant, il reste à construire un Parvovirus recombinant et à le produire. Il reste aussi à voir, dans un modèle animal, si virus recombinant est infectieux, et dans l'affirmative si le produit du gène HSV1-*tk* est exprimé spécifiquement dans les tissus cibles.

Pour que ces travaux puissent être entrepris, il faut disposer d'une cellule permettant une production continue du virus recombinant, sans effet toxique de NS1, et qui soit apte à compléter les fonctions d'un virus rendu déficient. Nous avons réussi à isoler et caractériser une cellule (FR3T3C), insensible à l'effet cytotoxique de la protéine NS1, qui permet la production constitutive et non-lytique du Parvovirus MVMP, et qui pourrait nous permettre de fabriquer une cellule de trans-complémentation pour produire des Parvovirus recombinants.

Ce système reste encore à évaluer.

Enfin, il est admis que les cellules "normales" sont en général résistantes aux Parvovirus, alors que les cellules transformées y sont sensibles. Nous avons utilisé ces caractéristiques pour évaluer l'effet "normalisant" de l'Azatyrosine, un antibiotique qui semble capable de "réverter" le phénotype de cellules transformées par le produit de l'oncogène *ras*. Nous avons observé que des cellules "normalisées" par l'Azatyrosine étaient en effet devenues résistantes aux effets cytopathiques des Parvovirus. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'Azatyrosine sélectionne des cellules qui révertent spontanément, car le traitement des cultures par cet antibiotique est associé à une mort cellulaire importante. Même si ceci était le cas l'Azatyrosine resterait une substance intéressante, car alors elle tuerait spécifiquement et efficacement les cellules transformées. Toutefois, une telle hypothèse devrait être vérifiée dans le modèle animal approprié.

En conclusion, l'oncotropisme des Parvovirus et la spécificité d'expression de leurs gènes sont un potentiel pour l'élaboration de nouvelles thérapies anti-cancéreuses humaines.

D**RÉFÉRENCES**

- 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. 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 non-structural protein NS1. *J. Virol.* **66** : 3776-3783.
- ANDERSON, M.J., and PATTISON, J.R.** (1984) The human Parvovirus. Brief review. *Arch. Virol.* **82** : 137-148.
- ANDERSON, M.J., KIDD, I.M., and MORGAN, C.P.** (1985) Human Parvovirus and rubella-like illness. *Lancet* **2** : 8456.
- ANDERSON, M.J., LEWIS, E., KIDD, I.M., HALL, S.M., and COHEN, B.J.** (1984) An outbreak of erythema infectiosum associated with human Parvovirus infection. *J. Hyg. Lond.* **93** : 85-93.
- ANTONIETTI, J.P., SAHLI, R., BEARD, P., and HIRT, B.** (1988) Characterization of the cell type-specific determinant in the genome of Minute Virus of Mice. *J. Virol.* **62** : 552-557.
- ARELLA, M., GARZON, S., BERGERON, J., and TIJSSSEN, P.** (1990) Properties of Parvovirus particles. In (Tijssen, P. ed.), "Handbook of Parvoviruses". CRC Press Inc, Boca Raton, FL U.S.A. vol I : **2** : 11-30.
- ASTELL, C.R.** (1990) Terminal hairpins of Parvovirus genomes and their role in DNA replication. In (Tijssen, P. ed.), "Handbook of Parvoviruses". CRC Press Inc, Boca Raton, FL U.S.A. vol I : **4** : 59-80.
- 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., 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.
- ASTELL, C.R., GARDINER, E.M., and TATTERSALL, P.** (1986) DNA sequence of the lymphotropic variant of Minute Virus of Mice, MVM(i), and comparison with the DNA sequence of the fibrotropic prototype strain. *J. Virol.* **57** : 656-659.
- ASTELL, C.R., MOL, C.D., and ANDERSON, W.F.** (1987) Structural and functional homology of Parvovirus and papovavirus polypeptides. *J. Gen. Virol.* **68** : 885-893.
- ASTELL, C.R., SMITH, M., CHOW, M.B., and WARD, D.C.** (1979) Structure of the 3' hairpin termini of four rodent Parvovirus genomes: nucleotide sequence homology at origins of DNA replication. *Cell* **17** : 691-703.
- ASTELL, C.R., THOMSON, M., CHOW, M.B., and WARD, D.C.** (1983b) Structure and replication of Minute Virus of Mice DNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **2** : 751-762.

- ASTELL, C.R., THOMSON, M., MERCHLINSKY, M., and WARD, D.C.** (1983a) The complete DNA sequence of Minute Mirus of Mice, an autonomous Parvovirus. *Nucleic Acids Res.* **11** : 999-1018.
- 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.
- AVALOSSE, B.L., CHEN, Y.Q., CORNELIS, J.J., DUPONCHEL, N., BECQUART, P., and ROMMELAERE, J.** (1987) Amplification of parvoviral DNA as a function of host cell transformation. In (Schlehofer, J.R., and zur Hausen, H., eds-) "The role of DNA Amplification in Tumor Initiation and Promotion". Lippincott, Philadelphia. p. 140.
- BALLGOODRICH, L.J., and TATTERSALL, P.** (1992) Two amino acid substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition of fibrotropism by the lymphotropic strain of Minute Virus of Mice. *J. Virol.* **66** : 3415-3423.
- BANTEL, SCHAAL U., and ZUR HAUSEN, H.** (1984) Characterization of the DNA of a defective human Parvovirus isolated from a genital site. *Virology* **134** : 52-63
- BANTEL, SCHAAL U., and ZUR HAUSEN, H.** (1988) Adeno-Associated Viruses inhibit SV40 DNA amplification and replication of Herpes Simplex Virus in SV40-transformed cells. *Virology* **164** : 64-74.
- BARBACID, M.** (1987) *Ras*-genes. *Ann. Rev. Biochem.* **56** : 779-827.
- BARRETT, C.B., SCHROETKE, R.M., VAN DER HOORN, F.A., NORDEEN, S.K., and MALLER, J.L.** (1990) Ha-*ras*^{Val12, Thr59} activates S6 kinase and p34^{cdc2} kinase in *Xenopus* Oocyte: Evidence for c-mos^{x^e}-dependant and independant pathways. *Mol. Cel. Biol.* **10** : 310-315.
- 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. *Nucleic Acids Res.* **20** : 5053-5060.
- BASS, L.R., and HETRICK, F.M.** (1978) Human lymphoblastoid cells as hosts for parvovirus H-1 and Rat Virus. *J. Virol.* **25** : 486-490.
- BEHRINGER, R.R., MATHEWS, L.S., PALMITER, R.D., and BRINSTER, R.L.** (1988) Dwarf mice produced by genetic ablation of growth hormone-expressing cells. *Genes Dev.* **2** : 1-2
- BEN-ASHER, E., and ALONI, Y.** (1984) Transcription of Minute Virus of Vice, an autonomous Parvovirus, may be regulated by attenuation. *J. Virol.* **52** : 266-276.
- BERGS, V.V.** (1969) Rat Virus-mediated suppression of leukemia induction by moloney virus in rats. *Cancer Res.* **42** : 1669-1673.
- BERNS, K.I.** (1990) Parvoviruses replication. *Microbio. Rev.* **54** : 316-329.
- BERNS, K.I., and BOHENZKY, R.A.** (1987) Adeno-Associated Viruses: an update. *Adv. in Virus Res.* **32** : 243-306.

- BERNS, K.I., PINKERTON, T.C., THOMAS, G.F., and HOGGAN, M.D.** (1975) Detection of Adeno-Associated Viruses (AAV) specific nucleotide sequences in DNA isolated from latency infected Detroit 6 cells. *Virology* **68** : 556.
- BISHOP, J.M.** (1987) The molecular genetics of cancer. *Science* **235** : 305-311.
- BLACKLOW, N.R., CUKOR, G., KIBRICK, S., and QUINNAN, G.** (1978) Interaction of adeno-associated virus with cells transformed by Herpes virus. In (Ward, D.C., and Tattersall, P. eds-), "Replication of mammalian Parvoviruses". Cold Spring Harbor : 87-98.
- BLAESE, M.** (1992). Congress communication and report. Les conférences Lilly, Paris-La Vilette.
- BODNAR, J.W.** (1988) Sequence organization in regulatory regions of DNA of Minute Virus of Mice. *Virus Genes* **2** : 167-182.
- BODNAR, J.W., HANSON, P.I., BODNAR-POLVINO, M., ZEMPSKY, W., and WARD, D.C.** (1989) The terminal regions of Adenovirus and Minute Virus of Mice DNAs are preferentially associated with the nuclear matrix in infected cells. *J. Virol.* **63** : 4344-4353.
- BONNARD, G.D., MANDERS, E.K., CAMPBELL, D.J., HERBERMAN, 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.
- BORRELLI, E., HEYMAN, R., ARIAS, C., SAWCHENKO, P.E., and EVANS, R.M.** (1989) Transgenic mice with inducible dwarfism. *Nature* **339** : 538-541.
- BORRELLI, E., HEYMAN, R., HSI, M., and EVANS, R.M.** (1988) Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85** : 7572-7576.
- BOTQUIN, V., CID, A., and SCHLEHOFER, J.R.** (a: submitted 1993) Induction of differentiated-linked antigens in embryonic cells of murine and human origin by infection with Adeno-Associated Virus type 2.
- BOTQUIN, V., MINCBERG, M., TAL, J., and SCHLEHOFER, J.R.** (b: submitted 1993) Complementation of Adeno-Associated Virus gene expression by the non-structural proteins of Parvovirus Minute of Mice.
- BOURGUIGNON, G.J., TATTERSALL, P.J., and WARD, D.C.** (1976) DNA of Minute Virus of Mice: self-priming, nonpermuted, single-stranded genome with a 5'-terminal hairpin duplex. *J. Virol.* **20** : 290-306.
- BRADY, H.J.M., and DZIEZARK, E.A.** (1991) Ablation strategy for HIV-tat expressing cells. International Workshop on human gene transfer, Chantilly (France).
- BRANDENBURGER, A., CAILLET-FAUQUET, P., LEGENDRE, D., PERROS, M., and ROMMELAERE, J.** (1989) Involvement of non-structural proteins in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp. IIIrd EMBO Parvovirus Workshop, Ma'ale Hachamisha (Israël).

- 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.
- BREITMAN, M.L., CLAPOFF, S., ROSSANT, J., TSUI, L.-C., GOLDE, L.M., MAXWELL, I.H., and BERNSTEIN, A.** (1987) Genetic ablation: Targeted expression of a toxin gene causes microphthalmia in transgenic mice. *Science* **238** : 1563-1565.
- BROUTY-BOYLE, D., WYBIER-FRANQUI, J., CALVO, C., FREUTEUN, J., and GRESSER, I.** (1984) Reversibility of a transformed and neoplastic phenotype. IV. Effects of a long term interferon treatment of C3H/10T1/2 cells transformed by methylcholanthrene and SV40 virus. *Intl. J. Cancer* **34** : 107-112.
- 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 non-structural protein NS2 and on the genotype of the allotropic determinants VP1 and VP2. *J. Virol.* **66** : 3118-3124.
- BROWSTEIN, D.G., SMITH, A.L., JACOBY, R.O., JOHNSON, E.A., HANSEN, G., and TATTERSALL, P.** (1991) Pathogenesis of infection with a virulent allotropic variant of Minute Virus of Mice and regulation by host genotype. *Lab. Invest.* **65** : 357-364.
- BULLER, R.M., JANIK, J.E., 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.
- 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 non-structural proteins. *Embo J.* **9** : 2989-2995.
- CAMPA, M.J., CHANG, K.J., VEDIA, L.M., REEP, B.R., and LAPETINA, E.G.** (1991). Inhibition of ras-induced vesicle breakdown in *Xenopus* oocytes by Rap-1B. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **174** : 1-5.
- CAMPA, M.J., GLICKMAN, J.F., YAMAMOTO, K., and CHANG, K.J.** (1992). The antibiotic azatyrosine suppresses progesterone or (Val 12)p21 Ha-ras/insuline-like growth factor I-induced germinal vesicle breakdown and tyrosine phosphorylation of *Xenopus* mitogen-activated protein kinase in oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** : 7654-7658.
- CARTER, B.J.** (1984) Variant and defective interfering Parvoviruses. In (Berns, K.I. ed.) "The Parvoviruses". Plenum Press, New York. p. 209.
- CARTER, B.J.** (1990) Parvoviruses as vectors. In (Tijssen, P. ed.), "Handbook of Parvoviruses". CRC Press Inc, Boca Raton, FL U.S.A. vol II : **18** : 247-284.
- CARTER, B.J., MENDELSON, E., and TREMPPE, J.P.** (1990) AAV DNA replication, integration and genetics. In (Tijssen, P. ed.), "Handbook of Parvoviruses". CRC Press Inc, Boca Raton, FL U.S.A. vol I : **11** : 169-226.

- CARUSO, M., and KLATZMANN, D.** (1991) Inhibition of HIV spreading in CD4⁺ cells harbouring an HIV-inducible suicide gene. International Workshop on human gene transfer, Chantilly (France).
- CARUSO, M., and KLATZMANN, D.** (1992) Selective killing of CD4⁺ cells harboring a human immunodeficiency virus-inducible suicide gene prevents viral spread in an infected cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** : 182-186.
- CASTO, B.C., and GOODHEART, C.R.** (1972) Inhibition of Adenovirus transformation in vitro by AAV-1. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* **140** : 72-78.
- 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.
- CELIS, J.E et al.** (1990) The MRC-5 human embryonal lung two-dimensional gel cellular protein database: Quantitative identification of polypeptides whose relative abundance differs between quiescent, proliferating and SV40 transformed cells. *Electrophoresis* **11** : 1072-1113.
- CELIS, J.E et al.** (1992) The human keratinocyte two-dimensional gel protein database (update 1992): Towards an integrated approach to the study of cell proliferation, differentiation and skin diseases. *Electrophoresis* **13** : 893-959.
- CHANY, C., and VIGNAL, M.** (1970) Effect of prolonged interferon treatment on mouse embryonic fibroblasts transformed by murine sarcoma virus. *J. Gen. Virol.* **7** : 203-210.
- CHANDRA, S., and TOOLAN, H.W.** (1961) Electron microscopy of the H-1 virus. Morphology of the virus and a possible virus-host relationship. *J. Natl. Canc. Inst.* **27** : 1405-1459.
- CHEN, C., and OKAYAMA, H.** (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cel. Biol.* **8** : 2745-2752.
- CHEN, K.C., TYSON, J.J., LEDERMAN, M., STOUT, E.R., and BATES, R.C.** (1989) A kinetic hairpin transfer model for parvoviral DNA replication. *J. Mol. Biol.* **208** : 283-296.
- CHEN, K.C., TYSON, J.J., BATES, R.C., and LEDERMAN, M.** (1993) Determination of the Flip/Flop ratio at the left ends of the plus strands in Lull1: a test of the kinetic hairpin transfer model. Vth Parvovirus Workshop, Cristal River, Florida (USA).
- 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., BOUCAMP, 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.

CHEUNG, A.K., HOGGAN, M.D., HAUSWIRTH, W.W., and BERNS, K.I. (1980) Integration of the Adeno-Associated Virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J. Virol.* **33** : 739-748.

CHUNG, D.L., BRANDT-RAUF, P., MURPHY, R.B., NISHIMURA, S., YAMAIZUMI, Z., WEINSTEIN, B., and PINCUS, M.R. (1991). A peptide from the GAP-binding domain of the ras-p21 protein as well as azatyrosine block ras-induced maturation of *Xenopus* oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **181** : 1378-1384.

CLEMENS, K.E., and PINTEL, D. (1987) Minute Virus of Mice (MVM) mRNAs predominantly polyadenylate at a single site. *Virology* **160** : 511-514.

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.

CLEMENS, K.E., CERUTIS, D.R., BURGER, L.R., YANG, C.Q., and PINTEL, D.J. (1990) Cloning of Minute Virus of Mice cDNAs and preliminary analysis of individual viral proteins expressed in murine cells. *J. Virol.* **64** : 3967-3973.

COLBERE-GARAPIN, F., CHOUSTERMAN, S., HORODNICEANU, F., KOURILSKY, P., and GARAPIN, A.C. (1979) Cloning of the active *tk* gene of HSV type 1 in *E. Coli* K12. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **76** : 3755-3759.

CONTENTE, S., KENYON, K., RIMOLDI, D., and FRIEDMAN, R. (1990) Expression of gene *rrg* is associated with reversion of NIH3T3 transformed by LTR-*c-Ha-ras*. *Science* **249** : 796-798.

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., 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.

CORNELIS, J.J., SPRUYT, N., SPEGELAERE, P., GUETTA, E., DARAWSHI, T., COTMORE, S.F., TAL, J., and ROMMELAERE, J. (1988b) Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus MVM correlates with an increase in viral gene expression. *J. Virol.* **62** : 3438-3444.

COTMORE, S.F. (1990) Gene expression in autonomous Parvoviruses. In (Tijssen, P. ed.), "Handbook of Parvoviruses". CRC Press Inc, Boca Raton, FL U.S.A. vol I : **9** : 141-154.

COTMORE, S.F., and TATTERSALL, P. (1986a) Organization of non-structural genes of the autonomous parvovirus Minute Virus of Mice. *J. Virol.* **58** : 724-732.

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

- COTMORE, S.F., and TATTERSALL, P.** (1984) Characterization and molecular cloning of a human Parvovirus genome. *Science* **226** : 1161-1165.
- COTMORE, S.F., and TATTERSALL, P.** (1987) The autonomously replicating Parvoviruses of vertebrates. *Adv. in Virus Res.* **33** : 91-174.
- COTMORE, S.F., and TATTERSALL, P.** (1988) The NS-1 polypeptide of Minute Virus of Mice is covalently attached to the 5' termini of duplex replicative-form DNA and progeny single strands. *J. Virol.* **62** : 851-860.
- COTMORE, S.F., and TATTERSALL, P.** (1989) A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious Parvovirus particles. *J. Virol.* **63** : 3902-3911.
- COTMORE, S.F., and TATTERSALL, P.** (1990) Alternate splicing in a parvoviral non-structural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics. *Virology* **177** : 477-487.
- COTMORE, S.F., and TATTERSALL, P.** (1992) In vivo 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.
- COTMORE, S.F., GUNTHER, M., and TATTERSALL, P.** (1989) Evidence for a ligation step in the DNA replication of the autonomous parvovirus Minute Virus of Mice. *J. Virol.* **63** : 1002-1006.
- COTMORE, S.F., STURZENBECKER, L.J., and TATTERSALL, P.** (1983) The autonomous parvovirus MVM encodes two non-structural proteins in addition to its capsid polypeptides. *Virology* **129** : 333-343.
- CRAWFORD, L.V.** (1966) A Minute Virus of Mice. *Virology* **29** : 605.
- CUKOR, G., BLACKLOW, N.R., HOGGAN, M.D., and BERNS, K.I.** (1984) Biology of Adeno-Associated Virus. In (Berns, K.I. ed.), "The Parvoviruses". New York, Plenum press. p 33.
- CUKOR, G., BLACKLOW, N.R., KIBRICK, S., and SWAN, I.C.** (1975) Effect of Adeno-Associated Virus on cancer expression by Herpes virus-transformed hamster cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **55** : 957-959.
- 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.
- DE MIRANDA, P., and GOOD, S.S.** (1992). Species differences in the metabolism and disposition of antiviral nucleoside analogues: 1. Acyclovir. *Antiviral Chem. and Chemother.* **3** : 1-8.
- DENT, P., WU, J., ROMERO, G., VINCENT, L.A., CASTLE, D., and STURGILL, T.W.** (1993) Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase pathway in triton X-100 disrupted NIH3T3 cells by p21Ras and in vitro by plasma membranes from NIH3T3 cells. *Mol. Biol. Cell* **4** : 483-493.

- DOERIG, C., HIRT, B., ANTONIETTI, J.P., and BEARD, P.** (1990) Non-structural 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.** (1988) Minute Virus of Mice non-structural protein NS-1 is necessary and sufficient for trans-activation of the viral P39 promoter. *J. Gen. Virol.* **69** : 2563-2573.
- DUPONT, F., TENENBAUM, L. and ROMMELAERE, J.** (1990) Negative control of replication of a MVM/SV40 hybrid genome in COS-1 cells by the MVM non-structural protein NS1. *Arch. Internat. Physio. Bio.* **99B** : 28.
- 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.
- DUTRILLAUX, B., and COUTURIER, J.** (1981) Technique de laboratoire, pratique de l'analyse chromosomique. Ed. Masson, p. 40-45.
- EDWARD, M.** (1992) Effect of retinoids on tumour invasion and metastasis. *Pathobiol.* **60** : 271-277.
- 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.
- EVANS, G.A.** (1989) Dissecting mouse development with toxigenics. *Genes & Dev.* **3** : 259-263.
- EZZEDDINE, Z.D., MARTUZA, R.L., PLATIKA, D., SHORT, M.P., MALIK, A., CHOI, B., and BREAKEFIELD, X.O.** (1991) Selective killing of glioma cells in culture and *in vivo* by retrovirus transfer of Herpes Simplex Virus thymidine kinase gene. *New Biol.* **6** : 608-614.
- FAIBT, S., PERROS, M., SPRUYT, N., PLAZA, S., and ROMMELAERE, J.** (submitted 1993) Mapping of protein binding sites within the upstream regulatory region of P4 promoter of the parvovirus Minute of Mice.
- FAIBT, S., SCHLEHOFER, J.R., and ZUR HAUSEN, H.** (1989) Transformation of human cells by oncogenic viruses support permissiveness for parvovirus H-1. *J. Virol.* **63** : 2152-2158.
- FAMILIA, R, SIVAN, S., MINCBERG, M., and TAL, J.** (1993) Function of Rep gene products of AAV and MVM in their respective DNA replication and promoter transactivation. Vth Parvovirus Workshop, Crystal River, Florida (USA).
- 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.
- FEDER, HM. JR., and ANDERSON, I.** (1989) Fifth disease. A brief review of infections in childhood, in adulthood, and pregnancy. *Arch. Intern. Med.* **149** : 2176-2178.

- FERRIS, S.D., SAGE, R.D., and WILSON, A.C.** (1982) Evidence from mtDNA sequences that common laboratory strains of inbred mice are descended from a single female. *Nature* **295** : 163-165.
- FLOTTE T.R., AFIONE, S.A., SOLOW, R., DRUMM, M.L., MARKAKIS, D., GUGGINO, W.B., ZEITLIN, P.L., and CATER, J.B.** (1993) Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel Adeno-Associated Virus promoter. *J. Biol. Chem.* **268** : 3781-3790.
- FRANCIOSI, R.A., and TATTERSALL, P.** (1988) Fetal infection with human Parvovirus B19. *Hum. Pathol.* **19** : 489-491.
- FRENCH, L.E., CHONN, A., DUCREST, D., BAUMANN, B., BELIN, D., WOHLWEND, A., KISS, J.Z., SAPPINO, A-P., TSCHOPP, J., and SCHIFFERLI, J.A.** (1993) Murine clusterin: molecular cloning and mRNA localization of a gene associated with epithelial differentiation processes during embryogenesis. *J. Cell. Biol.* **122** : 1119-1130.
- FUJITA-YOSHIGAKI, J., YOKOYAMA, S., SHINDO-OKADA, N., and NISHIMURA, S.** Azatyrosine inhibits neurite outgrowth of PC12 cells induced by oncogenic *ras*. *Oncogene* **7** : 2019-2024.
- FURMAN, P.A., MCGUJRT, P.V., KELLER, P.M., FYFE, J.A., and ELION, G.B.** (1980) Inhibition by acyclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with Herpes virus genetic information. *Virology* **102** : 420-430.
- GAERTNER, D.J., JACOBY, R.O., and SMITH, L.A.** (1993) Persistent Rat Virus (RV) infection in juvenile athymic rats. Vth Parvovirus Workshop, Crystal River, Florida (USA).
- GARDINER, E.M., and TATTERSALL, P.** (1988a) Evidence that developmentally regulated control of 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.
- GARELL, J.I.** (1979) *J. Biol. Chem.* **254** : 7961-7977.
- 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.
- GEORG-FRIES, B., BIEDERLACK, S., WOLF, J., and ZUR HAUSEN, H.** (1984) Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human Parvovirus. *Virology* **134** : 64-71.
- GHYSDAEL, J., GEGONNE, A., POGNONEC, P., DERNIS, D., LEPRINCE, D., and STEHELIN, D.** (1986). Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a *c-ets* oncogene encoded Mr 54,000 cytoplasmic protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **83** : 1714-1718.
- GRAHAM, F.L., and VAN DER EB, A.J.** (1973) A new technique for the assay of infectivity of human Adenovirus 5 DNA. *Virology* **52** : 456-467.

- 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** : 1177-1780.
- GUETTA, E., MINCBERG, M., MOUSSET, S., BERTINCHAMPS, C., ROMMELAERE, J., and TAL, J.** (1990) The selective killing of transformed rat cells by Minute Virus of Mice does not require infectious virus production. *J. Virol.* **64** : 458-462.
- GUNTHER, M., and TATTERSALL, P.** (1988) The terminal protein of Minute Virus of Mice is an 83 kilodalton polypeptide linked to specific forms of double-stranded and single-stranded viral DNA. *Febs Lett.* **242** : 22-26.
- HAAR, L., and FLATMARK, T.** (1987) Evidence that deletion of coding sequences in the 5' end of *tk* gene of HSV1 affects stability of the gene products. *Virology* **68** : 2817-2829.
- HAAR, L., MARSDEN, H.S., PRESTON, C.M., SMILEY, J.R., SUMMERS, W.C., and SUMMERS, W.P.** (1985) Utilization of internal AUG codons for initiation of protein synthesis directed by mRNAs from normal and mutant genes encoding Herpes Simplex Virus-specified thymidine kinase. *J. Virol.* **56** : 512-519.
- HADRY, H., BALICK, M., and SCHIERWATER, B.** (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* **1** : 55-63.
- HANDA, H., SHIROKI, K., and SHIMOJO, H.** (1977) Establishment and characteristics of KB cell lines latently infected with Adeno-Associated Virus type1. *Virology* : 82-84.
- HARTLEY, J.W., and ROWE, W.P.** (1960) A new mouse virus apparently related to the Adenovirus virus group. *Virology* **11** : 645-647.
- HARVEY, J.J.** (1964) An unidentified virus which causes the rapid production of tumors in mice. *Nature* **204** : 1104-1105.
- HEILBRONN, R., BURKLE, STEPHAN, and ZUR HAUSEN, H.** (1989) The Adeno-Associated Virus rep-gene suppresses Herpes Simplex Virus induced DNA amplification. IIIrd EMBO Parvovirus Workshop, Ma'ale Hachamisha (Israël).
- HEILBRONN, R., BURKLE, STEPHAN, and ZUR HAUSEN, H.** (1990) The Adeno-Associated Virus rep gene suppresses Herpes Simplex Virus-induced DNA amplification. *J. Virol.* **64** : 3012-3018.
- 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.
- HERMONAT, P.L.** (1989) The Adeno-Associated *rep78* gene inhibits cellular transformation induced by bovine papillomavirus. *Virology* **172** : 253-261.

- HEYMAN, R., BORELLI, E., LESLEY, E., ANDERSON, D., RICHMAN, D.D., BAIRD, S.M., HYMAN, R., and EVANS, R.M.** (1989) Thymidine kinase obliteration: Creation of transgenic mice with controlled immune deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86** : 2698-2702.
- HICKS, N.J., MORRIS, A.G., and BURKE, D.C.** (1981) Partial reversion of the transformed phenotype of murine sarcoma virus-transformed cells in the presence of interferon: a possible mechanism for the anti-tumor effect of interferon. *J. Cell. Sci.* **49** : 225-236.
- HOGGAN, M.D., THOMAS, G.F., and JOHNSON, F.B.** (1973) Continuous carriage of Adeno-Associated Virus genome in cell culture in the absence of Adenovirus. In *Proc. 4th Lepetit coll.* p. 243.
- INOUE, S., SHOMURA, T., TSURUOKA, T. et al.** (1975) L- β -(5-hydroxy-2-pyridyl)-alanine and L- β -(5-hydroxyureido)-alanine from *Streptomyces*. *Chem. Pharm. Bull.* **23** : 2669-2677.
- IZAWA, M., TAKAYAMA, S., SHINDO-OKADA, N., DOI S., KIMURA, M., KATSUKI, M., and NISHIMURA, S.** (1992). Inhibition of chemical carcinogenesis *in vivo* by treatment with the antibiotic azatyrosine. *Cancer Res.* **52** : 1628-1630.
- JENNE, D., and TSCHOPP, J.** (1992) Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *TIBS* **17** : 154-159.
- 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.
- JULIANO, R.L., and HASKILL, S.** (1993) Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **120** : 577-585.
- KAHN, A.** (1992) La transmission du signal en amont et en aval de Ras. *Med. & Scie.* **8** : 1097-1099.
- KAHN, A.** (1993) Thérapie génique, l'ADN médicament. *Coll. Med. & Scie. Ed. J.Libbey, Eurotext.*
- KATZ, E., and CARTER, B.J.** (1986) Effect of Adeno-Associated Virus on transformation of NIH3T3 cells by *ras* gene and on tumorigenicity of NIH3T3 transformed cell line. *Cancer Res.* **18** : 247-284.
- KENYON, K., CONTENTE, S., TRACKMAN, P.C., TANG, J., KAGAN, H.M., and FRIEDMAN, R.** (1991) Lysosyl oxydase and *rrg* messenger. *Science* **253** : 802.
- KILHAM, L., and OLIVIER, L.J.** (1959) A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology* **7** : 428-437.
- KIMSEY, P.B., ENGERS, H.D., HIRT, B., and JONGENEEL, C.V.** (1986) Pathogenicity of fibroblast- and lymphocyte-specific variants of Minute Virus of Mice. *J. Virol.* **59** : 8-13.

- KIRCHSTEIN, R.L., SMITH, K.O., and PETERS, E.A.** (1968) Inhibition of Adenovirus 12 oncogenicity by Adeno-Associated Virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **128** : 670-673.
- KIRSTEN, W.H., and MAYER, L.A.** (1967) Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J. Natl. Cancer. Inst.* **39** : 311-335.
- 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.
- KLEINSCHMIDT, J., GEIGER, C.P., MOHLER, M., WEINDLER, F., STEPHAN, S., and HEILBRONN, R.** (1993) Domains of AAV-2 Rep required for AAV DNA replication, for the inhibition of DNA amplification and cell transformation. Vth Parvovirus Workshop, Crystal River, Florida (USA).
- KOERING, C.E., DUPRESSOIR, T., PLAZA, S., STEHELIN, D., and ROMMELAERE, J.** (accepted for publication in *Human Gene Therapy*, 1993) Induced expression of the conditionally cytotoxic Herpes Simplex Virus thymidine kinase by means of a parvoviral regulatory circuit.
- KOERING, C.E., VENIN-FIKRY, M., DUPRESSOIR, T., SCHLEHOFER, J.R., ROMMELAERE, J., and Stehelin, D.** (submitted 1994). Azatyrosine-mediated phenotypic reversion of transformed FR3T3 rat fibroblasts abrogates sensitivity to the Parvovirus Minute of Mice (MVMp).
- KOERING, C.E., GEUSKENS, M., and ROMMELAERE, J.** Characterization of a normal variant of Fisher Rat Fibroblasts (FR3T3) constitutively producing Minute Virus of Mice without cell lysis
- KOTIN, R.M., SINISCALCO, M., SAMULSKI, R.J., ZHU, X., HUNTER, L., LAUGHLIN, C.A., McLAUGHLIN, S., MUZYSKA, N., ROCCHI, M., and BERNS, K.I.** (1990) Site-specific integration by Adeno-Associated Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87** : 2211-2215.
- KRAUSKOPF, A., RESNEKOV, O., and ALONI, Y.** (1990a) A cis downstream element participates in regulation of *in vitro* transcription initiation from the P38 promoter of Minute Virus of Mice. IIIrd EMBO Parvovirus Workshop, Ma'ale Hachamisha (Israël).
- KRAUSKOPF, A., RESNEKOV, O., and ALONI, Y.** (1990b) 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.
- KRZYZOSIAK, W.J., SHINDO-OKADA, N., TESHIMA, H., NAKAJIMA, K., and NISHIMURA, S.** (1992) Isolation of genes specifically expressed in flat revertant cells derived from activated ras-transformed NIH3T3 cells on treatment with azatyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** : 4879-4883.
- KUMAR, G., and SHARMA, A.K.** (1993) Localization of adjacent binding domains for cellular proteins over the Minute Virus of Mice P4 promoter by site-specific photoaffinity labelling. *Gene* **127** : 237-242.

- KWONG, A.D., and FRENKEL, N.** (1984) Herpes Simplex Virus amplicon: effect of size on replication of constructed defective genomes containing eukaryotic DNA sequences. *J. Virol.* **51** : 595-603.
- KYPRIANOU, N., and TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J.** (1992) Isolation of azatyrosine-induced revertants from *ras*-transformed human mammary epithelial cells. *Oncogene* **7** : 57-63.
- LABIENIEC-PINTEL, L., and PINTEL, D.** (1986) The Minute Virus of Mice P₃₉ transcription unit can encode both capsid proteins. *J. Virol.* **57** : 1163-1167.
- LABOW, M.A., GRAF, L.H., and BERNS, K.I.** (1987) Adeno-Associated Virus gene expression inhibit cellular transformation by heterologous genes. *Mol. Cel. Biol.* **7** : 1320-1325.
- LABOW, M.A., HERMONAT, P.L., and BERNS, K.I.** (1986) Positive and negative autoregulation of the Adeno-Associated Virus type 2 genome. *J. Virol.* **60** : 251-258.
- LAGAYE, S., VEXIAU, P., MOROZOV, V., GUÉNEBAUT-CLAUDET, V., TOBALY-TAPIERO, J., CAVINET, M., CATHELINÉAU, G. PÉRIÈS, J., and EMANOIL-RAVIER, R.** (1992) Human spumaretrovirus-related sequences in the DNA of leukocytes from patients with Graves disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** : 10070-10074.
- LANDEL, C.P., ZHAO, J., BOK, D., and EVANS G.A.** (1988) Lens specific expression of recombinant ricin induces developmental defects in the eyes of transgenic mice. *Genes Dev.* **2** : 1168-1178.
- LEGENDRE, D., and ROMMELAERE, J.** (1992) Terminal regions of the NS-1 protein of parvovirus MVMp are involved in cytotoxicity and promoter trans-inhibition. *J. Virol.* **166** : 5705-5713.
- LEGRAND, C., MOUSSET, S., SALOME, N., and ROMMELAERE, J.** (1992) Cooperation of Oncogenes in Cell Transformation and Sensitization to Killing by the Parvovirus Minute Virus of Mice. *J. Gen. Virol.* **73**: 2003-2009.
- LI, X., and RHODE, S.L. 3D.** (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.
- LINSER, P., BRUNING, H., and ARMENTROUT, R.W.** (1977) Specific binding sites for a parvovirus, Minute Virus of Mice, on cultured mouse cells. *J. Virol.* **24** : 211-221.
- LORSON, C., ZHAO, Q., BURGER, L., and PINTEL, D.J.** (1993) Analysis of transactivation of the MVM P38 promoter. Vth Parvovirus Workshop, Crystal River, Florida (USA).
- LOWY, D.R., ZHANG, K., DECLUE, J.E., and WILLUMSEN, B.M.** (1991) Regulation of p21^{ras} activity. *Tig* **7** : 346-351.
- LUM, G.S., and SCHREINER, A.W.** (1963) Study of a virus isolated from a chloroleukemic Wistar rat. *Cancer Res.* **23** : 1742-1747.

- MACKETT, M., SMITH, G.L., and Moss, B.** (1982) Vaccinia Virus: a selectable eukaryotic cloning vector. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79** : 7415-7422.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., and SAMBROOK, J.** (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. First Ed. Cold Spring Harbor Laboratory press. CHS, New York. p. 424.
- MARSDEN, H.S., HAAR, L., and PRESTON, C.M.** (1983) Processing of HSV proteins and evidence that translation of *tk* mRNA is initiated at 3 separate AUG codons. Virology **46** : 134-445.
- MARSHALL, M.S.** (1993) The effector interactions of p21Ras. TIBS **18** : 250-254.
- MATTHEWS, R.E.F.** (1982) Classification and nomenclature of viruses. Intervirology **17** : 72-75.
- MAXWELL, I.H., LONG, C.J., CARLSON, J.O., RHODE III, S.L., and MAXWELL, F.** (1993) Encapsidation of a recombinant Lulll parvovirus genome by H-1 virus and the fibrotrpic or lymphotropic strains of Minute Virus of Mice. J. Gen. Virol. **74** : 1175-1179.
- MAXWELL, I.H., MAXWELL, F, RHODE III, S.L., CORSINI, J., and CARLSON, J.O.** (1993) Recombinant Lulll autonomous parvovirus as a transient transducing vector for human cells. Hum. Gen. Ther. **4** : 441-450.
- MAXWELL, I.H., MAXWELL, F., and GLODE, L.M.** (1986) Regulated expression of *diphtheria toxin A-chain* gene transfected into human cancer cells: a possible strategy for inducing cancer cell suicide. Cancer Res. **46** : 4660-4664.
- MAYOR, H.D., DRAKE, S., STAHMANN, J., and MUMFORD, D.M.** (1976) Antibodies to Adeno-Associated satellite Virus and Herpes simplex in sera from cancer patients and normal adults. Am. J. Obstet. Gynecol. **126** : 100-104.
- MAYOR, H.D., HOULDITCH, G.S., and MUMFORD, D.M.** (1973) Influence of Adeno-Associated satellite Virus on Adenovirus-induced tumors in hamster. Nat. New Biol. **241** : 44-46.
- MCCORMICK, F.** (1993) How receptors turn Ras on. Nature **363** : 15-16.
- MCMMASTER, G.K., BEARD, P., ENGERS, H.D., and HIRT, B.** (1981) Characterization of an immunosuppressive parvovirus related to the Minute Virus of Mice. J. Virol. **38** : 317-326.
- MENDELSON, E., TREMPE, J.P., and CARTER, B.J.** (1986) Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide. J. Virol. **60** : 823-832.
- MENGELING, W.L., PAUL, P.S., BUNN, T.O., and RIDPATH, J.F.** (1986) Antigenic relationship among autonomous Parvoviruses. J. Gen. Virol. **67** : 2839-2844.
- MERCHLINSKY, M.J., TATTERSALL, P., LEARY, J.J., COTMORE, S.F., GARDINER, E.M., and WARD, D.C.** (1983) Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus Minute Virus of Mice. J. Virol. **47** : 227-232.

- MICHEL, D., GILLET, G., VOLOVITCH, M., PESSAC, B., CALOTHY, G., and BRUN, G.** (1989) Expression of a novel gene encoding a 51,5 kD precursor protein is induced by different retroviral oncogenes in quail neuroretinal cells. *Oncogene Res.* **4** : 127-136.
- MOEN, PT. JR., FOX, E., and BODNAR, J.W.** (1990) Adenovirus and Minute Virus of Mice DNAs are localized at the nuclear periphery. *Nucleic Acids Res.* **18** : 513-20.
- MOHANTY, S.B., and BACHMANN, P.A.** (1974) Susceptibility of fertilized mouse eggs to Minute Virus of Mice. *Infect. Immun.* **9** : 762-763.
- MOLTEN, F., and WELLS, J.M.** (1990) Curability of tumors bearing Herpes Thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors *J. Natl. Cancer Inst.* **82** : 297-300.
- MOLTEN, F., WELLS, J.M., HEYMAN, R.A., and EVANS, R.M.** (1990) Lymphoma regression induced by ganciclovir in mice bearing a Herpes thymidine kinase transgene. *Hum. Gene Ther.* **1** : 125-134.
- MONTARRAS, D., and SAULE, S.** (1988) Oncogènes et différenciation. Dans (Crepin, M. ed.) "Retrovirus et oncogènes". Ed INSERM/J. Libbey, Eurotext. **7** : 257-288.
- 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., and TCHERNIA, G.** (1991) Le parvovirus B19 et l'hématopoïèse. *Med. & Sci.* **7** : 127-137.
- MORTIMER, P.P., HUMPHRIES, R.K., MOORE, J.G., PURCELL, R.H., and YOUNG, N.S.** (1983) A human parvovirus-like virus inhibits haematopoietic colony formation in vitro. *Nature* **302** : 426-429.
- 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** : 107-171.
- MOUSSET, S., CORNELIS, J.J., SPRUYT, N., and ROMMELAERE, J.** (1986) Transformation of established murine fibroblasts with an activated cellular *Harvey ras* oncogene or the polyoma virus middle T gene increases cell permissiveness to parvovirus Minute Virus of Mice. *Biochimie* **68** : 951-956.
- MULLER, D. E., and SIEGL, G.** (1983) Maturation of parvovirus Lu-III in a subcellular system. I. Optimal conditions for *in vitro* synthesis and encapsidation of viral DNA. *J. Gen. Virol.* **64** : 1043-1054.
- MULLIGAN, R.C., HOWARD, B.H., and BERG, P.** (1979) Synthesis of rabbit β -globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 β -globin recombinant genome. *Nature* **277** : 108.
- MYINT, S., PATOU, G., and PATTISON, J.R.** (1990) Parvovirus B19 seroprevalence in cancer patients. VIIIth International Congress of Virology. Berlin (Allemagne) 239.

- NAEGER, L.K., CATER, J., and PINTEL, D.J.** (1990) The small non-structural 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.
- NAEGER, L.K., CLEMENS, K.E., TULLIS, AND PINTEL, D.** (1989) Analysis of the role of the small non-structural proteins (NS2) of MVMP during infection. IIIrd EMBO Parvovirus Workshop, Ma'ale Hachamisha (Israël).
- NAEGER, L.K., SCHOBORG, R.V., ZHAO, Q., TULLIS, G.E., and PINTEL, D.J.** (1993) Nonsense mutations inhibit splicing of MVM RNA when they interrupt the reading frame of either exon of the final spliced product. Vth Parvovirus Workshop, Crystal River, Florida (USA).
- 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.
- NAIDES, S.J., SCHAROSCH, L.L., FOTO, F., and HOWARD, E.J.** (1990) Rheumatologic manifestations of human Parvovirus B19 infection in adults *Arthritis Rheum.* **33** : 1297-1309.
- NAMBA, M., NISHITANI, K., FUKUSHIMA, F., and KIMOTO, T.** (1988) Multistep carcinogenesis of normal human fibroblasts. *Anticancer Res.* **8** : 947-958.
- NELSON-REES, W.A., and FLANDERMEYER, R.R.** (1977) Inter and intra-species contamination of human breast tumor cell lines HBC and BrCa5 and other cell cultures. *Science* **185** : 1343-1344.
- NODA, M., KITAYAMA, H., MATSUZAKI, T., SUGIMOTO, Y., OKAYAMA, H., BASSIN, R.H., and IKAWA, Y.** (1989) Deletion of genes with a potential for suppressing the transformed phenotype associated with activated *ras* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86** : 162-166.
- OHI, S., DIXIT, M., TILLERY, M.K., and PLONK, S.** (1990) Construction and replication of an Adeno-Associated Virus expression vector that contains human β -globin cDNA. *Gene* **89** : 279-282.
- OSTROWE, J.M., DUCKWORTH, D.H., and BERNS, K.I.** (1981) Inhibition of Adenovirus-transformed cell oncogenicity by adeno-associated virus. *Virology* **113** : 521-533.
- OZAWA, K., AYUB, J., KAJIGAYA, S., SHIMANDA, T., and YOUNG, N.** (1988) The gene encoding the non-structural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells. *J. Virol.* **82** : 2884-2889.
- PALMITER, R.D., BEHRINGER, R.R., QUAIFFE, C.J., MAXWELL, F., MAXWELL, I.H., and BRINSTER, R.L.** (1987) Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene. *Cell* **50** : 435-443.
- PARADISO, P.R.** (1984) Identification of multiple forms of the noncapsid parvovirus protein NCVP1 in H-1 parvovirus-infected cells. *J. Virol.* **52** : 82-87.
- PARKER, C., and SHERBET, G.V.** (1992) Modulation of gene function by retinoic acid. *Pathobiol.* **60** : 278-283.

- PATTISSON, J.R.** (1987) B19 virus- a pathogenic human Parvovirus. *Blood Rev.* **1** : 58-64.
- PATTISSON, J.R.** (1988) Disease caused by the human Parvovirus B19. *Arch. Dis. Child.* **63** : 1426-1427.
- PERROS, M., VANACKER, J.M., KOERING, C., DUPRESSOIR, T., FAIBT, S., and ROMMELAERE, J.** (1992) Etude des interactions du Parvovirus MVMP avec les cellules transformées. Dans (Goudeau, A., and Barin, F., eds-), "Interactions virus-cellule". *Coll. Soc. Fr. Microbio./Virol., SFM, Paris. Vol XI* : 157-172.
- PFEFFER, L.M., and TAN, Y.H.** (1991) Do second messengers play a role in interferon signal transduction? *Tibbs* **16** : 321-323.
- PINCUS, M.R., CHUNG, D., BRANDT-RAUF, P., WEINSTEIN, I.B., YAMAIZUMI, Z., and NISHIMURA, S.** (1992) Pathways for activation of the ras-oncogene-encoded p21 protein. *An. Clin. Lab. Sci.* **22** : 323-342.
- 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.
- PLAZA, S., DINSART, C., FAIBT, S., VANACKER, J.M., PERROS, M., ROMMELAERE, J., and CORNELIS, J.J.** (submitted 1993). Cooperation of USF and FOS related proteins for complex formation and transcription stimulation at an enhancer.
- POLAKIS, P., and McCORMICK, F.** (1993) Structural requirements for the interaction of p21Ras with GAP, exchange factors, and its biological effector target. *J. Biol. Chem.* **268** : 9157-9160.
- POST, L.E., MACKEN, S., and ROIZMAN, B.** (1981) Regulation of a genes of HSV: expression of chimeric genes produced by fusion of *tk* with a gene promoters. *Cell* **54** : 555-565.
- 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. U.S.A.* **86** : 12-16.
- RHODE, SL 3D.** (1973) Replication process of the parvovirus H-1. I. Kinetics in a parasynchronous cell system. *J. Virol.* **11** : 856-861.
- RHODE, SL 3D.** (1985) Trans-activation of Parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *J. Virol.* **55** : 886-889.
- RHODE, SL 3D.** (1987) Construction of a genetic switch for inducible trans-activation of gene expression in eucaryotic cells. *J. Virol.* **61** : 1448-1456.

- RHODE, SL 3D., and PARADISO, P.R.** (1989) Parvovirus replication in normal and transformed cells correlates with the nuclear translocation of early protein NS1. *J. Virol.* **63** : 349-355.
- RHODE, SL 3D., 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, SL3D.** (1989) Both excision and replication of cloned autonomous Parvovirus DNA require the NS1 (Rep) protein. *J. Virol.* **63** : 4249-4256.
- RICHARDS, R., LINSER, P., and ARMENTROUT, R.W.** (1977) Kinetics of assembly of a parvovirus, Minute Virus of Mice, in synchronized rat brain cells. *J. Virol.* **22** : 778-793.
- ROMMELAERE, J., and CORNELIS, J.J.** (1991) Antineoplastic activity of Parvoviruses. *J. Virol. Methods* **33** : 233-251.
- ROMMELAERE, J., and TATTERSALL, P.** (1990) Oncosuppression by Parvoviruses. In (Tijssen, P. ed.), "Handbook of Parvoviruses". CRC Press Inc, Boca Raton, FL U.S.A. vol II : **3** : 41-57.
- ROMMELAERE, J., VOS, J.M., CORNELIS, J.J., and WARD, D.C.** (1981) U.V.-enhanced reactivation of Minute Virus of Mice: stimulation of late step in the viral life cycle. *Photochem. Photobiol.* **33**: 845-854.
- RON, D., TATTERSALL, P., and TAL, J.** (1984) Formation of a host range mutant of the lymphotropic strain of Minute Virus of Mice during persistent infection in mouse L cells. *J. Virol.* **52** : 63-69.
- ROSENBERG, M., and COURT, D.** (1979) Regulation sequences involved in the promotion and the termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genet.* **13** : 63-69.
- RUBIN, A.L., SNEADE-KOENIG, A., and RUBIN, H.** (1992) High rate of diversification and reversal among subclones of neoplastically transformed NIH3T3 clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** : 4183-4186.
- RUSSELL, S.J., BRANDENBURGER, A., FLEMMING, C.L., COLLINS, M.K.L., and ROMMELAERE, J.** (1992) Transformation-dependent expression of interleukin genes delivered by a recombinant Parvovirus. *J. Virol.* **66** : 2821-2828.
- SAGER, R.** (1986) Genetic suppression of tumor formation: a new frontier in cancer research. *Cancer Res.* **46** : 1573-1580.
- SAHLI, R., MCMASTER, G.K., and HIRT, B.** (1985) DNA sequence comparison between two tissue-specific variants of the autonomous parvovirus, Minute Virus of Mice. *Nucleic Acids Res.* **13** : 3617-3633.
- SALOME, N., HILLE B. VAN, M. GEUSKENS, and J. ROMMELAERE.** (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** : 4797-4807.

- 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** : 123-130.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second Ed. Cold Spring Harbor Laboratory press. CHS, New York.
- SAMID, D., CHANG, E.H., and FRIEDMAN, R.** (1984) Biochemical correlates of phenotypic reversion in interferon-treated mouse cells transformed by a human oncogene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119** : 21-28.
- SAMID, D., CHANG, E.H., and FRIEDMAN, R.M.** (1985a) Development of transformed phenotypic by a human *ras* oncogene is inhibited by interferon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126** : 509-516.
- SAMID, D., CHANG, E.H., FRIEDMAN, R.M., SCHAFF, Z., and GREENE, J.J.** (1985b) Biological and morphological characteristics of phenotypic revertants appearing in interferon-treated mouse cells transformed by a human oncogene. *J. Exp. Pathol.* **2** : 211-222.
- SAMID, D., FLESSATE, D.M., and FRIEDMAN, R.M.** (1987) Interferon-induced revertants of *ras*-transformed cells: resistance to transformation by specific oncogenes and retransformation by 5-azacytidine. *Mol. cel. biol.* **7** : 2196-2200.
- SAMULSKI, R.J.** (1993) Adeno-Associated Virus: integration at a specific chromosomal locus. *Cur. Opin. Genet. Dev.* **3** : 74-80.
- 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.
- SARVER, H., GRUSS, P., LAW, M.F., KHOURY, G., and HOWLEY, P.M.** (1981) Bovine Papilloma Virus deoxyribonucleic acid: a novel eukaryotic cloning vector. *Mol. Cell Biol.* **1** : 4896.
- SAULE, S.** (1988) Retrovirus aviaires. Dans (Crepin, M. ed.) "Retrovirus et oncogènes". Ed INSERM/J. Libbey, Eurotext. **2** : 17-58.
- SAULE, S., and LEPRINCE, D.** (1988) Les oncogènes. Dans (Crepin, M. ed.) "Retrovirus et oncogènes". Ed INSERM/J. Libbey, Eurotext. **6** : 181-256.
- SCHAEFFER, H.J., BEAUCHAMP, L., DE MIRANDA, P., and ELION, G.B.** (1978) 9-(2-Hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the Herpes group. *Nature* **272** : 583-585.
- SCHLEHOFER, J.R.** (1994) The tumor suppressive properties of Adeno-Associated Viruses. *Mut. Res. in press*.
- SCHLEHOFER, J.R., EHRBAR, M., and ZUR HAUSAN, 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.

- SCHLEHOFER, J.R., HEILBRONN, R., GEORG-FRIES, 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.
- SCHLESSINGER, J.** (1993) How receptor kinases activate Ras. *TIBS* **18** : 273-275.
- SCHMITT, J., SCHLEHOFER, J.R., MERGENER, K., GISSMAN, L., and ZUR HAUSEN, H.** (1989) Amplification of bovine papillomavirus DNA by N-methyl-N'-Nitro-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.
- SHIMIZU, K., GOLDFARB, M., SUARD, Y., PERUCHO, M., LI, Y., KAMATA, T., FERAMISCO, J., STAVNEZER, E., FOGH, J., and WIGLER, M.H.** (1983) Three human transforming genes are related to the viral *ras* oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80** : 2112-2116.
- SHIMOTOHNO, K., and TEMIN, H.** (1982) Loss of inverted sequences in mouse α *globin* DNA inserted in an infectious retrovirus vector. *Nature* **299** : 265.
- SHINDO-OKADA, N., MAKABE, O., NAGAHARA, H. and NISHIMURA, S.** (1989) Permanent conversion of mouse and human cells transformed by activated *ras* or *raf* genes to apparently normal cells by treatment with the antibiotic azatyrosine. *Mol. Carcin.* **2** : 159-167.
- SHINDO-OKADA, N., KRZYZOSIAK, W.J., TESHIMA, H., IZAWA, M., NAKAJIMA, O., MAKABE, O., and NISHIMURA, S.** Permanent conversion of mouse and human cells transformed by activated *ras* to normal phenotype by treatment with the antibiotic azatyrosine. *Congress communication*
- SIEGL, G.** (1976) The Parvoviruses. In (Gard, S., and Hallauer, C. eds-), "Virology monographs". Springer Verlag, Berlin, **15**.
- SIEGL, G.** (1984) Biology and pathogenicity of autonomous Parvoviruses. In (Berns, K.I. ed.), "The Parvoviruses". New York, Plenum press.
- 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.
- SINGER, I.I., and RHODE, S.L. 3D.** (1978) Electron microscopy and cytochemistry of H-1 parvovirus intracellular morphogenesis. In (Ward, D.C., and Tattersall, P. eds-), "Replication of mammalian Parvoviruses". Cold Spring Harbor. p. 479.
- SKIADOPOULOS, M.H., SALVINO, R., LEONG, W.L., and FAUST, E.A.** (1992) Characterization of linker insertion and point mutations in the NS-1 gene of Minute Virus of Mice - Effects on DNA replication and transcriptional activation functions of NS-1. *Virology* **188** : 122-134.

- SNYDER, R. O., IM, D.S., and MUZYCZKA, N.** (1990) Evidence for covalent attachment of the Adeno-Associated Virus (AAV) rep protein to the ends of the AAV genome. *J. Virol.* **64** : 6204-6213.
- SNYDER, R.O., SAMULSKI, R.J., and MUZYCZKA, N.** (1990) In vitro resolution of covalently joined AAV chromosome ends. *Cell* **60** : 105-113.
- SOUTHERN, P.J., and BERG, P.** (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Gen.* **1** : 327-341.
- 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.
- SPANDIDOS, D.A.** (1988) *Ras* oncogenes in cell transformation. *ISI At. Sci. Imm.* : 1-6.
- SPEGELAERE, P., VAN HILLE, B., SPRUYT, N., FAISST, S., CORNELIS, J.J., and ROMMELAERE, J.** (1991) Initiation of transcription from the Minute Virus of Mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a c-Ha-*ras* oncogene. *J. Virol.* **65** : 4919-4928.
- SPRECHER-GOLDBERGER, S., DEKEGEL, D., OTTEN, D., and THIRY, L.** (1970) Incidence of antibodies to Adenovirus-Associated Viruses in patients with tumors or others diseases. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **30** : 16-21.
- SPRECHER-GOLDBERGER, S., THIRY, L., LEFEVRE, N., DEKEGEL, and DE HALLEUX, F.** (1971) Complement fixation antibodies to Adenovirus-associated viruses, Adenoviruses, cytomegalovirus and Herpes Simplex Viruses in patients with tumors and control individuals. *Am. J. Epidemiol.* **94** : 351-358.
- 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.
- STACEY, D.W., and ALLFREY, V.G.** (1976) Microinjection studies of duck *globin* messenger RNA translation in human and avian cells. *Cell* **9** : 725-734.
- STEHELIN, D., and MARTIN, P.** (1988) Retrovirus with two oncogenes. *Haematol. & Blood Transf.* **31**.
- 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.
- STRICKLAND, S., and MAHDAVI, V.** (1978) The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* **15** : 393-403.
- SU HUANG, H.J., YEE, J.K., SHEW, J.Y., CHEN, P.L., BOOKSTEIN, R., FRIEDMANN, T., LEE, E.Y.H.P., and LEE W.H.** (1988) Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the *Rb* gene in human cancer cells. *Science* **242** : 1563-1566.

- 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** : 1395-1400.
- TABIN, C.J., BRADLEY, S.M., BARGMANN, C.I., and WEINBERG, R.A., PAPAGEORGE, A.G., and SCOLNICK, E.M., DHAR, R., LOWY, D.R., and CHANG, E.H.** (1982) Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* **300** : 143-149.
- TATTERSALL, P.** (1972) Replication of the parvovirus MVM. I. Dependence of virus multiplication and plaque formation on cell growth. *J. Virol.* **10** : 586-590.
- TATTERSALL, P.** (1978) Susceptibility to Minute Virus of Mice as a function of host-cell differentiation. In (Ward, D.C. and Tattersall, P. eds-) "Replication of mammalian Parvoviruses", Cold Spring Harbor : 131-149.
- TATTERSALL, P., and BRATTON, J.** (1983) Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of Minute Virus of Mice. *J. Virol.* **46** : 944-955.
- TATTERSALL, P., and COTMORE, S.F.** (1990) Reproduction of autonomous Parvoviruses. In Tijssen, P. (ed.), *Handbook of Parvoviruses*. CRC Press Inc, Boca Raton, FL U.S.A. vol I : **8** : 123-140.
- TATTERSALL, P., and GARDINER, E. M.** (1990) Autonomous Parvovirus-host-cell-interactions. In Tijssen, P. (ed.), *Handbook of Parvoviruses*. CRC Press Inc, Boca Raton, FL U.S.A. vol I : **7** : 111-121.
- TATTERSALL, P., and WARD, D.C.** (1978) The Parvoviruses. In (Ward, D.C., and Tattersall, P. eds-), "Replication of Mammalian Parvoviruses". Cold Spring Harbour. : 3-12.
- TATTERSALL, P., CAWTE, P.J., SHATKIN, A.J., and WARD, D.C.** (1976). Three structural polypeptides coded for by Minute Parvovirus of Mice, a parvovirus. *J. Virol.* **20** : 273-289.
- TATTERSALL, P., SHATKIN, A.J., and WARD, D.C.** (1977) Sequence homology between the structural polypeptides of Minute Virus of Mice. *J. Mol. Biol.* **111** : 375-394.
- TELERMAN, A., TUYNDER, M., DUPRESSOIR, T., ROBAYE, B., SIGAUX, F., SHAULIAN, E., OREN, M., ROMMELAERE, J., and AMSON, R.** (1993). A model for tumor suppression using H-1 parvovirus. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **90** : 8702-8706.
- THOMPSON, L.** (1992). At age two, gene therapy enters a growth phase. *Science* **258** : 744-746.
- TOBIASCH, E., RABREAU, M. AND SCHLEHOFFER, J.R.** (submitted 1993) Detection of Adeno-Associated Virus DNA and proteins in the trophoblast of spontaneously abortion.
- TOOLAN, H.W.** (1960) Experimental production of mongoloid hamsters. *Science* **131** : 1446-1449.

- TOOLAN, H.W.** (1961) Studies on a viral agent associated with human tumors. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. **3** : 273.
- TOOLAN, H.W.** (1967) Lack of oncogenic effect of the H-viruses. Nature **214** : 1036-1039.
- TOOLAN, H.W., and LEDINKO, N.** (1965) Growth and cytopathogenicity of H-viruses in human and simian cell cultures. Nature **208** : 812-813.
- TOOLAN, H.W., and LEDINKO, N.** (1968) Inhibition by H-1 virus of the incidence of tumors produced by Adenovirus 12 in hamsters. Virology **208** : 812-813.
- TOOLAN, H.W., RHODE, S.L. 3D, and GIERTHY, J.F.** (1988) Inhibition of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced tumors in Syrian hamsters by prior infection with H-1 parvovirus. Cancer Res. **42** : 82552-2555.
- 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.
- TYSON, J.J., CHEN, K.C., LEDERMAN, M., and BATES, R.C.** (1990) Analysis of the kinetic hairpin transfer model for parvoviral DNA replication. J. Theor. Biol. **144** : 155-169.
- URCELAY, E., WEITZMAN, M.D., SAFER, B., and KOTIN, R.M.** (1993) The integration locus for AAV DNA contains an origin of replication responsive to recombinant Rep. Vth Parvovirus Workshop, Crystal River, Florida (USA).
- VAN DOEREN, K., HANAHAN, D., and GLUZMAN, Y.** (1984) Infection of eukaryotic cells with helper-independent recombinant Adenovirus: early region 1 is not obligatory for integration of viral DNA. J. Virol. **50** : 606-614.
- 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 non-structural proteins may determine the extent of sensitization of *EJ-ras*-transformed rat cells to Minute Virus of Mice. Virology **171** : 89-97.
- VANACKER, J.M., PERROS, M., DUPONCHEL, N., and ROMMELAERE, J.** (submitted 1993) Transcriptional activities exerted by the non-structural proteins of parvovirus MVMP.
- VAITHILING, G.D., et al.** (1973) Standard karyotype of Norway rat, *Rattus norvegicus*. Cytogenet. **12** : 199-205.
- VENKATESH, L.K., ARENS, M.Q., SUBRAMANIAN, T., and CHINNADURAI, G.** (1990) Selective induction of toxicity to human cells expressing Human Immunodeficiency Virus type 1 tat by a conditionally cytotoxic Adenovirus vector. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87** : 8746-8750.
- WALSH, C.E., LIU, J.M., XIAO, X., YOUNG, N.S., NIENHUIS, A.W., and SAMULSKI, R.J.** (1992) Regulated high level expression of a human *gamma-globin* gene introduced into erythroid cells by an adeno-associated virus vector. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89** : 7257-7261.

- WALTON, T.H., MOEN, P.T., FOX, E., and BODNAR, J.W.** (1989) Interactions of Minute Virus of Mice and Adenovirus with host nucleoli. *J. Virol.* **63** : 3651-3660.
- WALZ, C.M., and LAVI, S.** (1993) The mechanism of AAV mediated cell death in chinese hamster cells. Vth Parvovirus Workshop, Crystal River, Florida (USA).
- 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.
- WALZ, C., and SCHLEHOFER, J.R.** (1989) Stable integration of AAV DNA induces growth retardation and enhanced sensitivity to mutagenes in HeLa cells. IIIrd EMBO Parvovirus Workshop, Ma'ale Hachamisha (Israël).
- WALZ, C., SCHLEHOFER, J.R., FLENTJE, M., RUDAT, V., and ZUR HAUSEN, H.** (1992) Adeno-Associated Virus sensitives HeLa cell tumor to gamma rays. *J. Virol.* **66** : 5651-5657.
- WARD, D.C., and TATTERSALL, P.** (1982) Minute Virus of Mice. In (Academic press, Inc.), "The mouse in biochemical research". **11** : 313-334.
- WEINBERG, R.A.** (1988) Les anti-oncogènes. *Pour la Science* **133** : 72-79.
- WEITZMAN, M.D., KYOSTIO, S.R.M., KOTIN, R.M., and OWENS, R.A.** (1993) Adeno-Associated Virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and the human integration site. Vth Parvovirus Workshop, Crystal River, Florida (USA).
- WELSH, J., and MCCLELLAND, M.** (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18** : 7213-7218.
- WELSH, J., PETERSEN, C., and MCCLELLAND, M.** (1991) Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse : application to strain identification and genetic. *Nucleic Acids Res.* **19** : 303-306.
- WILSON, G.M., JINDAL, H.K., YEUNG, D.E., CHEN, W., and ASTELL, C.R.** (1991) Expression of Minute Virus of Mice major non-structural protein in insect cells - Purification and identification of ATPase and Helicase activities. *Virology* **185** : 90-98.
- WINOCOUR, E., CALLAHAM, M.F., and HUBERMAN, E.** (1988) Perturbation of cell cycle by Adeno-Associated Virus. *Virology* **167** : 393-399.
- WINOCOUR, E., and KESHET, I.** (1980) Indiscriminate recombinant in Simian virus 40-infected monkey cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77** : 4861-4865.
- WOLTER, S., RICHARDS, R., and ARMENTROUT, R.W.** (1980) Cell cycle-dependent replication of the DNA of Minute Virus of Mice, a parvovirus. *Biochim. Biophys. Acta* **607** : 420-431.
- YAKOBSON, B., KOCH, T., and WINOCOUR, E.** (1987) Replication of Adeno-Associated Virus in synchronised cells without the addition of a helper virus. *J. Virol.* **61** : 972-981.

YALKINOGLU, A.Ö., HEILBRONN, R., BÜRKLE, 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.

YANAGIHARA, K., CIARDIELLO, F., TALBOT, N., MCGEADY, M.L., COOPER, H., BENADE, L., SALOMON, D.S., and BASSIN, R.H. (1990) Isolation of a new class of "Flat" revertants from *ras*-transformed NIH3T3 cells using cis-4-hydroxy-L-proline. *Oncogene* **5** : 1179-1186.

YANG, T.J. (1987) Parvovirus-induced regression of canine transmissible venereal sarcoma. *Am. J. Vet. Res.* **48** : 799-800.

YOSIDA, T.H. (1973) Evolution of karyotypes and differentiation in 13 *Rattus* species. *Chromosoma.* **40** : 285-297.

YOSIDA, T.H., KATO, H., TSUCHIYA, K., MORIWAKI, K. OCHIAI, Y., and MONTY, J. (1979) Mauritius type black rats with peculiar karyotypes derived from robertsonian fission of small metacentrics. *Chromosoma* **75**: 51-62.