



HAL
open science

Protéine NS1 du parvovirus H-1 et induction de la mort cellulaire dans des cellules humaines normales et transformées

Pierre Wizla

► **To cite this version:**

Pierre Wizla. Protéine NS1 du parvovirus H-1 et induction de la mort cellulaire dans des cellules humaines normales et transformées. Biologie cellulaire. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT: . tel-00499417

HAL Id: tel-00499417

<https://theses.hal.science/tel-00499417>

Submitted on 9 Jul 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Lille 2 – Droit et Santé

Thèse

Protéine NS1 du parvovirus H-1
et induction de la mort cellulaire
dans des cellules humaines
normales et transformées

Présentée et soutenue publiquement par

Pierre Wizla

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université
en Sciences de la Vie et de la Santé

devant un jury composé de :

Pr. Didier Hober (Président)

Dr. Annick Brandenburger (Rapportrice)

Pr. Dr. Jörg Schlehofer (Rapporteur)

Pr. Jean Rommelaere (Examineur)

Pr. Dominique Stéhelin (Directeur de thèse)

*A mes grands-parents Bruno, Berthie et Robert
Je suis sûr que, de là-haut, on a une vue magnifique.*

*En espérant que ma modeste contribution aide un jour à vaincre
ce qui ne m'a pas tué.*

« Ce qui ne nous tue pas, nous rend plus fort. »

Friedrich Nietzsche

*« They who dream by day are cognizant of many things
which escape those who dream only by night. »*

Edgar Allan Poe

*« Moi, le cancer, je n'en ai pas.
Je n'en aurai jamais de toutes façons,
je suis contre. »*

Pierre Desproges

Les travaux présentés dans ce manuscrit
ont pu être réalisés grâce au soutien financier de :

la Région Nord-Pas-de-Calais,

qui a notamment financé à 100 % mon Allocation de Recherche pendant 3 ans



diverses fondations :

le Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (GEFLUC)

l'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC)

la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), comité du Nord-Pas-de-Calais

et la Ligue contre le Cancer



l'Université de Lille 2



et le Centre National de la Recherche Scientifique



REMERCIEMENTS

Version officielle

Je tiens à remercier :

Le **Professeur Dominique Stéhelin**. Vous m'avez accueilli au sein de votre groupe, dans une période qui était difficile pour moi. Je cherchais ma voie, ne supportait plus la relative linéarité des cours dispensés à l'université, et voulais relever de nouveaux challenges. Vous m'avez permis de m'épanouir en me donnant tous les moyens nécessaires et une pleine autonomie pour réaliser mes projets, dans un contexte accueillant et propice à de belles découvertes. Je suis ravi d'avoir fait partie de « l'épopée Parvovirus » sous votre direction.

Le **Professeur Dr. Jörg Schlehofer** et le **Docteur Annick Brandenburger**. Je ne vous connais (presque) pas mais vous avez accepté sans aucune hésitation d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je vous en suis particulièrement reconnaissant. J'espère que la qualité de cet ouvrage sera à la hauteur de la confiance que vous m'avez accordée et de l'honneur que vous me faites en acceptant cette responsabilité. Votre expertise sur les parvovirus donnera lieu à de passionnantes discussions sur le sujet.

Le **Professeur Jean Rommelaere**. Avant que nous nous rencontrions, vous étiez une sorte de légende vivante pour moi, puisqu'au moins 80% des articles que je lisais portaient votre signature en dernier nom. Merci pour votre accueil chaleureux lors de mes quelques visites à Heidelberg. Je suis très honoré que vous ayez accepté de faire partie de ce jury et attends avec impatience votre regard critique et votre œil d'expert, qui feront naître d'intéressants débats.

Le **Professeur Didier Hober**. La presse grand public vous décrit parfois comme « l'homme qui passe son temps à traquer les virus ». C'est en tout cas sous ces termes que j'ai découvert votre nom. Votre avis de virologue avisé, tout en étant extérieur au domaine des parvovirus, sera infiniment utile pour juger mes travaux avec tout le recul nécessaire. Merci d'avoir également accepté de faire partie de mon jury sans aucune hésitation, j'en suis très honoré.

Le **Docteur Yvan de Launoit**. Vous m'avez accueilli au sein de votre unité, dans ce beau bâtiment qu'est l'IBL, qui comporte toutes les infrastructures et services nécessaires pour réaliser mes travaux dans les meilleures conditions qui soient. Merci pour tout cela.

Le **Docteur Perrine Caillet-Fauquet**. Vous étiez en quelque sorte une légende aussi pour moi puisque vous avez publié LE papier qui a montré le rôle de NS1 dans la cytotoxicité. Merci d'avoir rejoint notre équipe et de m'avoir épaulé sans relâche tout au long de cette thèse.

REMERCIEMENTS

Version pour ceux qui ont du temps à perdre, envie de lire une belle histoire,
la patience de lire jusqu'au bout mes divagations, ou qui pensaient (à tort) avoir été oubliés *

Placer simplement un grand "MERCI" écrit en caractères de taille 44 en travers de cette page aurait pu traduire ma pensée. Cela aurait également pu me...

Comment ? Attendez, un instant s'il-vous-plaît... Oui ? ... Ah... Vous êtes sûr ? OK. Bien.

On me dit dans l'oreillette que j'ai déjà utilisé cette formule pour mon mémoire de Master 2. Soit... soyons original, alors.

J'ai des tonnes de gens à remercier ici. Et je ne vais pas me contenter de faire une bête liste de noms, mais chacune et chacun aura le droit à son petit commentaire. Vous êtes certain de vouloir lire jusqu'au bout ? OK. Ne me dites pas que vous n'avez pas été prévenu. Et je ne rembourse pas, non plus, si à la fin vous n'êtes pas satisfait. Bien. Paraphez au bas de chacune des pages et signez... ici... et là... Voilàààà. Paaaaarfait ! On va pouvoir commencer.

Ah oui, j'oubliais. Il n'y a aucun ordre dans ces remerciements. Je remercie les gens au moment où leur nom me traverse l'esprit. Et oui, je suis suffisamment torturé pour ne pas créer de hiérarchie. Je suis un rebelle, moi, même pas peur. J'en entends un au fond là-bas qui dit : « bon, c'est bon ? on peut commencer maintenant ? » Oui, oui... Impatient, va !

Je vous ai parlé de mon poisson rouge qui ... Non, je déconne. On va vraiment commencer.

Bon... *raclement de gorge...*

Je remercie ma famille. Oui, Maman et Papa, sans vous, je ne serai pas là (lapalissade). Mais je veux dire, pas uniquement physiquement pas là. En dehors du fait que Papa a mis la petite graine et que Maman m'a supporté 9 mois dans son ventre, je ne serai jamais arrivé à ce niveau d'études si vous ne m'aviez pas accordé tout ce soutien, tout cet amour. Vous m'avez donné toutes les chances. Merci du fond du cœur. Et toi non plus, frérot, je ne t'oublie pas ! Toi aussi, Hervé, tu m'as donné beaucoup d'amour, de soutien, de complicité, tu as donné sans forcément recevoir, parce que quelque part, je suis toujours un peu trop ingrat. Heureusement que ces quelques lignes sont là pour tenter de rattraper ça... Rien, personne, ne pourra remplacer ce que vous avez tous les trois fait pour moi pendant ces presque 29 ans. Et nous sommes bien d'accord, si vous n'aviez pas été là au moment le plus dur de ma vie, celui où j'ai dû subir cette maladie de merde, je ne serai aussi physiquement plus là. On a passé tout ça ensemble, et on l'a tous vaincu.

Je vous aime.

Et merci à toute ma famille au sens élargi, mes cousin / cousine Caroline et Sébastien, mes tantes Dolorès et Béatrice, mon oncle Marcel, ma mamie Michèle, et la famille encore plus élargie, avec notamment Chloé, la cousine cachée !! Je vous aime tous aussi.

* rayer la (ou les) mention(s) inutile(s)

OK, on sent l'émotion pointer. Mais si le petit du fond pouvait arrêter de pleurer et ranger son mouchoir, ou au moins, faire moins de bruit en se mouchant. Merci...

Audrey, Ingrid, Ghaffar, Nathalie, Annie. Vous avez fait comment, pour me supporter, pendant tout ce temps ? Je veux dire, je ne mets pas en doute le fait que vous êtes les meilleurs collègues du monde (pas de l'Univers, parce que sur Proxima du Centaure, je connais un qui... mais bref, je m'égare...)

Audrey, je sais comment tu as fait pour me supporter. De la même manière que j'ai fait pour *te* supporter. Mouahaha. Avec beaucoup de stoïcisme, d'élégance, de don de soi et... d'onomatopées. Allez, avoue, tu vas pleurer quand je vais partir, non ? Comment ça, non ? Même pas un tout petit peu... ? Aaaah, si, quand même ! Bon, sans blagues, c'était génial de passer cette épreuve de la thèse avec toi, de ne plus être le seul étudiant en train de ramer, de déprimer, de pleurer parce que les manip ne marchaient pas (qui a dit que j'étais une chochette ?). C'était un bonheur de se faire péter les rotules, de se voir appuyer sur le clavier pour écrire des mots aussi intéressants que mlfjzmefn ou encore lfjzempl (imparfait du subjonctif du mot précédent). De prendre des pauses café sur la terrasse ou ailleurs. De discuter science, aussi, parfois (si, si, ça nous arrivait). Je t'ai apprécié entre autres parce que globalement, tu étais tout ce que je n'étais pas. Je veux dire, à la base, si Dieu avait voulu créer deux êtres aux caractères plus opposés que les nôtres, il se serait mordu les ***** plusieurs fois avant d'y arriver. Et pourtant, ça a fonctionné. Extrêmement bien, j'ai beaucoup apprécié ta présence, et... non, j'arrête, c'est trop dur, je vais pleurer aussi... Oh, mais ta g***** toi, là-bas, au fond, moins fort quand tu te mouches, bordel ! Bref. Bonne chance pour la suite. Et tu ne te débarrasseras pas comme ça de moi. Je serai là, à ta thèse, niark niark niark.

Ingrid. Toi aussi je sais comment tu m'as supporté. Parce que tu es aussi folle et rêveuse que moi. Mouahahahaha. Euh, désolé... On a appris à se connaître, on a refait le monde au travers de conversations abordant des sujets aussi métaphysiques que l'origine des expressions françaises ou le stockage des rames de métro pendant la nuit (on me dit dans l'oreillette que, ça aussi, je l'ai déjà dit dans mes remerciements de Master 2... et je dis à l'oreillette qu'elle peut bien aller se faire voir et que je dis qu'est-ce-que-je-veux dans mes remerciements, OK ?!). Ton soutien psychologique sans faille s'est même transformé en soutien physique de premier choix pour m'aider à boucler mes expériences dans les temps, sur la fin de ma thèse. C'était bien, les après-midi nucléo, hein ? J'ai encore tes dédicaces. Bon évidemment, si j'obtiens un prix Nobel, je les brûlerai avant, afin d'effacer toute trace de ta participation. Tu ne m'en voudras pas, j'espère ? Merci encore pour tout. Bon, ensuite, tu es partie faire un bébé, mais ça, c'est une autre histoire. Et puis, ce n'est pas plus mal, car tu n'as pas trop connu du coup ma période de déchéance / ermite / j'arrive au labo à 14h, pas rasé, les yeux complètement écarquillés, l'air hagard de l'étudiant en fin de thèse, quoi. Nos échanges m'ont beaucoup manqué, pendant cette période. Mais c'est la loi de la vie. J'avais déjà bien profité de ta patience avant ;-))

Audrey et Ingrid, votre rigueur scientifique m'a aussi permis de recadrer mes pensées loufoques et ma façon de fonctionner pas assez... scientifique. Merci d'avoir remis la brebis dans le droit chemin.

Ghaffar. Toi aussi, je sais pourquoi tu m'as supporté. Car Bouddha, à côté, il fait pitié. Tu aurais pu supporter un train qui aurait roulé sur ton gros orteil gauche 53 fois. En marche avant ET en marche arrière. Le Zen par excellence. On est arrivés quasiment en même temps dans le groupe parvo. Bon, tu es parti avant moi, sale traître... Euh, pardon, je m'égare... Ta gentillesse, ton accueil chaleureux (aussi bien au labo que lors de soirées mémorables chez toi) m'ont grandement aidé. Tu m'as aussi beaucoup appris, après tout tu étais à la fois suffisamment proche des étudiants pour comprendre leur fonctionnement, suffisamment « nouveau docteur » pour guider les petits nouveaux, et suffisamment « déjà docteur » pour épauler, encadrer, structurer ma pensée. Et puis, parmi beaucoup d'autres choses, tu m'as appris à utiliser le cytospin, conseillé pour les immunofluorescences, l'utilisation des microscopes... bref, montré des tas de manips et surtout, surtout, tu m'as permis d'avoir un nom dans Pubmed, avant mon propre article, et ça, c'est *priceless*. Merci pour tout, et bonne chance à Helsinki, on ne t'oubliera pas, Gafounet.

Annie et Nathalie, on ne s'est pas nécessairement beaucoup côtoyés, à cause de la « distance physique » entre nos bureaux, au contraire des zozos, moi compris, qui peuplaient le « bureau parvo ». Mais j'ai beaucoup apprécié votre compagnie, votre humour, votre gentillesse, votre accueil, votre dévouement pour le groupe, vos conseils et nos discussions rares mais intenses. Vous avez chacune rejoint d'autres cieux, pour l'une plus ensoleillés, pour l'autre, plus gris mais plus « élevés » physiquement. Mais je ne vous oublie pas. Merci et bonne chance pour la suite !

Fiou... Vous êtes encore là, vous ? Ah ben oui, vous n'avez toujours pas été cités. Ça va venir. Je bois une petite gorgée et... voilà. Fais chaud, hein, ici ? Non ? Vous avez raison. Et d'abord on s'en fout, en fait.

Les parvos au sens large, c'est aussi... Agnès. Votre sens du clonage... Ah la la, quelle histoire. Irremplaçable. Je n'ai jamais vu quelqu'un chérir autant ses bactéries, être capable de mettre au point un protocole *en live sans filet*, résoudre les plus complexes des problèmes de PCR... aussi bien que vous. Merci pour toute votre aide, et en particulier pour la construction des clones que j'ai appelés pNS1wt et pNS1-S473A, c'est toute ma vie dans ce labo !

Les parvos au sens large, c'est aussi... Christian. Tu es parti trop vite. Du labo... et du reste. Tu nous manques. Même pas eu le temps de bien profiter de ta retraite. Merci pour tout ce que tu m'as appris sur la culture cellulaire, et sur la vie en général.

Et les parvos au sens large, c'est aussi les stagiaires que nous avons accueillis. Enfin, ceux qui m'ont marqué. Aline, Valérie, Marion, Maxime, Margot, Claire, Agathe, et bien sûr Anne-Lucie. Quelle aventure, Anne-Lu, hein ? Je suis sûr que toute ta vie, tu te souviendras du meilleur tuteur du monde, qui a dû te faire pleurer / t'énerver plein de fois, mais qui t'as tant appris. Ou pas. Mouahaha. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ton aide et ta persévérance sur ton projet qui était *mon* projet aussi, et pour être devenue l'amie fidèle que tu es aujourd'hui.

Je n'oublie pas Gaëlle non plus. Ton passage chez nous a été court, mais fort appréciable. Ta bonne humeur et ta joie de vivre font plaisir à voir. Finalement, j'oserai presque dire que c'est tant mieux pour nous que tu aies développé cette allergie aux œufs, parce que sinon, on ne t'aurait jamais connue ! Bon OK, c'est un peu moche de dire ça. Mais quand même. Je suis bien content que tu sois « revenue » dans le Nord. Et puis, même si tu n'es plus dans les parvos à l'heure où j'écris ces lignes, tu es chez les voisins d'en face, ce n'est pas si loin.

Les parvos, je vous aime.

Et les parvos au sens large... mais non, voyons, je ne vous avais pas oubliées ! Ce sont nos super secrétaires de luxe, Nicole et Marie-Christine. Je pense qu'il n'existe pas une seule secrétaire au monde, et encore moins deux, qui auraient pu supporter la charge de travail que je vous ai demandée, sans broncher et avec toute la gentillesse du monde, le sourire aux lèvres. J'étais chiant, je sais. Si ça peut vous rassurer, tout le monde me le dit. Demandez à ma maman, tiens ;-))

Vous avez toujours été là pour résoudre tous mes problèmes en un rien de temps. Pour nous prévenir à chaque fois qu'on recevait un colis, pour les trier, pour gérer toutes nos commandes, nos déplacements, nos coups de fil... Pour nous écouter, partager nos peines alors que vous aviez déjà largement les vôtres, et nous faire rire malgré tout. Merci du fond du cœur. Ma thèse n'aurait pas pu arriver à son terme sans vous non plus.

Elargissons.

Je remercie toutes celles et ceux qui m'ont côtoyé à l'IBL. Toutes ces personnes avec qui j'ai noué des liens d'amitié. Marion, Cindy, Capucine, Sébastien (Martien), Majid, Alex, Gaylor, Loïc, Marie-Véronique, Tian, Séb (Pinte), Fred, Béné, Jonathan, Suzanne, Gauthier, Aymeric, Nicolas, Franck, Guillaume, Alioune, Vanessa, Sophana, Olivier, Céline, Pierre-Yves, Kathye...

Merci au service informatique, Karl en particulier qui m'a accordé la confiance nécessaire pour devenir administrateur des ordinateurs du groupe parvo et qui a répondu à toutes mes exigences tout en m'ayant beaucoup appris en informatique, le tout avec beaucoup de sympathie. Merci aussi à Hubert, Geoffrey et Guillaume. Vous avez fait et faites du très bon travail, pour nous fournir un très haut niveau de service à l'IBL et une grande flexibilité. Merci également au service technique, Hughes, Jean-Yves et Marc, aux dames de la laverie qui se levaient très tôt pour chouchouter tout notre matériel et le remettre à sa place, tels des petite lutins... et qui nous ont accueilli les bras ouverts pour certains pots d'anniversaire, toujours avec le sourire. Merci aussi aux services administratifs qui font fonctionner tout ce bâtiment, et en particulier à Josiane Pesant, Philippe Boutin et Francine Cluckers.

Merci au véhicule IBL, ce fameux Scénic avec lequel j'ai fait bien des kilomètres, en tant que passager de Paris jusqu'au Luxembourg, ou en tant que conducteur jusqu'à Heidelberg aller/retour (neige et verglas aux alentours de l'Alsace, que de souvenirs ! tu tiens bien la route, titine, merci de nous avoir ramené à bon port !)

Merci aux organisateurs des congrès auxquels j'ai pu assister. Cordoba, Les Diablerets... c'était magique. Merci aussi à ceux qui m'ont permis d'y aller, à ceux qui m'y ont accompagné, et à tous ceux que j'y ai rencontré.

Merci aux ordinateurs qui m'ont permis de travailler et de me détendre. Le plus ancien d'entre eux, mon portable Toshiba qui est en fin de vie, chez moi. L'Acer, des parvos, *laptop* super performant mais qui a attrapé une infection pulmonaire sur la fin et toussait plus qu'un mineur de carrière. Parvo-1, qui a encaissé sans broncher toutes les demandes de gestion de sauvegarde que je lui ai demandées, pour le bien du groupe, et qui encore aujourd'hui reste le maître du jeu, celui qui fait tourner la maison. Et mes chers petits derniers iMac et MacBook personnels, sur lesquels j'ai entre autres écrit ce roman.

Merci aux membres du G2, cette fausse multinationale créée lors des Doctoriales 2008. Jaouad, Diana, Lucie, Fleur, Audrey, Khodor, Fadila. On a passé de super moments ensemble à concevoir ce Frigo Mémo. Et je maintiens qu'on aurait pu se faire des sous en le commercialisant ;-))

Merci aussi à tous les amis que je me suis faits au gré de rencontres gravitant autour des formations de la thèse. Je pense en particulier à Céline (Cudejko), Estelle (Adje) et Caroline (Ballot).

Merci à Sophie, la chérie et fiancée de mon frérot.

Merci Facebook de m'avoir permis de rester en contact avec ceux que j'aime, voire de retrouver des gens que j'aime comme Lucie (Duflot) (merci pour ton accueil chaleureux à Colombiers) et Valentine (Vaudey) (merci pour ton soutien sans faille, on a galéré ensemble pour notre thèse !), ou même de découvrir une cousine cachée.

Et enfin, *last but not least*, merci à mes *super* amis à Lausanne, ma Diana, ma Valou, et mon Gigi. J'ai vraiment très bien fait d'assister à cette formation à Genève il y a de cela déjà 4 ans, si c'est pour rencontrer quelqu'un d'aussi adorable que Diana et pour qu'elle me présente des amis tout aussi adorables. Nos moments passés à Lausanne resteront gravés dans ma mémoire, du *googling* de noms, au manège de la mort, en passant par la raclette en fête, la *black and white* et sa semaine surprise, le DGM *meeting* au chalet. Je vous aime, les amis ! Merci d'avoir été là pour moi quand il le fallait, et, patience, j'arrive dans peu de temps maintenant, ce n'est que le début ! J'ai découvert une Suisse que je ne connaissais pas, et je vais l'épouser, c'est décidé.

C'est l'heure du vrac. Je remercie : Resident Advisor pour avoir distillé de si bons mixes qui m'ont accompagné pendant ces trois ans et en particulier pendant mes longues nuits de rédaction. Idem pour les mixes de Lars Behrenroth et ceux d'Audiogrooves et Deepmix.ru. Plus généralement, tous les artistes qui ont rythmé ou mélodié ma vie toutes ces années. La musique, c'est ma vie. Merci aussi à l'équipe du At Home Café, François 'deep', Johann, Sarah, Myriam... pour ces belles soirées et pour votre accueil chaleureux lors de mon arrivée sur Lille. Merci à la pluie de m'avoir tenu compagnie en claquant sur les fenêtres lors de ces longues soirées d'hiver 2009 à l'IBL, où j'avais l'impression d'être le fantôme des lieux. Merci Facebook d'avoir avalé sans broncher tous ces statuts, commentaires et liens plus inutiles les uns que les autres... Merci à Céline Guenebeaud et Patrick Mehlen pour leur collaboration. Merci à Agathe d'avoir croisé ma vie. Merci aux Monty Python, aux Nuls et aux Robins des Bois d'être aussi drôles. Merci à mon orchidée et mon yucca d'avoir apporté un peu de verdure dans mon chez-moi. Merci au Dr. Marie-Christine Baranzelli de m'avoir si bien accompagné au C.O.L. Merci aux chefs du R+3 de l'IBL qui savent rester accessibles. Merci à Steve Jobs de concevoir des machines si belles et performantes. Merci à l'Ecole Doctorale de proposer des formations enrichissantes (anglais professionnel, gestion de projet, nouveau chapitre de la thèse...). Merci spécialement à Claudine Dumont pour ses initiatives, à Serge Bossut pour cette expérience très enrichissante du NCT. Merci aux sushis. Merci à ma bouilloire électrique d'avoir assuré pour autant de thés. Merci à mon lit. Merci aux chocolats du Migros et aux bonbons en général. Merci à Lille, c'est une chouette ville (et en plus, ça rime).

Ah oui, et j'oubliais : merci à ce cancer à la con qui m'a pourri la vie pendant un petit moment, mais qui finalement fait que je ne serai plus jamais comme avant, et n'en serai peut-être pas là, aujourd'hui, à rédiger une thèse sur un virus oncolytique. Finalement, tu as donné un sens à ma vie, en quelque sorte.

Voilà. Je n'en reviens pas que vous ayez eu la patience de lire jusque là et... comment ? ah... oui, OK... d'accord... hmmm... bon je conclus,

On me dit dans l'oreillette que je dois rendre l'antenne.

Mais attendez, ne partez pas. Le programme qui suit est intéressant aussi. Les choses sérieuses commencent *maintenant*. Bonne lecture !

Lille, samedi 9 janvier 2010, 06 :11 (du matin, bien sûr)

(et oui, on garde les habitudes de thésard pour qui la notion de temps n'existe plus...

dormir ? pfff, ça sert à quoi, ce truc ?)

Pierre Wizla

« Salut, et encore merci pour le poisson ! »

Douglas Adams

Table des Matières

I. INTRODUCTION

<u>PREAMBULE</u>	<u>1</u>
<u>I.1. QUELQUES GENERALITES SUR LES PARVOVIRIDAE</u>	<u>2</u>
I.1.1. Classification	2
I.1.2. Caractéristiques structurales	3
<u>I.2. CYCLE D'UN PARVOVIRUS DANS SA CELLULE-HOTE</u>	<u>4</u>
I.2.1. Trajet des parvovirus jusqu'au noyau de la cellule-hôte	5
I.2.1.1. <i>Entrée du virus dans la cellule</i>	5
I.2.1.2. <i>Transport des particules virales vers le noyau : Voie des endosomes</i>	6
I.2.1.3. <i>Relargage des virions dans le cytosol et entrée dans le noyau</i>	7
I.2.1.4. <i>Libération intranucléaire du contenu des particules virales</i>	8
I.2.2. Parvovirus et cellule-hôte	8
I.2.2.1. <i>Amplification virale</i>	9
I.2.2.1.1. Dépendance au cycle de la cellule-hôte	9
I.2.2.1.2. Réplication parvovirale	10
I.2.2.2. <i>Transcription et traduction</i>	11
I.2.2.3. <i>Formation de nouveaux virions</i>	11
I.2.2.4. <i>Transport des virions néosynthétisés</i>	12
<u>I.3. PARVOVIRUS ET CANCER</u>	<u>14</u>
I.3.1. H-1, agent étiologique des cancers ?	14
I.3.2. Oncosuppression	14
I.3.3. Oncotropisme	15
I.3.4. Oncolyse	18

<u>I.4. PROTEINES PARVOVIRALES NON STRUCTURALES</u>	<u>20</u>
I.4.1. Activités de la protéine NS2	20
I.4.2. Les nombreuses activités de NS1 au cours du cycle viral	21
<i>I.4.2.1. Implication de NS1 dans la réplication parvovirale</i>	21
<i>I.4.2.2. Implication de NS1 dans la régulation de promoteurs</i>	22
<i>I.4.2.3. Implication de NS1 dans la cytotoxicité</i>	23
I.4.3. Régulation des activités de NS1	23
<i>I.4.3.1. Activités de NS1, localisation et trafic intracellulaires</i>	24
<i>I.4.3.2. Régulation de NS1 et phosphorylations</i>	24
<i>I.4.3.3. Dimension temporelle de la régulation de NS1</i>	25
<i>I.4.3.4. Création de nouveaux environnements intracellulaires</i>	26
I.4.4. Plusieurs façons d'induire la cytotoxicité	27
<i>I.4.4.1. Arrêt du cycle cellulaire</i>	27
<i>I.4.4.2. Induction de voies apoptotiques</i>	28
<i>I.4.4.3. Nécrose</i>	29
<i>I.4.4.4. Altérations du cytosquelette</i>	30
<u>BUT DE LA THESE</u>	<u>31</u>

R1. RESULTATS DU « PROJET NS1 »

<u>R1.1. CONTEXTE DU PROJET NS1</u>	
<u> ET RESULTATS PRELIMINAIRES</u>	<u>32</u>
R1.1.1. Présentation de la problématique, du modèle cellulaire	32
R1.1.2. Résultats préliminaires	34
<i>R1.1.2.1. Les cellules normales MRC-5 sont insensibles à l'infection par le PVH-1, contrairement à leurs homologues transformées MRC-5 SV2.</i>	34
<i>R1.1.2.2. La comparaison des séquences nucléotidiques de NS1 des parvovirus H-1 et MVM montre plus de 90% d'identité de séquence et la stricte conservation des résidus impliqués dans la cytotoxicité.</i>	35
<i>R1.1.2.3. Nous avons construit deux vecteurs permettant respectivement l'expression ectopique d'une forme native et d'une forme mutée (a priori non toxique) de NS1.</i>	36

<i>R1.1.2.4. Le rendement de transfection transitoire des MRC-5 obtenu par les techniques classiques est relativement faible et incompatible avec une interprétation correcte des phénomènes que nous souhaitons observer.</i>	37
<i>R1.1.2.5. La technique de « nucléofection » permet d'obtenir de très bons rendements de transfection transitoire et une faible toxicité dans les cellules MRC-5 et MRC-5 SV2.</i>	38

ARTICLE : <u>H-1 PARVOVIRUS NS1 PROTEIN ECTOPIC EXPRESSION INDUCES ACTIN FILAMENTS ALTERATIONS AND CELL DEATH IN HUMAN NORMAL MRC-5 AND TRANSFORMED MRC-5 SV2 CELLS</u>	40
---	----

R2. RESULTATS DU « PROJET NETRIN-1 »

<u>R2.1. CONTEXTE DU PROJET « NETRIN-1 »</u>	47
--	----

<u>R2.2. RESULTATS OBTENUS POUR LE PROJET « NETRIN-1 »</u>	50
--	----

R2.2.1. Les lignées cellulaires SK-BR-7, T-47D et MDA-MB-231 sont sensibles à l'infection par le parvovirus H-1.	50
R2.2.2. Les conditions de culture influent sur le niveau de sensibilité des lignées SK-BR-7 et T-47D au PVH-1, même si SK-BR-7 reste la lignée la plus sensible.	51
R2.2.3. Les conditions de culture influent sur la vitesse de croissance des lignées SK-BR-7 et T-47D, et donc sur leur niveau de sensibilité à l'infection par le parvovirus H-1.	52
R2.2.4. L'infection des lignées SK-BR-7 et T-47D par le parvovirus H-1 permet l'expression de la protéine parvovirale NS1.	53
R2.2.5. L'infection des SK-BR-7 par le parvovirus H-1 ne semble pas induire le clivage de la caspase 3.	53
R2.2.6. L'utilisation du DCC-5Fbn, inhibiteur de la netrin-1, provoque la mort des cellules SK-BR-7 mais n'induit pas l'activation de la caspase 3.	54
R2.2.6. L'infection par le parvovirus H-1 induit des changements morphologiques chez les cellules SK-BR-7.	55

ARTICLE : <u>PARVOVIRUS H-1 INDUCES CYTOPATHIC EFFECTS IN BREAST CARCINOMA-DERIVED CULTURES</u>	56
---	----

D. DISCUSSION

<u>D.1. A PROPOS DU « PROJET NS1 »</u>	<u>67</u>
D.1.1. Modèles d'expression de NS1	67
D.1.2. Nos résultats permettraient-ils une extension aux cellules humaines normales de travaux précédents effectués sur des cellules transformées ?	68
D.1.3. Vers une définition plus large de l'oncotropisme ?	69
<i>D.1.3.1. Notion de « seuil » d'expression de NS1</i>	70
<i>D.1.3.2. Importance des partenaires cellulaires de NS1 : La théorie des cibles</i>	71
D.1.3.2.1. NS1 est elle-même une cible de protéines de la cellule-hôte	72
D.1.3.2.2. NS1 interagit avec des cibles protéiques dans la cellule-hôte	73
<i>D.1.3.3. D'autres paramètres à prendre en compte</i>	75
D.1.3.3.1. Localisation intracellulaire de NS1	75
D.1.3.3.2. Coopération avec NS2	77
<i>D.1.3.4. Conclusion</i>	77
<u>D.2. A PROPOS DU « PROJET NETRIN-1 »</u>	<u>79</u>
D.2.1. Sensibilité des cellules à l'infection par le parvovirus H-1	79
D.2.2. Protéine NS1 et mort cellulaire	80
<i>D.2.2.1. Profil d'expression de NS1</i>	80
<i>D.2.2.2. Mort cellulaire induite par NS1</i>	81
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	<u>83</u>

A. ANNEXES

A.1. MATERIEL ET METHODES	I
A.1.1. Cellules	I
A.1.1.1. <i>Lignées cellulaires et milieux de culture</i>	I
A.1.1.2. <i>Entretien des lignées</i>	II
A.1.2. Expériences en contexte d'infection virale	II
A.1.2.1. <i>Procédure d'infection virale</i>	III
A.1.2.2. <i>Coloration au Giemsa</i>	III
A.1.3. Colorimétrie au MTT	III
A.1.4. Western Blot	IV
A.1.4.1. <i>Obtention d'extraits protéiques totaux</i>	IV
A.1.4.2. <i>Dosage des extraits protéiques</i>	IV
A.1.4.3. <i>Préparation des extraits protéiques dosés pour la migration</i>	V
A.1.4.4. <i>Migration</i>	V
A.1.4.5. <i>Transfert</i>	V
A.1.4.6. <i>Saturation des sites aspécifiques (« Blocage »)</i>	V
A.1.4.7. <i>Incubation dans des solutions d'anticorps primaire</i>	V
A.1.4.8. <i>Incubation dans des solutions d'anticorps secondaire</i>	VI
A.1.4.9. <i>Détection des protéines</i>	VI
A.1.5. Transfections	VII
A.1.5.1. <i>Lipofections</i>	VII
A.1.5.2. <i>Nucléofection</i>	VII
A.1.6. Immunofluorescence et microscopie confocale	VIII
A.1.7. Construction et préparation des plasmides	VIII
A.1.7.1. <i>Construction du vecteur pNS1wt</i>	VIII
A.1.7.1.1. <i>Stratégie de construction</i>	VIII
A.1.7.1.2. <i>Réalisation de la construction</i>	VIII
A.1.7.2. <i>Construction du vecteur pNS1-S473A</i>	IX
A.1.7.3. <i>Préparation des stocks de plasmide</i>	IX
A.2. BIBLIOGRAPHIE	X
A.3. ABREVIATIONS	XXIII

Le texte de ce manuscrit comporte un certain nombre de conventions d'écriture.

- Tout mot ou expression d'origine étrangère est indiqué *en italique*.
- Les abréviations sont définies entre parenthèses lors de leur première utilisation. Vous trouverez leur liste dans la toute dernière page de ce manuscrit, numérotée XXIII (section « Annexes »).
- Les références bibliographiques sont désignées par un [numéro en gris clair entre crochets], elles sont classées par ordre de première apparition dans le texte. La liste complète de ces publications est donnée en fin d'ouvrage, dans la section « Annexes » A.2., pages X à XXII.
- Les appels de figure dans le texte sont indiqués **en gras et en bleu**.
- Dans la section Résultats, vous trouverez, en dessous du titre de chaque paragraphe, un renvoi **en orange** qui vous indique le(s) paragraphe(s) de la section Matériel et Méthodes (située en Annexes, pages I à IX) que vous pouvez consulter si vous souhaitez avoir plus de détails sur la façon dont les expériences ont été menées.

Note au lecteur

Lors de la rédaction de l'introduction bibliographique de ce manuscrit, j'ai été constamment tiraillé entre le strict respect des règles académiques et l'envie de laisser libre cours à l'expression de ma créativité.

C'est la raison pour laquelle, pour chaque paragraphe de cette introduction, vous trouverez à la fois un titre « officiel », et un sous-titre « libre ». Le contenu des paragraphes reste, lui, aussi bien en ce qui concerne sa forme que son fond, dans le plus pur style académique de rigueur.

Je souhaite profondément que l'on ne voit pas, dans ce choix, un quelconque dénigrement des travaux effectués au cours de ces soixante dernières années sur les parvovirus autonomes. Bien au contraire, cela traduit une volonté de rendre hommage aux acteurs de cette recherche, en tentant d'imager le texte et de donner une dimension tour à tour épique, poétique ou humaine aux faits, et donc à leurs magnifiques découvertes.

J'espère que ce choix, certes risqué, mais montrant un véritable engagement personnel dans la rédaction, ne portera pas atteinte à la qualité globale du manuscrit. Et pour être franc, j'ose même espérer que cela n'en rendra la lecture que plus agréable, et que les lecteurs prendront au moins autant de plaisir à lire ces titres que j'en ai pris à les composer !

Pierre Wizla

Introduction

Préambule

Vous avez dit... insignifiant ?!

L'une des particularités des *Parvoviridae* est leur taille très réduite, qui à la fois définit et limite leur stratégie de parasites cellulaires. Les particules virales (communément appelées virions) mesurent une vingtaine de nanomètres seulement. Ceci fait figurer les parvovirus parmi les plus petits virus connus (*parvo* étant dérivé du latin *parvus*, qui peut être traduit par « de petite dimension », voire, par extension, par « insignifiant »). Leur génome ne code que deux gènes. La machinerie complexe dont ils ont besoin pour assurer leur existence les rend donc extrêmement dépendants de leur cellule-hôte et, dans certains cas, de divers virus plus élaborés, dits « auxiliaires ». De ce fait, les parvovirus sont devenus des maîtres à parasitisme, détournant les signaux de leur hôte pour leur propre amplification préférentielle. Ils peuvent également être des champions de la discrétion, parfois capables de persister sous forme d'infections latentes au cours desquelles ils sont à peine détectables — et vraisemblablement ignorés — par leur hôte. Chez l'Homme, certains d'entre eux, comme le parvovirus B19, sont des pathogènes notoires, alors que d'autres, pourtant largement répandus dans la population, établissent des relations asymptomatiques mais néanmoins persistantes avec l'hôte.

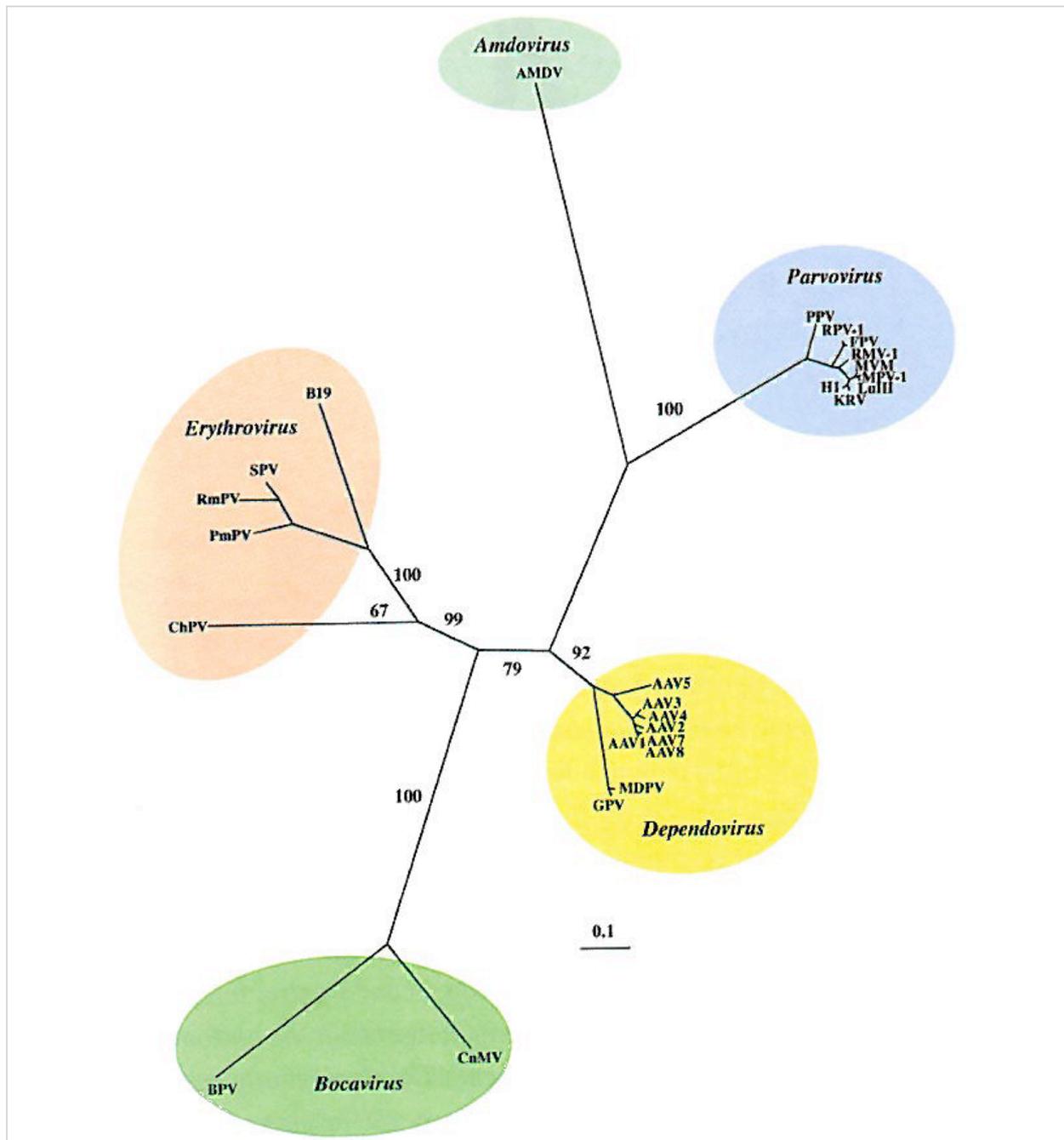


Figure I.1

Arbre phylogénétique de la sous-famille des *Parvovirinae* basé sur la comparaison des séquences nucléotidiques des protéines non structurales.

Extrait de l'illustration originale de Peter Tattersall [1]
 Merci à Eric Viscogliosi, Inserm U547, Institut Pasteur de Lille, pour les explications.

Les cinq genres de la sous-famille des *Parvovirinae* sont représentés par des ellipses de couleur. La longueur des branches est proportionnelle au nombre de différences observées d'après l'alignement des séquences nucléotidiques. L'échelle « 0,1 » est donnée à titre indicatif, signifiant que la longueur représentée pour cette échelle (soit 1cm) correspond à une différence de 10 nucléotides entre deux séquences (=10%, soit 0,1). Les valeurs indiquées aux nœuds correspondent aux valeurs de bootstrap et permettent d'évaluer la probabilité (en %) d'un regroupement de séquences à un nœud donné. Par exemple, la valeur 100 (%) figurée sur la branche menant au genre Parvovirus indique qu'il est extrêmement probable que ces espèces soient regroupées et donc phylogénétiquement très voisines.

I. 1. Quelques généralités sur les Parvoviridae*

Faisons connaissance avec la famille...

I.1.1. Classification

Un peu de taxonomie

On a tendance, par abus de langage, à parler de « parvovirus » pour désigner une famille de virus de petite taille à ADN simple brin. Mais la structure taxonomique de cette famille, dont le nom officiel est *Parvoviridae*, est plus complexe (**Figure I.1**), et le terme Parvovirus est en fait réservé à un petit genre de cette grande famille. Les *Parvoviridae* s'organisent en deux sous-familles.

La sous-famille des *Parvovirinae*, qui infectent uniquement les Vertébrés, comprend cinq genres :

- les *Dependovirus*, également appelés AAV (pour *Adeno Associated Viruses*), dépendent, comme leur nom l'indique, de virus « auxiliaires » (*helper viruses*, généralement des adénovirus ou des herpès virus) pour leur réplication
- les *Amdovirus*, dont le nom est un néologisme formé à partir du représentant principal de ce genre qu'est l'*Aleutian Mink Disease Virus*, responsable d'une maladie du vison à progression lente mais à l'issue fatale
- les *Bocavirus*, autre néologisme, condensation de 'bovin' et 'canin' en référence à deux hôtes de ce genre ; en 2005 a été découvert, dans des fluides des cavités nasopharyngées de patients suédois, un bocavirus humain (HBoV), qui pourrait être la cause d'affections respiratoires
- les *Erythrovirus*, qui comme leur nom l'indique également, montrent une réplication préférentielle dans les cellules précurseurs des érythrocytes ; le parvovirus B19, espèce majeure de ce genre, est l'un des *Parvoviridae* les plus connus en clinique humaine car c'est à ce jour le seul responsable d'affections chez l'Homme
- et les *Parvovirus* proprement dits, qui infectent diverses espèces de mammifères, et dont font partie les parvovirus de rongeurs tels que le parvovirus H-1, dont l'hôte naturel est le rat, et son cousin murin MVM

La seconde sous-famille, celle des *Densovirinae*, n'infecte que les Arthropodes et comprend trois genres : *Densovirus*, *Iteravirus* et *Brevdensovirus*. Les distinctions entre ces différents genres reposent majoritairement sur des critères d'organisation et de structure du génome : nombre de phases ouvertes de lecture, présence de brins négatifs et/ou positifs et distribution variable de ceux-ci, et conformation des palindromes terminaux.

* source : Virus Taxonomy Online : <http://www.virustaxonomyonline.com/virtax/lpext.dll?f=templates&fn=main-h.htm>

I.1.2. Caractéristiques structurales

Photo de famille

Les *Parvoviridae* sont des virus non enveloppés, d'un diamètre compris entre 18 et 26 nm, et dont la capsidie présente une symétrie icosaédrique. Ils montrent une grande stabilité : plus d'une heure de chauffage à 56°C, plusieurs mois voire plusieurs années d'incubation à température ambiante, l'utilisation de solvants lipidiques, ou une exposition à un pH compris entre 3 et 9, ne sont pas suffisants pour les détruire [2].

Leur ADN simple brin, long de 4 à 6 kilobases (kb), présente des structures palindromiques repliées en « épingles à cheveux » à ses extrémités. Leur génome ne renferme que deux phases ouvertes de lecture (ou ORF, pour *Open Reading Frame*). La première, appelée REP ou NS, code les protéines non structurales, essentielles pour la réplication de l'ADN viral (d'où le nom de l'ORF). La seconde ORF, appelée CAP (également appelée CP ou S) code les protéines de capsidie. Pour le genre Parvovirus, les protéines non structurales sont désignées par NS suivi d'un chiffre, et les protéines de capsidie par VP suivi d'un chiffre.

La masse d'un virion est d'environ 6 megaDalton. 80% de cette masse est de nature protéique, les 20% restants correspondant à des acides nucléiques, les *Parvoviridae* ne possédant ni structure lipidique, ni structure osidique.

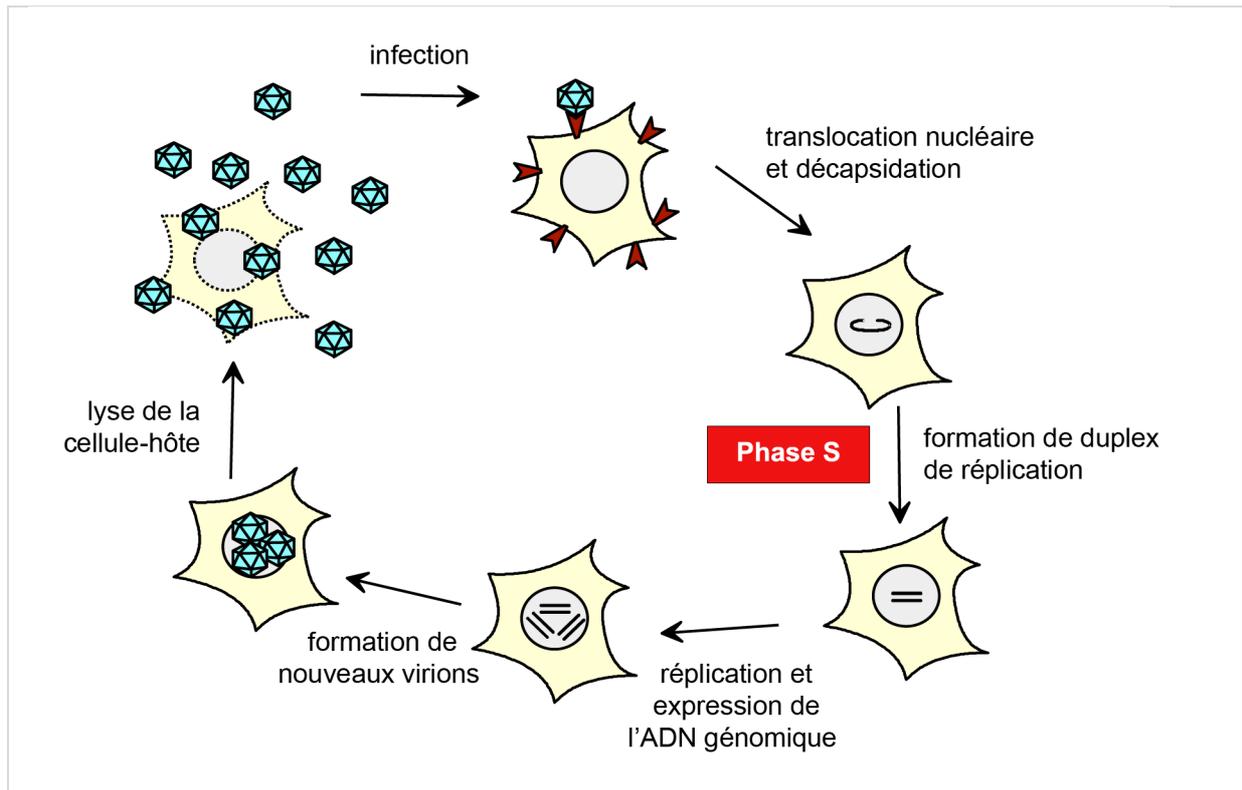


Figure 1.2

Grandes étapes du cycle des parvovirus autonomes.

Illustration aimablement communiquée par Virginie Eichwald.

Après son entrée dans la cellule, la particule virale est dirigée vers le noyau où elle est décapsidée. L'entrée de la cellule-hôte dans la phase S du cycle cellulaire permet de déclencher la réplication de l'ADN viral. L'expression du génome viral entraîne la production des protéines entrant dans la constitution des virions-fils. Ces nouveaux virions, une fois la cellule lysée, pourront à leur tour infecter d'autres cellules.

2. Cycle d'un parvovirus dans sa cellule-hôte

L'Iliade et l'Odyssée, version parvo

NB : Nous ne nous intéresserons maintenant qu'à deux parvovirus, du genre Parvovirus, dont les hôtes naturels sont des rongeurs : le parvovirus MVM et son cousin le parvovirus H-1. Le premier a pour hôte naturel la souris, le second, le rat. Ils partagent 86% d'identité de séquence. Cette forte similarité, qui se traduit aussi bien au niveau génomique qu'au niveau fonctionnel, implique que, de manière générale, on considère que ce qui a été observé chez MVM (beaucoup plus étudié) est extrapolable à H-1. Ainsi, dans toute la suite de cette introduction, sauf mention contraire, les données décrites seront issues de la littérature concernant le parvovirus MVM mais pourront être considérées comme valables pour le parvovirus H-1, et le terme parvovirus pourra être utilisé pour désigner indifféremment ces deux virus.

Les virus affectant les animaux ont développé des stratégies variées pour infecter leurs cellules-hôtes, mais toutes requièrent plus ou moins les mêmes conditions : adsorption à des récepteurs de la surface cellulaire, entrée dans le cytosol, libération du génome viral et adressage, vers les bons compartiments ou organelles cellulaires, du génome viral et de toute protéine cellulaire requise pour la réplication.

Alors que les virus enveloppés entrent bien souvent dans la cellule par la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, on sait beaucoup moins de choses à propos de l'entrée de virus non enveloppés tels que les parvovirus. Mais il est fort probable que le passage de la membrane cellulaire et la lyse des endosomes soient des mécanismes faisant intervenir au moins en partie la capsidite parvovirale. Les virus se répliquant dans le noyau de leurs cellules-hôtes, ils doivent être en mesure de transporter leur génome, d'abord à proximité du noyau, puis à travers les pores nucléaires. Pour arriver là, la voie des endosomes est souvent choisie par ces virus : les vésicules contenant les particules virales sont transportées, au travers du cytoplasme, le long des rails du cytosquelette que sont les microtubules. L'entrée proprement dite dans le noyau nécessite des interactions entre les particules virales et la machinerie d'import nucléaire.

Vous trouverez un schéma récapitulatif du cycle parvoviral en [Figure I.2](#).

Nous détaillerons ici, dans une première partie, les quelques caractéristiques connues à ce jour quant aux différentes étapes du cycle d'un parvovirus, depuis l'extérieur de la cellule, jusqu'au noyau cellulaire. Puis nous nous intéresserons aux événements qui se produisent dans le noyau (réplication virale) et ensuite (formation de nouveaux virions, « retour » dans le cytosol et relargage dans le milieu extracellulaire).

* source : Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), utilisant l'algorithme de comparaison de deux séquences (bl2seq) en prenant pour référence celle du parvovirus H-1 (GenBank #X01457.1) et celle du parvovirus MVM (NCBI #NC_001510.1). Test effectué le 15 septembre 2009 sur <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

1.2.1. Trajet des parvovirus jusqu'au noyau de la cellule-hôte

Histoire d'une rencontre

1.2.1.1. Entrée du virus dans la cellule

Capside virale cherche récepteur pour interaction, et plus si affinités...

Peu d'études ont été menées au sujet de l'entrée du parvovirus MVM, et *a fortiori* du parvovirus H-1, dans la cellule-hôte. Cependant, divers travaux convergent vers l'hypothèse d'un mécanisme d'endocytose médiée par un récepteur. Si la partie 'endocytose' est aujourd'hui plutôt bien documentée, le problème de la nature du récepteur reste, lui, épineux. La capacité du virus à infecter de nombreux types cellulaires différents laisse penser que le récepteur permettant son internalisation est exprimé de façon ubiquitaire. La nature exacte de ce récepteur n'est pas encore connue, mais dès la fin des années 1980, deux arguments ont joué en faveur d'une ou plusieurs glycoprotéine(s) exposant des chaînes osidiques sialylées. D'une part, un prétraitement des cellules à la trypsine empêche l'adsorption du virus à la surface des cellules, laissant supposer qu'au moins une des composantes du récepteur possède un squelette protéique. D'autre part, un prétraitement des cellules à la neuraminidase prévient également l'entrée du virus dans la cellule-hôte, indiquant la présence d'acide sialique au niveau du récepteur [3].

De longues années se sont écoulées avant que ne soient précisément caractérisées, à l'aide de puces à glycannes, les structures osidiques mises en jeu. Mais l'on sait aujourd'hui que, si elles sont diverses, les structures qui permettent l'attachement du parvovirus MVM à la membrane cellulaire partagent toutes un motif composé d'au moins 5 résidus osidiques, se terminant par Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNac [4].

La nature du squelette protéique du (ou des) récepteur(s) reste, en revanche, encore inconnue à ce jour. Des travaux ont montré que le récepteur de la transferrine (TfR, pour *Transferrin Receptor*) pouvait être utilisé par les parvovirus canin (CPV) et félin (FPV) pour infecter des cellules humaines [5]. Le récepteur de la transferrine est exprimé de façon ubiquitaire chez l'Homme, sauf à la surface des érythrocytes [6], qui se trouvent être l'une des cibles privilégiées du parvovirus B19. Le récepteur cellulaire du parvovirus B19, caractérisé par K. Brown, est un globoside (antigène du groupe sanguin P) [7]. Mais ni le TfR ni ce globoside ne semblent être utilisés par le parvovirus MVM comme point d'entrée dans la cellule [2].

Un certain nombre de travaux démontrent l'importance de la protéine de capsid VP2 pour l'établissement de l'interaction du virus avec les récepteurs présents à la surface de la cellule-hôte. Ainsi, la présence de certains acides aminés bien spécifiques à certains

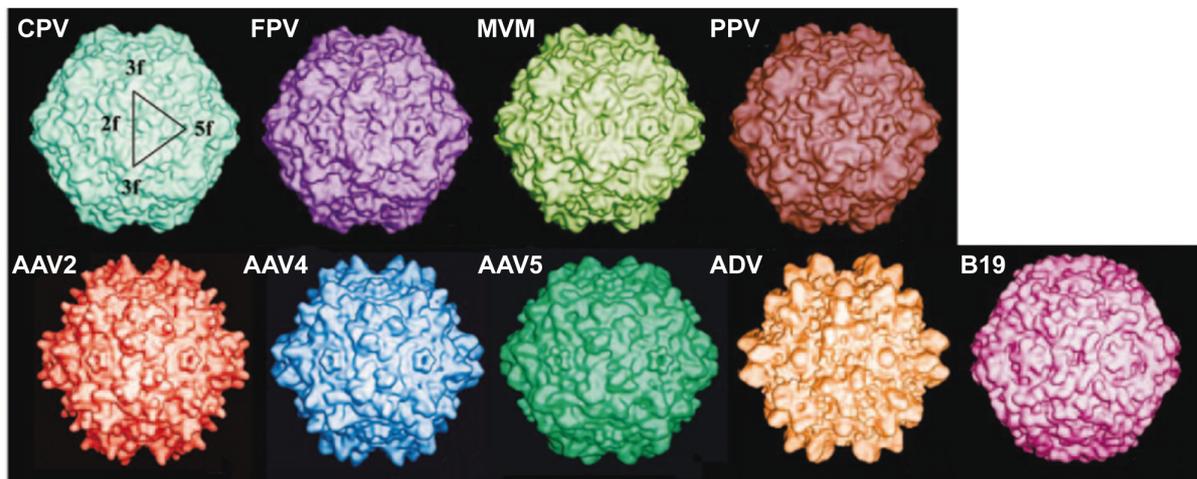


Figure 1.3

Modélisation de la surface des capsides de différents membres de la sous-famille des *Parvovirinae*.

Illustration originale d'Eric Padron [8]

Les cartes de surface ont été générées à partir de coordonnées atomiques et pseudo-atomiques (comme décrit dans [9]) à une résolution de 13 Å. Le triangle noir dessiné sur la surface de la capsid de CPV représente une unité virale asymétrique, délimitée par les axes de symétrie double (2f), triple (3f) et quintuple (5f).

Abréviations : CPV : Canine Parvovirus ; FPV : Feline Parvovirus ; MVM : Minute Virus of Mice ; PPV : Porcine Parvovirus ; AAV : Adeno-Associated Virus ; ADV : Aleutian mink Disease Virus ; B19 : parvovirus B19.

endroits de la séquence de cette protéine peut aller jusqu'à définir le tropisme cellulaire du virus au sein d'un même hôte. Ceci est illustré de façon particulièrement intéressante dans les travaux de Lisa Ball-Goodrich et Peter Tattersall sur le parvovirus MVM, dont il existe deux variants. MVMp, également appelé souche prototype de MVM, infecte les fibroblastes, alors que MVMi, variant immunosuppresseur, infecte les progéniteurs érythropoïétiques et les lymphocytes T, mais pas ou très peu les fibroblastes. Ces auteurs ont montré qu'une double mutation, au niveau des résidus 317 et 321 de la protéine VP2, suffit à modifier le tropisme du variant lymphotropique MVMi, qui est alors capable d'infecter les fibroblastes avec une efficacité 100 fois supérieure [10].

La clé d'une infection parvovirale réussie est donc en partie détenue par la capsid virale. Les structures de la capsid de plusieurs parvovirus ont été décrites depuis plusieurs années déjà [11-14] (**Figure I.3**). Cependant, les auteurs ne parviennent toujours pas à comprendre en détail comment cette capsid peut moduler l'infection, ni quels sont les rôles précis des différentes caractéristiques structurales observées.

1.2.1.2. *Transport des particules virales vers le noyau : Voie des endosomes*

Après l'entrée : Highway to Cell (Nucleus)

L'hypothèse de l'endocytose a été très tôt étayée par des études en microscopie électronique qui ont révélé à la fois la formation d'invaginations membranaires, faisant penser à des puits de clathrine, et la présence cytoplasmique de particules virales regroupées dans des vésicules [3].

Plus récemment, les travaux de Carlos Ros sur le parvovirus MVM ont apporté un certain nombre de précisions à ce sujet. Ainsi, les vésicules d'endocytose, en fusionnant leur membrane avec celle des endosomes, y relarguent les particules virales qu'elles contiennent. Cependant, comme cela a été observé pour d'autres virus, MVM nécessite une acidification des endosomes pour pouvoir les quitter et rejoindre le cytosol. MVM semble passer des endosomes précoces aux endosomes tardifs. En effet, au cours de l'infection de fibroblastes murins par le MVMp, l'utilisation de composés tels que la bréfeldine A, qui bloque la transition entre ces deux compartiments, réduit drastiquement l'accumulation d'ADN viral ainsi que la transcription et l'expression des protéines NS et des VP.

Les travaux de Carlos Ros ont également montré une certaine implication du cytosquelette pour le transport des particules virales, puisque d'autres composés, comme le nocodazole, qui promeut la dépolymérisation des microtubules, et la cytochalasine D, qui inhibe la formation des filaments d'actine, ont tous deux un effet, certes modéré, sur l'accumulation d'ADN viral et la synthèse des protéines virales lors de l'infection [15, 16].

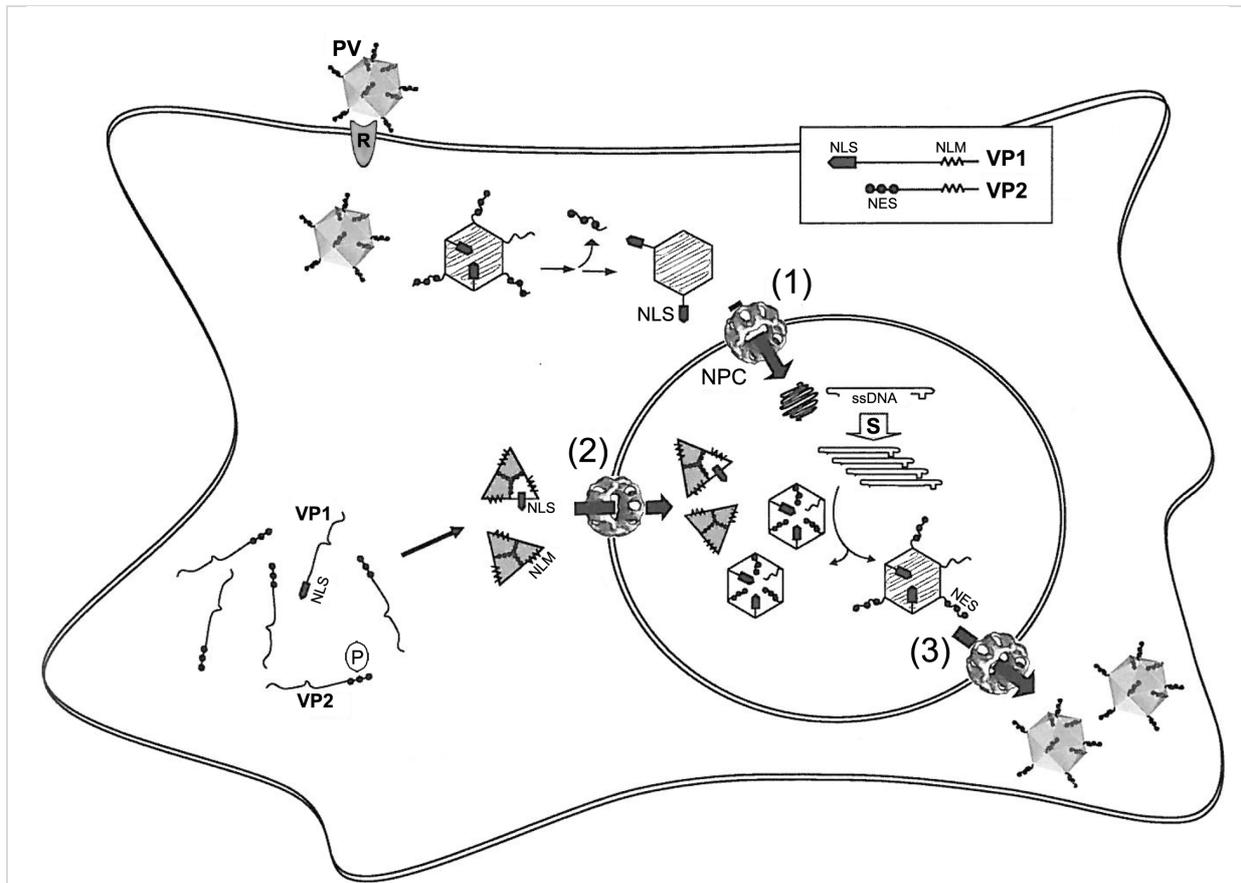


Figure I.4

Transport nucléaire des protéines de capside et des particules virales lors du cycle parvoviral.

Illustration originale de Noelia Valle [17]

(1) Entrée du virion dans le noyau. Après fixation au récepteur membranaire (noté R), le virion (noté PV) entre dans la cellule. Lors de son transport jusqu'au noyau, les signaux d'export nucléaire (NES, *Nuclear Export Signal*) portés par les protéines de capside VP2 sont clivés. L'exposition, par un changement de conformation, des signaux de localisation nucléaire (NLS, *Nuclear Localization Signal*) permet l'entrée dans le noyau via un complexe de pore nucléaire (NPC, *Nuclear Pore Complex*). Le schéma est ici simplifié et pourrait laisser penser qu'une décapsidation se produit à l'extérieur du noyau et que le génome viral (noté ssDNA, *single strand DNA*) est « injecté » à travers ce pore. Ce n'est pas actuellement l'hypothèse la plus répandue (voir texte).

(2) Assemblage des particules virales et encapsidation intranucléaire. Les protéines de capside VP1 et VP2 sont synthétisées dans le cytoplasme, et le NES situé à l'extrémité amino-terminale de VP2 y est phosphorylé par Raf-1. Ces protéines forment des homotrimères de VP2 (en gris) et des hétérotrimères comportant une VP1 (en blanc) et deux VP2. Les trimères sont transloqués vers le noyau, notamment grâce aux NLS portés par VP1 et aux motifs de localisation nucléaire (NLM, *Nuclear Localization Motif*) portés par VP1 et VP2. Ces trimères entrent dans le noyau *via* les NPC. L'encapsidation de l'ADN viral, amplifié pendant la phase S du cycle de la cellule-hôte, se fait alors *a priori* dans des capsides préformées.

(3) Export nucléaire des virions néoformés. Les virions matures quittent le noyau *via* le NPC. Cette sortie active implique des NES, portés par les VP2 et exposés à la surface de la capside parvovirale.

L'encart en haut à droite montre la position approximative des différents signaux d'import (NLS, NLM) et d'export (NES) nucléaire portés par les protéines de capside.

1.2.1.3. Relargage des virions dans le cytosol et entrée dans le noyau

Le métro ne va pas jusqu'au noyau, il faudra terminer le voyage à pied

Il est désormais clair que la partie N-terminale de la protéine VP1 de MVM, parfois appelée région unique de VP1 car absente de la séquence de VP2, joue un rôle important dans le processus d'infection parvovirale. En 1993 déjà, Gregory Tullis démontrait que, si cette protéine n'était pas indispensable pour la néosynthèse de virions, des mutants déplétés en VP1 étaient défectifs pour l'infection, à une étape située après l'attachement à la membrane de la cellule-hôte mais avant la réplication virale [18].

De la synthèse de travaux plus récents [19-21] pourrait émerger une hypothèse séduisante. Le pH acide des endosomes permettrait des modifications de la conformation de la capsid virale, modifications qui auraient pour conséquence l'externalisation de la région unique de VP1 (en abrégé, VP1_{up}, pour VP1 *unique part*). VP1_{up}, possédant une activité semblable à celle de certaines phospholipases A2 (comme démontré pour une trentaine de parvovirus différents [17]), serait alors en mesure d'altérer la structure de la membrane des vésicules contenant les capsides virales. Ceci aurait alors pour effet de libérer les dites capsides, vraisemblablement dans le cytosol, au niveau de la périphérie du noyau cellulaire.

D'autres évènements semblent se produire entre le relargage des particules virales dans le cytosol et l'entrée dans le noyau. Les particules de MVM pourraient être prises en charge par le protéasome. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs réversibles du protéasome provoque l'accumulation, dans la région périnucléaire, de particules virales non décapsidées, alors que la levée de cette inhibition permet à nouveau au virus de transloquer vers le noyau et de se répliquer. L'implication exacte du protéasome dans le processus de l'infection par le MVM reste cependant encore obscure, puisqu'on n'observe ni ubiquitination ni dégradation totale des protéines de capsid [16]. Cependant, l'activité chymotrypsique semble être une composante indispensable à la poursuite du cheminement du MVM [15]. Une hypothèse avancée est que des clivages protéolytiques orchestrés par le protéasome engendreraient une réorganisation de la conformation de la capsid. Cette réorganisation permettrait alors d'exposer plus facilement, d'une part, les deux séquences de localisation nucléaires (NLS) portées par l'extrémité N-terminale de VP1, et d'autre part certaines régions de VP2 riches en aminés basiques dont la structure tridimensionnelle en feuillet β peut former des motifs de localisation nucléaire (NLM) [20, 22, 23] (**Figure I.4**). On ne sait toutefois pas, actuellement, si ces observations sont applicables au parvovirus H-1, d'autres parvovirus (comme le parvovirus bovin, BPV) pouvant emprunter des voies n'impliquant pas le protéasome [16].

Les capsides de MVM entreraient donc intactes, entières, dans le noyau, bien que leur conformation puisse avoir été convertie en une forme « ouverte », dite de transition. Il est généralement admis que l'entrée des parvovirus dans le noyau se fait par un passage à travers les complexes des pores nucléaires (ou NPC, pour *Nuclear Pore Complex*). C'est un

mécanisme actif, impliquant de l'énergie (consommation d'ATP), des facteurs cytosoliques (probablement des importines), et les NLS et NLM évoqués plus haut. Cependant, de récents travaux, relativement controversés, suggèrent que le MVM altérerait l'enveloppe nucléaire, y causant des brèches par lesquelles le virus s'introduirait [24, 25].

1.2.1.4. Libération intranucléaire du contenu des particules virales

Entrés dans le noyau, mes chers virus, le moment est venu de vider son sac

Une fois entrées dans le noyau, les capsides virales doivent libérer le génome qu'elles contiennent pour que la réplication virale puisse commencer. Les mécanismes de libération du génome ne sont pas encore bien compris, mais certaines suggestions ont été faites. 20 à 30 nucléotides de l'extrémité 5' du génome viral sont exposés à l'extérieur de la capside de MVM, et la protéine NS1 est liée, de façon covalente, à cette extrémité 5' [26]. L'autre extrémité du génome viral, en 3', peut également être exposée à l'extérieur de la capside, comme cela a été montré au cours d'expériences impliquant des traitements qui modifient la structure de la capside sans la détruire. Dans ces cas, l'extrémité 3' peut servir de motif de départ pour l'ADN polymérase, au moins *in vitro* [27]. Ces différents travaux suggèrent un mécanisme au cours duquel l'ADN exposé en dehors de la capside servirait de motif d'initiation de la réplication pour l'ADN polymérase de la cellule-hôte. L'ADN viral serait alors progressivement déroulé hors de la capside virale sans que celle-ci ne soit dégradée [20, 27]. Si cette théorie reste la plus en vogue actuellement, elle n'a pas encore été démontrée.

1.2.2. Parvovirus et cellule-hôte

Coup de foudre et conséquences

La réplication de l'ADN viral est suivie de la transcription des gènes viraux puis de l'expression des protéines virales. *In fine*, on obtient, après assemblage des protéines structurales et encapsidation du génome parvoviral, des virions néoformés, parfois appelés virions-fils, qui après la lyse de leur cellule-hôte, sont relargués dans le milieu extracellulaire et peuvent éventuellement aller infecter d'autres cellules.

1.2.2.1. Amplification virale

Dans le noyau, c'est l'effervescence

1.2.2.1.1. Dépendance au cycle de la cellule-hôte

Avant l'heure, c'est pas l'heure : De l'importance du S

Quelques heures après leur entrée dans la cellule-hôte, les parvovirus s'accumulent dans le noyau. Cependant, contrairement à d'autres virus à ADN (notamment ceux responsables de tumeurs), ils ne possèdent pas de protéines capables de moduler le cycle cellulaire, qui leur permettraient d'induire la phase S dans des cellules quiescentes. Ainsi, ces virus restent généralement « en dormance » à l'intérieur du noyau jusqu'à ce que la cellule entre en phase S. Les promoteurs parvoviraux sont inclus dans un génome simple brin. L'acquisition d'un brin complémentaire précède donc nécessairement l'expression des gènes viraux s'ils veulent utiliser la machinerie eucaryote impliquée dans la transcription. Ceci est d'ailleurs un argument qui vient renforcer l'hypothèse d'une absence de décapsidation. En effet, s'il y avait une décapsidation, l'ADN viral simple brin, alors mis à nu dans le noyau, serait probablement rapidement reconnu comme étranger par les systèmes de surveillance et de réparation cellulaires. Il en résulte qu'il serait dégradé avant même d'avoir pu donner lieu à la réplication virale.

La synthèse du brin complémentaire se produit lors de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire. Elle est exclusivement réalisée par l'ADN polymérase δ de la cellule-hôte. En effet, le simple fait de piéger PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*, qui est un cofacteur de la polymérase) en incubant des cellules infectées en présence de p21^{WAF1/CIP1} suffit pour abolir la synthèse du nouveau brin, ce phénomène étant réversible par addition de PCNA. La synthèse du brin complémentaire est dépendante de l'expression de la cycline A et de l'activité kinase associée à la cycline A, et indépendante du couple cycline E / cdk 2 [28].

L'activation du promoteur P4, responsable de la synthèse des protéines non structurales NS1 et NS2, implique notamment la présence du facteur de transcription E2F [29], qui devient lui aussi disponible à la transition G1 / S.

L'entrée de la cellule-hôte dans la phase S du cycle est donc une condition indispensable à la poursuite du cycle parvoviral. Nous verrons plus loin, et de façon plus détaillée, qu'elle n'est pas la seule, mais retenons déjà qu'il a été montré à plusieurs reprises, sur divers types cellulaires humains ou murins, issus de différents tissus, que le promoteur P4 n'est pas ou très peu activé dans des cellules normales en division active [30-37].

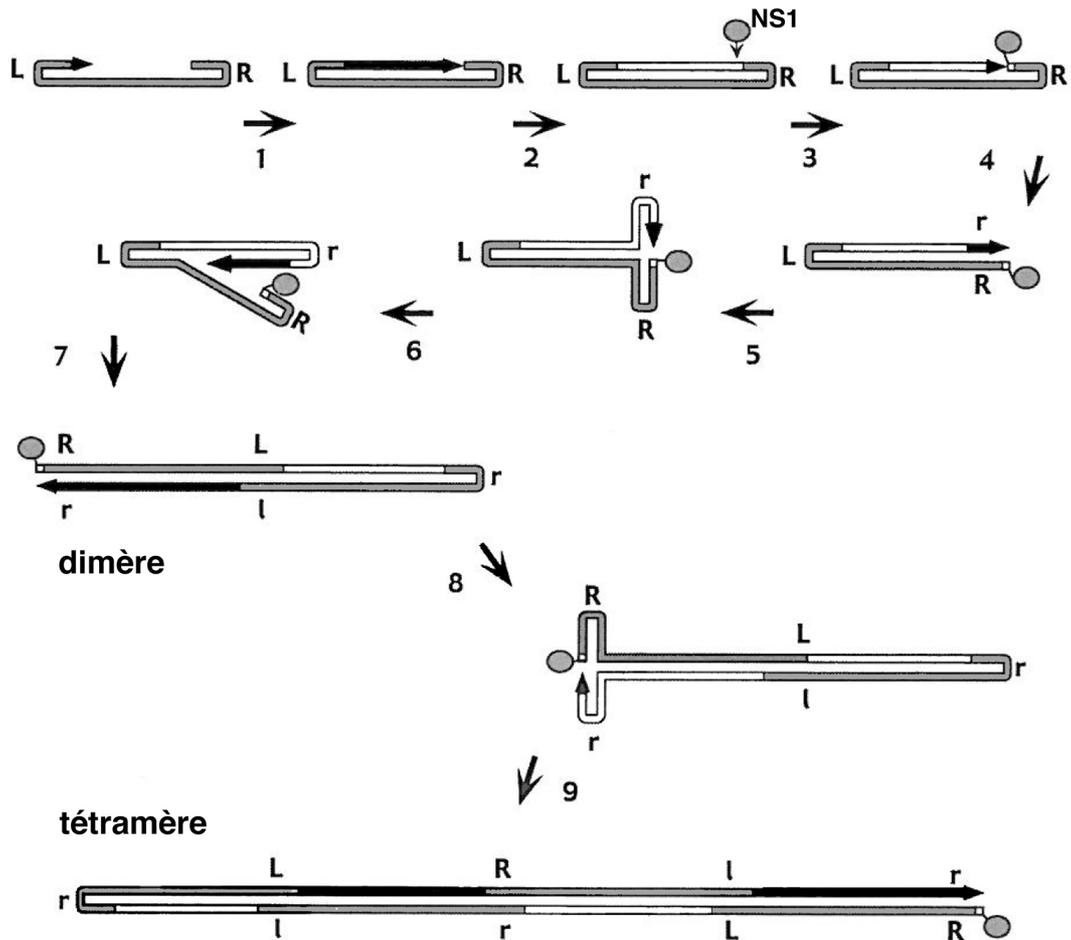


Figure I.5

Modèle de réplication parvovirale dite 'en épingle à cheveux roulante' (*rolling-hairpin*).

Illustration originale de Susan Cotmore et Peter Tattersall [38]

Le génome parvoviral est représenté par une ligne continue. Cette ligne est colorée en gris lorsqu'elle correspond au génome original, en blanc pour les génomes répliqués, et en noir lorsqu'il s'agit d'ADN nouvellement synthétisé, l'extrémité 3' étant indiquée par une flèche noire. La sphère grise représente une molécule de NS1.

L'extrémité gauche (ou 3', notée L) du génome de MVM sert d'amorce pour la synthèse du brin complémentaire. Ceci permet de convertir l'ADN du virion en un premier intermédiaire de réplication, appelé duplex (**étape 1**). Quand la fourche de réplication cellulaire atteint l'extrémité droite du génome (ou 5', notée R), elle est incapable de déplacer l'épingle à cheveux qui s'y trouve. L'extrémité 3' du brin d'ADN nouvellement synthétisé est liée de façon covalente, par une ligase de la cellule-hôte, à l'extrémité 5' de cette épingle à cheveux de droite (R). On obtient ainsi un duplex continu (**étape 2**).

L'expression de NS1 est ensuite nécessaire pour la poursuite de la réplication. NS1 permet d'introduire une cassure simple brin au niveau de l'«extrémité» 3' (R) (**étape 3**). Cette cassure libère une extrémité 3' hydroxyl libre, sur laquelle peut alors venir se fixer à nouveau la fourche de réplication cellulaire. NS1, elle, reste attachée à l'extrémité 5' ainsi libérée, via un motif (ACCA)₂₋₃ du génome. C'est à ce moment que NS1 recrute la protéine RPA, pour former un complexe essentiel pour l'établissement de la fourche et pour la stabilisation des simples brins. C'est aussi à ce moment que NS1 exerce son activité hélicase 3'→5'. Elle aide ainsi la fourche de réplication à déplier l'épingle à cheveux droite (R), qui peut alors être répliquée (la copie de R étant notée r). On obtient ainsi un « duplex étendu » (**étape 4**).

En hydrolysant de l'ATP, et grâce à ses fonctions d'hélicase et de liaison à l'ADN, NS1 promeut un repliement des extrémités R et r du duplex étendu, formant des structures dites «en oreilles de lapin» (**étape 5**). Cette configuration permet un autre changement de conformation (**étape 6**), qui va repositionner la fourche de réplication. La synthèse d'ADN se poursuit, donnant un dimère, dans lequel on remarquera une première copie (notée l) de l'épingle à cheveux gauche L, et une deuxième copie (notée r) de l'épingle à cheveux droite R (**étape 7**).

S'ensuit à nouveau la formation d'«oreilles de lapin» (**étape 8**) suivie d'un changement de conformation et d'un repositionnement de la fourche de réplication. La synthèse, se poursuivant, donne enfin un tétramère (**étape 9**).

1.2.2.1.2. Réplication parvovirale

Plus on est de fous, plus on rit (The rolling hairpin madness)

Les parvovirus sont uniques en leur genre car ils possèdent un ADN qui est à la fois simple brin et sous forme linéaire. Ce chromosome inhabituel ne rencontre donc pas les contraintes structurales que peuvent rencontrer les ADN double brin et/ou circulaires. Ceci permet de stocker un maximum d'information génétique (5 kilobases) dans le plus petit espace possible (une particule de seulement 26 nm de diamètre). Cela implique en revanche le recours à un mécanisme de réplication particulier, appelé dans la littérature internationale '*rolling-hairpin replication*' (littéralement : réplication par épingle à cheveux roulante).

La description très détaillée de ce mécanisme pourrait faire l'unique objet d'une thèse* et ne sera donc pas donnée ici. Dans les grandes lignes, elle reprend le principe de '*rolling-circle replication*' utilisé par de nombreux réplicons procaryotes ou eucaryotes (et décrit par exemple pour le phage T4 [40]), mais avec des adaptations permettant la réplication d'un chromosome linéaire. En pratique, il s'agit d'utiliser les palindromes terminaux de la structure du génome parvoviral comme amorces lors de l'initiation de la réplication, l'amplification des réplicons se faisant ensuite *via* la synthèse d'une série de duplex de réplication. Chaque cycle de réplication est à la fois initié et terminé par une coupure simple brin spécifique, réalisée par la protéine NS1 qui possède une activité endonucléase (*nickase*, en anglais). Les courts palindromes imparfaits situés à chacune des deux extrémités du génome sont constamment dépliés et repliés : les duplex de télomères se replient en épingles à cheveux puis en une structure cruciforme (en « oreilles de lapin »), qui est à nouveau dépliée pour permettre la formation de télomères plus longs, et ainsi de suite. Les palindromes servent en fait de culbuteurs, inversant le sens de la synthèse à chaque fois que la machinerie de réplication de la cellule-hôte les rencontre, à l'une ou l'autre des extrémités du génome viral [38].

Ce mécanisme étant à la fois complexe à décrire et relativement simple à schématiser, le lecteur intéressé trouvera plus de détails dans la [Figure I.5](#).

La réplication des parvovirus H-1 [41] et MVM [42] s'effectue dans des structures du noyau appelées corps de réplication des parvovirus autonomes, en abrégé APAR (*Autonomous Parvovirus-Associated Replication bodies*). Ce sont des structures spécifiquement induites lors de l'infection parvovirale, qui ne correspondent à aucune autre structure connue [41]. Elles séquestrent diverses protéines cellulaires essentielles à la réplication parvovirale, telles que l'ADN polymérase δ , la cycline A, PCNA et RPA (*Replication Protein A*), ainsi que l'ADN polymérase α , dont l'implication dans la réplication parvovirale n'a à ce jour pas été démontrée [42].

* Et en l'occurrence, ce fut le cas pour Peter Tattersall, dont les travaux ont notamment été publiés dans Nature en 1976 [39].

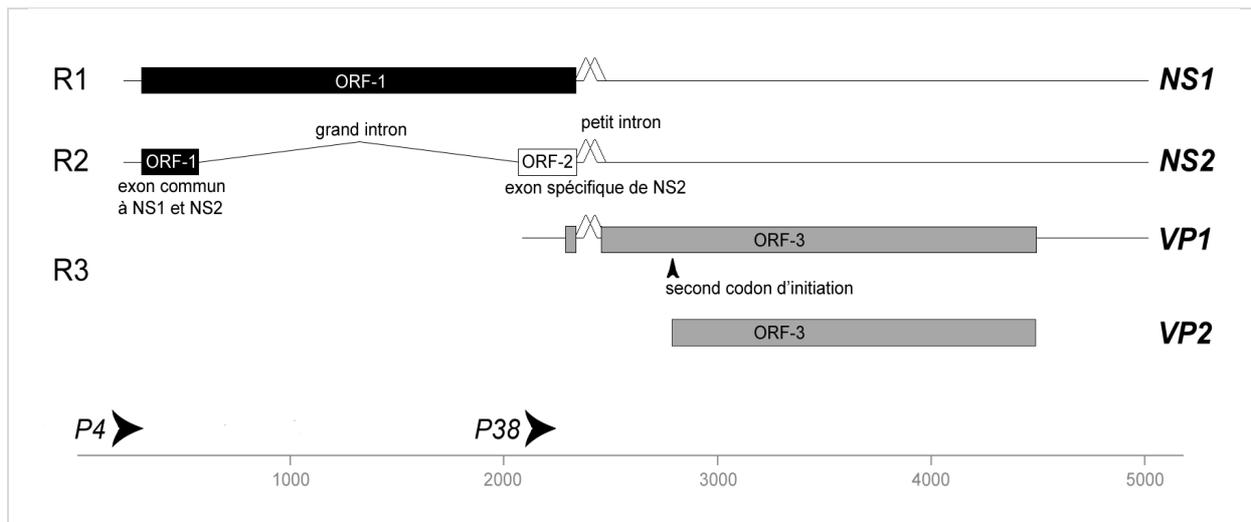


Figure I.6

Carte de transcription du parvovirus MVM.

Adapté de l'illustration originale de Jianming Qiu [43]

Trois transcrits majeurs (R1, R2 et R3) permettent, en utilisant trois cadres de lectures (ORF-1, ORF-2 et ORF-3), l'obtention des quatre protéines parvovirales (NS1, NS2, VP1 et VP2).

Chacun des trois transcrits subit un épissage particulier (petit intron, au centre) qui peut impliquer deux couples donneurs/accepteurs. R2 est en outre soumis à l'épissage d'un grand intron, donnant naissance à un exon spécifique de NS2.

La phase ouverte de lecture ORF-1 permet la traduction de la protéine NS1, qui partage son extrémité amino-terminale avec NS2. L'extrémité carboxy-terminale de NS2 est en revanche issue de l'ORF-2, unique. La présence de deux codons d'initiation en phase au sein de l'ORF-3 permet, à partir du même transcrit R3, la traduction de VP1 ou de VP2 qui ne diffèrent donc que par leur extrémité amino-terminale (plus longue pour VP1).

A titre représentatif, les positions des promoteurs P4 (commandant la synthèse de NS1 et NS2) et P38 (gouvernant celle de VP1 et VP2) sont indiquées sur le génome parvoviral, représenté schématiquement par une ligne graduée (unité : 1000 nucléotides).

1.2.2.2. Transcription et traduction

Maintenant que l'architecte a les plans, y'a plus qu'à construire...

La suite logique de la réplication de l'ADN viral est la transcription des gènes viraux et la production des protéines qu'ils codent. Le génome parvoviral ne contient que deux unités transcriptionnelles (**Figure I.6**).

La première unité transcriptionnelle du PVH-1 est sous le contrôle du promoteur P4 qui commande la synthèse des protéines virales non structurales NS1 et NS2. NS1 et NS2 sont issues de la traduction de deux transcrits respectivement dénommés R1 et R2, qui couvrent la quasi-totalité du génome, leur extrémité poly-adenylée se situant au niveau de la position cartographique 95 (ou map position 95, en abrégé mp 95). L'épissage d'un intron entre les positions 44 et 46 du génome se produit aussi bien pour R1 que pour R2. En revanche, l'épissage d'un autre intron, plus grand, compris entre les mp 10 et 39, n'est observé que pour R2. Il provoque un décalage du cadre de lecture, ce qui explique que la partie carboxy-terminale de NS2 soit différente de celle de NS1 [44].

La seconde unité transcriptionnelle du PVH-1 est régie par le promoteur P38, qui est dépendant de la protéine NS1 pour sa transactivation [45]. P38 contrôle l'expression des gènes codant les protéines virales structurales VP1 et VP2. VP1 et VP2 proviennent du même transcrit R3, qui est initié à la mp 38 et, comme R1 et R2, présente l'épissage d'un intron entre les mp 44 et 46. La séquence de R3 présente 2 codons d'initiation de la traduction (codons AUG), ce qui permet soit la synthèse de VP1 lorsque le complexe d'initiation de la traduction se fixe sur le premier AUG, soit la synthèse de VP2 lorsque ce complexe se fixe sur le second codon AUG. Ces deux codons sont en phase. Il en résulte que les parties C-terminales de VP1 et VP2 sont communes, mais que la partie N-terminale de VP1 est plus longue et comporte 143 acides aminés supplémentaires situés en amont de la séquence de VP2 [44].

La traduction des trois transcrits viraux R1, R2 et R3 donne donc naissance à quatre protéines : NS1, NS2, VP1 et VP2 (**Figure I.6**).

1.2.2.3. Formation de nouveaux virions

Emballer, c'est pesé

Après production des protéines et amplification de l'ADN viraux, la prochaine étape est la formation de nouveaux virions dits « matures », c'est-à-dire correspondant à des capsides constituées de 60 protéines VP (une copie de VP1 pour cinq copies de VP2) qui contiennent les quelques 5 kilobases du chromosome viral.

L'assemblage de nouveaux virions est un processus complexe, qui n'est pas encore complètement caractérisé. On sait toutefois que l'étape finale de ce processus correspond à l'emballage de l'ADN au sein de capsides déjà entièrement formées. Les protéines VP sont synthétisées dans le cytoplasme, mais la capside vide doit se trouver dans le noyau pour incorporer l'ADN viral. Se pose alors la question du compartiment cellulaire dans lequel s'effectue l'assemblage de la capside : cytoplasme ou noyau ? Si dans de rares cas utilisant des systèmes d'expression hétérologues, on a pu observer la formation de capsides dans le cytoplasme, lors d'infections naturelles, l'assemblage des capsides semble se faire dans le noyau. Les travaux de Laura Riobos montrent en effet qu'il y a tout d'abord formation, dans le cytosol, de deux types de trimères de VP (des homotrimères de VP2 et des hétérotrimères comportant une VP1 et deux VP2). Les VP2 sont phosphorylées par Raf-1 [46], ce qui permet aux trimères d'entrer dans le noyau par les pores nucléaires, grâce aux NLS de VP1 et aux NLM de VP2, de la même manière que pour l'entrée de virions matures lors d'une infection. Ils peuvent ensuite, vraisemblablement avec l'aide de protéines chaperonnes, s'assembler entre eux pour former des capsides entières, dans lesquelles l'ADN viral sera finalement intégré [47] (**Figure I.4** en regard de la page 7).

1.2.2.4. Transport des virions néosynthétisés

L'âge de la maturité : les petits quittent le nid

La poursuite du cycle viral se fait ensuite à l'extérieur du noyau. Les virions matures (c'est-à-dire encapsidant de l'ADN) doivent donc franchir l'enveloppe nucléaire pour rejoindre le cytosol. Ils quittent le noyau en empruntant les NPC, suite à la reconnaissance d'un signal d'export nucléaire (ou NES, pour *Nuclear Export Signal*). Ce NES est porté par l'extrémité amino-terminale de VP2, qui n'est exposée en dehors de la capside que chez les virions matures. Elle comporte trois résidus de sérine dont la phosphorylation semble indispensable pour l'export nucléaire (**Figure I.4** en regard de la page 7). De plus, il a également pu être démontré que la protéine NS2 est impliquée dans l'export nucléaire des virions de MVM lors de l'infection de cellules murines. Cela est rendu possible, d'une part grâce aux séquences NES que porte NS2, d'autre part par l'interaction de NS2 avec CRM1 (également appelé exportine 1), récepteur nucléaire impliqué dans l'export au niveau des NPC [48-50].

La fin du cycle viral correspond aux étapes qui se situent entre la sortie du noyau des virions néoformés et leur relargage extra-cellulaire. On a longtemps pensé que la libération des virions était le résultat passif de la lyse de leur cellule-hôte. Pourtant, les très récents travaux de Severine Bär et Jürg Nüesch [51, 52] apportent un éclairage nouveau à ce sujet et vont au contraire dans le sens d'un mécanisme actif de libération des virions. Ceci vient en renfort des observations effectuées par Nathalie Salomé et Benoît van Hille qui, il y a vingt ans déjà,

montraient la possibilité d'observer la libération de parvovirus néosynthétisés sans destruction de la cellule [53].

Ce transport actif se ferait en cheminement inverse de celui observé lors de l'entrée dans la cellule de virions infectieux, commençant dans la région périnucléaire puis empruntant des vésicules (lysosomes et/ou endosomes tardifs) guidées par les rails cellulaires que constituent les microtubules. Ce transport implique l'activité d'une protéine cytosolique, appelée gelsoline. La gelsoline est connue pour faciliter l'exocytose en permettant un remodelage des filaments d'actine : elle s'y fixe, les disloque localement, et reste fixée à l'extrémité + des microfilaments, empêchant une repolymérisation rapide de l'actine [54]. En plus de ce rôle « classique » de la gelsoline, des rôles plus spécifiques ont été mis en évidence par ces auteurs. Sous le coup de l'infection parvovirale, la gelsoline s'accumule, mais elle est également sujette à des modifications post-traductionnelles qui pourraient modifier sa localisation subcellulaire, sa capacité de fixation aux membranes cellulaires, et ses fonctions. Il semblerait que la gelsoline soit impliquée dans l'assemblage, le remplissage ou la mobilisation des vésicules transportant les nouveaux virions, car il n'est possible de localiser ces virions dans lesdites vésicules que lorsque la gelsoline est fonctionnelle.

Les auteurs ont en outre observé, d'une part une colocalisation des capsides virales et de la dynamine [51], et d'autre part, le maintien des structures de microtubules jusqu'aux étapes tardives de l'infection [55]. La dynamine est une protéine cytosolique impliquée dans la formation des vésicules de transport. Elle participe, sous une forme liée au GTP, à l'individualisation de ces vésicules : sa polymérisation forme un « étranglement » qui permet à la vésicule de se détacher de la membrane à partir de laquelle elle s'est formée. Cette activité s'illustre aussi bien au niveau de la membrane plasmique que des endosomes et du réseau trans Golgien [56]. La dynamine est ainsi une composante du transport impliquant les microtubules. De récentes études ont montré qu'il existe un dialogue entre le transport dépendant de l'actine et celui reposant sur les microtubules [57]. Séverine Bär et Jürg Nüesch ont alors émis l'hypothèse que, lors de l'infection parvovirale, la gelsoline puisse en fait servir de médiateur de ce dialogue. Les modifications de l'actine induites par la gelsoline pourraient déclencher la prise en charge, par les microtubules, de vésicules contenant des virions néoformés [51].

Ces deux auteurs ont aussi observé l'absence de plages de lyse lors de l'infection par MVM de cellules rendues déficientes en une protéine de la famille ERM (pour *Ezrin*, *Radixin*, *Moesin*). Ils ont démontré que cette protéine, la radixine, impliquée dans l'organisation du cytosquelette, interagit avec la protéine kinase C η (PKC η) pour phosphoryler les protéines de la capsid de MVM [52]. La phosphorylation d'un ou plusieurs des trois résidus de Serine situés au niveau de l'extrémité N-terminale de VP2, exposée hors de la capsid de virions matures, est un prérequis indispensable à la sortie de nouveaux virions, comme l'a montré Beatriz Maroto [58]. Les protéines de la famille ERM pourraient donc jouer un rôle crucial dans les étapes finales du cycle parvoviral, notamment la libération des virions néoformés.

Virus	Voie	Cible	Animal	Effet(s)	Réf.
-------	------	-------	--------	----------	------

Infection d'animaux avant tentative de greffe tumorale

MPV1	ip	Myélome	Souris	Rejet de la greffe tumorale	[65]
MPV1	ip + on	Sarcome allogénique	Souris balb/c	Accélération du rejet de la greffe tumorale	[63]
RPV1	on	Leucémie	Rats	Réduction de la croissance tumorale, Atténuation des effets de la maladie	[66]

Injection aux animaux de cellules tumorales infectées *ex vivo*

PVH-1	<i>in vitro</i>	Carcinome du col de l'utérus (cellules HeLa)	Souris nude Swiss CD1	Réduction de l'incidence d'apparition de tumeurs	[67]
MVMp	<i>in vitro</i>	Mélanome syngénique (cellules B78)	Souris C57B1/6	Retard dans l'apparition de tumeurs	[68]
MVMp	<i>in vitro</i>	Endothéliome syngénique (cellules HSV)	Souris C57B1/6	Ralentissement de la croissance de la tumeur primaire, Réduction de l'incidence des métastases	[69]

Infection d'animaux portant des tumeurs préétablies

PVH-1	it	Carcinome du col de l'utérus (cellules HeLa)	Souris SCID balb/c	Régression de la tumeur, dépendante de la dose de virus injectée	[70]
MVMp	it	Mélanome syngénique (cellules B78)	Souris C57B1/6	Retard dans la croissance tumorale	[71]
MVMp	it	Mastocytome syngénique (cellules P815)	Souris DBA/2	Retard dans la croissance tumorale	[69]
PVH-1	iv	Métastases pulmonaires d'hépatome syngénique (cellules MH)	Rats immuno-compétents ACI	Incidence réduite de l'apparition de tumeurs	[72]
PVH-1	it	Adénocarcinome pancréatique syngénique (cellules HA-RPC)	Rats immuno-compétents Lewis	Ralentissement de la croissance tumorale, Régression complète de la tumeur dans certains cas, Diminution de l'incidence des métastases	[73]
PVH-1	ic	Gliome syngénique (cellules RG2)	Rats immuno-compétents Wistar Kyoto	Régression tumorale	[74]

Tableau I.1

Résumé des données collectées depuis 1990 sur l'interférence des parvovirus *wild-type* avec la formation et la croissance de tumeurs chez l'animal

Tableau original de Jan Cornelis [75], remis à jour en novembre 2009.

Abréviations : ip : intrapéritonéale ; on : oronasale ; it : intratumorale ; iv : intraveineuse ; ic : intracrâniale ; Réf. : références bibliographiques.

Les références bibliographiques sont désignées par les mêmes numéros que dans le texte de ce manuscrit (voir la section Bibliographie en fin d'ouvrage).

3. Parvovirus et cancer

Les liaisons dangereuses

1.3.1. H-1, agent étiologique des cancers ?

Le jury déclare l'accusé non coupable

Le parvovirus H-1 tire son nom des tumeurs humaines transplantables HEp-1 dans lesquelles il a été isolé, par Helene W. Toolan, dans les années 1960 [59]. Plusieurs arguments ont pendant longtemps suggéré que ce virus puisse être à l'origine de cancers. En effet, outre le fait d'avoir été découvert dans des tumeurs humaines, on a pu également l'isoler chez des animaux portant des tumeurs, il a souvent été un contaminant lors de purification d'autres virus induisant des tumeurs, et il possède une taille similaire à celle des virus de la famille des papovavirus (dont fait partie SV40) [60]. De plus, il n'a pas été possible d'isoler H-1 à partir de tissus humains normaux [3]. Cependant, une étude, menée pendant trois ans, sur près de 2000 hamsters, a montré que l'incidence des tumeurs était 20 fois moindre chez des hamsters adultes auxquels on avait injecté le virus H-1 à la naissance que chez des hamsters contrôles non infectés [61]. Ces résultats ont été les premiers à suggérer que la présence du parvovirus H-1 dans les tumeurs était de nature opportuniste et non causale.

Au contraire d'induire des tumeurs, les parvovirus H-1 et MVM montrent trois propriétés anti-cancéreuses intéressantes : l'oncosuppression, l'oncotropisme, et l'oncolyse.

1.3.2. Oncosuppression

H-1 et cancer : il ne peut en rester qu'un

Le terme d'oncosuppression fait référence à des effets observés *in vivo* (**Tableau I.1**) qui prouvent que les parvovirus autonomes, dont H-1 et MVM, protègent les animaux de laboratoire du développement tumoral, et ce de plusieurs façons :

- des animaux infectés par ces virus dès la naissance ont une incidence beaucoup plus faible de tumeurs, qu'elles soient spontanées ou induites par des virus ou des agents chimiques carcinogènes (pour revue : [62]) ;
- des animaux porteurs de parvovirus deviennent résistants aux greffes de tumeurs syngéniques ou hétérologues [63-65] ;

- des cellules néoplasiques, infectées *in vitro* par ces virus, forment moins fréquemment [68, 76] ou plus tardivement [71] des tumeurs après implantation chez l'animal
- des tumeurs établies chez l'animal peuvent voir leur croissance ralentir ou s'arrêter [71, 77] ; ces tumeurs peuvent même diminuer de taille, la régression étant dépendante de la dose de parvovirus injectée [70]

Si une corrélation peut être établie de façon certaine entre ces effets anti-tumoraux et la toxicité de ces parvovirus envers leurs cellules-hôtes (appelée oncolyse), il est probable que d'autres paramètres entrent en jeu. On peut par exemple supposer que la lyse des cellules favorise le relargage d'antigènes associés aux tumeurs et de cytokines immunomodulatrices, qui déclencheraient alors des réponses immunitaires dirigées contre la tumeur. En accord avec cette hypothèse, des expériences menées avec des parvovirus H-1 ou MVM recombinants, exprimant l'interleukine 2, la protéine chimiotactique des monocytes (MCP-1, *Monocyte Chemotactic Protein 1*) ou la chimiokine antiangiogénique IP-10 (ou CXCL10, pour *Chemokine C-X-C motif Ligand 10*) ont démontré, aussi bien *in vivo* que *in vitro*, une implication, dans l'oncosuppression parvovirale, de lymphocytes T cytotoxiques exprimant de l'interféron γ ou de cellules NK (*Natural Killer*) activées [67, 68].

1.3.3. Oncotropisme

Un parvovirus ne fait pas son nid chez n'importe qui

Des expériences historiques, datant du début des années 1980, ont montré que le parvovirus MVM pouvait tuer des fibroblastes murins transformés par le SV40 (*Simian Virus 40*), alors que les fibroblastes « parentaux » non transformés étaient résistants à MVM [78]. Ont suivi de nombreux travaux apportant la preuve que diverses cultures de cellules primaires, ou même des lignées immortalisées de cellules d'origine humaine, résistaient à l'infection parvovirale, alors que leurs équivalents provenant de tumeurs ou transformées *in vitro* étaient sensibles aux effets cytotoxiques du virus (pour revue : [62]). Tous ces travaux de comparaison de couples de cellules normales et transformées ont permis d'aboutir à la conclusion que la transformation maligne peut stimuler fortement le cycle de vie parvoviral. En particulier, on a souvent montré que l'amplification de l'ADN viral et l'expression des gènes viraux étaient augmentées dans les cellules transformées [34]. On fait référence à cette stimulation de la réplication parvovirale, associée à la transformation cellulaire, par le terme d'oncotropisme [62].

Il n'est pas surprenant que les parvovirus autonomes, dont la réplication est fortement dépendante de la phase S, puissent tirer avantage des perturbations du cycle cellulaire

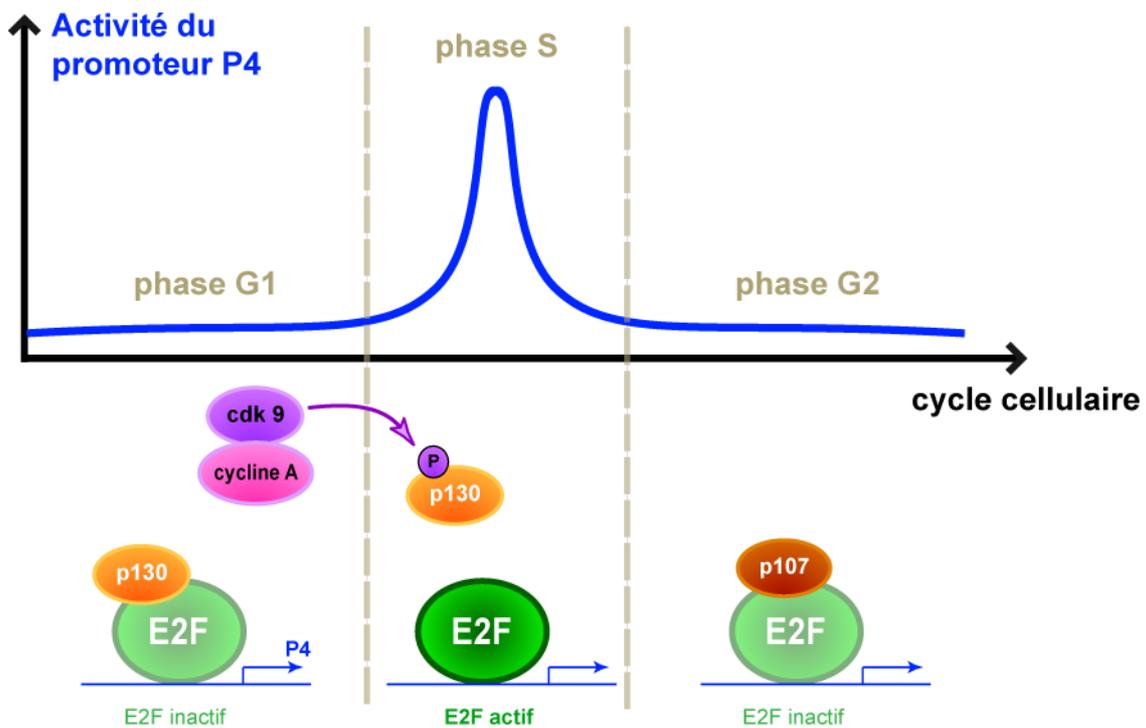


Figure I.7

Variations de l'occupation du site E2F et de l'activité du promoteur parvoviral P4 au cours du cycle cellulaire.

Illustration créée d'après les travaux de Laurent Deleu [79]

Au cours de la phase G1 du cycle cellulaire, le facteur de transcription E2F est inactivé par liaison à des membres de la famille de protéines de poche (ou *pocket protein family*), dont font partie p130 et p107. Lors de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire, la phosphorylation des protéines de poche, réalisée principalement par les kinases dépendantes du cycle cellulaire (ou cdk, *cyclin dependent kinases*), les détache du facteur de transcription E2F, levant ainsi l'inhibition qu'elles exerçaient sur lui. Le début de la phase S coïncide donc avec la libération de quantités importantes du facteur E2F sous une forme libre, donc active, qui peut aller jouer son rôle transactivateur.

L'occupation du site de fixation d'E2F situé sur P4 varie au cours du cycle cellulaire : le site est occupé par E2F lié à p130 pendant la phase G1, par E2F libre pendant la transition G1/S et pendant une grande partie de la phase S, et par E2F lié à p107 en fin de phase S et pendant G2. Ces variations d'occupation du site correspondent aux variations d'activité du P4, qui passe par une période d'hyperactivation en phase S alors que son niveau d'activité est basal en G1 et en G2.

caractéristiques des tissus néoplasiques. Les travaux de Laurent Deleu ont démontré que le facteur E2F était un facteur limitant de l'activation du promoteur parvoviral P4, en apportant deux arguments. Il a tout d'abord montré que la suppression du site de fixation pour E2F présent dans la structure du promoteur parvoviral P4 suffit à diminuer de 80% l'activité de ce promoteur au cours de la phase S [79]. Mais il a aussi constaté que l'occupation du site de fixation d'E2F situé sur P4 varie au cours du cycle cellulaire. Ces variations sont en phase avec les variations d'activité du P4, qui passe par une période d'hyperactivation en phase S alors que son niveau d'activité est basal en G₁ et en G₂ (Figure I.7). Cependant, E2F est aussi activé dans les cellules normales en prolifération et ne peut donc pas être suffisant pour la définition de l'oncotropisme parvoviral.

L'examen de la structure du promoteur parvoviral P4 montre plusieurs autres sites de fixation putatifs de facteurs cellulaires qui peuvent expliquer au moins en partie cet oncotropisme (Figure I.8). Le promoteur P4 semble intégrer de multiples signaux qui coopèrent dans l'induction de la transformation cellulaire ; de plus, des oncogènes activés peuvent induire l'entrée dans le cycle mitotique des cellules quiescentes. Par exemple, l'activation de l'oncogène Ras a pour résultat la stimulation de multiples voies de signalisation cellulaire. Parmi elles, la cascade de signalisation des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) active les facteurs de transcription des familles Ets et ATF/CREB (*Activating Transcription Factor / cAMP Response Element Binding*). On a pu montrer que ces facteurs de transcription se lient à des éléments spécifiques du promoteur P4 du parvovirus MVM [80, 81], et que ces sites de liaison sont conservés entre MVM et H-1. En accord avec ces données, l'expression des gènes parvoviraux est stimulée de manière significative dans les cellules transformées par Ras [82].

Le promoteur P4 comprend également des sites de liaison pour d'autres facteurs de transcription sensibles à la transformation, comme USF (*Upstream transcription Factor*) et NF-Y (*Nuclear Factor Y*) qui sont les cibles respectives de c-Myc et de l'antigène large T de SV40 [83-85].

Il est difficile de connaître dans quelle mesure les différences frappantes de permissivité pour l'infection parvovirale entre cellules normales et cellules transformées peut être assignée uniquement aux contrôles transcriptionnels et répliationnels décrits ci-dessus. La fixation des virions entrants sur les récepteurs à la surface des cellules ne semble pas être modulée de façon significative par la transformation, et ce dans aucun des systèmes étudiés jusqu'à maintenant. En revanche, les étapes suivantes du cycle viral, telles que son acheminement intracellulaire et la décapsidation du génome viral, semblent pouvoir limiter le déclenchement de la réplication virale, et méritent d'être étudiés plus amplement au regard

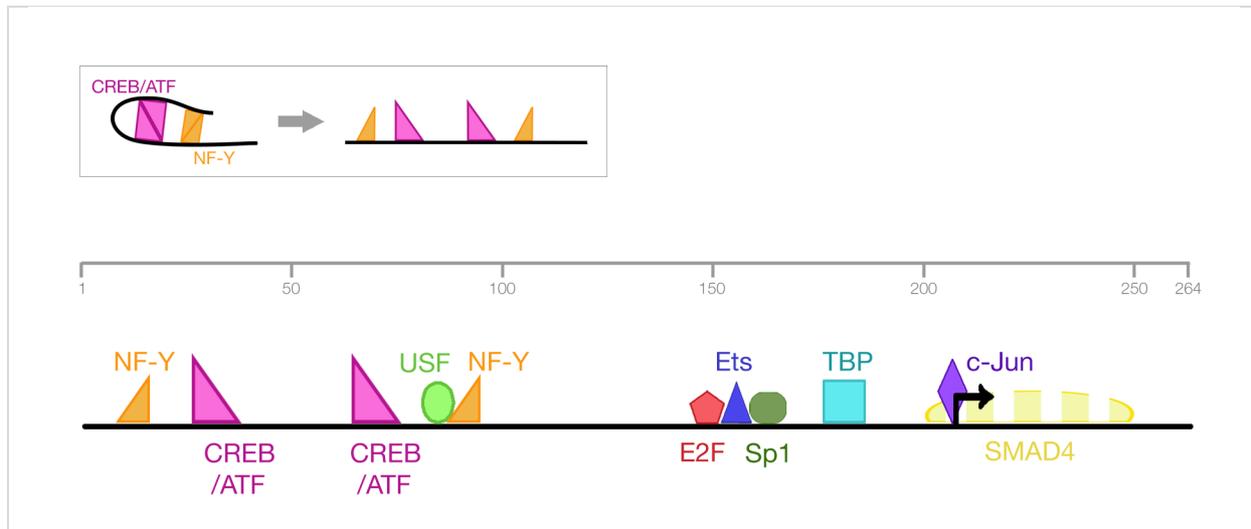


Figure I.8

Sites de fixation des facteurs de transcription sur le promoteur parvoviral P4

Illustration créée d'après les travaux de Laurent Deleu [79], Jeong Ahn [86], Stefen Faisst [87], François Fuks [81], Zhennan Gu [84], Mannos Perros [80] et Sebastian Dempe [88]

Les différents facteurs de transcription connus à ce jour pour interagir avec des éléments de séquence spécifiques sont représentés, par des symboles de couleurs et de formes différentes. La séquence du promoteur P4, présentée ici en configuration dépliée, est symbolisée par une ligne horizontale. Au-dessus, l'échelle (en gris) indique la position des nucléotides dans la séquence génomique, du premier nucléotide jusqu'au site d'initiation de la traduction (position 261). Le site d'initiation de la transcription (symbolisé par une flèche noire coudée) est situé au niveau des nucléotides 204-205.

L'encart en haut à gauche explique le cas particulier des sites NF-Y et CREB/ATF : si la figure symbolise ici le promoteur P4 en configuration dépliée, les palindromes terminaux du génome parvoviral sont en fait repliés. La représentation linéarisée crée donc artificiellement deux boîtes de fixation pour NF-Y et ATF/CREB.

La fixation effective de SMAD-4 et c-Jun n'a été pour l'instant démontrée que pour le parvovirus H-1, alors que celle des autres facteurs n'a en revanche été démontrée à ce jour que pour le MVM (alors que les sites putatifs de fixation sont conservés entre H-1 et MVM).

Abréviations : NF-Y : *Nuclear Factor Y*, CREB/ATF : *cAMP Response Element Binding / Activating Transcription Factor* ; USF : *Upstream transcription Factor* ; Ets : *E-twenty-six* ; TBP : *TATA box Binding Protein*.

de leur correspondance avec la transformation cellulaire. En particulier, dans certains cas, la réplication du parvovirus H-1 peut être bloquée, par un mécanisme encore inconnu, à une étape précoce, avant même la formation de duplex de réplication [89]. De plus, les travaux de Nicoletta Previsani ont montré que la décapsidation est un phénomène finement régulé et constitue une étape limitante de la réplication parvovirale. En effet, la comparaison entre deux souches du parvovirus murin, MVMi et MVMp, suggère que la réplication du MVMp est restreinte aux fibroblastes car les lymphocytes ne possèdent pas les éléments nécessaires à sa décapsidation, bien qu'ils puissent décapsider MVMi [90].

La transformation cellulaire est une condition nécessaire à la réplication parvovirale et l'expression des gènes parvoviraux, mais elle n'est pas suffisante. L'oncotropisme parvoviral semble en effet restreint à la présence de certains oncogènes. Les travaux de Nathalie Salome ont ainsi montré que des fibroblastes de rat sont sensibles aux effets du parvovirus MVM s'ils sont transformés par Ha-Ras, v-src, v-myc ou par l'antigène T de SV40. En revanche, ces mêmes fibroblastes transformés par une souche du papillomavirus bovin (BPV-1) restent insensibles à l'infection parvovirale [91]. Ces variations peuvent être imputées à des différences dans le mode d'action d'oncogènes distincts. Cependant, de manière intéressante, on observe que des lignées différentes de fibroblastes de rat, ayant pourtant subi la même transformation maligne par l'oncogène EJ-ras, ne sont pas toutes sensibles à l'infection parvovirale [92]. D'autres événements sont donc à prendre en considération au regard de l'oncotropisme parvoviral [89, 93].

L'activation du promoteur P4 peut également impliquer des composantes spécifiques du tissu cellulaire. Il est notamment intéressant de noter que le promoteur P4 peut être modifié artificiellement pour que son activation ne puisse se faire qu'en présence de facteurs de transcription préférentiellement produits dans certaines tumeurs. Par exemple, les travaux de Maddalena Malerba ont montré que la substitution de certains éléments du promoteur P4 par des sites de fixation du Tcf (*T-cell Factor*) et de la beta caténine permet de construire un virus mutant, qui s'exprime et se réplique spécifiquement dans les cellules de cancer du colon dans lesquelles la voie de signalisation Wnt* est activée [94, 95]. Dans le même ordre d'idées, Sebastian Dempe a récemment montré qu'il existe, dans certaines lignées cellulaires d'adénocarcinome ductal du pancréas, une corrélation entre le niveau d'expression du facteur de transcription SMAD4, sous sa forme native, et l'activité du P4. Ses travaux ont permis d'identifier de nouveaux sites de régulation du P4, qui serait ainsi également sous l'influence de SMAD4, celui-ci collaborant notamment avec c-Jun [88].

* Wnt : contraction des sigles Wg (=wingless, un gène chez la Drosophile) et int-1 (un oncogène cellulaire impliqué dans la tumorigénèse mammaire chez la souris)

Cellules		Immortalisées	Transformées	Statut de p53	Effet(s)	Réf.
Fibroblastes embryonnaires de rat	1	Non	Non	Native	Pas de lyse	[96]
	2	Non	Oui	Native	Pas de lyse	
	3	Non	Oui	Inactivée (dominant négatif)	Lyse	
Kératinocytes humains	4	Oui	Non	Mutée	Lyse	[31]
	5	Oui	Oui	Mutée	Lyse	
Hépatocytes humains	6	Oui	Oui	Native	Lyse	[97]
	7	Oui	Oui	Mutée	Lyse	
Lymphoblastes humains	8	Oui	Oui	Native	Pas de lyse	[96]
	9	Oui	Oui	Mutée	Lyse	

Tableau I.2

Influence de différents paramètres des cellules-hôte sur leur sensibilité à l'oncolyse parvovirale

Les couleurs ont été choisies selon que le phénotype observé est *a priori* attribué à des cellules normales (vert) ou non (rouge) : classiquement, une cellule non immortalisée et non transformée exprime la protéine p53 sous une forme native et n'est pas sensible à l'oncolyse parvovirale (ligne 1). En revanche, une cellule immortalisée, transformée, et présentant une p53 inactivée est généralement sensible à l'oncolyse parvovirale (lignes 5, 7 et 9).

Cependant, des exemples montrent qu'il est difficile de prédire la sensibilité à l'oncolyse parvovirale en établissant une combinaison de ces trois facteurs (immortalisation, transformation et statut de p53). En effet :

- des cellules transformées mais non immortalisées peuvent être lysées si p53 est inactivée (ligne 3)
- des cellules immortalisées mais non transformées peuvent être lysées si p53 est mutée (ligne 4)
- des cellules immortalisées et transformées peuvent être lysées même si p53 est exprimée nativement (ligne 6)

Les références bibliographiques (Réf.) sont désignées par les mêmes numéros que dans le texte de ce manuscrit (se reporter à la section Bibliographie en fin d'ouvrage).

Ainsi, de multiples limitations peuvent affecter la réplication parvovirale, certaines d'entre elles ne pouvant pas être levées par la transformation cellulaire et expliquant la faible permissivité et/ou sensibilité de certaines cellules tumorales à l'infection parvovirale. Enfin, l'oncotropisme des parvovirus peut être contrôlé non seulement au niveau quantitatif (expression et réplication virale) mais aussi qualitatif (activités des protéines virales).

1.3.4. Oncolyse

Ingratitude d'un parvovirus envers son hôte

La transformation maligne peut avoir des effets très importants, non seulement sur la réplication et l'expression des parvovirus, mais aussi sur leur potentiel cytotoxique. On parle d'oncolyse pour désigner la lyse des cellules-hôtes transformées suite à leur infection par le parvovirus H-1.

Certains oncogènes sont capables de sensibiliser des fibroblastes de rat immortalisés à l'activité lytique des parvovirus [91, 98], en revanche, leur impact sur des cellules non immortalisées semble être plus complexe. Ainsi, le traitement combiné de fibroblastes embryonnaires de rat (REF, *Rat Embryo Fibroblasts*) par c-Myc et Ha-Ras mène à la transformation cellulaire, mais ne suffit pas pour rendre ces REF transformés sensibles à la mort induite par H-1. Il faut adjoindre, à c-Myc et Ha-Ras, un dominant négatif de p53 pour que les REF meurent après infection parvovirale [96]. Les mutations de p53, qui se produisent naturellement dans 80 % des tumeurs humaines, pourraient ainsi contribuer à rendre les cellules vulnérables à l'infection. On a d'ailleurs pu montrer qu'il existe une corrélation entre des mutations de p53 et une sensibilisation progressive de fibroblastes humains au parvovirus H-1 [99]. De plus, les travaux d'Adam Telerman et Marcel Tuynder ont fait ressortir, de manière intéressante, que l'apparition d'une résistance aux effets cytotoxiques du parvovirus H-1 coïncidait avec la ré-expression de la forme native, non mutée, de p53 dans des lignées leucémiques humaines [96, 100] ([Tableau 1.2](#)).

Bien qu'étant un déterminant important, le statut de p53 n'est certainement pas la seule clé de l'oncolyse parvovirale. Par exemple, des kératinocytes humains immortalisés et leurs dérivés tumorigènes transformés par l'oncogène ras portent tous les deux des mutations sur les deux allèles de p53 et sont pourtant sensibles de la même manière au parvovirus H-1 [31]. De même, certaines lignées hépatocytaires humaines exprimant la forme native de p53 restent sensibles à l'action lytique du parvovirus H-1, bien que de manière moins importante que d'autres lignées hépatocytaires exprimant des formes mutées de cette protéine [97, 101]. Ainsi, d'autres facteurs, associés à l'oncogénèse mais restant à identifier,

coopèrent avec la p53 mutante afin de rendre sensibles les cellules tumorales humaines à l'attaque parvovirale.

L'activité de certains de ces facteurs pourrait dépendre de signaux extracellulaires, en particulier hormonaux. Les hormones sont des acteurs-clés dans l'évolution des cancers, et à cet égard, il est intéressant de noter que Catherine Van Pachterbeke a démontré une corrélation entre l'expression des récepteurs aux œstrogènes et l'augmentation de la sensibilité au H-1 de cellules de carcinome mammaire^{*} [103]. De plus, la mort cellulaire induite par le parvovirus MVM chez des fibroblastes transformés par Ha-Ras est vraisemblablement interconnectée avec les voies de signalisation de l'hormone thyroïde [104].

L'identification des déterminants moléculaires de l'oncolyse et des voies de mort cellulaire qui sont activées reste un challenge majeur de la recherche fondamentale sur les parvovirus. On sait cependant que ce sont les protéines parvovirales non structurales qui portent cette activité oncolytique.

^{*} Cependant, les travaux effectués dans notre laboratoire, sur un grand échantillon de tumeurs du sein, ne retrouvent pas une telle corrélation [102].

4. Protéines parvovirales non structurales

Quand on est peu, il faut savoir être polyvalents

NB : Sauf mention explicite, les données citées ici sont issues de la littérature de MVM, mais sont considérées, comme c'est souvent le cas dans la littérature sur les parvovirus autonomes, comme extrapolables à H-1, au vu de la forte identité de séquence (86%) qui existe entre ces deux virus.

La traduction des trois transcrits R1, R2 et R3 du parvovirus H-1 donne naissance à quatre protéines : NS1, NS2, VP1 et VP2. Le rôle des protéines VP a déjà été assez largement détaillé dans le chapitre 2 de ce manuscrit. Nous nous attacherons ici à décrire plus particulièrement les nombreuses fonctions portées par NS1, ainsi que les quelques connaissances acquises sur NS2.

1.4.1. Activités de la protéine NS2

La petite sœur a aussi son mot à dire

NS2, 180 acides aminés, 25 kDa, est beaucoup moins stable que NS1, et a une demi-vie plus courte (moins de 90 minutes). Il semble dans tous les cas que NS2 ne soit indispensable que dans les cellules de l'hôte naturel du virus concerné (la souris pour MVM et le rat pour H-1), puisque l'amplification virale y est nettement diminuée, voire inexistante, en l'absence de NS2. En revanche, l'infection de cellules humaines par des virus mutants ne permettant pas l'expression de NS2 ne montre aucun effet majeur au niveau de l'amplification virale [105, 106].

Dans les cellules murines, la protéine NS2 de MVM montre plusieurs propriétés régulatrices. Elle ne semble pas porter d'activité enzymatique mais elle peut interagir avec de nombreux partenaires protéiques au sein de la cellule-hôte. En particulier, elle peut, en se liant au facteur CRM1, jouer un rôle central dans le contrôle de l'export nucléaire et ainsi contrôler la sortie des virions néosynthétisés [49, 107]. La NS2 de MVM est également suspectée d'être impliquée dans la modulation de la signalisation cellulaire murine. En effet, elle interagit avec des membres de la famille de protéines 14-3-3, connues pour influencer sur la régulation des kinases et phosphatases cellulaires [108].

Enfin, la protéine NS2 de MVM semble également agir en synergie avec NS1 dans l'apparition d'effets cytopathiques chez la cellule-hôte [109]. En particulier, il a pu être montré que la cytotoxicité observée lors de la surexpression ectopique des deux protéines NS1 et NS2 dans des cellules néoplasiques humaines est plus importante que lorsque seule NS1 est exprimée [110].

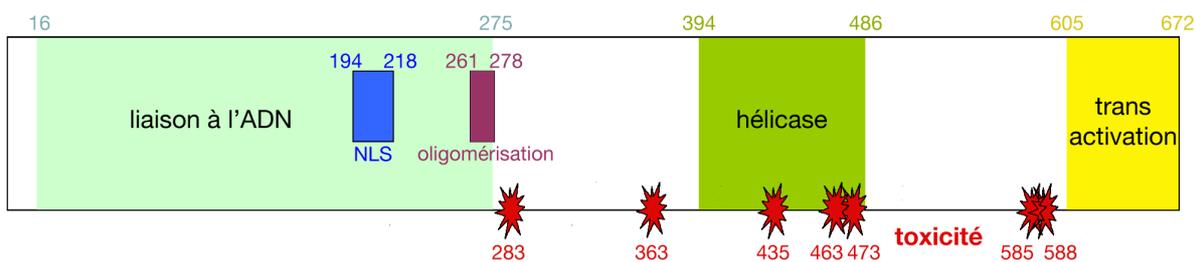


Figure I.9

Carte des domaines fonctionnels de la protéine NS1 du parvovirus MVM.

Illustration créée d'après les travaux de Jürg Nüesch [111]

Sur la séquence primaire de NS1 (*schématisée par un rectangle noir*) sont représentés :

- le domaine de liaison à l'ADN (*en vert clair*) qui s'étend des résidus 16 à 275
- le domaine à activité hélicase (*en vert foncé*) situé au niveau des résidus 394 à 486
- le domaine de transactivation (*en jaune*) du promoteur parvoviral p38, domaine qui couvre les 65 derniers résidus à l'extrémité carboxy-terminale de NS1, soit les positions 605 à 672

NS1 présente également un signal de localisation nucléaire (NLS) bipartite (*en bleu*), de séquence 194-KK (X₁₈) KKK XX-218 (où K désigne une lysine et X un acide aminé quelconque), ainsi qu'une séquence (*en pourpre*) 261-VETTVT (X₉) IQT-278 permettant l'auto-assemblage de NS1 en oligomères.

Les résidus impliqués dans la cytotoxicité induite par NS1 (Ser283, Thr363, Thr435, Thr464, Ser473, Thr585 et Ser588) sont également figurés (*en rouge*).

1.4.2. Les nombreuses activités de NS1 au cours du cycle viral

La grande sœur joue sur tous les tableaux

Issue de la traduction du transcrit parvoviral R1, lui-même obtenu après activation du promoteur P4, la protéine NS1, 672 acides aminés, 76 kiloDalton (kDa), est une protéine à la demi-vie relativement longue (plus de 6 heures). Durant cette fenêtre de temps, elle exerce de nombreuses fonctions, réparties tout au long du cycle parvoviral et qui dépendent de plusieurs domaines protéiques distincts (**Figure I.9**).

Ces fonctions sont intimement liées à la capacité de NS1 de s'auto-assembler sous forme d'oligomères, elle-même nécessitant la fixation d'ATP [112]. Cet auto-assemblage est, au moins en partie, médié par un motif bipartite de séquence peptidique VETTVT(X₉)IQT, correspondant aux résidus 261 à 278 de NS1 et donc situé entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine hélicase [113].

1.4.2.1. Implication de NS1 dans la réplication parvovirale

NS1 ouvre la danse entre jumelles

La protéine NS1 est indispensable à la réplication des parvovirus autonomes, principalement en exerçant deux activités : coupure spécifique de la molécule d'ADN viral (activité endonucléase) et déroulement de l'hélice d'ADN (activité hélicase).

Les toutes premières étapes de la réplication parvovirale impliquent la fixation de NS1 et d'un hétérodimère appelé PIF (pour *Parvovirus Initiation Factor*)^{*} [114, 115] au niveau de l'origine de réplication parvovirale, correspondant au palindrome terminal situé à l'extrémité gauche du génome. Cette interaction fait intervenir, d'une part, le domaine de liaison à l'ADN de NS1, et d'autre part, des sites consensus du génome viral portant le motif (ACCA)₂₋₃ [116]. La formation du complexe ternaire entre NS1, PIF et l'ADN parvoviral active la fonction endonucléase de NS1 [117]. Après coupure spécifique d'un brin d'ADN, NS1 reste attachée de façon covalente à l'extrémité 5' mais laisse une extrémité 3' hydroxyl libre qui sert d'amorce pour la synthèse d'ADN [116, 118] (pour rappel, voir **Figure I.5**, en regard de la page 10).

C'est alors qu'entre en jeu la fonction hélicase de NS1, la protéine déroulant la molécule d'ADN double brin en aval de la fourche de réplication, l'énergie nécessaire étant fournie par hydrolyse de l'ATP [114]. Cette activité hélicase 3' → 5' n'est elle aussi possible qu'après oligomérisation de NS1 [112], et, par analogie avec d'autres hélicases virales de type SF3, tels que l'antigène T de SV40, on soupçonne qu'il s'agisse ici d'hexamères [119]. Il a été montré que la protéine RPA, capable de se lier à de l'ADN simple brin, interagit avec NS1 et

^{*} qui serait l'homologue humain d'une protéine de rat appelée protéine GMEB (pour *Glucocorticoid-Modulating Element Binding*)

fait donc partie de la fourche de réplication, au même titre que PCNA et l'ADN polymérase δ [120]. Toutes ces protéines sont séquestrées dans les APAR, structures subnucléaires spécifiquement formées lors de la réplication parvovirale [42].

1.4.2.2. Implication de NS1 dans la régulation de promoteurs

NS1 donne un coup de pouce à ses cousines mais sait aussi mettre des bâtons dans les roues

John W. Bodnar a montré que les motifs de type (ACCA)₂₋₃ étaient très régulièrement retrouvés dans la séquence d'ADN de MVM. En effet, le motif à 9 nucléotides AACCAACCA occupe presque 10% du génome de MVM [121] et, si l'on prend en compte des formes dégénérées (pour lesquelles on a une correspondance de 7 ou 8 nucléotides sur 9), on observe que ces motifs sont espacés de manière régulière, tous les 74 nucléotides environ [119]. Il a été démontré que NS1 est effectivement capable de se lier à des motifs (ACCA)₂₋₃ dits « internes » (par opposition aux sites dits « terminaux » situés dans les palindromes et participant à l'initiation de la réplication) [119]. La fixation de NS1 sur l'un de ces sites internes, situé en amont du promoteur p38 et portant le nom de *tar* (pour *transactivation responsive element*), revêt une importance particulière. En effet, la formation, au niveau de ce *tar*, d'un complexe entre des éléments viraux (protéine NS1 et ADN parvoviral) et cellulaires (le facteur de transcription SP1, qui se lie au promoteur p38 [122], et des membres de la machinerie transcriptionnelle, tels que TBP et TFIIA [123]) permet la transactivation du promoteur p38, qui gouverne la synthèse des protéines de capsid [124-127]. En plus de transactiver le promoteur p38, NS1 est également capable de transactiver son propre promoteur, le P4, par un mécanisme partiellement décrit, dépendant à la fois de l'intégrité des palindromes terminaux et de l'amplification de l'ADN viral [198].

NS1 est également capable de réguler des promoteurs hétérologues. Ainsi, il a été montré que cette protéine transinhibe les *long terminal repeats* (LTR) du virus du sarcome de Rous (*Rous sarcoma virus*, RSV) [125, 128] et du virus d'immunodéficience humaine (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV) [128, 129] ainsi que le promoteur *Harvey-ras* (Ha-ras) [128]. NS1 peut aussi transactiver le promoteur du gène *c-erbA1* qui contrôle la synthèse du récepteur α de l'hormone thyroïdienne T3 (également appelée triiodothyronine) [104].

L'abondance et la régularité des sites de fixation de NS1 à l'ADN parvoviral suggèrent que cette interaction ait une implication dans des fonctions de NS1 autres que l'initiation de la réplication ou la transactivation de p38, et qui seraient encore inconnues. Cette hypothèse serait notamment supportée par l'argument qu'il existe, d'après les récents travaux de Susan Cotmore, Raymond Gottlieb et Peter Tattersall, au moins six types de sites « internes », dont certains seulement voient leur affinité de liaison fortement augmentée en présence d'ATP [119].

1.4.2.3. Implication de NS1 dans la cytotoxicité

NS1 rime avec assassin

En plus de ses activités précoces dans le cycle viral, NS1 agit également plus tardivement : c'est l'acteur principal de la cytotoxicité induite par les parvovirus. Annick Brandenburger a démontré la possibilité d'isoler différentes activités exercées par les protéines non structurales, et pressenti que la toxicité cellulaire observée est un effet directement lié à ces protéines [109]. Peu de temps après, les travaux de Perrine Caillet-Fauquet ont explicitement montré que l'expression des protéines non structurales provoque la mort de cellules néoplasiques humaines stablement transfectées par un clone moléculaire du parvovirus MVMp, dans lequel P4 a été remplacé par un autre promoteur viral, inductible. Cependant, la cytotoxicité ne semble être observée que lorsque l'accumulation de protéines NS1 dans la cellule-hôte atteint un certain seuil, variable selon les cellules envisagées [130]. Suzanne Mousset a démontré que ce seuil de production de NS1, atteint à l'aide du même système inductible dans des cellules de rat, les cellules FR3T3, immortalisées mais présentant un phénotype normal, est non toxique. En revanche, ses travaux montrent aussi que le même taux de production de NS1 provoque la mort de FR3T3 transformées par des oncogènes viraux [131]. Il en a été conclu que la protéine NS1 ne devenait toxique qu'en présence de certains facteurs cellulaires, eux-mêmes sous la dépendance de l'expression d'oncogènes.

Les mécanismes par lesquels la protéine NS1 induit la mort de la cellule-hôte sont encore peu connus et largement dépendants du type cellulaire. Ils feront l'objet d'un paragraphe spécifique ultérieurement.

1.4.3. Régulation des activités de NS1

Mettons de l'ordre dans tout ça...

Les multiples activités de NS1 sont impliquées à divers moments du cycle parvoviral. De plus, elles font intervenir des partenaires cellulaires différents, localisés dans des compartiments cellulaires spécifiques. Il est donc indispensable que toutes ces activités soient finement régulées. De manière générale, des changements dans la conformation d'une protéine peuvent être induits par de nombreux mécanismes différents. L'interaction avec des ions (Ca^{2+} , Mg^{2+} ...) [116, 126], des partenaires protéiques ou des composés cellulaires de plus petite taille (certains nucléotides triphosphate, dont l'ATP) [113, 126, 132, 133], la capacité de s'assembler sous plusieurs formes d'oligomères ainsi que les modifications post-traductionnelles sont autant de moyens de régulation des activités de NS1 (pour revue : [111], et paragraphe 1.4.2.2).

1.4.3.1. Activités de NS1, localisation et trafic intracellulaires

Je fais ce que je veux avec mes lieux

Les implications de NS1 dans la réplication virale et la transactivation de promoteurs nécessitent sa présence dans le noyau. *A contrario* l'induction de la mort cellulaire passe principalement par l'interaction de NS1 avec des protéines cytosoliques. La distribution subcellulaire de NS1 constitue ainsi un premier mode de régulation de ses activités.

La synthèse de NS1 s'effectue en utilisant la machinerie cellulaire et se réalise donc au niveau des ribosomes, au sein du cytoplasme, comme pour toute protéine cellulaire. Cependant, il a été montré que NS1 est majoritairement nucléaire (environ 70% du *pool* de cette protéine) [134]. NS1 doit donc être transportée dans le noyau, mais sa taille relativement importante l'empêche de diffuser passivement à travers les pores nucléaires. Les travaux de Jürg Nüesch et Peter Tattersall ont montré que la NS1 de MVM possède un signal de localisation nucléaire (NLS, pour *Nuclear Localization Signal*) bipartite, similaire à celui porté par d'autres protéines à destination du noyau des cellules eucaryotes, telles que la nucléoplasmine [135].

Ils ont aussi montré que la délétion des 67 derniers acides aminés du côté carboxy-terminal (C-ter) de NS1 déséquilibrait encore plus la distribution subcellulaire de NS1, puisque dans ce cas seul 5% du *pool* de NS1 est retrouvé dans le cytoplasme. Ceci suggère que NS1 posséderait également, dans sa partie C-ter, un signal de rétention cytoplasmique ou d'export nucléaire, bien qu'aucune séquence n'ait encore été identifiée à ce jour [136].

1.4.3.2. Régulation de NS1 et phosphorylations

Phosphoryle-moi, je te dirai qui tu es

On considère souvent qu'il existe une relation entre les fonctions d'une protéine et sa structure. Les modifications post-traductionnelles d'une protéine sont ainsi connues pour engendrer des changements locaux de conformation qui favorisent une (ou plusieurs) fonction(s) spécifique(s). La phosphorylation est l'une des modifications les plus étudiées et depuis longtemps connue pour être impliquée dans la régulation des voies de signalisation. Dès 1986, Susan Cotmore et Peter Tattersall montraient que la protéine NS1 de MVM existe sous deux formes prédominantes, une forme phosphorylée et une autre faiblement voire non phosphorylée [134]. L'implication de la phosphorylation dans le cycle parvoviral a pour la

résidu	S283	T363	T394	T403	K405	T435	T463	S473	T585	S588
transloc. noyau					K405 H-1 [1] MVM [2]					
liaison ADN					K405 MVM [2]					
ATP					K405 MVM [2]					
endonuc.					K405 H-1 [1] MVM [2]					
hélicase								S473 [3]		
réplic.		T363 [4]	T394 [4]	T403 [4]	K405 H-1 [1] MVM [2]	T435 [4]		S473 [4]		
transac. p38	S283 (Δ) [4]	T363 [4]	T394 (Δ) [4]	T403 [4]	K405 H-1 [1] MVM [2]					
cytotox.	S283 (-) [4]	T363 [4] et [6]			K405 H-1 [1]	T435 [4]	T463 [4]	S473 [4]	T585 (+) [5]	S588 (-) [5]
phospho. in vivo		T363 [6]		T403 [4]		T435 [4]		S473 [4]	T585 [5]	S588 [5]

Tableau I.3

Implication de certains acides aminés de NS1 dans les diverses fonctions qu'elle exerce au cours du cycle parvoviral.

Les résidus de NS1 sont identifiés par leur nature (code à une lettre) et leur position dans la séquence. Lorsqu'un résidu est impliqué dans une des fonctions de NS1 (listées dans la première colonne à gauche), la case est colorée en fonction de l'activité concernée. Dans cette case, la désignation de l'acide aminé est reprise et suivie d'un chiffre entre crochets renvoyant à la référence bibliographique dans laquelle cette implication a été démontrée (voir liste ci-dessous).

Ce tableau peut ainsi être lu de deux manières :

- horizontalement, afin de déterminer tous les résidus impliqués dans une fonction particulière de NS1
- verticalement, afin d'identifier toutes les fonctions de NS1 auxquelles participe un résidu donné

Certaines cases portent des mentions spéciales entre parenthèses : (-) le résidu est impliqué dans une régulation négative de la cytotoxicité ; (+) le résidu est impliqué dans une régulation positive de la cytotoxicité ; (Δ) l'implication est modérée car le promoteur p38 peut être transactivé d'environ 40% même si ce résidu est muté.

Pour tous les résidus, sauf la lysine 405, les données sont issues de la littérature sur MVM. Le cas de la K405 est particulier car son implication peut être différente suivant le virus concerné (qui est précisé, le cas échéant).

Abréviations : transloc. noyau : translocation vers le noyau ; ATP : fixation et hydrolyse de l'ATP ; endonuc. : activité endonucléase ; répl. : réplication parvovirale ; transac. p38 : transactivation du promoteur parvoviral p38 ; cytotox. : cytotoxicité ; phospho. in vivo : le résidu est phosphorylé *in vivo*, c'est-à-dire lors du cycle parvoviral.

Références :

- [1] Li, X. and S.L. Rhode, 3rd. 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*, 1990. 64(10): 4654-60.
- [2] Nüesch, J.P., S.F. Cotmore, and P. Tattersall. Expression of functional parvoviral NS1 from recombinant vaccinia virus: effects of mutations in the nucleotide-binding motif. *Virology*, 1992. 191(1): 406-16.
- [3] Dettwiler, S., J. Rommelaere, and J.P. Nüesch. DNA unwinding functions of minute virus of mice NS1 protein are modulated specifically by the lambda isoform of protein kinase C. *J Virol*, 1999. 73(9): 7410-20.
- [4] Corbau, R., V. Duverger, J. Rommelaere, and J.P. Nüesch. Regulation of MVM NS1 by protein kinase C: impact of mutagenesis at consensus phosphorylation sites on replicative functions and cytopathic effects. *Virology*, 2000. 278(1): 151-67.
- [5] Daeffler, L., R. Horlein, J. Rommelaere, and J.P. Nüesch. Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. *J Virol*, 2003. 77(23): 12466-78.
- [6] Nüesch, J.P. and J. Rommelaere. A viral adaptor protein modulating casein kinase II activity induces cytopathic effects in permissive cells. *PNAS*, 2007. 104(30): 12482-7.

première fois été évoquée par Fatima Anouja, qui a montré que NS1 était phosphorylée pendant la phase S du cycle cellulaire [137]. Ce sont surtout Jürg Nüesch et Romuald Corbau qui ont effectué une analyse exhaustive de la phosphorylation de NS1 et de ses implications. Ils ont tout d'abord montré que la déphosphorylation *in vitro* de NS1 engendre une perte de l'activité hélicase de cette protéine et une réduction des activités ATPase et endonucléase. En revanche, cette forme déphosphorylée de NS1 se fixe avec une meilleure affinité que la forme phosphorylée sur les motifs (ACCA)₂₋₃ du génome viral. De plus, ces études ont montré que la mise en présence de NS1 déphosphorylée avec des protéines kinases endogènes, issues d'extraits cellulaires, permet de retrouver une protéine parfaitement fonctionnelle pour la réplication virale. En particulier, NS1 déphosphorylée retrouve son activité hélicase en présence de protéine kinase C (PKC) et de cofacteurs classiquement associés à l'activité des kinases cellulaires (ions calcium, phosphatidylsérine et, parfois, esters de phorbol) [138, 139]. Ces premiers travaux ont mis à jour la possibilité d'une régulation des fonctions de NS1 par une ou plusieurs kinase(s) cellulaire(s). Ils ont été complétés par une analyse fine de la phosphorylation de NS1, réalisée par mutagenèse dirigée de résidus situés dans des sites consensus de phosphorylation par les membres de la famille des PKC. Les auteurs ont ainsi identifié sept résidus de sérine ou de thréonine impliqués dans différentes fonctions de la protéine NS1, dont trois d'entre eux sont effectivement phosphorylés *in vitro* par les PKC [140]. L'activation de certaines fonctions de NS1 nécessite même parfois l'activité de deux membres de cette famille. Ainsi, NS1 nécessite l'action de la PKC λ pour remplir ses fonctions hélicase et endonucléase [140-143], mais elle ne peut cependant participer pleinement à la réplication, en induisant l'amplification de l'ADN parvoviral, qu'après avoir été également phosphorylée par PKC η [144].

1.4.3.3. Dimension temporelle de la régulation de NS1

Tout vient à point à qui sait attendre

Le profil de phosphorylation de la protéine NS1 varie au cours du cycle viral, comme l'ont montré Romuald Corbau et Jürg Nüesch lors de l'infection, par le parvovirus MVM, de cellules murines synchronisées [145]. De manière intéressante, ces variations coïncident avec le fait que les résidus de NS1 soient impliqués dans des fonctions intervenant à divers moments du cycle viral. Ainsi, la substitution des résidus de thréonine (Thr) 363, 394 et 403 par des résidus d'alanine empêche la réplication virale et la transactivation du promoteur p38. La mutation de la Ser283, elle, augmente la cytotoxicité induite par NS1 alors que celle de la Thr463 supprime cette activité toxique. Enfin, la mutation de la Thr435 ou de la Ser473 bloque à la fois la réplication virale et la cytotoxicité [140] ([Tableau I.3](#)).

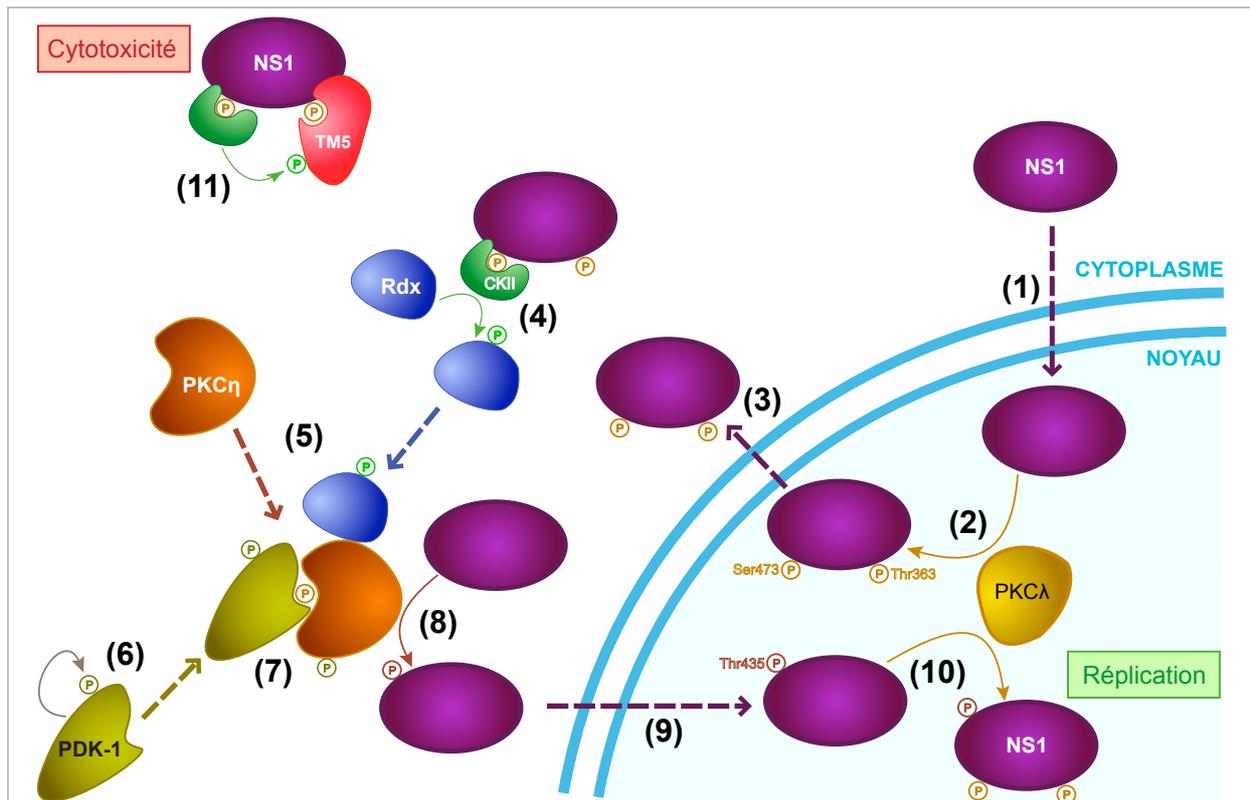


Figure I.10

Interactions de NS1 avec différentes kinases cellulaires lors de l'infection de fibroblastes murins A9 par le parvovirus MVM

Illustration créée d'après les travaux de Jürg Nüesch, Séverine Bär et Sylvie Lachmann [52, 154]

Les flèches en pointillés représentent des déplacements, les flèches arrondies des événements de phosphorylation.

La protéine NS1, nouvellement synthétisée dans le cytoplasme, entre dans le noyau, grâce à son signal de localisation nucléaire (1). Elle est phosphorylée par la protéine kinase C λ (PKC λ) au niveau de deux résidus, la sérine en position 473 et la thréonine en position 363 (2). Elle repasse ensuite dans le cytoplasme (3), la phosphorylation de sa Ser473 lui permettant de former un complexe avec la caséine kinase II α (CKII). La CKII phosphoryle la radixine (Rdx) qui devient active (4). L'infection par le parvovirus provoque, par des mécanismes encore inconnus, une relocalisation de la radixine activée et de la protéine kinase C η (PKC η) vers la périphérie du noyau (5). Sous l'effet de l'infection parvovirale, la *phosphoinositol-dependent kinase* (PDK-1) est activée par autophosphorylation, et également relocalisée vers la périphérie nucléaire (6). La PKC η est phosphorylée par la PKC λ (non représentée à ce niveau pour ne pas surcharger le schéma) au niveau de son site de fixation de PDK-1. PDK-1 peut alors se fixer sur la PKC η et l'activer par phosphorylation (7). La PKC η active peut alors phosphoryler à son tour NS1 au niveau de son résidu de thréonine en position 435 (8). NS1 retourne alors dans le noyau, où elle peut exercer ses fonctions dans la réplication parvovirale lorsqu'elle a été phosphorylée à la fois par la PKC λ et par la PKC η (10).

La double phosphorylation de NS1 sur ses résidus 363 et 473 lui permet de recruter la CKII et la tropomyosine 5 (TM5). Grâce au rôle d'adaptateur protéique que NS1 joue à ce niveau, la CKII phosphoryle la tropomyosine 5 (11), alors qu'elle phosphoryle la tropomyosine 2 en absence de NS1. Ces modifications de la phosphorylation de protéines du cytosquelette, associée à des altérations des filaments d'actine et de vimentine, est à l'origine de la cytotoxicité induite par le parvovirus dans ce modèle cellulaire.

Ces données ont progressivement fait émerger une hypothèse séduisante : la phosphorylation différentielle de NS1 au cours du cycle parvoviral permettrait à celle-ci d'effectuer une transition entre ses fonctions précoces dans le cycle (réplication, transactivation) et ses fonctions tardives (cytotoxicité et libération des virions). Cette hypothèse est supportée par plusieurs arguments.

Les travaux de Laurent Daeffler ont permis de mettre en évidence des effets antagonistes dans la régulation de la cytotoxicité induite par NS1. Il a ainsi démontré que la Thr585 et la Ser588, qui sont des sites consensus de phosphorylation pour la PKC, sont phosphorylés *in vivo* (bien qu'il n'existe pas pour l'instant de preuve directe que cette phosphorylation soit effectivement réalisée par une PKC). L'auteur soupçonne que la phosphorylation de la Ser588, qui diminue la cytotoxicité induite par la NS1 de MVM, se produise au début du cycle parvoviral. Ceci permettrait en effet de modérer les effets destructeurs de la cellule-hôte par le parvovirus, ce dernier ayant besoin de la machinerie cellulaire afin d'assurer une synthèse efficace de nouveaux virions. La phosphorylation de la Thr585, qui au contraire augmente la cytotoxicité induite par NS1, interviendrait tardivement dans le cycle pour induire et/ou renforcer les effets toxiques du parvovirus et ainsi faciliter la libération des nouveaux virions par lyse de leur cellule-hôte [147].

D'autres travaux ont montré que la phosphorylation de NS1 par des membres de la famille des PKC peut favoriser soit les fonctions répliquatives de NS1, soit sa capacité d'induction de la cytotoxicité. Dans ce contexte, l'analyse de différents éléments issus de la littérature met à jour un concept séduisant : la Ser473 jouerait un rôle pivot dans le cycle parvoviral. En effet, lorsque la Ser473 et la Thr435 sont phosphorylées par la PKC λ [138, 141, 143], alors ce sont les fonctions de NS1 impliquées dans les étapes précoces du cycle viral qui sont mises en jeu. En revanche, lorsque la Ser473 et la Thr363 sont phosphorylées, alors ce sont les fonctions tardives de NS1 qui sont mises en avant, et en particulier la capacité d'induire des déformations du cytosquelette qui sont fatales pour la cellule-hôte [148] (**Figure I.10**).

1.4.3.4. Création de nouveaux environnements intracellulaires

On n'est jamais aussi bien servi que par soi-même

En plus d'être sujette à une régulation de ses activités par le trafic intracellulaire, la protéine NS1 est elle-même capable d'altérer ce trafic. Elle peut notamment utiliser certaines protéines du cytosquelette pour relocaliser des kinases cellulaires et/ou leur substrat, et ainsi favoriser ou modifier leur activité (**Figure I.10**). Ceci permet parfois à NS1 de diriger elle-même l'activation de ses fonctions. A titre d'exemple, lors de coopération entre la PKC λ et la PKC η pour l'initiation de la réplication parvovirale, c'est NS1 qui active la PKC η . En effet, NS1 induit la phosphorylation de la PDK-1 (*Phosphoinositol Dependent Kinase-1*), ce qui l'active. NS1 induit également la relocalisation de PDK-1 et de la PKC η vers la région

<i>Effet toxique</i>	<i>Phénotype</i>		<i>Cellules</i>	<i>Réf.</i>	
Arrêt du cycle cellulaire			Fibroblastes de rat transformés	[149]	
			Fibroblastes humains transformés		
Apoptose	Formation de corps apoptotiques	Fragmentation de l'ADN	Glioblastome de rat	[150]	
		Clivage de la PARP	Lymphome humain	[151]	
		Externalisation de la phosphatidylsérine membranaire	Hépatome humain	[97]	
	Libération cytosolique d'enzymes lysosomales			Gliome humain	[74]
				Adénocarcinome pancréatique humain	[73]
Nécrose	Diminution du stock énergétique cellulaire		Fibroblastes de rat transformés	[152]	
			Fibroblastes humains transformés		
Altérations du cytosquelette			Fibroblastes de souris	[55, 148, 153]	
			Fibroblastes humains transformés	[55]	

Tableau I.4

Effets toxiques induits par les parvovirus dans diverses lignées

A ce jour, quatre grands types d'effets délétères pour les cellules-hôtes ont été observés (correspondant aux quatre catégories de couleurs différentes). Sont précisés les cellules mises en jeu (type et hôte) ainsi que, le cas échéant, le « phénotype » ayant permis d'associer les effets observés à l'une de ces catégories.

Les références bibliographiques (Réf.) sont désignées par les mêmes numéros que dans le texte de ce manuscrit (voir la section Bibliographie en fin d'ouvrage).

périnucléaire. La PDK-1 et la PKC λ , ainsi colocalisées, peuvent interagir. La PKC λ phosphoryle le site de fixation de PDK-1 porté par la PKC η . Cette phosphorylation permet à la PDK-1 activée de se lier à PKC η . PDK-1 peut alors à son tour activer, par phosphorylation, la PKC η [154]. La relocalisation des PDK-1 et PKC η implique l'activité de la radixine*, qui est une protéine « réticulante » (ou *cross-linker* en anglais) c'est-à-dire qui sert de lien covalent entre deux polymères, en l'occurrence entre le cytosquelette et la membrane plasmique [155].

Il se trouve que l'activation de la radixine par phosphorylation est induite par NS1 et se fait par l'intermédiaire d'un complexe formé entre NS1 et une autre kinase cellulaire, la caséine kinase II α (CKII α). Ce même complexe NS1-CKII α est utilisé lors de l'induction de la cytotoxicité. Dans ce cas, NS1, en permettant le recrutement d'un substrat inhabituel de la CKII α , modifie l'activité de la kinase [148] (**Figure I.10**). Enfin, rappelons que l'infection parvovirale crée de nouvelles structures cellulaires, les APAR (voir paragraphe 1.2.2.1.2. page 10), et bien que cela n'ait pas encore été formellement démontré, il est probable que la protéine NS1 soit impliquée dans leur formation, notamment via ses interactions avec la gelsoline qui permettent de remodeler le cytosquelette [51].

1.4.4. Plusieurs façons d'induire la cytotoxicité

NS1 a plus d'une corde à son arc

S'il a été clairement démontré que NS1 est l'acteur de la cytotoxicité induite par les parvovirus [130], les mécanismes par lesquels cette protéine mène à la destruction de la cellule restent encore largement méconnus. L'existence de plusieurs types de mort induite par le parvovirus H-1 (**Tableau I.4**) suggère que ces mécanismes soient dépendants du type cellulaire.

1.4.4.1. Arrêt du cycle cellulaire

Haut les mains, que personne ne bouge

Les effets toxiques des parvovirus H-1 et MVM ne se résument pas à une induction de la mort cellulaire : avant de présenter des effets cytotoxiques, ils peuvent induire des effets cyostatiques. Ainsi, les travaux d'Anne Op de Beeck ont montré que l'infection de lignées transformées de fibroblastes (d'origine humaine ou murine) interfère avec la progression du cycle cellulaire et induit un blocage des cellules au cours des phases S et G₂ [149, 156]. L'expression de NS1, en dehors de tout contexte viral, donne les mêmes résultats dans ces

* Cette activation en cascade étant fastidieuse à lire, vous la trouverez schématisée dans la **Figure I.10**.

cellules, bien que les mécanismes mis en jeu soient un peu différents. Dans le cas d'une infection, le blocage des cellules en phase S est lié à l'accumulation de la protéine p53, sous forme active, dans le noyau. Le blocage en phase G₂ des cellules infectées dépend, lui, de l'expression de p21^{cip1}, qui inhibe les complexes cycline A / cdk1 et cycline E / cdk2 (cdk signifiant *cyclin-dependent kinases*), et dont le promoteur est transactivé par p53. Dans le cas de l'expression de NS1 hors contexte viral, seule l'accumulation de p21^{cip1} est observée [157]. Ceci suggère que l'accumulation de p53, connue pour induire un arrêt du cycle cellulaire en réponse à l'apparition de dommages à l'ADN [158], soit une conséquence de l'apparition d'un grand nombre de cassures simple brin dans les duplex de réplication, lors de l'amplification virale, plus qu'un effet direct de NS1 [157].

1.4.4.2. Induction de voies apoptotiques

La cellule se petit-suicide

Dès les premiers travaux démontrant que NS1 était l'acteur principal de la cytotoxicité induite par les parvovirus [130, 131, 156], les auteurs ont cherché à déterminer quels étaient les mécanismes aboutissant à la mort cellulaire. On a pu mettre en évidence des lésions de la chromatine dans des fibroblastes exprimant la NS1 de MVM sous le contrôle d'un promoteur inductible, bien qu'aucun autre signe d'apoptose n'ait été détecté [156]. En revanche, des travaux portant spécifiquement sur le parvovirus H-1 (PVH-1) ont montré l'induction de voies apoptotiques *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*.

Ainsi, Takayuki Ohshima a démontré que l'infection, par ce parvovirus, d'une lignée de cellules de glioblastome de rat induit l'apparition de corps apoptotiques et la fragmentation de l'ADN, phénomènes atténués en présence d'inhibiteurs de la caspase 3 [150].

Béatrice Rayet a, elle, démontré que l'infection de cellules issues de la lignée U937 (lymphome humain) par le PVH-1 conduit à la formation de corps apoptotiques et au clivage de la poly ADP-ribose polymérase (PARP) [151], signes caractéristiques de l'induction de l'apoptose [159]. Les mécanismes exacts aboutissant à ces effets sont encore inconnus. Cependant, d'une part ils impliquent vraisemblablement les protéines non structurales, puisqu'ils peuvent être reproduits lors de l'infection des U937 par des PVH-1 recombinants n'exprimant pas les protéines de capsid, et d'autre part ils paraissent semblables à ceux induits par le *Tumor Necrosis Factor* α (TNF α) et pourraient donc correspondre plutôt à la voie extrinsèque d'induction de l'apoptose [151]. Toutefois, le PVH-1 ne semble pas induire lui-même une expression massive de TNF α , comme l'ont montré les travaux de Jörg Schlehofer sur des lignées cellulaires humaines ou de rongeurs [160].

Les travaux de Markus Moehler montrent la formation de corps apoptotiques et l'externalisation de la phosphatidylsérine membranaire après infection de lignées cellulaires

issues d'hépatomes humains [97]. L'induction de l'apoptose par le PVH-1 y est plus marquée lorsque les cellules sont déficientes en p53, et semble impliquer la protéine de la leucémie promyélocytaire (en anglais : *promyelocytic leukemia protein*, PML) [101].

Matteo Di Piazza, enfin, a montré que l'apoptose induite par le PVH-1 n'est pas nécessairement dépendante de l'activation des caspases. En effet, l'infection de cellules de gliome humain conduit à la libération, dans le cytosol, d'enzymes protéolytiques lysosomales, les cathepsines B et L. En parallèle, l'expression de leurs inhibiteurs, les cystatines B et C, est diminuée par le PVH-1. Ces voies apoptotiques particulières sont observées dans des cellules résistantes aux traitements anti-mitotiques classiques qui induisent l'apoptose par voie extrinsèque (fixation du ligand TRAIL, analogue du TNF α) ou intrinsèque (cisplatine, qui provoque des lésions dans l'ADN). L'infection par le PVH-1 induit la mort des cellules de gliome même lorsque celles-ci surexpriment des facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2. Ces résultats obtenus *ex vivo* ont été reproduits *in vivo* chez le rat [74]. L'infection par le PVH-1 de diverses lignées cellulaires humaines issues de cancer du pancréas induit aussi l'accumulation de cathepsines B dans le cytosol, en particulier lorsque ces cellules sont soumises à l'action concomitante de la gemcitabine (traitement du cancer du pancréas chez l'Homme) [73] et du PVH-1.

L'implication de NS1 dans les modèles susmentionnés n'a pas encore été directement démontrée. Cependant, elle est fortement suggérée par la corrélation entre le niveau d'expression de cette protéine et l'intensité des phénomènes cytotoxiques observés [74, 101, 151].

1.4.4.3. Nécrose

Ou comment moisir dans son coin...

Les travaux de Zhi-Hua Ran et Béatrice Rayet [152] ont montré que des lignées transformées de fibroblastes de rat et de kératinocytes humains infectées par le PVH-1 montrent à la fois des signes d'apoptose (activation de la caspase 3 et clivage de la PARP) et de nécrose (perte de l'intégrité membranaire, en particulier de la membrane nucléaire). L'apoptose est un mécanisme nécessitant de hauts niveaux d'énergie intracellulaire [161]. Lors de l'infection de ces cellules, on observe une diminution du stock de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), due à une activité accrue des enzymes impliquée dans la chaîne respiratoire. Ceci incite donc les auteurs à penser que la baisse du niveau d'énergie induite par le PVH-1 oriente plutôt la cellule vers la voie nécrotique [152, 161].

1.4.4.4. Altérations du cytosquelette

Jeu de mains, jeu de vilains

Les premières expériences portant sur la cytotoxicité induite par NS1 [130] montraient déjà que cette protéine peut induire des changements importants dans la morphologie de la cellule. En particulier, le cytoplasme des fibroblastes semble s'effondrer sur lui-même et ces cellules se « rétractent » pour finir par se détacher du support de culture. Les travaux de Jürg Nüesch [55, 153] décrivent en détail les mécanismes responsables de ces phénomènes. Ceux-ci sont le résultat d'une atteinte sélective de certaines structures du cytosquelette, plutôt qu'un effet secondaire de l'infection et de l'accumulation intracellulaire de virions néo-synthétisés. En effet, l'infection provoque d'importants réarrangements, puis une dégradation, des filaments d'actine, de vimentine et de tropomyosine, mais préserve les microtubules.

La dégradation de l'actine est le résultat d'un déséquilibre entre la protéine WASP (*Wiscott-Aldrich Syndrome Protein*) et la gelsoline. L'expression de WASP, activateur du complexe responsable de la polymérisation de l'actine, diminue au fur et à mesure de l'infection. Au contraire, la gelsoline, inhibiteur de la polymérisation de l'actine, voit son expression augmenter. En revanche, d'autres protéines impliquées dans la polymérisation (profiline, cortactine) ou la dépolymérisation (cofiline) de l'actine ne semblent pas être affectées [55].

Le maintien de la structure des microtubules n'est pas le résultat d'une promotion de leur polymérisation. Il s'agit plutôt d'une stabilisation directement commandée par la PKC λ , qui phosphoryle les tubulines α et β sous le coup de l'infection parvovirale [55].

NS1 est capable de perturber l'organisation des filaments de tropomyosine, au point de provoquer leur dégradation, qui sera fatale pour la cellule. Ceci est le résultat de modifications du profil de phosphorylation des isoformes de tropomyosine. La lignée A9 de fibroblastes de souris montre deux types de tropomyosine, la tropomyosine 2 (TM2) et la tropomyosine 5 (TM5). En dehors d'une infection parvovirale, la caséine kinase II α (CKII α) phosphoryle la TM2. En revanche, lors de l'infection par le MVMp, la CKII α phosphoryle la TM5. Ceci se produit car NS1, après avoir été phosphorylée par la PKC λ au niveau de ses résidus Ser473 et de Thr363, sert d'adaptateur protéique : elle recrute à la fois la CKII α et la TM5 et modifie ainsi la spécificité de substrat de la kinase, qui phosphoryle alors la TM5 au lieu de la TM2 [148] (pour rappel, [Figure 1.10](#) en regard de la page 26).

Les mécanismes de mort impliquant le cytosquelette restent les mieux connus à ce jour, même si les travaux les concernant ont principalement été effectués dans le cadre d'un seul modèle : l'infection, par le parvovirus MVMp, de fibroblastes murins transformés, la lignée A9 [55, 153].

But de la thèse

Les propriétés d'oncosuppression, d'oncotropisme et d'oncolyse que possède le parvovirus H-1 font de lui un candidat médicament particulièrement intéressant pour le traitement de tumeurs humaines. Les traitements anti-mitotiques actuellement sur le marché ont deux inconvénients majeurs :

- leur spécificité est limitée, ils peuvent donc porter atteinte aux cellules saines de l'organisme et sont ainsi rarement dépourvus d'effets secondaires
- les cellules tumorales peuvent posséder de façon innée ou développer divers mécanismes de résistance aux traitements.

Nos travaux ont tenté d'évaluer dans quelle mesure le parvovirus H-1 pourrait répondre à ces deux problèmes.

Dans une première partie (*projet NS1*), vous trouverez le résumé des travaux tentant de répondre au premier problème. Comment le parvovirus H-1 se comporte-t-il dans une cellule normale ? La question n'est pas nouvelle, et de nombreux travaux (*largement détaillés dans le Chapitre 3 de l'introduction de ce manuscrit*) ont déjà démontré que l'infection de cellules non transformées était sans effet délétères pour ces cellules, principalement parce que le promoteur P4 n'y est pas activé, et donc que la protéine NS1 n'y est pas produite. Nous avons cependant cherché à savoir ce qui se produirait si la protéine NS1 venait à être exprimée dans une cellule normalement insensible à l'infection parvovirale. Pour cela, nous avons utilisé un modèle permettant l'expression ectopique de NS1 dans des cellules humaines normales, et observé les conséquences de l'expression de cette protéine.

Dans une seconde partie (*projet Netrin-1*), vous trouverez le résumé des travaux tentant de répondre au second problème. Le parvovirus H-1 peut-il être efficace contre des tumeurs résistantes à certains traitements classiques ? De récents travaux démontrent que c'est le cas, notamment dans le traitement des gliomes et de certains cancers du pancréas [73, 74, 88]. Nous nous sommes penchés sur un autre type de cellules, des cellules humaines de cancer du sein présentant un haut risque de formation de métastases. Ces cellules montrent une résistance à l'apoptose, par l'intermédiaire d'un système autocrine inhibant l'induction de celle-ci. Nous avons cherché à savoir si l'infection de ces cellules par le parvovirus H-1 pouvait induire leur mort, et si oui, par quels mécanismes.

Résultats

Projet NS1

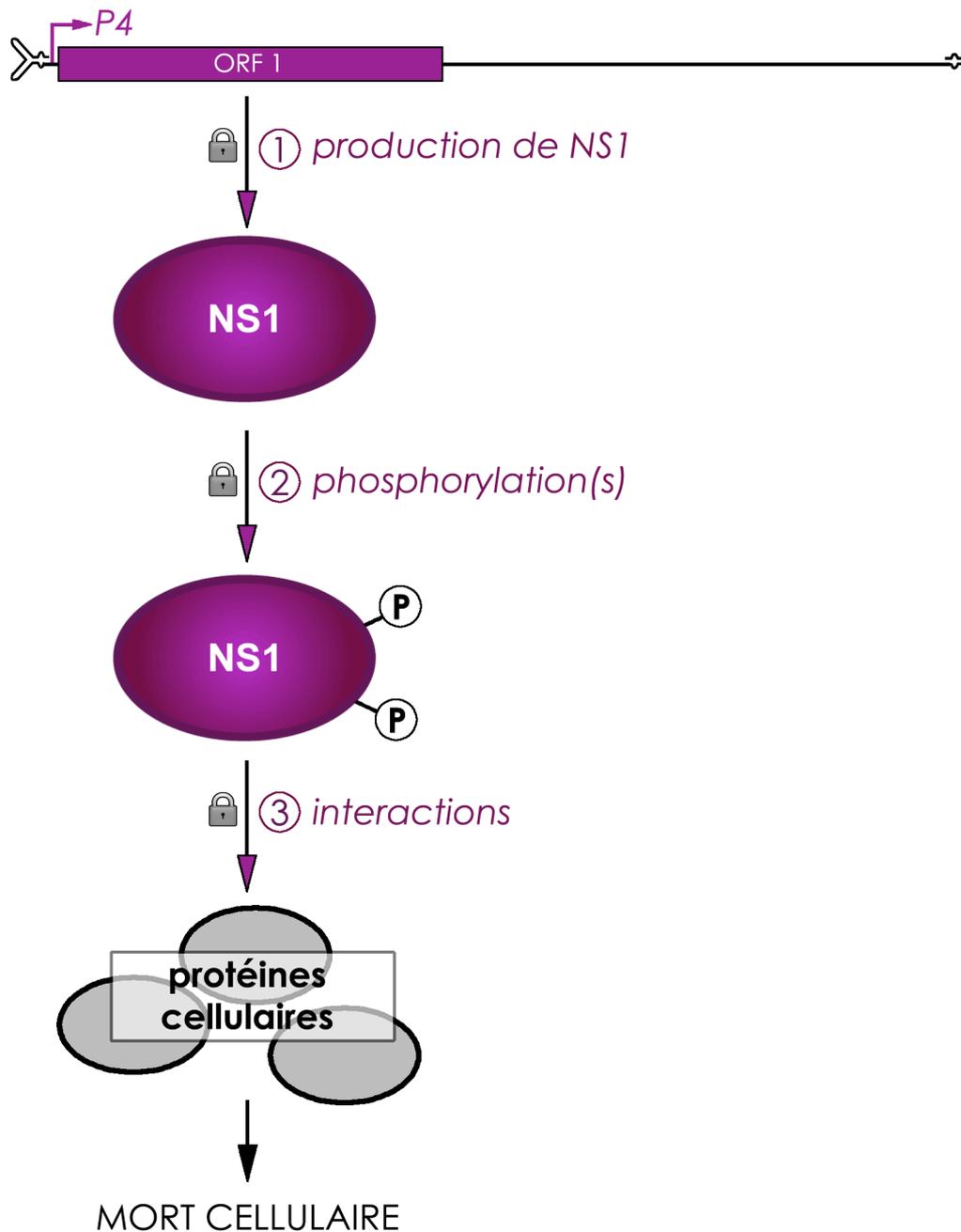


Figure R1.1

Modèle « à verrous successifs » de la cytotoxicité induite par le parvovirus H-1

Schématiquement, l'induction de la mort cellulaire par le parvovirus H-1 nécessite trois grandes étapes. La première d'entre elles est la production de la protéine NS1, après activation du promoteur parvoviral P4. La deuxième est l'activation des fonctions cytotoxiques de NS1 par phosphorylation de résidus spécifiques. La troisième est l'interaction entre la protéine NS1 « activée » et des partenaires protéiques cellulaires qui vont participer à l'induction de la mort de la cellule-hôte. A chacune de ces étapes peut correspondre un blocage (symbolisé par un verrou), qui ne sera levé que si certaines conditions sont réunies dans la cellule-hôte.

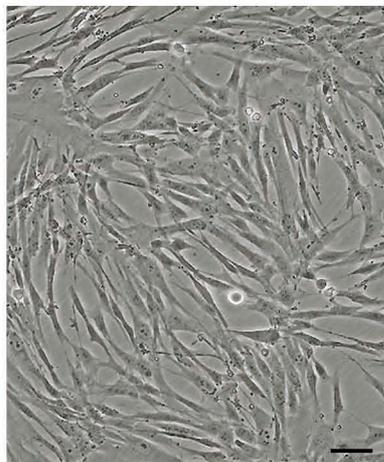
R1. 1. Contexte du projet NS1 et Résultats préliminaires

R1.1.1. Présentation de la problématique et du modèle cellulaire

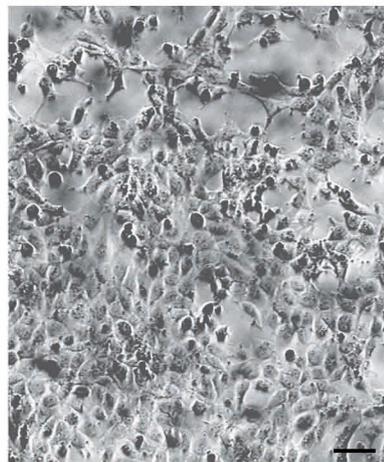
Les mécanismes de la cytotoxicité induite par le parvovirus H-1 sont encore relativement peu connus, malgré la progression accrue des connaissances dans ce domaine, grâce à quelques modèles particuliers, au cours de ces cinq dernières années. Cependant, le processus général menant à la mort cellulaire, tel qu'il est connu actuellement, peut être simplifié de façon à ne comporter que trois étapes majeures (**Figure R1.1**). La première d'entre elles correspond à l'activation du promoteur P4 qui aboutit à la production de la protéine NS1. La seconde est l'activation des fonctions cytotoxiques de NS1, par l'intermédiaire de la phosphorylation de résidus spécifiques. La troisième, enfin, correspond aux interactions entre la protéine parvovirale NS1 activée et des partenaires protéiques cellulaires. Ce sont ces interactions qui aboutiront à la mort cellulaire.

On pourrait donc considérer, toujours schématiquement et avec une vision assez finaliste, que la validation de chaque étape est confrontée à un « verrou » de la cellule-hôte. Une cellule sensible à l'infection parvovirale fournirait ainsi les éléments nécessaires au « déverrouillage » des trois étapes susmentionnées. En revanche, toujours selon ce même modèle, dans une cellule dite insensible à l'infection par le PVH-1, au moins un des trois « verrous » serait maintenu, empêchant ce virus de conduire à la destruction de la cellule-hôte.

De nombreux travaux ont été effectués sur la première étape de ce modèle, c'est-à-dire sur l'activation du promoteur parvoviral P4 (pour rappel, voir le paragraphe 1.3.3 de ce manuscrit). Généralement, une cellule insensible à l'infection par le PVH-1 l'est parce que le promoteur P4 n'a pas été activé et que la protéine NS1, principal acteur de la cytotoxicité induite par ce virus, n'a donc pas été produite. C'est généralement le cas des cellules non transformées. Nous avons souhaité savoir ce qu'il adviendrait si nous forçons le premier « verrou », en déclenchant la production de la protéine parvovirale NS1 dans une cellule insensible à l'infection parvovirale. Pour cela, nous avons choisi un modèle impliquant un couple cellulaire : la lignée cellulaire humaine MRC-5, non transformée et non immortalisée, et sa lignée dérivée MRC-5 SV2, transformée par le virus SV40.



MRC-5



MRC-5 SV2

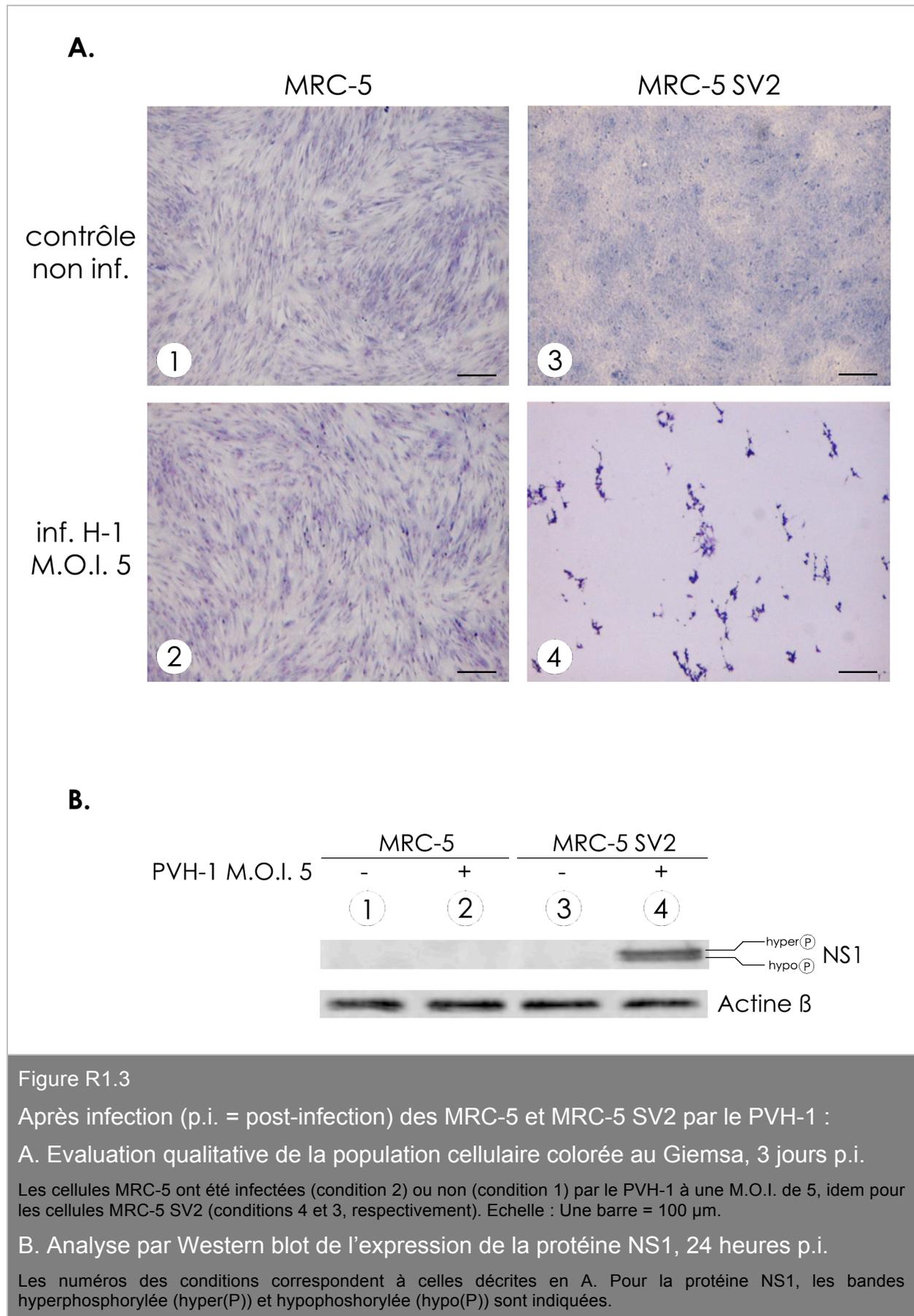
Figure R1.2

Morphologie des cellules MRC-5 et MRC-5 SV2 en culture

Ces photos ont été prises à forte densité cellulaire, sur cellules non fixées. Echelle : une barre = 100 μm .

La lignée cellulaire MRC-5 a été dérivée, par J.P. Jacobs en septembre 1966, du tissu pulmonaire d'un embryon humain mâle âgé de 14 semaines. Ces fibroblastes présentent un phénotype normal. Leur caryotype est $2n=46$, leur taux de polyplôidie très faible (moins de 4%) et on n'observe aucune anomalie au niveau des chromosomes X et Y. L'ATCC (*American Type Cell Collection*) indique que ces cellules sont capables d'effectuer 42 à 46 doublements de population (pd = *population doubling*) avant d'entrer en sénescence. Nous les avons achetées à pd 19 et avons observé des signes de ralentissement de croissance dès pd 30. Pour toutes nos expériences, nous les avons donc utilisées entre pd 20 et pd 27.

La lignée cellulaire MRC-5 SV2 a été établie par L.I. Huschtscha et R. Holliday en 1983 [162]. Ce sont des dérivés transformés par le virus SV40, mais qui ne produisent pas ce virus. Au contraire de leurs cellules parentales MRC-5, elles n'entrent pas en sénescence. Elles sont hyperdiploïdes, le nombre modal de chromosomes étant compris entre 60 et 80 chromosomes. Les auteurs avaient obtenu deux clones différents, appelés MRC-5 SV1 et MRC-5 SV2. Ce sont les MRC-5 SV2 qui présentent les signes de transformation les plus marqués. En particulier, contrairement aux MRC-5 SV1, elles sont capables de proliférer dans des conditions de culture minimales (très faible teneur en sérum, absence de méthionine), ont totalement perdu l'inhibition de contact, et sont capables de proliférer en lignée continue pendant au moins 5 ans sans aucun ralentissement de croissance. Bien que les MRC-5 soient des fibroblastes, la morphologie des cellules MRC-5 SV2 est nettement différente de la lignée parentale et se rapproche plus de celle de cellules épithéliales (**Figure R1.2**). La morphologie des MRC-5 SV2 est plus homogène au sein de la population cellulaire que celle des MRC-5 SV1.



R1.1.2. Résultats préliminaires

R1.1.2.1. Les cellules normales MRC-5 sont insensibles à l'infection par le PVH-1, contrairement à leurs homologues transformées MRC-5 SV2

Matériel et Méthodes :
paragraphe A.1.1. et A.1.2. (pages I à III),
A.1.4. (pages IV à VI)

Les cellules MRC-5 sont connues pour être peu sensibles à l'infection par le parvovirus H-1. En effet, des travaux effectués par Jan Cornelis ont montré que, 5 jours après infection par le PVH-1 à une multiplicité d'infection (M.O.I. ^{***}) égale à 10, la viabilité cellulaire des MRC-5 est proche de 70% alors que celle des MRC-5 SV1 n'est que de 2% [32].

La **Figure R1.3** montre que les cellules MRC-5 infectées par le PVH-1 à une M.O.I. de 5 ne sont majoritairement pas affectées, 72 heures après infection. En revanche, les mêmes conditions d'infection entraînent la destruction de la quasi-totalité de la population cellulaire de leurs homologues transformées MRC-5 SV2. L'analyse par Western Blot de l'expression de la protéine NS1, 24 heures après infection, montre que seules les cellules MRC-5 SV2 expriment cette protéine. Les cellules MRC-5 sont donc relativement insensibles à l'infection parvovirale, au contraire de leurs homologues transformées MRC-5 SV2. Selon notre modèle décrit plus haut, les cellules MRC-5 présenteraient donc au moins un « verrou » : la production de la protéine NS1 n'est pas possible lors de l'infection de ces cellules par le parvovirus H-1, probablement par défaut d'activation du promoteur P4.

^{***} M.O.I. = Multiplicity Of Infection (multiplicité d'infection), soit le nombre de particules virales qu'une cellule a reçu en moyenne ; la M.O.I. est calculée *a priori*, c'est-à-dire au moment de l'infection, et correspond au rapport entre le nombre de particules virales et le nombre de cellules



LEGENDE : pas d'alignement liaison à l'ADN NLS oligomérisation hélicase transactivation cytotoxicité

Figure R.1.4
Alignement des séquences en acides aminés de la protéine NS1 des parvovirus H-1 et MVM.
Les acides aminés de chacune des deux protéines sont représentés par leur code à une lettre. Les numéros indiqués au-dessus de certains acides aminés correspondent à leur position dans la séquence ; en plus du premier et du dernier (672) acide aminé et d'une indication de position tous les dix acides aminés, sont ainsi figurés les numéros de certains acides aminés d'intérêt. Les différents domaines d'activité de NS1 sont indiqués par les mêmes codes couleurs que dans la Figure 1.7, dont la légende est représentée ci-dessus. Seuls les acides aminés en blanc sur fond gris foncé sont ceux qui diffèrent entre H-1 et MVM. Source : COBALT (constraint based protein multiple alignment tool) réalisé à l'aide des outils de la page BLAST sur le site web du NCBI (National Center for Biology Information. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?link_loc=BlasHomeLink à l'aide des séquences de NS1 identifiées NP_040318 pour le parvovirus H-1 et NP_041243 pour MVM.

R1.1.2.2. La comparaison des séquences nucléotidiques de NS1 des parvovirus H-1 et MVM montre plus de 90% d'identité de séquence et la stricte conservation des résidus impliqués dans la cytotoxicité.

En grande majorité, les travaux effectués sur la protéine parvovirale NS1 ont été réalisés chez le MVM. Il est assez généralement admis que ce qui est observé pour MVM est extrapolable au PVH-1, de par leur forte identité de séquence (86%). Nous avons cependant souhaité comparer plus précisément les séquences nucléotidiques de la région codant la protéine NS1 des parvovirus H-1 et MVM. L'alignement des séquences est présenté **Figure R1.4**. On y remarquera notamment :

- que la séquence en acides aminés est plutôt bien conservée entre H-1 et MVM puisqu'on dénombre seulement 58 différences sur 672 acides aminés au total, ce qui représente 92% d'identité de séquence
- que les huit acides aminés connus pour être impliqués dans la cytotoxicité induite par NS1 (Ser283, Thr363, Lys405, Thr435, Thr463, Ser473, Thr585 et Ser588) sont tous strictement identiques entre H-1 et MVM
- que le domaine hélicase est entièrement conservé entre les deux espèces
- que le domaine de transactivation est, proportionnellement à sa taille, celui qui montre le plus de différences entre les deux espèces (16 différences sur les 67 nucléotides que constituent ce domaine, soit 23% de différence).

Au vu des résultats obtenus ici, nous considérerons donc par la suite que les travaux publiés sur les résidus impliqués dans la cytotoxicité portée par NS1 chez MVM sont extrapolables au parvovirus H-1.

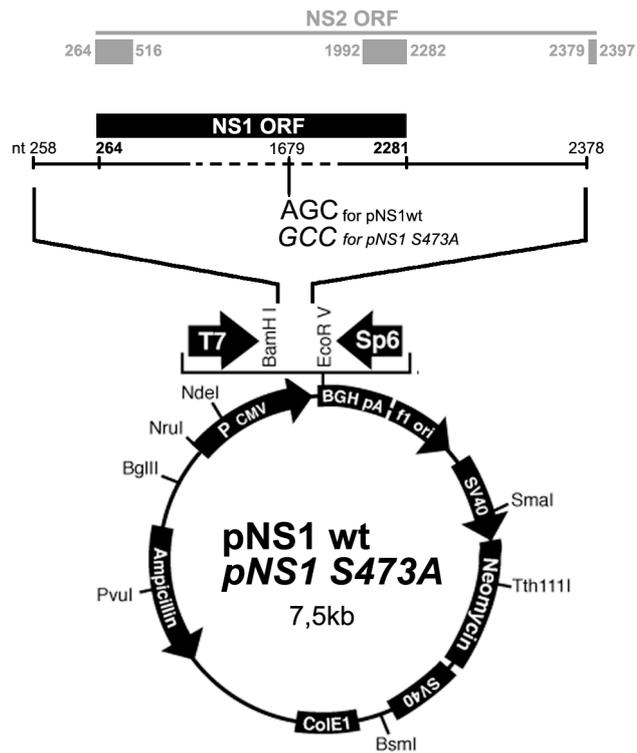


Figure R1.5

Carte des vecteurs pNS1wt et pNS1 S473A

Tous les numéros font référence à la position des nucléotides (nt) dans la séquence publiée du génome du parvovirus H-1 (référence NCBI NC_001358.1). La séquence codant NS1 (nt258 à 2378) a été insérée dans le vecteur pcDNA3 (Invitrogen) entre les sites de restriction BamHI et EcoRV. La mutation S473A a été introduite en remplaçant les nucléotides 1679 à 1681 (AGC) par GCC. La phase ouverte de lecture de NS1 (NS1 ORF, rectangle noir) couvre les nucléotides 264 à 2281. Au-dessus, nous avons représenté la phase ouverte de lecture de NS2 (NS2 ORF, rectangles gris) qui couvre les nucléotides 264 à 516, 1992 à 2282 et 2379 à 2397. Ceci montre que notre construction pourrait permettre l'expression d'une forme tronquée de NS2 à laquelle il manquerait les six derniers acides aminés carboxyterminaux (correspondant aux nucléotides 2379 à 2397).

R1.1.2.3. Nous avons construit deux vecteurs permettant respectivement l'expression ectopique d'une forme native et d'une forme mutée (a priori non toxique) de NS1.

Matériel et Méthodes :
paragraphe A.1.7. (pages VIII et IX)

Le vecteur appelé pNS1wt, dont vous trouverez la carte en [Figure R1.5](#), correspond au plasmide pcDNA3 (développé par Invitrogen) dans lequel nous avons inséré les nucléotides 258 à 2378 du génome du parvovirus H-1. Il permet l'expression d'une forme native de la protéine NS1. Vous remarquerez qu'il est également possible que ce vecteur permette l'expression d'une forme tronquée de la protéine NS2 à laquelle il manquerait les six derniers acides aminés carboxy-terminaux.

Nous avons également construit, par mutagenèse dirigée à partir de pNS1wt, un plasmide, appelé pNS1-S473A, qui permet l'expression d'une forme mutée de NS1, dans laquelle le résidu de sérine situé en position 473 (noté Ser473) est remplacé par un résidu d'alanine. Il a préalablement été démontré que cette mutation (désignée S473A par la suite) aboutit à une forme non toxique de NS1, la phosphorylation de la Ser473 par la protéine kinase C étant un prérequis à l'exercice des fonctions cytotoxiques de NS1 [140]. Hormis le changement des nucléotides 1679 à 1681 pour obtenir la mutation S473A, le plasmide pNS1-S473A est identique au pNS1wt et vous trouverez donc également sa carte en [Figure R1.5](#).

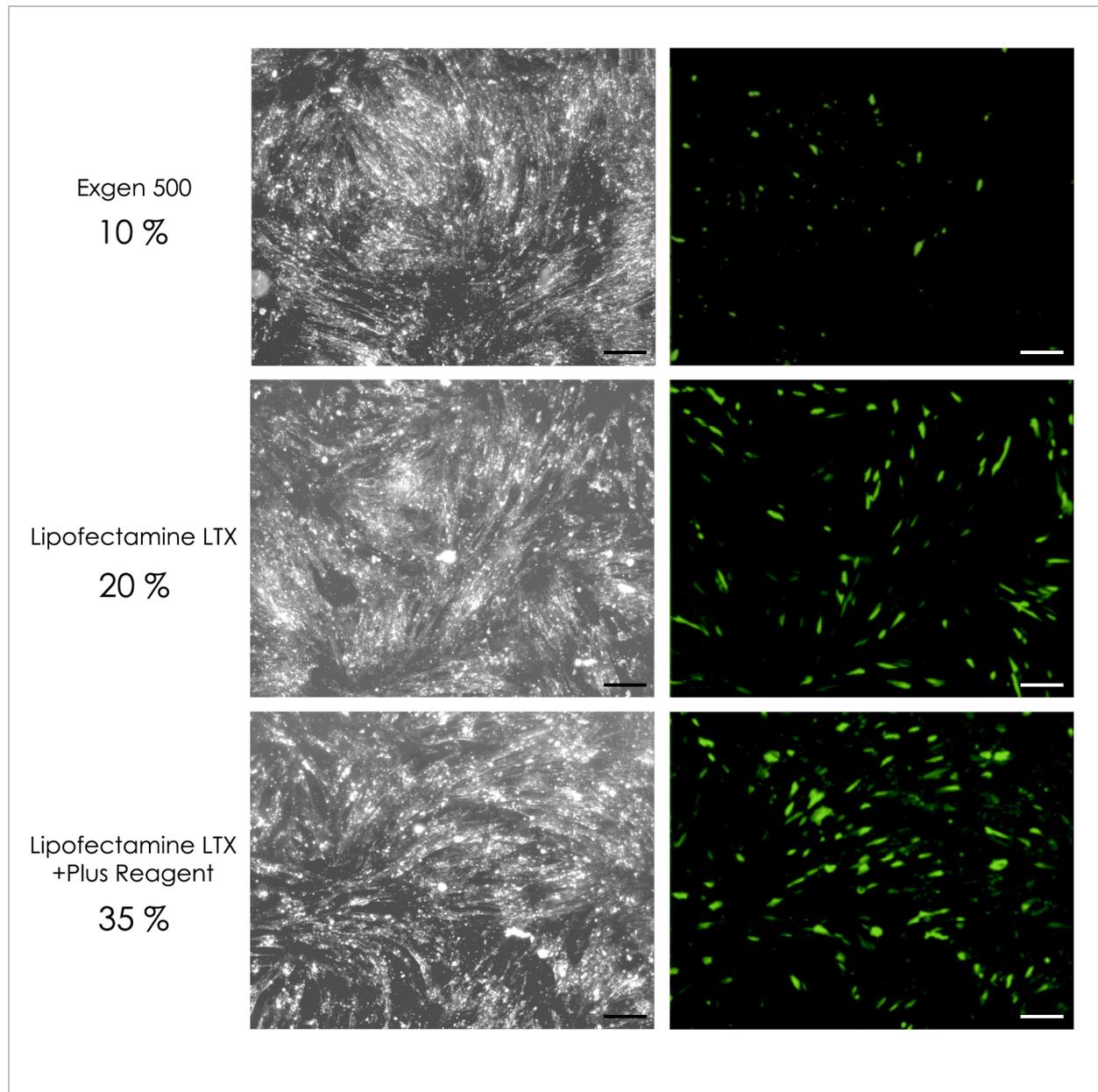


Figure R1.6

Estimation, par visualisation de l'expression de la GFP, du rendement de transfection transitoire dans les cellules MRC-5 lors de l'utilisation de divers agents de lipofection

Chaque ligne correspond à l'utilisation d'un (ou plusieurs) composés : à gauche des photos, le texte indique le nom du composé et le rendement calculé, exprimé en pourcentage et correspondant à la fraction de cellules exprimant la GFP par rapport à la population totale observée. Les photos de gauche montrent un champ observé en lumière visible au microscope à contraste de phase, et celles de droite montrent le même champ observé après excitation laser et utilisation du filtre approprié pour la mise en évidence l'expression de la GFP.

Echelle : Une barre = 100 μ m.

R1.1.2.4. *Le rendement de transfection transitoire des MRC-5 obtenu par les techniques classiques est relativement faible et incompatible avec une interprétation correcte des phénomènes que nous souhaitons observer.*

Matériel et Méthodes :
paragraphe A.1.5.1. (page VII)

Afin de déterminer le rendement de transfection transitoire obtenu dans les cellules MRC-5, nous avons construit un vecteur, appelé pcDNA3 GFP, qui, comme son nom l'indique, est dérivé du pcDNA3 et permettant l'expression de la *Green Fluorescent Protein* (GFP).

La technique de transfection transitoire appliquée en routine au laboratoire utilisait le mécanisme de lipofection (contraction de *liposome transfection*) employé par un réactif appelé ExGenTM 500 (développé par Fermentas). A différents temps après transfection transitoire des cellules MRC-5 par le pcDNA3 GFP, nous avons observé les cellules au microscope à contraste de phase, en lumière visible puis sous excitation laser et avec utilisation de filtres appropriés permettant de visualiser l'expression de la GFP. Nous avons ainsi pu calculer, pour chaque champ observé, le rendement de transfection transitoire, correspondant au rapport entre le nombre de cellules observées en lumière visible et le nombre de cellules exprimant la GFP. Le rendement moyen de transfection transitoire (correspondant à la moyenne des valeurs de rendements obtenues pour 5 champs observés par puits dans trois puits différents lors de trois expériences indépendantes) atteint un maximum de 10 % avec l'ExGenTM 500, 24 heures après transfection, valeur qui reste stable jusqu'à 48h après transfection avant de rapidement décliner pour être quasiment nulle au bout de 72h.

L'utilisation de produits a priori spécialement développés pour être utilisés dans des cellules difficiles à transférer, telles que les cellules primaires, a permis d'améliorer ces résultats. Ainsi, l'utilisation de la *Lipofectamine*TM LTX (développée par Invitrogen) permet d'obtenir des rendements moyens atteignant un maximum de 20%. L'adjonction d'un composé appelé *Plus Reagent*TM permet une amélioration notable du rendement de transfection transitoire, qui peut alors atteindre un maximum de 35%. La **Figure R1.6** montre les images obtenues pour un champ particulier au cours d'une expérience représentative, 24h après transfection.

Dans tous les cas, nous avons jugé que le meilleur rendement obtenu avec cette technique et les différents composés testés était insuffisant pour pouvoir observer les éventuels effets de l'expression de la protéine NS1 dans les cellules MRC-5. En particulier, ces effets pourraient être masqués par la prolifération des cellules non transférées, qui représenteraient au moins les deux tiers de la population cellulaire 24h après transfection.

Programme utilisé	A-024	T-016	U-012	U-013	U-023	V-013
Rendement de transfection	25-40 %	40-55 %	< 80 %	< 85 %	< 85 %	< 90 %
Viabilité cellulaire	< 95 %	< 90 %	70-80 %	< 80 %	60-70%	50-60 %

Tableau R1.1

Rendements de transfection (expression de la GFP) et viabilité cellulaire (colorimétrie au MTT) 24h après utilisation de divers programmes de nucléofection dans les cellules MRC-5

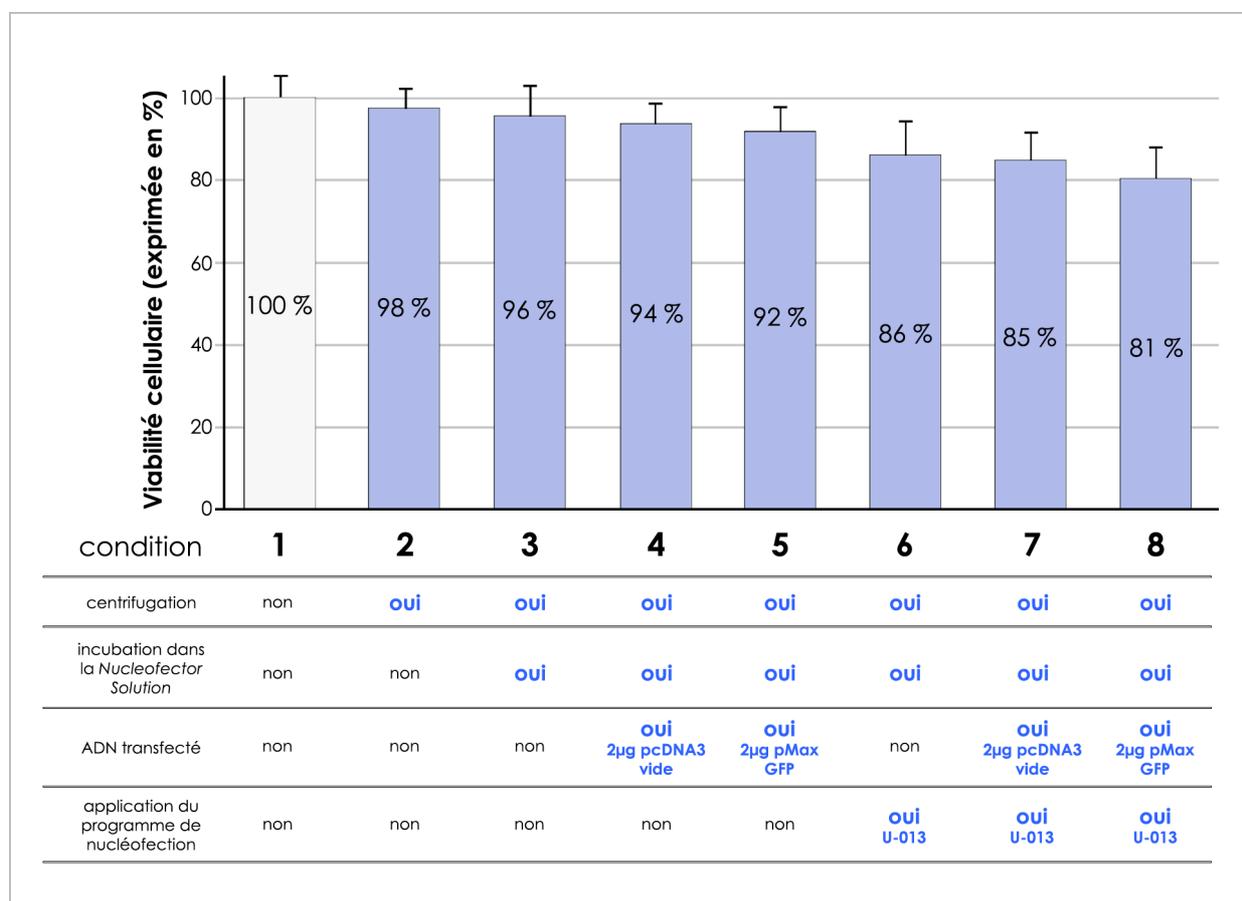


Figure R1.7

Evaluation, par la technique de colorimétrie au MTT, de l'impact de chacune des étapes du processus de nucléofection sur la viabilité des cellules MRC-5

Pour chacune des conditions, numérotées 1 à 8, le détail des traitements appliqués aux cellules MRC-5 est donné dans le tableau situé sous l'histogramme. Cet histogramme représente la viabilité cellulaire, exprimée en pourcentage, en prenant comme référence la condition 1, dans laquelle les cellules n'ont subi aucun traitement. Le cas échéant, le programme appliqué est indiqué, ainsi que le nom et la quantité de plasmide utilisé (exprimé en µg d'ADN pour 500 000 cellules)

R1.1.2.5. La technique de « nucléofection » permet d'obtenir de très bons rendements de transfection transitoire et une faible toxicité dans les cellules MRC-5 et MRC-5 SV2

Matériel et Méthodes :
paragraphe A.1.3. (page III) et A.1.5.2. (page VII)

Les rendements de transfection transitoire peu satisfaisants obtenus par lipofection nous ont amenés à utiliser une autre technologie, appelée *nucléofection*, du nom de l'appareil, le *Nucleofector*TM, développé par Amaxa. C'est un dérivé de la technique d'électroporation, basée sur la création momentanée de pores dans les membranes des cellules par application d'un courant électrique. Au contraire de la lipofection, la nucléofection délivre directement les plasmides à transférer dans le noyau de la cellule, assurant une expression plus rapide des protéines d'intérêt. La possibilité de combiner l'un des programmes d'application de courant électrique, prédéfinis dans le *Nucleofector*TM, avec l'une des solutions de nucléofection garantit des conditions montrant une toxicité plus faible qu'avec les autres techniques d'électroporation. Dans un premier temps, nous avons transfecté les cellules MRC-5 avec le plasmide pMaxGFP (fourni par Amaxa et permettant l'expression de la GFP) en utilisant la solution de nucléofection contenue dans le *Basic Nucleofector Kit for Primary Fibroblasts* et les différents programmes conseillés par le fabricant pour ce kit. Les valeurs de rendement de transfection transitoire obtenues, évaluées par la même méthode que pour les transfusions par lipofection, sont données dans le **Tableau R1.1**. Nous y avons également reporté les valeurs de viabilité cellulaire mesurées par la technique de colorimétrie au MTT*. Nos résultats indiquent que c'est le programme U-013 qui représente le meilleur compromis entre rendement de transfection et toxicité induite. Il nous permet en effet d'obtenir en routine un rendement de transfection supérieur à 85% et une viabilité cellulaire supérieure à 80%, 24h après transfection.

La technique de nucléofection implique :

- de centrifuger les cellules pendant 10 minutes à 90g,
- de resuspendre le culot cellulaire obtenu dans la *Nucleofector Solution* fournie dans le kit et de ne pas y incuber les cellules plus de 15 minutes,
- d'ajouter à cette solution l'ADN à transférer,
- et enfin, d'appliquer un programme prédéfini qui va délivrer un courant électrique d'intensité et de durée déterminées (tenues secrètes par le fabricant)

La **Figure R1.7** analyse l'impact de chacune de ces étapes sur la viabilité cellulaire. Elle montre que c'est l'application d'un courant électrique qui est le facteur principal responsable de la toxicité (comparaison des conditions 3 et 6, 4 et 7, et 5 et 8, où l'application du programme U-013, seul paramètre différent dans chacun de ces couples de conditions, diminue la viabilité de 9 à 11%).

* le principe de la technique de colorimétrie au MTT, ainsi que sa réalisation, sont détaillés dans le paragraphe A.1.3. page III (section Annexes, à la fin de ce manuscrit)

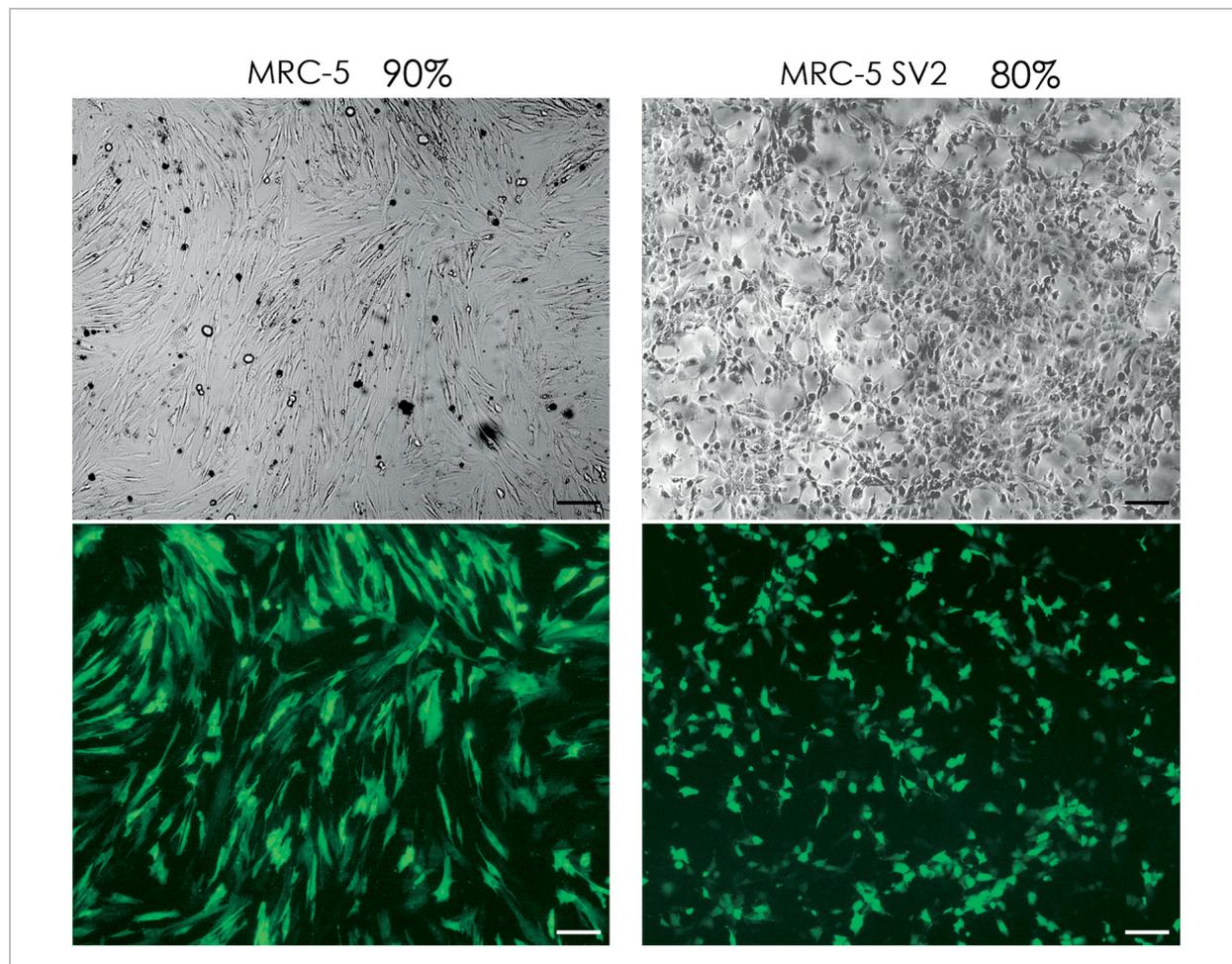


Figure R1.8

Estimation, par visualisation de l'expression de la GFP, du rendement de transfection transitoire (par nucléofection) dans les cellules MRC-5 et MRC-5 SV2

Les cellules ont été transfectées avec 2 μ g par puits (soit 500 000 cellules) de plasmide pMaxGFP. Le programme de nucléofection utilisé est U-013. Le rendement indiqué en regard du nom de la lignée cellulaire correspond, comme pour la Figure R1.6, à la fraction de cellules exprimant la GFP (photos du bas) par rapport à la population totale observée (photos du haut).

Echelle : Une barre = 100 μ m.

Nous avons également confirmé que la nucléofection permettait une expression plus rapide de la GFP qu'avec les techniques de lipofection. Il est en effet possible de visualiser l'expression de la GFP dès 4h après transfection (au lieu de 16h avec la lipofection). Avec le programme U-013, 4h après transfection des cellules MRC-5, on observe déjà un rendement de 50%, qui augmente de façon relativement linéaire pour atteindre au moins 85% 24h après transfection.

Nous avons également déterminé le meilleur ratio entre quantité d'ADN à transférer et nombre de cellules par puits de plaques 6 puits. Le fabricant propose d'utiliser 5.10^5 à 1.10^6 cellules et 1 à 5 μg d'ADN à transférer par puits. Les conditions optimales (utilisation du plus faible nombre de cellules possibles et meilleur compromis entre rendement de transfection et toxicité) sont obtenues avec 500 000 cellules et 2 μg d'ADN par puits (résultats non montrés ici).

Des résultats comparables ont été obtenus en utilisant le plasmide pcDNA3 GFP, et en reproduisant ces expériences (avec les deux plasmides pMax GFP et pcDNA3 GFP) dans les cellules MRC-5 SV2. La [Figure R1.8](#) montre ainsi une image obtenue pour un champ particulier au cours d'une expérience représentative, 24h après transfection des cellules MRC-5 et MRC-5 SV2 par le plasmide pMax GFP.

Nous avons cette fois jugé ces résultats satisfaisants pour utiliser ces conditions lors de nos expériences de transfection transitoire, visant à déterminer les effets éventuels de l'expression ectopique, dans les cellules MRC-5 et MRC-5 SV2, des formes native et mutée (S473A) de la protéine NS1. Les résultats que nous avons obtenu au cours de ces expériences ont donné lieu à la publication d'un article. Le manuscrit original, soumis au journal *Archives of Virology*, a nécessité des révisions mineures. C'est cette version révisée du manuscrit, remise en page pour ce manuscrit de thèse (avec notamment les figures en regard du texte), que vous trouverez en pages 40 à 46. A l'heure où vous lisez ces lignes, ce manuscrit est en train d'être ré-évalué par le comité éditorial du journal.

H-1 parvovirus NS1 protein ectopic expression induces actin filaments alterations and cell death in human normal MRC-5 and transformed MRC-5 SV2 cells

Pierre Wizla, Agnès Begue, Ingrid Loison, Audrey Richard, Perrine Caillet-Fauquet, Dominique Stéhelin.

CNRS, UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex, France.

Corresponding author:

Pierre Wizla, E-mail: pwizla@me.com, Phone: +33 320 871 094, Fax: +33 320 871 111.

Keywords: H-1 parvovirus, NS1 protein, cytotoxicity, MRC-5, MRC-5 SV2, actin filaments

ABSTRACT:

Regarding human cell lines, oncolytic H-1 parvovirus (H-1PV) replication preferentially occurs in transformed cells, which ultimately die upon infection. H-1PV-induced cytotoxicity is mainly due to P4 promoter-driven NS1 protein expression. Infection of untransformed cells generally does not induce deleterious effects because P4 promoter is not activated. Here we show that ectopic CMV-driven NS1 protein expression in normal human MRC-5 cells results in actin filaments alterations and cell death, both effects being prevented by serine 473 mutation. The same substitution preserves actin filaments of transfected MRC-5 SV2 cells, MRC-5 transformed counterparts, but does not impair NS1-induced cytotoxicity.

Parvoviruses are small single-stranded DNA viruses that infect a variety of species, including humans [20]. Autonomous parvoviruses, notably H-1 parvovirus (H-1PV) and Minute Virus of Mice (MVM) which share 86% sequence homology, have been shown to exert oncosuppressive properties *in vivo*. These properties are tightly linked to parvoviral oncotropism, which is defined as a cell transformation-associated stimulation of parvovirus replication. Indeed, as others and we demonstrated, a wide range of primary tissue cultures or even immortalized cell lines of normal origin were shown to resist parvovirus infection, whereas their tumor-derived or *in vitro* transformed equivalents were sensitive to parvovirus-induced cytotoxicity [13, 20]. H-1 parvovirus genome includes two promoters, the early P4 promoter, which controls non-structural (NS) proteins expression, and the late P38 promoter, which controls expression of structural, viral proteins (VP), constituting parvovirus capsid [20]. NS1 protein is the main effector of parvovirus-induced cytotoxicity, as it was demonstrated in a virus-free system in which MVM NS1 expression, driven by an inducible promoter replacing P4, led neoplastic human cells to death [2]. In addition to its cytotoxic properties, NS1 protein is required for parvovirus replication, which occurs only when host cell enters S-phase, underlining the high parvoviral dependency on host cell factors to achieve viral life cycle (for review, see [6, 17]). As NS1 protein is endowed with multiple activities, it is subjected to functional post-translational regulation through cellular kinases. NS1 protein phosphorylation pattern, affecting serine and threonine residues, was found to change throughout the course of infection [4].

NS1-induced cytopathic effects (CPE), leading to oncolysis, are the final result of a cascade of events. First, intracellular NS1 production has to reach a given threshold [2], and then NS1 protein is phosphorylated on specific residues, thus allowing it to interact with host cell protein partners [17], which finally leads to cell death induction. Therefore it is conceivable that the simple expression of NS1 protein in normal, non-transformed cells, would not lead cells to death, as the process concluded by CPE may be blocked at any of the above-mentioned steps. To test this hypothesis, we used a non-transformed vs. transformed human cells couple model: MRC-5 cells (MRC-5 pd19, ECACC 05072101, LGC Promochem, Teddington, UK), which are normal, embryonic lung fibroblasts with limited life span, and their simian virus (SV)40-transformed derivatives, MRC-5 SV2 cells (ECACC 84100401). Both cell lines were cultured in DMEM medium supplemented with 0.1 mM non-essential amino acids, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 20% (for MRC-5 cells) or 10% (for MRC-5 SV2 cells) FBS (all products: Invitrogen, Paisley, UK). Under these culture conditions, cell population doubling time ranged from 24 to 36 hours for both cell lines. MRC-5 cells were used at passage 20 to 26 for all experiments.

Fig. 1a

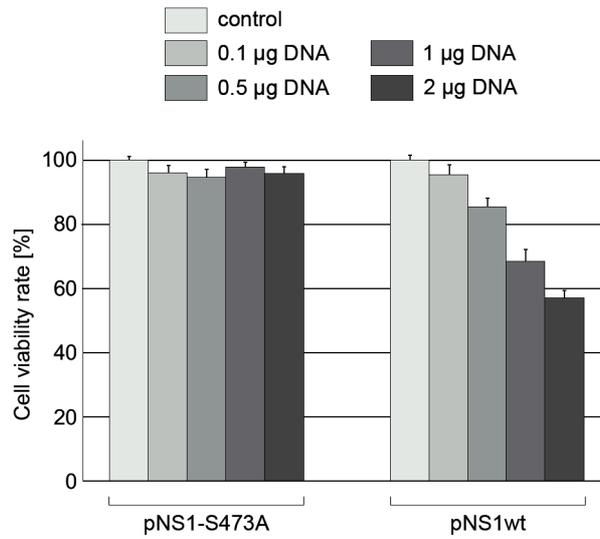


Fig. 1b

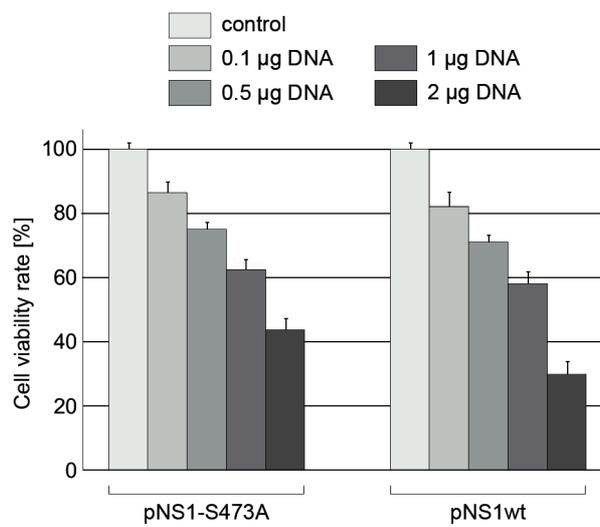


Fig. 1 MRC-5 **(a)** and MRC-5 SV2 **(b)** cell viability measured by MTT assay 24 hours p.t.. 500,000 cells were transfected with 0.1 to 2µg DNA from pNS1wt or pNS1-S473A plasmid. pCDNA3 plasmid without any insert (namely empty pCDNA3) was co-transfected to ensure cells received the same total DNA amount within each experiment. Cell viability is expressed as the ratio of the corresponding absorbency to that of control cells, transfected only with 2µg empty pCDNA3 (control), arbitrarily set at 100%

We first assayed MRC-5 and MRC-5 SV2 cells susceptibility to H-1PV infection. H-1PV was produced in a human cell line, as previously described [13]. While 90% MRC-5 SV2 were killed within 72 hours of H-1PV infection with 5 plaque-forming units inoculated per cell, there was no visible toxicity for MRC-5 cells under the same infection conditions (data not shown). Western blot analysis performed 24 hours after infection, before any visible H-1PV-induced effect, showed NS1 protein expression in MRC-5 SV2 cells, while NS1 was not detectable in MRC-5 cells (data not shown), suggesting deficiency in P4 promoter activity in these normal cells.

In order to bypass poor P4 promoter activity in MRC-5 cells and achieve high H-1PV NS1 protein expression levels by transient ectopic expression, we used a plasmid (named pNS1wt hereafter) in which NS1 production was driven by the strong, constitutively active CMV promoter. The NS1 coding sequence from an infectious H-1PV molecular clone [9] was inserted into the pCDNA3 vector (Invitrogen, Paisley, UK). A control vector, named pNS1-S473A hereafter, encoding a mutant form of NS1, in which the serine residue at position 473 was substituted by an alanine residue, was also generated using the Quikchange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Cedar Creek, NE, USA). This substitution has been previously reported as resulting in a non-toxic MVM NS1 protein form [5].

All transient transfection experiments were performed using the Amaxa® Nucleofector II® technology and Basic Nucleofector® Kit for Primary Mammalian Fibroblasts (Lonza, Basel, Switzerland), according to manufacturer's protocol. Program "U-013" was used for all experiments performed in triplicate three times. Transfection efficiency rate, as measured by GFP expression observation after a control transfection using the supplied pMax® GFP plasmid, started at 50% transfected cells 4 hours p.t. and routinely reached a 90% peak 24 hours p.t., a time at which all subsequent assays were made. In addition to the manufacturer's recommended controls, we performed additional controls to check the impact of any step of the transfection process on cell viability. All control experiments showed little (5 to 15%) toxicity compared to cells that were not subjected to any treatment (data not shown). MRC-5 cells were transfected with increasing quantities of either pNS1wt or pNS1-S473A plasmid DNA. Cell viability was quantified by means of a tetrazolium salt (MTT) viability assay (as described in [13]), each condition being tested in triplicate (Fig. 1). NS1 protein expression was assessed by Western blotting, as described in [13]. While the expression of the mutant form of H-1PV NS1 protein (namely NS1 S473A) had no significant effect on MRC-5 cells viability, expression of the wild type form of NS1 (NS1 wt) reduced cell viability in a dose-dependent manner (Fig. 1a).

Fig. 2a

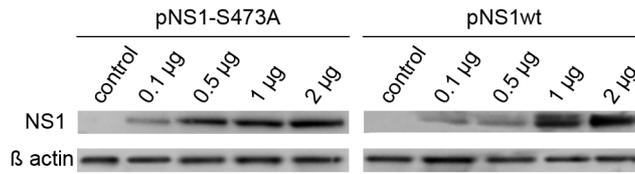


Fig. 2b

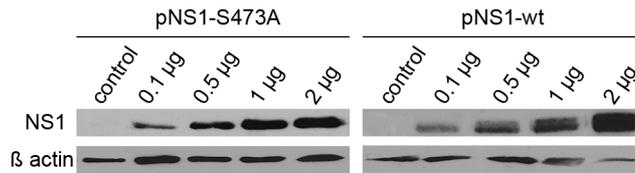
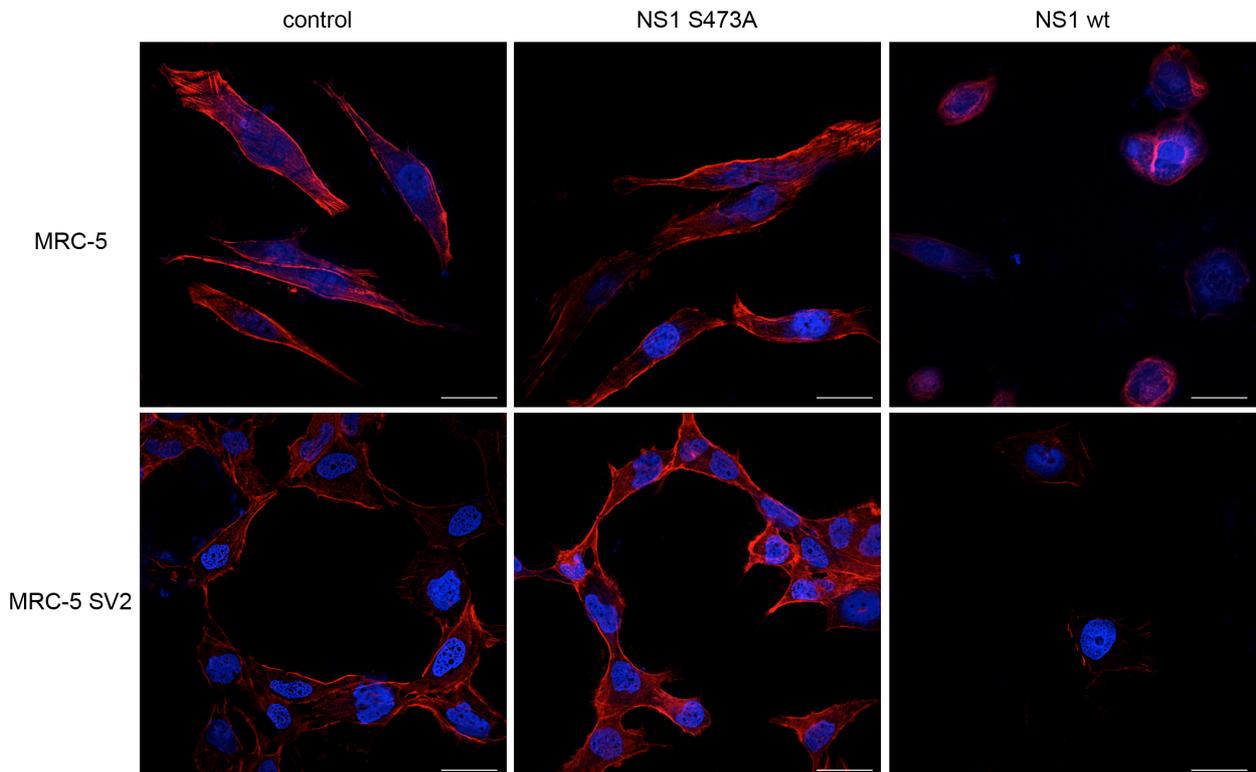


Fig. 2 Detection of NS1 expression using SP8 anti-NS1 rabbit serum in MRC-5 (**a**) and MRC-5 SV2 (**b**) cells by Western blotting 24 hours p.t. Transfection conditions are the same as for Fig. 1. β-actin expression was also assessed as a loading control (β-Actin C4 antibody, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). 20μg total proteins were loaded per well

Fig. 3



Western blotting analysis of NS1 expression classically shows a two-band doublet around 76 kDa, the upper band corresponding to a hyperphosphorylated form and the lower band to an hypophosphorylated form [14]. The NS1 protein doublet is visible in MRC-5 cells transfected with pNS1wt, while the expression of NS1 in MRC-5 cells transfected with pNS1-S473A was detected by only one distinctive band (Fig. 2a). We also performed the same transient transfection experiments with MRC-5 SV2 cells. In that case, both NS1 S473A and NS1 wt proteins expression led to a dose-dependent decrease in cell viability, as shown in Fig. 1b. It is worth noting that the NS1-induced toxicity is more pronounced in transformed than in normal cells, even when comparing NS1 S473A in MRC-5 SV2 (Fig. 1b) to NS1 wt in MRC-5 cells (Fig. 1a). Similarly to what was observed with MRC-5 cells, Western blot analysis revealed one NS1 band with pNS1-S473A and a doublet with pNS1wt (Fig. 2b).

Selective alterations of the host cell architecture, including actin filaments degradation, were shown to be part of the NS1-induced CPE [15]. We thus examined actin filaments structure by fluorescent staining after ectopic expression of NS1 wt or NS1 S473A. MRC-5 and MRC-5 SV2 cells grown on cover slips were fixed, permeabilized and actin filaments were marked with Alexa[®] Fluor 546 phalloidin (Invitrogen, Paisley, UK) solution according to manufacturer's protocol. Cells were then mounted in VECTASHIELD[®] Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Slides were observed under a LSM 710 confocal laser scanning microscope controlled by ZEN software version 2009 1.0 SP1 (Zeiss, Jena, Germany). The same results were observed for both MRC-5 and MRC-5 SV2 cell lines, as shown in Fig. 3. Cells transfected with empty pCDNA3 plasmid showed a spread shape due to typical fibroblast-like actin filaments organization. Cells transfected with pNS1-S473A did not show any perturbation, as compared with cells on control slides. In contrast, cells transfected with pNS1wt underwent marked morphological changes, showing collapse of actin filaments network and cell rounding. These cytoskeleton modifications were visible from 8 to 24 hours after transfection and correlated with NS1 protein expression, as checked by time-lapse Western blotting experiments (data not shown).

We demonstrate here for the first time that some non-transformed, non-susceptible to H-1PV human cells might provide a favorable context for NS1-induced CPE in vitro. However, normal MRC-5 cells and their transformed derivatives MRC-5 SV2 show different responses to NS1 expression, pointing to a higher sensitivity of transformed MRC-5 SV2 cells to NS1-triggered toxicity. Indeed, while the lowest NS1wt-encoding DNA amount was sufficient to induce a decrease in cell viability in MRC-5 SV2 cells, MRC-5 required a five-fold higher dose for toxicity to appear (Student's independent two-sample t-test returns a two-tailed p-

value equal to 0,0067). Even with high NS1 wt expression levels (obtained when using 2 μ g pNS1wt NDA), cell viability is lower in MRC-5 SV2 than in MRC-5 cells (p value = 0,0052). So far, a limited number of NS1 amino-acid residues have been shown to be required in their phosphorylated state for NS1-induced toxicity *in vivo*. They are all consensus phosphorylation sites for members of the protein kinase C (PKC) family [5, 7, 10]. Among them, serine at position 473 (Ser473) has been highlighted as of particular interest because its mutation impairs NS1 cytotoxicity in non-transformed murine fibroblasts [5]. Our results with human non-transformed MRC-5 cells are in agreement with these findings, as the Ser473Ala mutation also impairs NS1-induced cytotoxicity. Interestingly, this mutation did not prevent MRC-5 SV2 cells from cell death. This suggests that Ser473 is not of primary importance for NS1-induced CPE in these human transformed cells. Though being dispensable for NS1-induced cytotoxicity in MRC-5 SV2 cells, Ser473 remains a major phosphorylation site in both MRC-5 and MRC-5 SV2 cells. Indeed, the upper hyperphosphorylated NS1 band on Western blotting analysis is missing from both cell types expressing NS1 Ser473Ala. This feature is striking compared to cells transfected with pNS1wt or, to a larger extent, compared to susceptible H-1PV-infected transformed human cells [9, 13].

Our observations suggest that H-1PV oncotropism is expressed at the translational and post-translational levels. Mechanisms by which NS1 protein leads to cell death are already known to be cell-type dependent, as different cell types die by different cell death pathways upon H-1PV infection [8, 18, 19]. Our results extend this by suggesting that within a given cell type, NS1-induced cell death mechanisms also depend on the cell transformation state. Because NS1-triggered toxicity is the result of interactions between this viral protein and host cell protein partners, it is highly dependent on the availability of host cell target proteins [3, 17]. This might explain the differences we observed between the two cell lines. Assuming that NS1 host cell targets are the same in both cell types, they might be in higher concentrations in transformed cells. But the relative Ser473Ala mutation independency in MRC-5 SV2 cells also suggests that targets implicated in transformed cells differ from those in normal cells. This strong reliance on host cell targets nature and expression could explain why previous studies have shown that intracellular accumulation of MVM NS1 protein after ectopic expression in normal, immortalized rat fibroblasts is not sufficient to kill them [12]. It should also be stated that our construct might allow for expression of a truncated form of NS2 protein, in which the last six carboxyterminal aminoacids of wildtype NS2 are missing. However, to date, NS2 protein has been shown to have little cytotoxic activity by itself in human transformed cells [11].

Our results show modifications in actin filaments organization when NS1 wt is expressed in both MRC-5 and MRC-5 SV2 cells. NS1 is known to induce selective host-cell cytoskeleton alterations in mouse fibroblasts upon MVM infection, such as degradation of actin [15] and tropomyosin [16] filaments. Actin filaments degradation as a consequence of MVM infection was shown to be the result of an imbalance between actin polymerization controlled by N-WASP protein and actin filaments cleavage by gelsolin. Gelsolin-mediated actin degradation is controlled by a complex formed by parvovirus NS1 protein and cellular casein kinase II α (CKII α) [1]. In that system, NS1 interacts with CKII α only after NS1 Ser473 phosphorylation by PKC λ [16]. It is therefore somewhat interesting that in our experiments, the Ser473Ala mutation prevented MRC-5 and MRC-5 SV2 cells from actin filaments alterations. The mouse is the natural host of MVM, whereas we are working on interactions between human cells and H-1PV, whose natural host is the rat. Despite this different context, our results could be in agreement with these previous observations. This suggests that the recently described parvovirus-induced cell death pathway implying cytoskeleton alterations might be extended to human fibroblasts. Altogether, our results enlighten the complex mechanisms that govern H-1PV-host cell interactions, for which MRC-5 vs. MRC-5 SV2 cells couple is a study model of choice.

Acknowledgments: We thank Dr. J. Nüesch and Pr. J. Rommelaere for helpful discussions, Dr. E. Werkmeister for technical assistance with confocal microscopy, and Dr. G. Muharram for critical reading of the manuscript. This work was financially supported by Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais and GEFLUC.

References

1. Bär S, Daeffler L, Rommelaere J, Nuesch JP (2008) Vesicular egress of non-enveloped lytic parvoviruses depends on gelsolin functioning. *PLoS Pathog* 4: e1000126
2. Caillet-Fauquet P, Perros M, Brandenburger A, Spegelaere P, 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
3. Chen YQ, Tuynder MC, Cornelis JJ, Boukamp P, Fusenig NE, 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
4. Corbau R, Salomé N, Rommelaere J, Nuesch JP (1999) Phosphorylation of the viral nonstructural protein NS1 during MVMp infection of A9 cells. *Virology* 259: 402-415
5. Corbau R, Duverger V, Rommelaere J, Nuesch JP (2000) Regulation of MVM NS1 by protein kinase C: impact of mutagenesis at consensus phosphorylation sites on replicative functions and cytopathic effects. *Virology* 278: 151-167
6. Cotmore SF, Tattersall, P. (2006) A rolling-hairpin strategy: basic mechanisms of DNA replication in the parvoviruses. In: J.R. Kerr CSF, Bloom M.E., Linden R.M., Parrish C.R. (ed) *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, pp 171-188
7. Daeffler L, Horlein R, Rommelaere J, Nuesch JP (2003) Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. *J Virol* 77: 12466-12478
8. Di Piazza M, Mader C, Geletneky K, Herrero YCM, Weber E, Schlehofer J, Deleu L, Rommelaere J (2007) Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. *J Virol* 81: 4186-4198

9. Faisst S, Faisst SR, Dupressoir T, Plaza S, Pujol A, Jauniaux JC, Rhode SL, Rommelaere J (1995) Isolation of a fully infectious variant of parvovirus H-1 supplanting the standard strain in human cells. *J Virol* 69: 4538-4543
10. Lachmann S, Bar S, Rommelaere J, Nuesch JP (2008) Parvovirus interference with intracellular signalling: mechanism of PKC ζ activation in MVM-infected A9 fibroblasts. *Cell Microbiol* 10: 755-769
11. Legrand C, Rommelaere J, Caillet-Fauquet P (1993) MVM(p) NS-2 protein expression is required with NS-1 for maximal cytotoxicity in human transformed cells. *Virology* 195: 149-155
12. Mousset S, Ouadrhiri Y, Caillet-Fauquet P, Rommelaere J (1994) The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice nonstructural proteins in FR3T3 rat cells depends on oncogene expression. *J Virol* 68: 6446-6453
13. Muharram G, Le Rhun E, Loison I, Wizla P, Richard A, Martin N, Roussel A, Begue A, Devos P, Baranzelli MC, Bonnetterre J, Caillet-Fauquet P, Stehelin D (2009) Parvovirus H-1 induces cytopathic effects in breast carcinoma-derived cultures. *Breast Cancer Res Treat* (*In press*)
14. Nuesch JP, Corbau R, Tattersall P, Rommelaere J (1998) Biochemical activities of minute virus of mice nonstructural protein NS1 are modulated *In vitro* by the phosphorylation state of the polypeptide. *J Virol* 72: 8002-8012
15. Nuesch JP, Lachmann S, Rommelaere J (2005) Selective alterations of the host cell architecture upon infection with parvovirus minute virus of mice. *Virology* 331: 159-174
16. Nuesch JP, Rommelaere J (2007) A viral adaptor protein modulating casein kinase II activity induces cytopathic effects in permissive cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12482-12487
17. Nuesch JPF (2006) Regulation of non-structural protein functions by differential synthesis, modification and trafficking. In: Kerr J.R. CSF, Bloom M.E., Linden R.M., Parrish C.R. (ed) *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, pp 275-289
18. Ran Z, Rayet B, Rommelaere J, Faisst S (1999) Parvovirus H-1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis. *Virus Res* 65: 161-174
19. Rayet B, Lopez-Guerrero JA, Rommelaere J, Dinsart C (1998) Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J Virol* 72: 8893-8903
20. Rommelaere J, Cornelis JJ (1991) Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods* 33: 233-251

Projet Netrin-1

R2. 1. Contexte du projet Netrin-1

La netrin-1 a été initialement découverte dans le système nerveux où elle exerce, au cours du développement, son chimiotactisme, créant un cône d'attraction qui guide la croissance des axones [163]. Cette molécule est un ligand capable de se lier à deux familles de récepteurs : DCC (pour *Deleted in Colorectal Cancer*) et UNC5H (pour *UNC5 Homolog**) [164]. Ce n'est que plus tardivement que le rôle de la netrin-1 dans la survie cellulaire a été mis à jour. Les récepteurs DCC et de la famille UNC5H appartiennent en fait à la famille des récepteurs de dépendance [165, 166]. Ces récepteurs ont la propriété d'induire l'apoptose lorsque leur ligand est absent : c'est ce que l'on appelle « signalisation négative ». En revanche, en présence de leur ligand, ces mêmes récepteurs bloquent leur propre activité pro-apoptotique : on parle alors de « signalisation positive » [167]. De tels récepteurs créent ainsi un état cellulaire de dépendance au ligand, d'où leur nom.

Un tel concept revêt une importance particulière dans le cadre du cancer. En effet, il a été suggéré que la signalisation négative de ces récepteurs puisse être impliquée dans l'élimination des cellules tumorales. Celles-ci, se développant trop rapidement dans un environnement cellulaire où la concentration en ligand est constante et limitée, ou bien migrant vers des tissus où le ligand n'est pas exprimé (cas des métastases), seraient ainsi détruites.

Dans ce contexte, l'acquisition d'un avantage sélectif pour des cellules tumorales initialement dépendantes d'un ligand pourrait revêtir deux formes. La première serait que les cellules limitent voire perdent leur signalisation négative, c'est-à-dire suppriment l'activité pro-apoptotique du récepteur, par exemple en sous-exprimant ce récepteur. Il est d'ailleurs intéressant de noter que DCC, dont l'expression est fortement diminuée dans une grande majorité de tissus tumoraux humains, a été proposé comme gène suppresseur de tumeur au début des années 1990 [168]. L'autre possibilité serait que les cellules entretiennent perpétuellement leur signalisation positive, c'est-à-dire bloquent constamment l'activité pro-apoptotique du récepteur, par exemple en devenant autocrines pour leur propre ligand. Elles pourraient même ainsi exercer une sorte de « chimiotactisme tumoral » : tant que le ligand est exprimé dans le milieu, les cellules tumorales peuvent se développer, et éventuellement s'éloigner du site tumoral primaire et se disséminer pour former des métastases. C'est le cas des cellules de cancer mammaire SK-BR-7 et T-47D sur lesquelles nous avons travaillé. Julien Fitamant a en effet montré que ces lignées expriment fortement, et de façon constitutive, à la fois le récepteur UNC5H2 et son ligand, la netrin-1. Il a également montré que le blocage de la signalisation positive induit l'apoptose *in vitro* dans ces cellules et empêche la formation de métastases *in vivo* dans différents modèles murins [169].

* UNC5 étant un gène de *C. elegans*, impliqué dans l'orientation des axones.

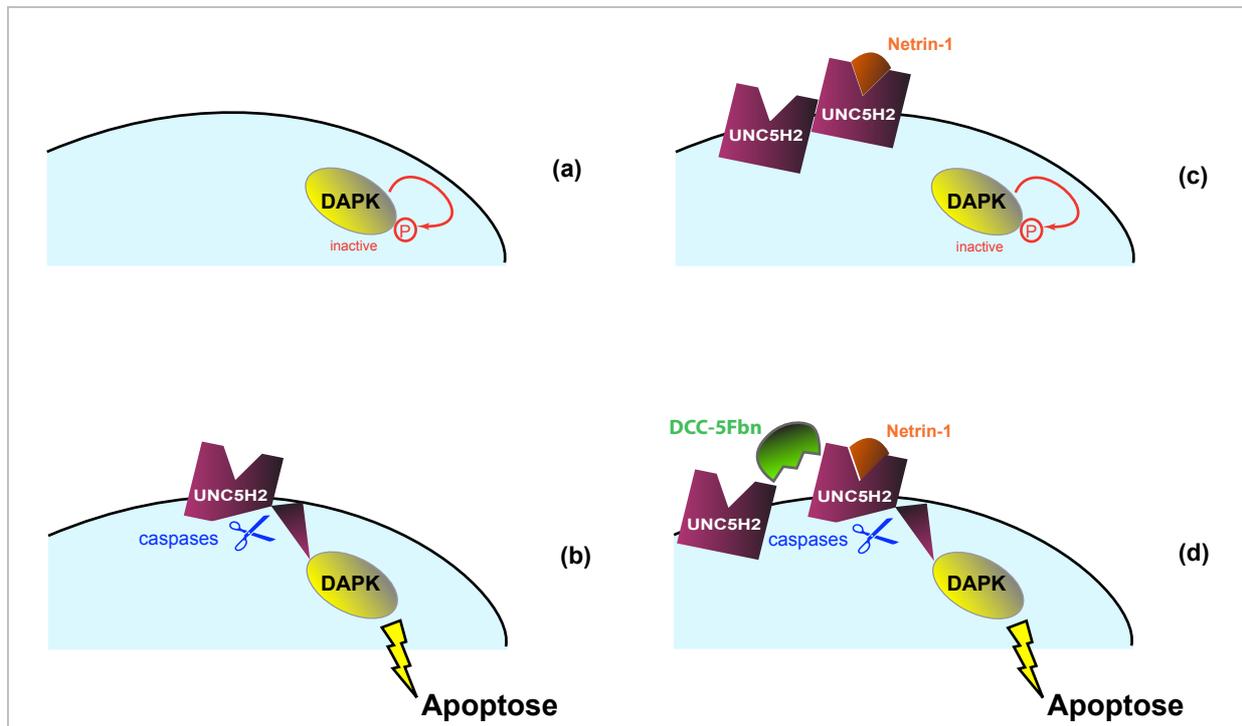


Figure R2.1

Scenarii possibles pour le système UNC5H/Netrin-1

Illustration réalisée d'après les travaux de Fabien Llambi [165, 170] et Florence Mille [171]

- (a) En dehors d'un contexte impliquant le système récepteur UNC5H/netrin-1, la protéine appelée DAPK (*Death Associated Protein Kinase*), présentant une activité sérine/thréonine kinase et possédant un domaine de mort cellulaire, est constitutivement inhibée et n'induit donc pas l'apoptose. Cette inhibition est le résultat d'une auto-phosphorylation de la DAPK sur son résidu de sérine en position 308, qui est situé dans un domaine permettant la liaison de la calmoduline.
- (b) Si le récepteur UNC5H2 est exprimé à la surface d'une cellule, il induit une « signalisation négative » lorsque son ligand, la netrin-1, n'est pas disponible dans le milieu extracellulaire. UNC5H2 présente un site de clivage par les caspases, de type DXXD (où D est un acide aspartique et X un résidu quelconque, le premier D étant situé en position 412 de la séquence en acides aminés de UNC5H2). En absence de netrin-1, un phénomène déclencheur encore inconnu (voir texte) induit un clivage de UNC5H2 par la caspase 3 [165]. Ce clivage permet une modification de conformation de la partie carboxy-terminale de UNC5H2, porteuse d'un domaine de mort cellulaire similaire à celui trouvé sur Fas et TNFr (récepteur du TNF). Ce domaine de mort est alors exposé mais pas complètement détaché du récepteur. En effet cette partie carboxy-terminale du récepteur possède un signal de myristoylation qui lui permet de rester attachée à la membrane, cet attachement étant indispensable pour l'induction de la mort cellulaire [165]. Ce domaine interagit avec le domaine de mort de DAPK [170]. et empêche l'autophosphorylation de cette dernière. DAPK, n'étant plus inhibée, induit donc l'apoptose.
- (c) La fixation de la netrin-1 sur UNC5H2 empêche le clivage de ce récepteur, par un mécanisme encore peu connu mais qui implique son homo-multimérisation. UNC5H2, non clivé, ne peut donc pas interagir avec DAPK. Dans ce cas, la DAPK, restant ainsi inhibée, ne peut pas induire l'apoptose.
- (d) L'inhibiteur de la netrin-1, le DCC-5Fbn, n'empêche pas la fixation de celle-ci sur son récepteur mais bloque la multimérisation des UNC5H2. DAPK induit l'apoptose, par le même mécanisme que dans le scénario (b).

La signalisation négative, c'est-à-dire l'induction de voies pro-apoptotiques par le récepteur, en absence de ligand, passe par l'activation de caspases qui clivent les récepteurs, ceux-ci exposant alors un domaine de mort [165] (**Figure R2.1**). Ce domaine de mort interagit avec DAPK (*Death Associated Protein Kinase*), une sérine/thréonine kinase qui induit l'apoptose lorsque son auto-inhibition par phosphorylation est levée [170]. En absence de netrin-1, UNC5H2 inhibe l'auto-phosphorylation de DAPK, ce qui active cette kinase qui induit donc l'apoptose. En revanche, lorsque la netrin-1 est fixée sur UNC5H2, ce récepteur n'interagit pas avec DAPK qui reste alors autophosphorylée, donc inhibée, et n'induit ainsi pas l'apoptose.

Actuellement, le problème de l'initiation du clivage du récepteur UNC5H par les caspases n'est pas encore résolu. En effet, classiquement, l'activation des caspases est un phénomène qui se situe en aval de l'activation de DAPK. Or, dans le modèle décrit, c'est au contraire le clivage de UNC5H2 par des caspases qui induit l'activation de DAPK. Une hypothèse avancée par les auteurs est que le clivage du récepteur pourrait se produire, à très petite échelle, par une protéase autre qu'une caspase. Ce premier clivage serait suffisant pour provoquer un « emballement » du système qui, en activant les caspases, amplifierait le clivage des récepteurs UNC5H2. Ceci produirait une boucle d'amplification des caspases, induisant *in fine* la mort cellulaire observée. Dans cette hypothèse, l'apoptose serait le résultat d'une forte augmentation de l'activité de caspases déjà actives à un niveau basal, plutôt qu'une activation de caspases considérées comme initialement complètement inactives.

DAPK est impliquée dans de nombreux types de mort cellulaire, apoptotique ou non, et quand il s'agit d'apoptose, elle peut être dépendante des caspases ou non [171]. Les mécanismes exacts par lesquels DAPK induit la mort cellulaire des cellules exprimant UNC5H2, en dehors d'une probable activation de la caspase 3, n'ont pas encore été déterminés à ce jour. Il est possible que les voies mises en jeu lors de l'induction de l'apoptose par UNC5H2 soient complexes, atypiques et impliquent de nombreux facteurs. Ainsi, l'apoptose induite par DCC, autre récepteur de la netrin-1, n'appartient clairement à aucune des deux voies d'apoptose classiques (intrinsèque, dépendante de la mitochondrie, ou extrinsèque, déclenchée par les récepteurs de mort cellulaire). En effet, DCC interagit avec la caspase 3 et la caspase 9, la seconde activant la première, sans aucune intervention du cytochrome c ou d'Apaf1 [172].

La signalisation positive, c'est-à-dire le fait que la fixation de la netrin-1 sur UNC5H2 bloque l'activité pro-apoptotique de ce récepteur, nécessite une homo-multimérisation du domaine intracellulaire de UNC5H2 (**Figure R2.1**). Il est ainsi possible d'empêcher la signalisation positive, c'est-à-dire qu'il est possible d'induire l'apoptose, en empêchant la multimérisation. Cela est réalisable en utilisant un composé développé par l'équipe de Patrick Mehlen, appelé

DCC-5Fbn car il correspond à une version recombinante soluble du cinquième domaine fibronectine (en abrégé, Fbn) du récepteur DCC. DCC-5Fbn interagit avec la netrin-1 et empêche que celle-ci inhibe l'apoptose. Le mode d'action exact du DCC-5Fbn n'est pas encore documenté mais il ne s'agit pas d'un inhibiteur compétitif de la netrin-1 [173].

L'équipe de Patrick Mehlen nous a fourni de petites quantités de ce composé DCC-5Fbn, et nous avons ainsi disposé d'un modèle cellulaire complet, les cellules SK-BR-7 et T-47D, exprimant UNC5H2 et autocrines pour leur ligand, la netrin-1. Dans ces cellules, une voie particulière d'apoptose est inhibée, mais nous pourrions *a priori* la rétablir en ajoutant du DCC-5Fbn dans le milieu de culture cellulaire.

Nous souhaitons savoir si ces cellules, dérivées de tumeurs mammaires à fort pouvoir métastatique, et dans lesquelles une voie d'apoptose était constitutivement inhibée, pouvaient être lysées sous l'effet de l'infection par le parvovirus H-1, et si oui, par quel mécanisme de mort cellulaire.

R2. 2. Résultats obtenus pour le projet Netrin-1

R2.2.1. Les lignées cellulaires SK-BR-7, T-47D et MDA-MB-231 sont sensibles à l'infection par le parvovirus H-1.

Matériel et Méthodes :
paragraphe A.1.1. à A.1.3. inclus
(pages I à IV)

Nos premiers travaux ont consisté à déterminer si les lignées mammaires SK-BR-7 et T-47D, exprimant le récepteur UNC5H2 et son ligand, la netrin-1, étaient sensibles à l'infection parvovirale. En contrôle, nous avons utilisé une autre lignée mammaire, la lignée MDA-MB-231, n'exprimant ni UNC5H2 ni la netrin-1 mais connue, de par de précédents travaux dans le laboratoire, pour être sensible à l'infection par le virus.

Nous avons donc infecté ces lignées avec le parvovirus H-1, à différentes multiplicités d'infection (en anglais, *Multiplicity Of Infection*, M.O.I., qui correspond au nombre moyen de particules virales qu'est supposée recevoir une cellule). Trois jours après infection, les cellules ont été fixées et colorées au Giemsa, puis observées sous loupe binoculaire (**Figure R2.2** page suivante) afin d'évaluer la population cellulaire. En parallèle, ces cellules ont été soumises à la technique de colorimétrie au MTT* (**Figure R2.3**). Les **Figures R2.2** et **R2.3** montrent que les trois lignées SK-BR-7, T-47D et MDA-MB-231 meurent sous l'effet de l'infection du parvovirus H-1 : dans toute la suite des résultats, nous dirons de cellules qui sont détruites après infection par le parvovirus H-1 qu'elles sont « sensibles » à ce parvovirus. On observe une destruction d'une grande partie de la population cellulaire à partir d'une multiplicité d'infection égale à 1, le phénomène s'amplifiant avec des M.O.I. plus fortes de telle sorte que, quelle que soit la lignée considérée, plus de 90% de la population initiale est détruite après 3 jours d'infection à M.O.I. 100.

* le principe de la technique de colorimétrie au MTT, ainsi que sa réalisation, sont détaillés dans le paragraphe A.1.3. page III (section Annexes, à la fin de ce manuscrit)

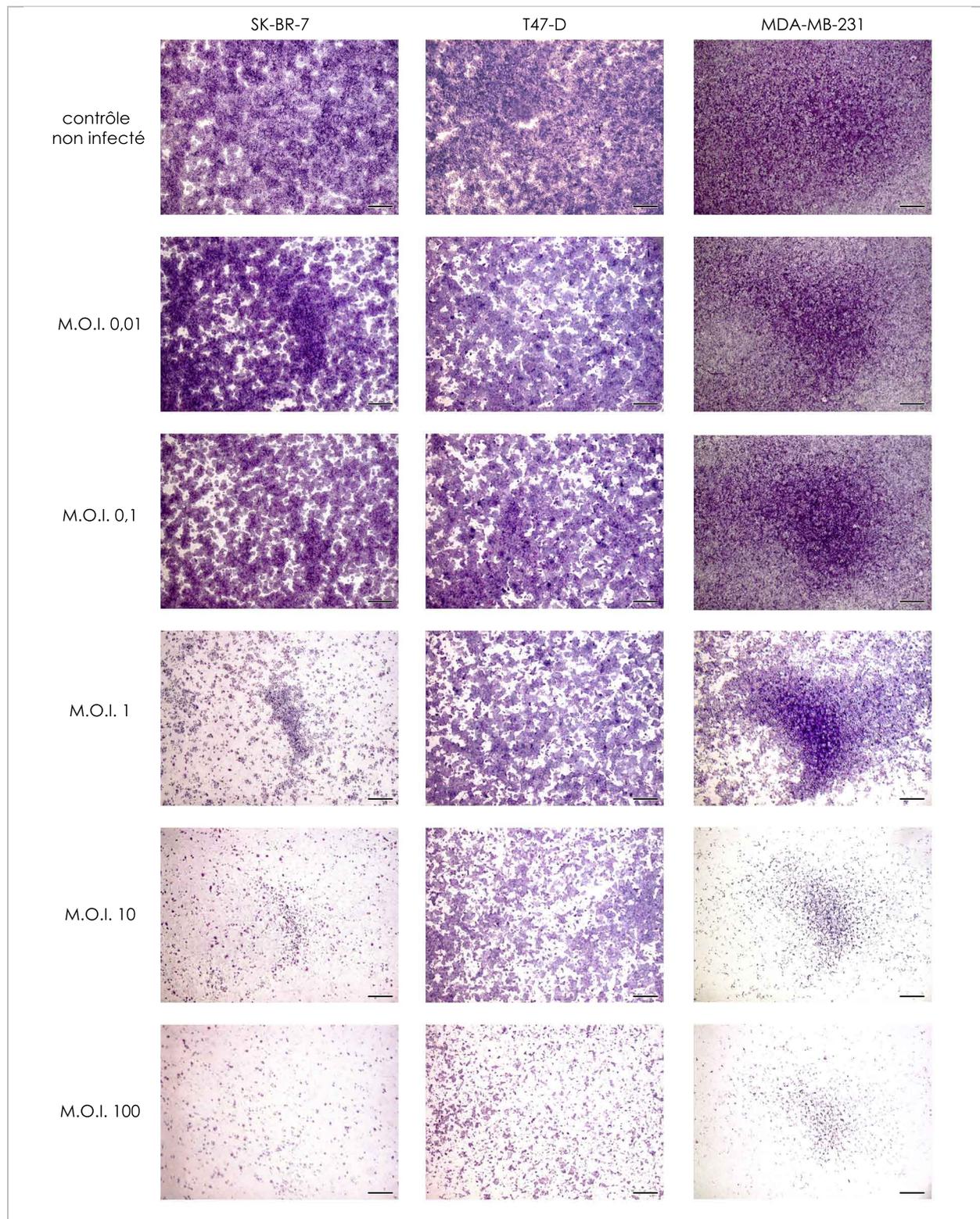


Figure R2.2

Evaluation qualitative de la population cellulaire, colorée au Giemsa, 3 jours après infection des lignées SK-BR-7, T47-D et MDA-MB-231 par le parvovirus H-1

Abréviations : M.O.I. : *Multiplicity Of Infection*, multiplicité d'infection, ou nombre moyen de pfu (*particle forming units*) par cellule, calculé *a priori* d'après la formule $M.O.I. = (\text{nombre de virions inoculés}) / (\text{nombre de cellules})$.
Echelle : Une barre = 2 mm.

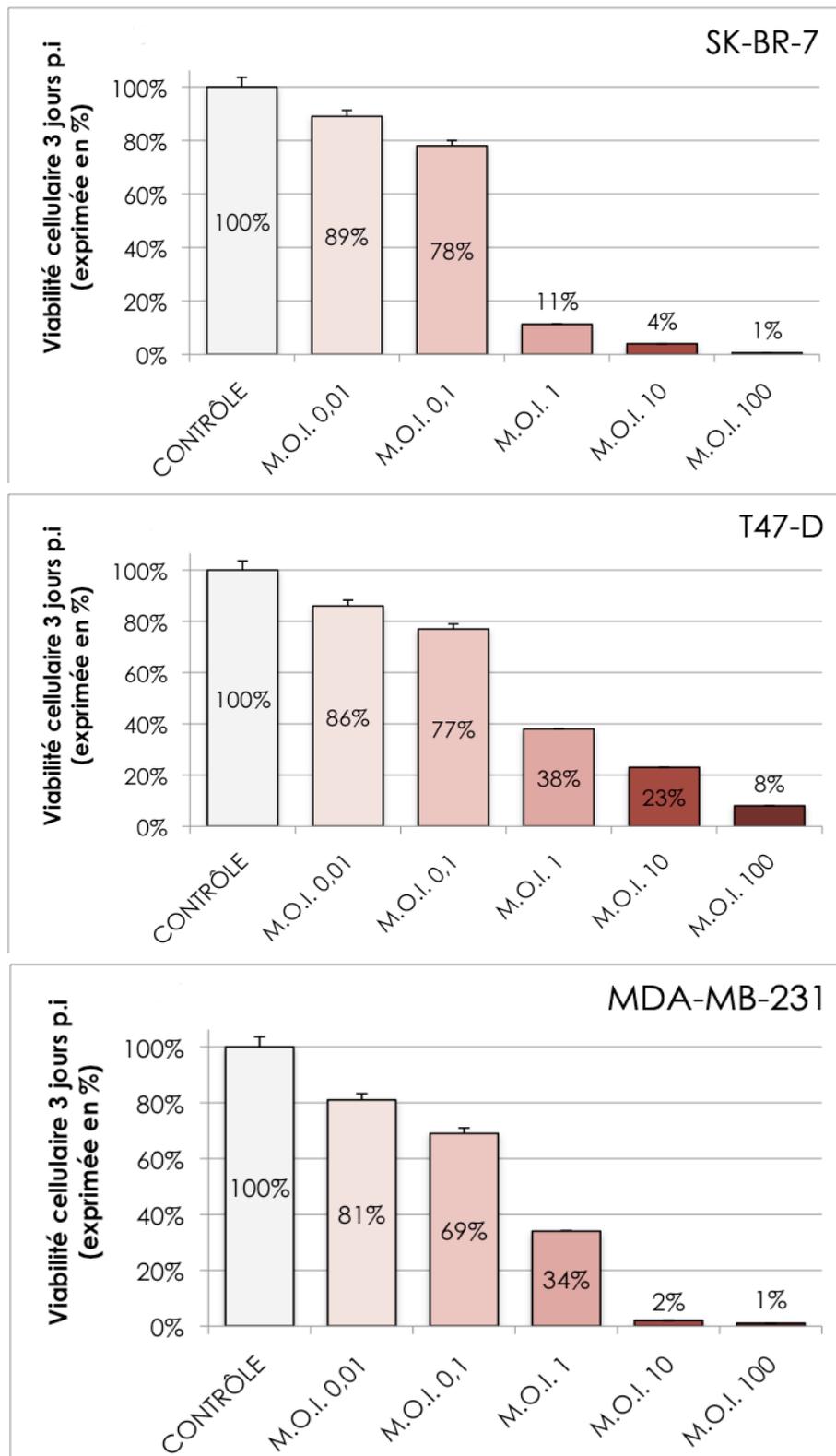


Figure R2.3

Evaluation quantitative de la viabilité cellulaire des lignées SK-BR-7, T47-D et MDA-MB-231 3 jours après infection par le parvovirus H-1

Les valeurs, obtenues par la technique de colorimétrie au MTT (voir texte), sont exprimées en pourcentage, la viabilité des cellules non infectées (« contrôle ») étant arbitrairement fixée à 100%. (M.O.I. : voir Figure R2.2)

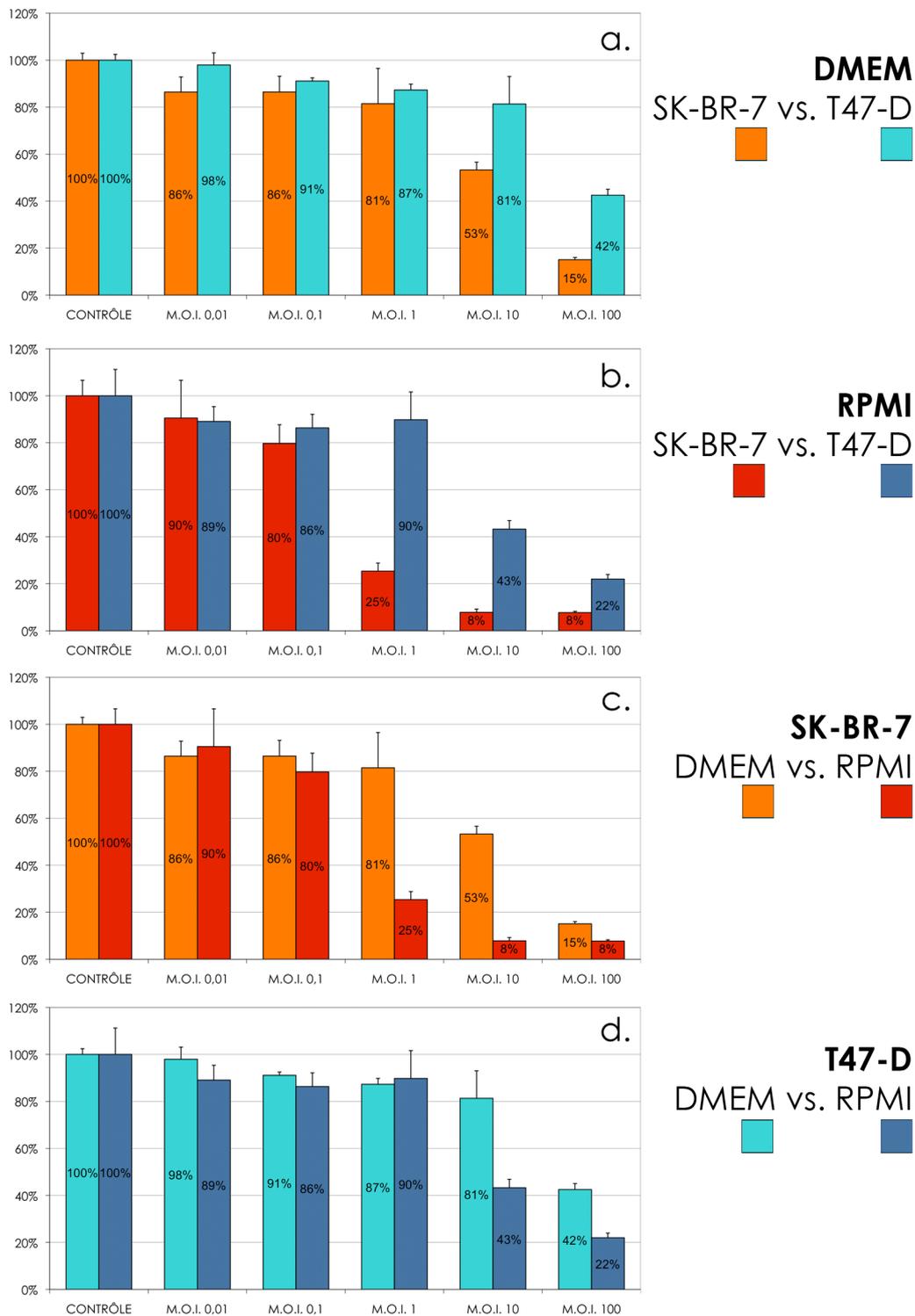


Figure R2.4

Evaluation quantitative de la viabilité cellulaire des lignées SK-BR-7 et T47-D cultivées dans les milieux de culture DMEM et RPMI, 3 jours post-infection (p.i.) par le parvovirus H-1

Les valeurs, obtenues par la technique de colorimétrie au MTT (voir texte), sont exprimées en pourcentage, la viabilité des cellules non infectées (« contrôle ») étant arbitrairement fixée à 100%. (M.O.I. : voir Figure R2.2). Quatre conditions seulement ont été testées au cours de ces expériences, correspondant aux quatre couleurs : orange = SK-BR-7 dans DMEM ; rouge = SK-BR-7 dans RPMI ; bleu clair = T47-D dans DMEM ; bleu foncé = T47-D dans RPMI. Les quatre histogrammes correspondent en fait à quatre représentations différentes de la même expérience, mettant à chaque fois en regard deux des quatre conditions testées. Ceci a été réalisé afin de faciliter l'analyse des données : pour chaque histogramme, un des deux paramètres (milieu ou type cellulaire) reste constant, et il est alors figuré en gras dans le titre, alors que l'autre paramètre varie.

R2.2.2. Les conditions de culture influent sur le niveau de sensibilité des lignées SK-BR-7 et T-47D au PVH-1, même si SK-BR-7 reste la lignée la plus sensible.

Matériel et Méthodes :
paragraphe A.1.1. à A.1.3. inclus
(pages I à IV)

Si les trois lignées mammaires testées sont toutes sensibles au parvovirus H-1, c'est toutefois la lignée SK-BR-7 qui apparaît la plus sensible. Il est cependant intéressant de noter que les premières expériences (paragraphe R2.2.1 et **Figures R2.2** et **R2.3**) ont été effectuées dans les conditions normales de culture de chaque lignée, c'est-à-dire en utilisant le milieu recommandé pour chacune d'entre elles. Dans ces conditions, les cellules SK-BR-7 ont été cultivées en milieu RPMI 1640, tandis que les cellules T-47D et MDA-MB-231 sont cultivées en milieu DMEM. Ainsi, afin d'évaluer si la différence de sensibilité observée au premier test est un fait avéré ou bien la conséquence d'un biais expérimental (qui serait le résultat de conditions de culture différentes), nous avons mis en culture, pendant une dizaine de passages, les lignées SK-BR-7 et T-47D dans les deux milieux DMEM et RPMI 1640. Puis nous les avons infectées par le PVH-1 à différentes M.O.I. et évalué leur viabilité cellulaire, dans chacune de ces conditions, avec la technique de colorimétrie au MTT, comme précédemment. Les résultats sont présentés **Figure R2.4**.

Nos résultats indiquent que, quel que soit le milieu utilisé, les cellules SK-BR-7 sont nettement plus sensibles que les T-47D aux M.O.I. 10 et 100 (**Figure R2.4, graphiques a. et b.**). Cette différence de sensibilité entre les deux lignées est même déjà visible à M.O.I. 1 lorsque les cellules sont cultivées en RPMI 1640. La sensibilité accrue des cellules cultivées en RPMI 1640 est par ailleurs visible pour les deux types cellulaires (**Figure R2.4, graphiques c. et d.**).

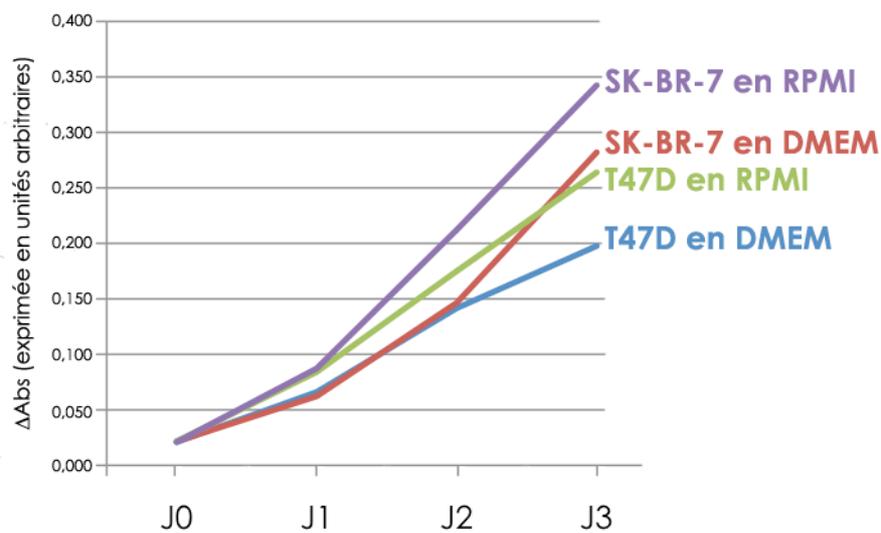


Figure R2.5

Evolution de la population cellulaire (courbes de croissance) des cellules SK-BR-7 et T47-D dans les milieux de culture DMEM et RPMI

Les valeurs représentées correspondent à la différence entre les valeurs d'absorbance (Δ Abs) mesurées aux longueurs d'onde de 620 et 540 nm, et reflètent le nombre de cellules viables (à notre connaissance, il n'existe cependant pas de relation permettant de convertir cette valeur de Δ Abs en un nombre de cellules exact, d'où le choix de l'unité représentée). Les cellules ont étéensemencées en nombre initial identique pour les quatre conditions au jour J0, puis suivies pendant les 3 jours de leur phase exponentielle de croissance (notés J1 à J3).

(Pour ne pas surcharger la figure, les barres d'erreurs n'ont pas été représentées mais l'écart-type est dans tous les cas inférieur à 5% de la valeur moyenne utilisée pour le graphique)

R2.2.3. Les conditions de culture influent sur la vitesse de croissance des lignées SK-BR-7 et T-47D, et donc sur leur niveau de sensibilité à l'infection par le parvovirus H-1.

Matériel et Méthodes :
paragraphe A.1.1. à A.1.3. inclus
(pages I à IV)

L'exécution du cycle viral du parvovirus H-1 nécessite que la cellule-hôte soit en prolifération active. Des variations de sensibilité au PVH-1 pourraient donc être liées à des variations de vitesse de croissance des cellules dans les différents milieux. Nous nous sommes donc intéressés à la croissance des cellules SK-BR-7 et T-47D en RPMI 1640 et DMEM. Les résultats, obtenus après évaluation quantitative de la population cellulaire par colorimétrie au MTT, sont donnés **Figure R2.5**. Ils montrent que, quel que soit le milieu, la croissance des cellules SK-BR-7 est plus rapide que celle des T-47D, et que, pour un type cellulaire donné, la croissance des cellules est plus rapide en RPMI 1640 qu'en DMEM.

Les résultats des **Figures R2.4** et **R2.5** sont donc en corrélation, montrant que plus la vitesse de croissance des cellules est élevée, plus le niveau de sensibilité des cellules à l'infection, traduit notamment par la nécessité d'utiliser des M.O.I. plus faibles pour obtenir une diminution significative de la viabilité cellulaire, est élevé.

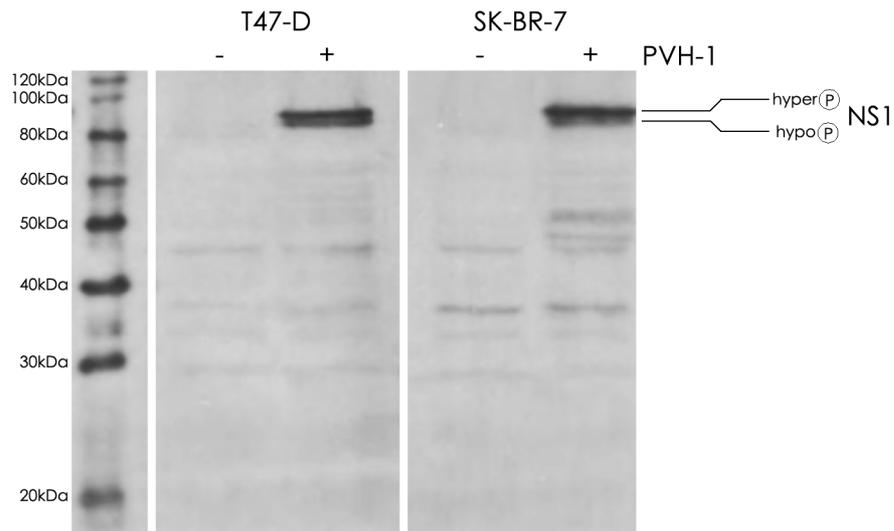


Figure R2.6

Mise en évidence de l'expression de la protéine NS1 par Western blot 24h après infection des cellules SK-BR-7 et T47-D par le parvovirus H-1 (M.O.I. 3)

Les cellules ont été infectées (PVH-1 +) ou non (PVH-1 -) par le parvovirus H-1. Les deux bandes hyperphosphorylée (hyper(P)) et hypophosphorylée (hypo(P)) de NS1 sont représentées. La piste la plus à gauche correspond aux marqueurs de taille *Magic Mark XP*[®] qui sont révélés par l'anticorps secondaire.

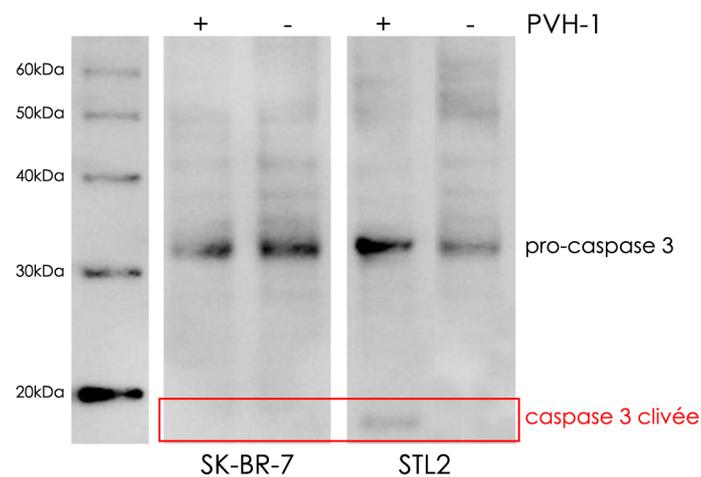


Figure R2.7

Examen de l'expression de la caspase 3 par Western blot 24h après infection des cellules SK-BR-7 par le parvovirus H-1 (M.O.I. 3)

Les cellules SK-BR-7 et STL2 (employées ici comme contrôle positif) ont été infectées (PVH-1 +) ou non (PVH-1 -) par le parvovirus H-1. La présence des formes non clivée (ou pro-caspase 3, à 32kDa) et clivée (à 17kDa, probablement) est indiquée. La piste la plus à gauche correspond aux marqueurs de taille *Magic Mark XP*[®] qui sont révélés par l'anticorps secondaire.

R2.2.4. L'infection des lignées SK-BR-7 et T-47D par le parvovirus H-1 permet l'expression de la protéine parvovirale NS1.

Matériel et Méthodes :
paragraphe A.1.2.1. (page III)
et A.1.4 (pages IV à VI)

L'analyse par Western blot montre l'expression de la protéine parvovirale NS1 24h après infection des cellules T-47D et SK-BR-7 à M.O.I. 3 (**Figure R2.6**). On peut observer en particulier les deux bandes caractéristiques du doublet, la bande supérieure correspondant à la forme dite hyperphosphorylée et la bande inférieure à la forme hypophosphorylée.

R2.2.5. L'infection des SK-BR-7 par le parvovirus H-1 ne semble pas induire le clivage de la caspase 3.

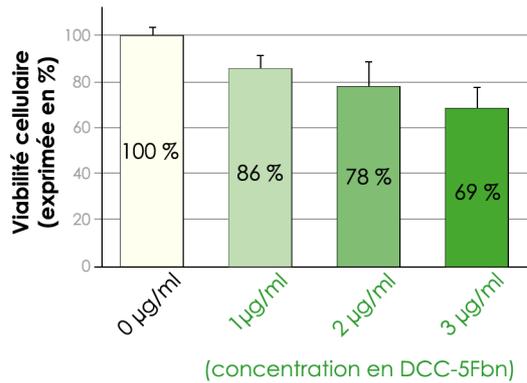
Matériel et Méthodes :
paragraphe A.1.2.1. (page III)
et A.1.4 (pages IV à VI)

Après avoir déterminé ce qui pouvait être la cause des différences de sensibilité au PVH-1 observées entre les cellules dépendantes du système UNC5H / Netrin-1 dans différentes conditions, nous nous sommes intéressés à la manière dont le PVH-1 induisait la mort de ces cellules. Nous avons choisi comme modèle d'étude la lignée SK-BR-7 (en milieu RPMI 1640), car c'est à la fois la lignée cellulaire la plus sensible à l'infection parvovirale et celle qui exprime le plus fortement la netrin-1 (d'après les travaux de Julien Fitamant [169]).

Connaissant le fonctionnement du système UNC5H2 / netrin-1, la voie de mort cellulaire que nous avons souhaité examiner en premier était logiquement l'induction de l'apoptose, et en particulier l'activation de la caspase 3. La caspase 3 existe sous une forme inactive, dite « pro-caspase 3 », non clivée, d'une taille de 32 kDa, et sous une forme active, clivée en un ou plusieurs fragments, de 19, 17 et parfois 12 kDa [159].

Nous avons donc infecté les cellules SK-BR-7 avec le parvovirus H-1 à M.O.I. 3 et analysé l'expression de la caspase 3 par Western blot, avec un anticorps reconnaissant à la fois les formes clivée et non clivée de cette protéine. Comme contrôle positif, nous avons utilisé la lignée STL2, lignée développée au laboratoire pour la production du PVH-1 et chez laquelle nous avons découvert, au cours de nos travaux de Master 2, le clivage de la caspase 3 comme conséquence de l'infection parvovirale. La **Figure R2.7** montre la présence d'une forme clivée de la caspase 3 chez les cellules STL2 infectées, absente des cellules STL2 non infectées. En revanche, on n'observe pas de clivage de la caspase 3 chez les cellules SK-BR-7 après infection. La forme pro-caspase 3 est exprimée dans les deux lignées cellulaires, qu'elles soient infectées ou non. La mort cellulaire induite par le PVH-1 chez les cellules SK-BR-7 ne semble donc pas impliquer l'activation de la caspase 3.

A. 6h d'incubation



B. 24h d'incubation

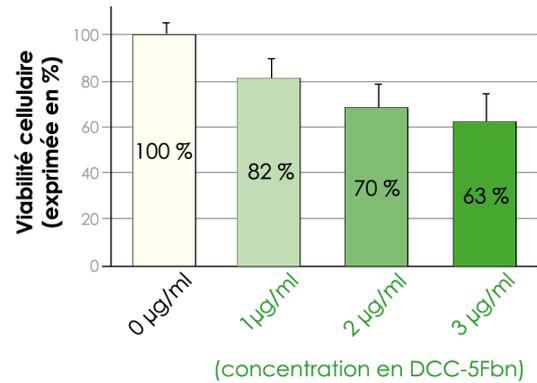


Figure R2.8

Evaluation de la viabilité cellulaire des cellules SK-BR-7 soumises à différentes conditions d'incubation en présence de DCC-5Fbn

Les valeurs, obtenues par la technique de colorimétrie au MTT (voir texte), sont exprimées en pourcentage, la viabilité des cellules n'étant pas mises en présence de DCC-Fbn (rectangle blanc, noté 0µg/ml) étant arbitrairement fixée à 100%.

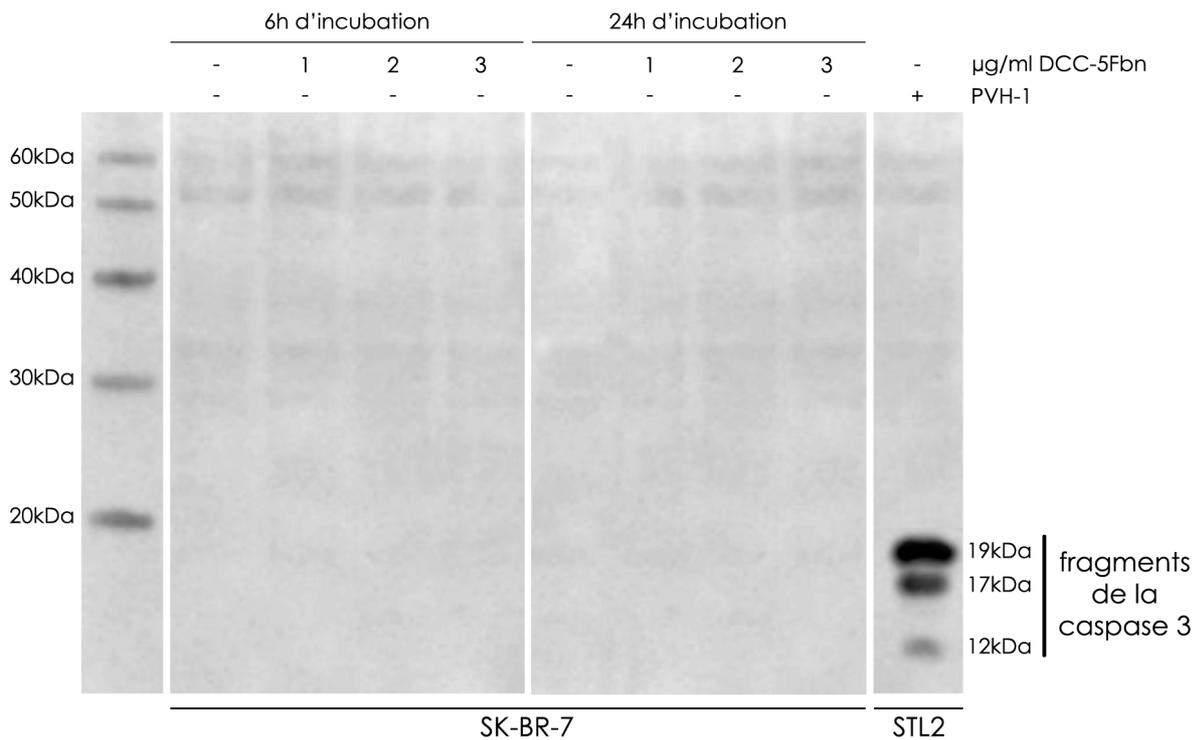


Figure R2.9

Tentative de détection des formes clivées de la caspase 3 par Western blot lors de différentes conditions d'incubation des cellules SK-BR-7 en présence de DCC-5Fbn

Les cellules SK-BR-7 ont été incubées dans du milieu contenant de 1 à 3 µg/ml de DCC-5Fbn ou en absence de celui-ci (-) pendant 6h (les quatre premières pistes à gauche) ou 24h (les quatre pistes plus à droite). La dernière piste, la plus à droite, correspond au contrôle positif de l'expression des formes clivées de la caspase 3, que sont les cellules STL2 infectées par le PVH-1 à M.O.I. 3, lysées 24h après infection. La taille respective des trois types de fragments est indiquée. La piste la plus à gauche correspond aux marqueurs de taille *Magic Mark XP*® qui sont révélés par l'anticorps secondaire.

R2.2.6. L'utilisation du DCC-5Fbn, inhibiteur de la netrin-1, provoque la mort des cellules SK-BR-7 mais n'induit pas l'activation de la caspase 3.

Matériel et Méthodes :
paragraphe A.1.1. à A.1.3. inclus
(pages I à IV)

Nous avons ensuite cherché à valider le modèle utilisé en vérifiant que l'utilisation de l'inhibiteur de la netrin-1, le DCC-5Fbn, permettait bien de restaurer la signalisation négative du récepteur UNC5H2 des cellules SK-BR-7. D'après le modèle précédemment décrit (pour rappel, voir [Figure R2.1](#) et texte page 48), la présence de DCC-5Fbn dans le milieu de culture cellulaire devrait induire le clivage de la caspase 3, et donc l'activation de cette caspase, chez les SK-BR-7.

Nous avons donc incubé les cellules SK-BR-7 en présence de DCC-5Fbn. Les conditions d'incubation (concentration en DCC-5Fbn et durée d'incubation) ont été définies avec l'équipe de P. Mehlen qui effectuait ces expériences en routine.

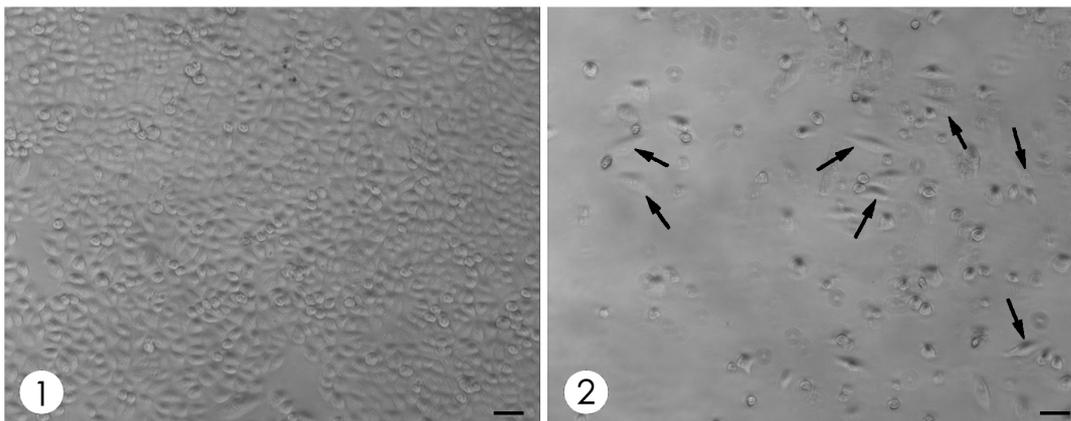
La [Figure R2.8](#) montre une diminution de la viabilité cellulaire après incubation des cellules SK-BR-7 en présence de doses croissantes de DCC-5Fbn, visible dès 6h d'incubation (graphique A) et légèrement accentuée après 24h d'incubation (graphique B). Le DCC-5Fbn induit donc bien la mort des cellules SK-BR-7, bien que le modèle suggérait un effet plus marqué.

Nous avons ensuite tenté de détecter le clivage de la caspase 3, cette fois à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement les formes clivées de celle-ci. Les cellules SK-BR-7 incubées dans différentes concentrations de DCC-5Fbn ont été lysées 6h et 24h après incubation (soit dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la [Figure R2.8](#)). Les cellules STL2 infectées par le parvovirus H-1 nous ont servi de contrôle positif d'expression des fragments de la caspase 3. La [Figure R2.9](#) montre l'expression des fragments à 19, 17 et 12 kDa chez les STL2 infectées, alors qu'aucune des conditions d'incubation des cellules SK-BR-7 en présence de DCC-5Fbn ne permet d'observer ces fragments. Les cellules SK-BR-7 expriment pourtant la forme « pro-caspase 3 » (pour rappel, voir [Figure R2.7](#)).

Il semble donc que, dans les conditions que nous avons testées, et qui sont celles appliquées en routine par l'équipe de P. Mehlen, le DCC-5Fbn n'induit pas le clivage de la caspase 3.

Nous avons appris ultérieurement que les lots de DCC-5Fbn qui nous avaient été fournis se sont avérés défectueux, et l'équipe de P. Mehlen, rencontrant des problèmes de production de nouvelles doses efficaces de DCC-5Fbn, n'a pu nous fournir de nouveaux lots. Ce projet n'a donc pas pu être mené à son terme.

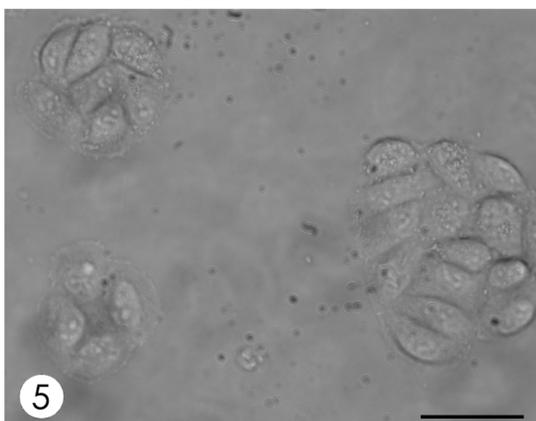
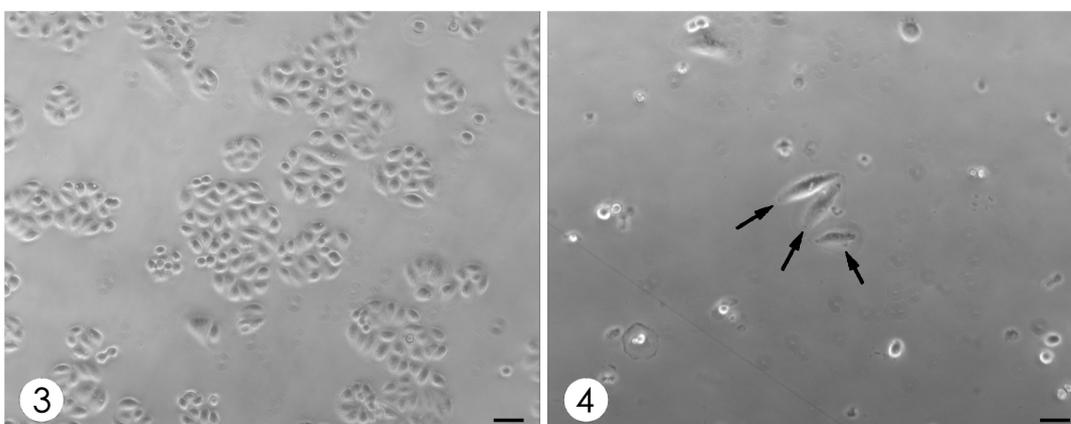
A. forte densité cellulaire



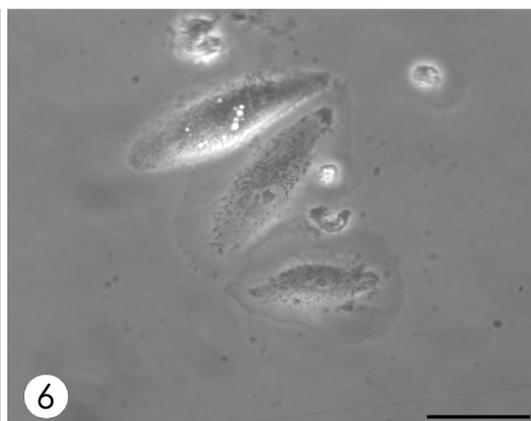
1
contrôle non infecté

2
+ PVH-1 M.O.I. 5

B. faible densité cellulaire



5
contrôle non infecté



6
+ PVH-1 M.O.I. 5

Figure R2.10

Observation de la morphologie des cellules SK-BR-7 dans diverses conditions de culture, en présence ou non de parvovirus H-1 par microscopie à contraste de phase

Les photos ont été prises sur cellules en culture, non fixées.

- A. 72 heures après mise en culture en absence (photo 1) ou en présence (photo 2) de PVH-1 à M.O.I. 5.
- B. 24 heures après mise en culture en absence (photo 3) ou en présence (photo 4) de parvovirus H-1 à M.O.I. 5. La photo 5 est un agrandissement d'un autre champ issu du même puits de culture que la photo 3, et la photo 6 est un agrandissement de la région centrale du champ de la photo 4.

Les flèches indiquent les cellules dont la morphologie est particulière (voir texte). Echelle : Une barre = 20 μ m.

R2.2.6. L'infection par le parvovirus H-1 induit des changements morphologiques chez les cellules SK-BR-7.

Matériel et Méthodes :
paragraphe A.1.1. et A.1.2.1 inclus
(pages I à III)

Le parvovirus H-1 ne semble pas induire l'activation de la caspase 3 chez les cellules SK-BR-7 (pour rappel, [Figure R2.7](#) en regard de la page 53). La question du type de mort induite par le PVH-1 lors de l'infection de ces cellules reste non résolue.

Nous avons cependant observé des modifications de la morphologie cellulaire après infection. En effet, la [Figure R2.10](#) montre, alors que la morphologie des cellules SK-BR-7 non infectées est de type épithélial (partie A. photo 1), qu'il est possible d'observer des cellules SK-BR-7 de forme allongée, et de taille plus grande, dont la morphologie est plus proche de celle de fibroblastes, 72 heures après infection par le PVH-1 (partie A., photo 2).

Nous avons émis l'hypothèse que ce changement morphologique pourrait être la conséquence d'un gain d'espace sur le support de culture : les cellules étant nettement moins nombreuses après infection, elles pourraient avoir tendance à « s'étendre ». Nos photos prises lorsque les cellules SK-BR-7 sont en culture à faible densité, en l'absence de parvovirus H-1, montrent que ces cellules ont plutôt tendance à conserver leur morphologie épithéliale et se regrouper en forme de « grappes » (partie B., photos 3 et 5). En revanche, l'infection par le parvovirus H-1 des SK-BR-7 cultivées à faible densité permet d'observer la morphologie « fibroblastique » particulière préalablement décrite (partie B, photos 4 et 6). L'apparition d'une morphologie différente d'une partie de la population cellulaire semble donc induit par l'infection parvovirale. Cependant, ces résultats restent très préliminaires, la poursuite du projet ayant été conditionnée par la validation du modèle, qui n'a pas pu être réalisée, faute d'obtenir un nouveau lot de DCC-5Fbn.

Ce projet de recherche inachevé n'a pas directement donné lieu à une publication. En revanche, une partie des résultats obtenus sur la sensibilité des cellules MDA-MB-231 et SK-BR-7 à l'infection parvovirale ont donné lieu à un article paru dans le journal *Breast Cancer Research and Treatment*. L'objectif principal de cet article était de démontrer l'efficacité du parovirus H-1 sur des cellules issues de cancer du sein humain, remises en culture à partir d'échantillons tumoraux de patientes du Centre Oscar Lambret de Lille. Vous trouverez la version publiée de cet article en pages 56 à 66 de ce manuscrit.

Parvovirus H-1 induces cytopathic effects in breast carcinoma-derived cultures

Ghaffar Muharram · Emilie Le Rhun · Ingrid Loison · Pierre Wizla ·
Audrey Richard · Nathalie Martin · Annie Roussel · Agnes Begue ·
Patrick Devos · Marie-Christine Baranzelli · Jacques Bonneterre ·
Perrine Caillet-Fauquet · Dominique Stehelin

Received: 18 March 2009 / Accepted: 13 June 2009
© Springer Science+Business Media, LLC, 2009

Abstract Parvovirus H-1 (H-1 PV) preferentially replicates in malignant cells resulting in their death by cytolysis. It has often been considered a potential candidate for use in novel anticancer therapy. To evaluate its potential in a model of natural tumors, we assayed in vitro the effect exerted by H-1 PV on short-term cultures derived from breast tumor samples freshly excised from patients. Our results show that H-1 PV effectively kills tumor-derived cells, whereas normal tissue-derived cells showed no H-1 PV-induced cytopathic effects (CPE). We also determined that the H-1 PV sensitivity (up to 67% sensitive cultures) is related with the quantities of virus assayed. We further examined the expression and phosphorylation state of the parvoviral nonstructural protein 1 (NS1), known to be associated with parvoviruses-induced CPE. Both appear to be impaired in normal tissue-derived cells and resistant cultures. Finally, we show that H-1 PV sensitivity in cultures correlates significantly with higher tumor grades (Nottingham combined histologic grade 2 or 3). This report

confirms that H-1 PV can efficiently induce CPE in primary breast tumor cells in vitro. It identifies tumor characteristics representing potential criteria for recruiting patients for clinical evaluation of H-1 PV antitumor effects.

Keywords Parvovirus H-1 · Oncolytic virus · Breast cancer · Short-term cultures · Histopathology predictive factors

Abbreviations

MOI Multiplicity of infection
MTT Tetrazolium salts

Introduction

Developing cancer-eradicating agents with low toxicity remains a prime goal. An attractive prospect is the use of oncolytic viruses, i.e., natural agents that act like tumor-cell parasites and are able to find and destroy malignant cells selectively [1]. Many different viruses of several viral families, such as Herpes simplex virus [2, 3], Reovirus [4], Adenovirus [5], and Parvovirus [6, 7], possess such properties. Those associated with limited or no toxicity are relevant to potential clinical use.

The rodent autonomous oncolytic parvovirus H-1 (H-1 PV) is a small (~25 nm), nonenveloped virus with single-stranded DNA (~5 kb). It replicates efficiently in human tumor cells in an episomal fashion, yielding infectious viral progeny. H-1 PV has never been linked to any pathology in humans [8]. Even retrospectively, no correlation has been found between H-1 PV serological detection and any pathology [9]. When H. Toolan (in 1965) injected the virus into two patients (12 and 13 years old) severely affected by

G. Muharram (✉) · I. Loison · P. Wizla · A. Richard ·
N. Martin · A. Roussel · A. Begue · P. Caillet-Fauquet ·
D. Stehelin
CNRS, UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du
Professeur Calmette, 59021 Lille cedex, France
e-mail: ghaffar.muharram@ibl.fr

E. Le Rhun · J. Bonneterre
Département de Sénologie, Centre Oscar Lambret,
59020 Lille, France

M.-C. Baranzelli
Département d'Anatomie Pathologique, Centre Oscar
Lambret, 59020 Lille, France

P. Devos
Département des Biostatistiques, Centre Hospitalier
Universitaire et Régional de Lille, 59037 Lille, France

osteosarcomas that had metastasized, with no other therapeutic option left, the virus caused no detectable side effect [10]. Ultimately, nevertheless, only a proper phase-I clinical trial with H-1 PV will be able to establish its therapeutic interest and innocuousness.

H-1 PV-induced destruction of malignant human cells has often been reported, both *in vitro* (transformed cell lines) and *in vivo* (human cell lines xenografted in animal models) [11, 12]. As demonstrated with the closely related Minute Virus of Mice (MVM), the cytopathic effects (CPE) exerted on malignant cells result from expression of the parvoviral nonstructural protein 1 (NS1) [13, 14], its phosphorylation [15], and its interaction with cell proteins, resulting in cytoskeletal modifications and cell death [16].

The tropism of H-1 PV for neoplastic cells has also been dissected in many studies. The virus can enter both normal and transformed cells. In the former, it seems only to cause abortive infection without proper neovirion production [14]. In the latter, a complete viral cycle can occur leading to release of new virions upon host cell lysis. Fibroblasts transformed by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or a tumor virus [17] and spontaneously or tumor virus-transformed keratinocytes [18] appear much more sensitive to H-1 PV-induced cell killing than their normal parental counterparts. The greater H-1 PV permissiveness of transformed cells might be attributable to changes in the nature and quantity of cell factors associated with cell cycling [19]. Activation of cell division might not suffice, since the differentiation status of the cell also appears to play a role in correct replication of H-1 PV [14]. Cell immortalization, resulting in permanent cell proliferation (a high proportion cells in the S phase), plus cell transformation thus represent ideal conditions for efficient parvovirus replication.

Most information concerning effective killing of malignant cells by H-1 PV has been obtained in studies on cell lines. Despite their overall relevance thanks to repeated observations, this information pertains model systems where conditions differ considerably from the physiological reality encountered in patients' tumor tissues. Only two preliminary studies have described H-1 PV-induced cell killing in primary breast tumor cells [20, 21]. The authors have notably demonstrated cytopathic effect induced by H-1 PV preferentially in tumor cells, as opposed to normal cells derived from the same patients [20].

In this study, we examine a large number of short-term breast tumor-derived cultures in order (1) to quantify precisely the H-1 PV-induced cell killing, (2) to test if there is a H-1 PV dose-effect, (3) to analyze the viral cytotoxic protein NS1 expression, (4) to determine if tumors' histopathological characteristics are predictive of H-1 PV-induced cell killing.

Materials and methods

All products were purchased from Invitrogen (Paisley, UK) unless otherwise specified.

HeLa-GFP xenografted-tumor-derived cell cultures and H-1 PV infection

SCID-mice (Institut Pasteur de Lille) were grafted with HeLa-GFP cells as described in [12]. After 10 days, tumors ($\approx 100 \text{ mm}^3$) were detectable. Mice were euthanized (in agreement with the ethical committee of our institution), and the excised tumors were minced as finely possible and disaggregated in a solution of dispase (10 mg/ml) and collagenase (5 mg/ml) at 37°C under gentle stirring for at least 1 h. The enzymatic reaction was stopped by addition of OptiMEM supplemented with 10% FCS. The cells were centrifuged. The pellet was resuspended in DMEM medium supplemented with 10% FCS, L-glutamine (2 mM), gentamycin (8 µg/ml), and neomycine (900 µg/ml) and plated in 100-mm-diameter culture dishes. Once cultures were established, cells were counted and plated in 12-well plates at 20,000 cells/well. The next day, cells were infected with H-1 PV at different multiplicities of infection (MOIs) or mock treated in control wells (Fig. 1a).

Short-term breast tumor-derived cell cultures and H-1 PV infection

Samples of invasive breast carcinomas (according to the World Health Organization classification) were collected at the Centre Oscar Lambret (Lille, France) in the Pathology Department in agreement with all ethical rules specified by the French Ministry of Research for use of patients' samples for research purposes. All patients were women and agreed for use of their tumor samples in our study. The tumor samples were obtained during surgical resection of newly diagnosed tumors, before any other anticancer treatment (chemotherapy, hormonotherapy, or radiotherapy). Patients' tumor detailed histopathological examination reports, including the Nottingham combined histologic grade (differentiation status, mitotic count, nuclear pleomorphism), vascular and sentinel and/or axillary lymph node invasion status, estrogen and progesterone receptor expression, were collected (see Table 1). Upon receipt immediately after surgery, the patients' tumor samples were dissected and analyzed by a pathologist. One part of the sample was transferred to a tube containing OptiMEM medium supplemented with 10% FCS, L-glutamine (2 mM), and gentamycin (8 µg/ml).

Upon arrival, the samples were weighed, decontaminated in Betadine® 10% dermal solution (Vitaris Manufacturing, Mérignac, France), and washed twice in PBS and

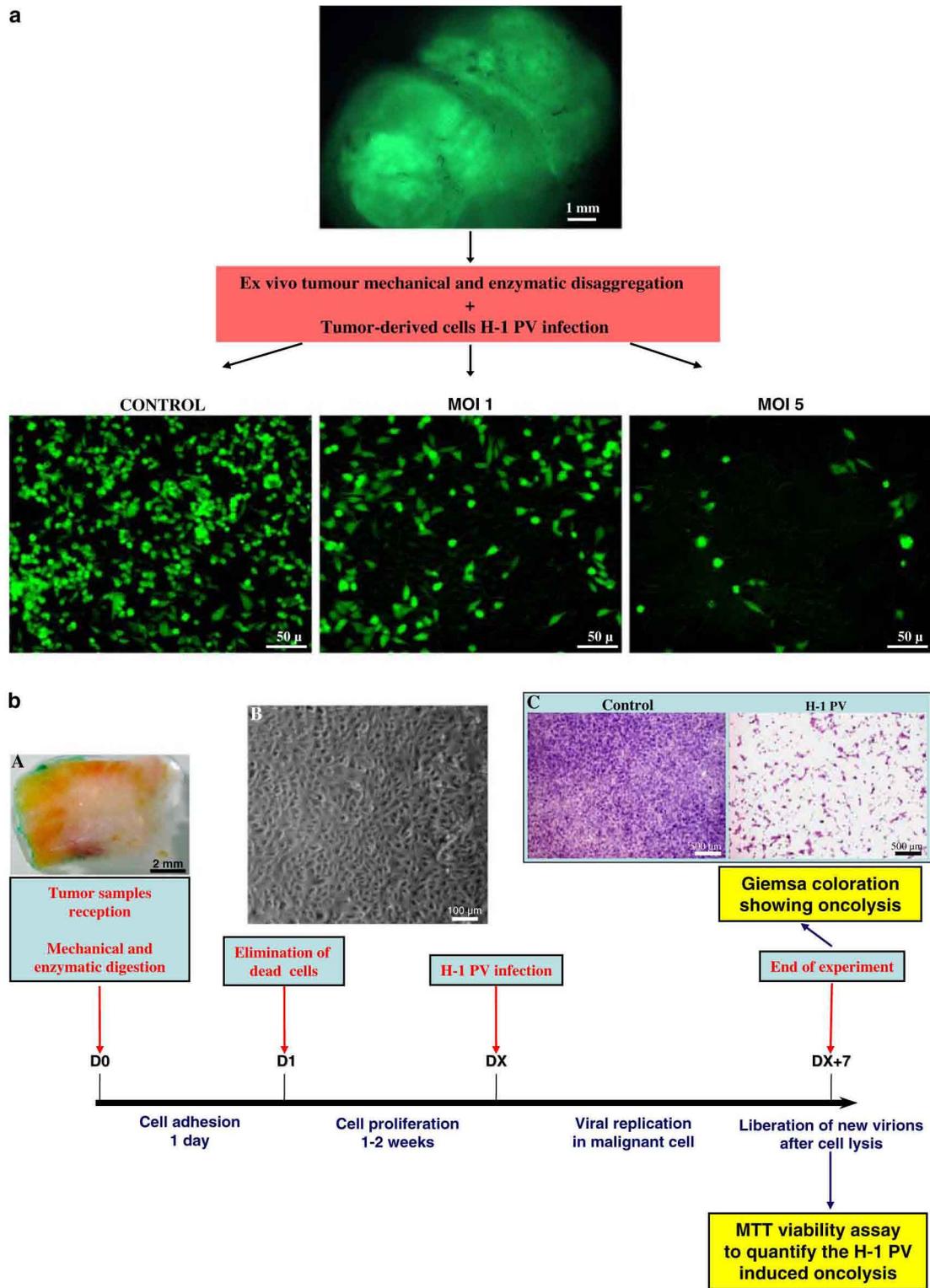


Fig. 1 In vitro assay showing the effect exerted by H-1 PV on short-term tumor-derived cultures. **a** Short-term cultures were derived from HeLa-GFP tumor freshly excised from SCID-mice bearing tumors (picture 1). After 5 days postinfection, H-1 PV-induced cytotoxicity was assessed in wells where doses of MOI 1 or MOI 5 virus were added when compared with mock-treated control wells (*lower panel*). **b** Short-term cultures were derived from patients' freshly excised

tumors (picture 1). Once sufficient amounts of cells were obtained (picture 2), they were seeded in equal number into different wells. Cells were mock treated or inoculated with a defined quantity of virus. One week postinfection, either the plates were stained (pictures 3) or H-1 PV induced cytotoxicity was assessed with a MTT cell viability assay

disaggregated as described with HeLa-GFP tumors. Once monocellular suspensions were obtained, breast tumor cells were resuspended in serum-free Mammary Epithelial Cell Growth Medium (PromoCell, Heidelberg, Germany) supplemented with bovine pituitary extract (0.052 mg/ml), epidermal growth factor (10 ng/ml), insulin (5 µg/ml), and hydrocortisone (0.5 µg/ml) (supplied by PromoCell with the medium) and plated in 35-mm-diameter culture dishes. After one night at 37°C, dead floating cells were eliminated, and live adhering cells were left to proliferate (Fig. 1b-picture 2).

After two to three passages, when sufficient cells were available, the cells were counted and plated in 24-well plates at 25,000 cells/well. The next day, the cells were infected with H-1 PV at different MOIs or mock treated in control wells (Fig. 1b).

Virus and cell lines

For infection, H-1 PV was produced in a human cell line, as described in [22], from a plasmid containing the wild-type H-1 PV genome (kindly provided by Pr J. Rommelaere, Heidelberg, Germany). Virus stock titers were determined according to plaque assays published methods [23]. The multiplicity of infection (MOI) is given by number of plaque-forming units (pfu) inoculated per cell.

Table 1 Histopathologic characteristics of the tumor samples from which cultures were derived and assayed for H-1 PV-induced CPE

Invasive ductal carcinoma (%)	82
Invasive lobular carcinoma (%)	18
Tumor grade (Nottingham combined histologic grade) (%)	
Grade 1	11
Grade 2	51
Grade 3	39
Differentiation state (%)	
Grade 2	16
Grade 3	84
Number of mitoses (%)	
Grade 1	46
Grade 2	35
Grade 3	19
Anisonucleosis (%)	
Grade 2	35
Grade 3	65
Presence of vascular invasion (%)	37
Sentinel-axillary lymph nodes: positive (%)	
Sentinel	42
Axillary	60
Estrogen receptor-positive (%)	87
Progesterone receptor-positive (%)	67

SK-BR-7 and MDA-MB-231 cells (kindly provided by Dr P. Mehlen, Lyon, France) were cultured, respectively, in RPMI medium supplemented with 10% FCS and gentamycin (8 µg/ml) and DMEM medium supplemented with 10% FCS, L-glutamine (2 mM), and gentamycin (8 µg/ml).

Parvovirus-H-1-induced CPE assay

Seven days postinfection, H-1 PV-induced CPE were observed after Giemsa staining (Fig. 1b, picture 3). Briefly, the culture medium was removed, the cells were washed twice with physiological water, fixed in methanol for 10 min, stained for 1 h at room temperature with diluted (1/10 in tap water) Giemsa stain modified solution (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), and dried after a final wash. The level of cytotoxicity was evaluated by direct microscopic observation, and pictures (representing ≈ 70% of the well) were taken. Cultures were considered sensitive to H-1 PV-induced CPE when massive cytolysis (>50% of the cells) was observed when compared to the mock-treated well.

Parvovirus-H-1-induced CPE quantification

The H-1 PV-induced CPE were quantified 7 days postinfection by means of a tetrazolium salt (MTT) viability assay (as described in [24]) for $n = 30$ tumor-derived cultures. Each condition was tested in duplicate. Briefly, the medium was removed and replaced with 500 µL of MTT solution (Sigma-Aldrich) diluted (final concentration: 0.5 mg/ml) in Mammary Epithelial Cell Growth Medium, then the culture was incubated for 4 h at 37°C. MTT salts were metabolized to formazan salts by viable cells and released in the supernatant after addition of a solubilization solution and incubation for 1 h at room temperature. A 100-µl volume of supernatant was transferred to a well in a 96-well plate (in duplicate) and read with a microplate spectrophotometer-reader (Multiskan RC, Thermo Labsystems, Helsinki, Finland) at 540 and 620 nm. The background absorbency (at 620 nm) was subtracted from the value obtained at 540 nm. The viability of the infected cells was expressed as the ratio of the corresponding absorbency to that of noninfected cells set arbitrarily at 100%.

Western blot analysis

Forty-eight hours postinfection, before any H-1 PV-induced effect was visible, the cells were lysed in PY buffer [25] supplemented with 0.04% Complete EDTA-free™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Germany). Cell lysates were stored at -20°C. Equal amounts of the various lysates were loaded. After 10% SDS-PAGE separation, the proteins were transferred onto

nylon membranes, and parvoviral NS1 was revealed with the NS1-specific Sp8 rabbit antiserum [26] diluted 1/1,000 in PBS supplemented with 0.2% AuroraTM blocking reagent (MP Biomedicals, Illkirch, France) and 0.01% Tween 20 (Sigma–Aldrich).

Expression levels were analyzed with a LAS-3000 imaging system (FUJIFILM, Quentin en Yvelines, France).

Statistical analysis

Breast tumor samples ($n = 112$) were obtained from the Centre Oscar Lambret. Some samples were excluded from the statistical analysis because of bacterial contamination in culture or because of technical difficulties in deriving the cultures. Similarly, a small number of samples of undifferentiated or epidermoid or mucinous breast cancer were also excluded in order to compare homogeneous subgroups. The statistical analysis was thus performed on 96 samples. First, a descriptive analysis (frequencies, boxplot, etc.) was performed in order to check and recapitulate the data. Then, comparisons of subgroups were performed. In accordance with parameter distribution and subgroup size, comparisons of means were performed using the nonparametric Wilcoxon test. Comparisons of frequencies were performed using the Chi-square test or Fisher's exact test if necessary. All analyses were carried out with the SAS software, V9.1. The significance level was set at 0.05.

Results

Parvovirus H-1 induces cytopathic effect on cultures from freshly excised xenografted HeLa-GFP tumors

Solid HeLa-GFP tumors were obtained in SCID-mice (Fig. 1a-picture 1). The advantage of using HeLa carcinoma cells stably expressing GFP enable us to visualize specifically the destruction of malignant cells *in vitro* when H-1 PV was added (Fig. 1a, control well compared to MOI 1 and MOI 5).

This model experiment is a proof-of-concept of our *in vitro* assay showing H-1 PV-induced CPE on short-term derived tumor cell cultures. This assay was then subsequently used with patients' tumors as described in the following sections.

Parvovirus H-1 induces cytolysis of short-term breast tumor-derived cells, as opposed to normal cells

To examine H-1 PV-induced CPE on primary breast tumor cells, short-term cultures were derived from breast tumor samples freshly excised from patients (Fig. 1b). As controls, cultures were also derived from normal peritumoral

tissue taken from the same patients (6 samples). To avoid stromal cell contamination in our cultures, we used a media specifically designed for the culture of mammary epithelial cells (confirmed by cytokeratin 19 labeling, data not shown). The tumor types studied were mainly ductal carcinomas (82%) and invasive lobular carcinomas (18%). Eighty-four percent of the samples were from undifferentiated tumors (differentiation grade 3). As for the Nottingham combined histologic grade, most of the samples were from high-grade tumors (51% grade-2 and 39% grade-3 tumors). Detailed histologic data are presented in Table 1.

Once primary cell cultures were successfully established in a media, they were infected with H-1 PV at varying multiplicity of infection (MOI) and incubated for 1 week, at which time CPE were evaluated. As illustrated in Fig. 2, cultures derived from an invasive ductal carcinomas (grade 3, ER+, PR+) showed very severe H-1 PV-induced CPE, in contrast to the corresponding normal cell cultures (Fig. 2 rows B and A, respectively). The latter showed an effect only at the highest dose tested (MOI 100), and even then the effect was weak.

H-1 PV-infected tumor-cell cultures showed a dose-dependent reduction in cell number (Fig. 2, rows B: MOI 1, MOI 10 and MOI 100), in contrast to mock-treated tumor-cell cultures (Fig. 2, control).

The level of sensitivity to H-1 PV-induced CPE varied among the different tumor samples examined.

The exploitation of these data was hampered by a major difficulty; patients' tumors are quite heterogeneous by nature, as opposed to tumor cell lines that appear very homogeneous in culture. A more refined and quantitative test was thus required as described in the next section.

Quantification and analysis of the differential effect of H-1 PV on normal and tumor-derived cells

The assay based on spectrophotometric detection of purple formazan produced by the metabolic action on tetrazolium salts (MTT) of mitochondrial dehydrogenases in living cells is commonly used to measure cell death induced by toxic chemicals or biological substances. Here, the MTT viability assay was used to quantify H-1 PV-induced CPE.

To compare the results of this assay with those obtained by Giemsa staining, we first used two breast carcinoma cell lines, the MDA-MB-231 and SK-BR-7. The cells were infected (at MOI 1, 5, or 10 or with no virus in control wells) and incubated for 7 days. Giemsa staining (Fig. 3a) and MTT quantification (Fig. 3b) were done in parallel. The viable cell rates measured by the MTT assay appeared to tally quite accurately with the visual impression after cell staining.

After 1 week H-1 PV appears to affect MDA-MB-231 cells very severely, since cells infected at MOI 1, MOI 5, and MOI 10 showed, respectively, only $10.2 \pm 0.8\%$,

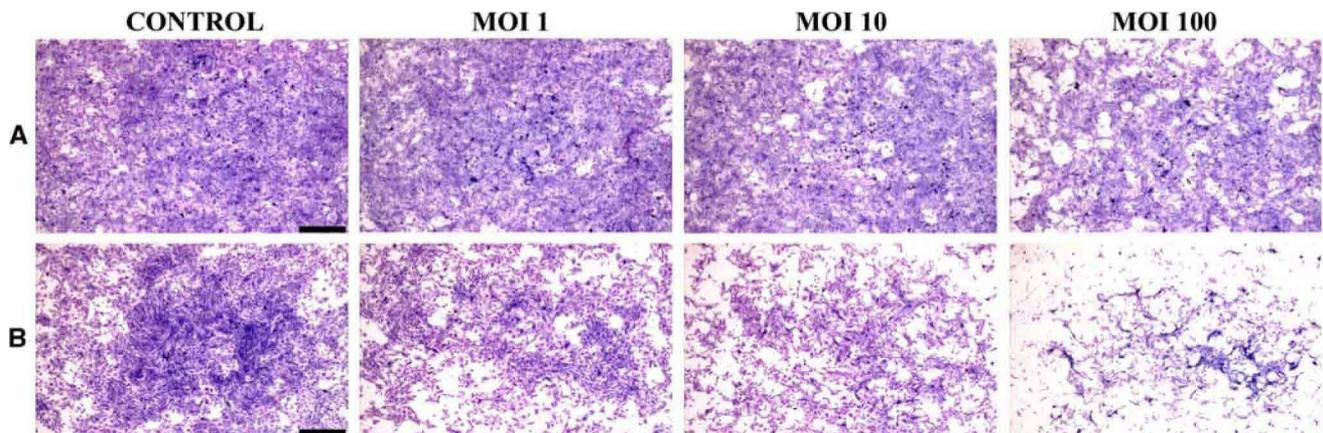


Fig. 2 H-1 PV-induced cytopathic effect assay on primary breast tumor cells. By Giemsa staining and direct microscopic observation, H-1 PV-induced CPE were compared in mock-treated wells (control column) and wells where different doses of H-1 PV (columns MOI 1,

$8.7 \pm 0.3\%$, and $9.1 \pm 0.8\%$ survival. In control wells, in contrast, survival was $100 \pm 5.3\%$. The effect of H-1 PV on SK-BR-7 cells was almost as drastic, leading to $28 \pm 1.7\%$, $26.7 \pm 1.8\%$, and $9.7 \pm 1.66\%$ at MOI 1, 5, and 10, respectively (Fig. 3b).

The same procedure was used to quantify H-1 PV-induced CPE on cultures derived from fresh normal and tumoral breast tissues (Fig. 4b, A and B, respectively). The former cultures displayed little or no H-1 PV-induced cell death, with $80 \pm 6.5\%$ or $72 \pm 5.2\%$ of the cells remaining viable 7 days postinfection at MOI 1 or MOI 100, respectively (Fig. 4b, A). Of the tumor-derived cells, only $69 \pm 3\%$ and $28 \pm 1\%$ of the cells remained viable 7 days postinfection at MOI 1 or MOI 100, respectively (Fig. 4b, B). The quantification test appeared as a decisive addition to the visual results obtained by Giemsa staining (Fig. 4a).

Differential expression and phosphorylation of the NS1 cytotoxic protein in the normal and tumor-derived cells

To further investigate reasons for the differential response to H-1 PV infection in the above-described normal and tumor-derived cells, we measured expression of the cytotoxic protein NS1 by immunoblotting with a specific antiserum directed against the carboxy-terminal region of the protein

MOI 10, and MOI 100) had been added. From the same patient, in (A) cultures derived from normal peritumoral breast tissue and in (B) cultures derived from invasive ductal carcinoma. The scale bar represents 200 μm

[26] (Fig. 4c). When expression profiles were compared 48 hours after infection with H-1 PV, cells derived from normal tissue showed much lower levels of both NS1 (lower band) and its active phosphorylated form (NS1-P, upper band) (Fig. 4c, A) than the corresponding tumor-derived cells. More interestingly, the ratio of NS1-P to NS1 was very different in the two situations, the phosphorylated form being more abundant in tumor-derived cells and less abundant in normal cells than unphosphorylated NS1.

Tumor histopathologic characteristics predictive of sensitivity to H-1 PV-induced CPE

Of the 96 tumors collected and considered for statistical analysis (see “Materials and methods”), 69 yielded successful short-term cultures (72%). Among these successfully cultured tumors, 48% yielded cultures sensitive to H-1 PV and 35% yielded resistant cultures. For 17% of the cultures, the level of sensitivity was intermediate. To study the factors predictive of sensitivity toward H-1 PV oncolysis, only the sensitive and resistant groups were compared. Only cultures from high-grade tumors appeared significantly ($P = 0.03$) sensitive to H-1 PV-induced CPE (Fig. 5). A trend ($P = 0.07$) toward higher sensitivity was also associated with a higher mitotic grade (data not shown).

Table 2 Breast carcinomas short-term derived cultures assayed with increasing doses of H-1 PV

H-1 PV doses used	H-1 PV sensitive cultures (%)	H-1 PV intermediate cultures (%)	H-1 PV resistant cultures (%)
Up to MOI 25 ($n = 61$)	48	11	41
Up to MOI 100 ($n = 18$)	67	11	22

H-1 PV-induced CPE was examined visually after Giemsa coloration. Cultures were considered *sensitive* when more than 75% of the cells were lysed, *intermediate* when between 50 and 75% of cells were lysed, and *resistant* when less than 50% cells were lysed

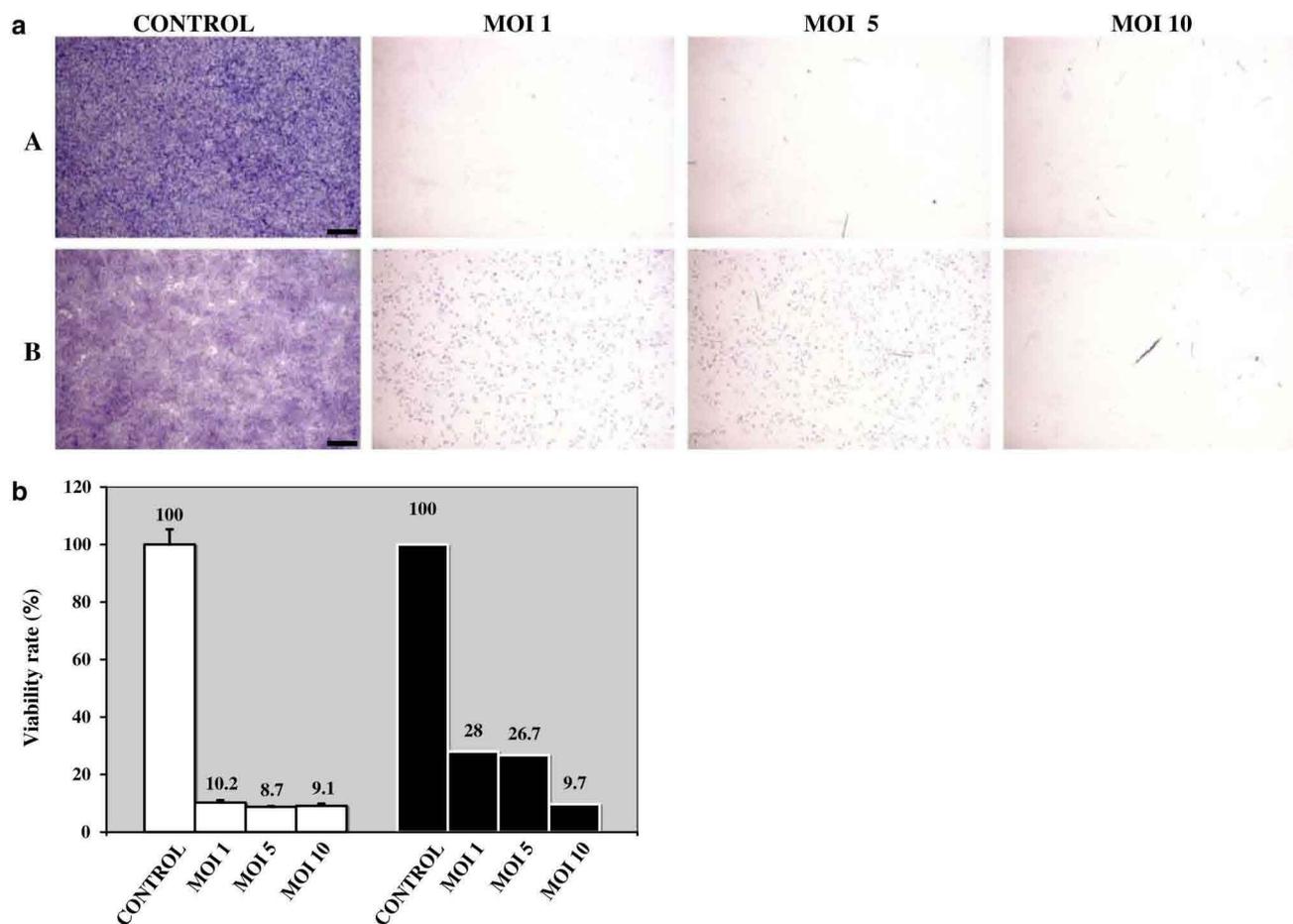


Fig. 3 Quantification of H-1 PV-induced CPE on MDA-MB-231 and SK-BR-7 cells in an MTT viability assay. **a** H-1 PV-induced CPE on MDA-MB-231 (A) and SK-BR-7 (B) cells 7 days postinfection, with increasing doses of virus (MOI 1, 5, and 10) or mock-treated cells

(control) after Giemsa staining. *Scale bar* represents 500 μm . **b** MDA-MB-231 and SK-BR-7 cell viability rates (\pm SD) measured with a MTT viability assay for each MOI, by comparison with the mock-treated control (viability = 100%)

Tumor-derived cells sensitivity to H-1 PV increase with higher doses

H-1 PV-induced CPE was examined with increasing quantities of virus. On a total number of 79 tumor-derived cultures, 61 were treated with doses of H-1 PV up to MOI 25, 47% were sensitive, 11% showed intermediate sensitivity, and 41% were resistant (Table 2). On the last 18 tumor-derived cultures assayed, we were able to reach doses up to MOI 100 resulting in 67% of H-1 PV sensitive cultures, 11% intermediately sensitive, and 22% resistant cultures (Table 2).

Discussion

Parvovirus H-1 is often referred to as an ideal candidate for use in cancer therapy based on viral agents capable of selectively killing malignant cells [6]. With the Minute

Virus of Mice (MVM), H-1 PV is known for its preferential replication in malignant cells (oncotropism) [14, 17] ultimately resulting in their death (oncolysis) [7, 16]. It also appears that H-1 PV injection is not associated with pathological side effects in patients [10]. Breast neoplasia appears as a potential target for H-1 PV-based anticancer virotherapy.

In this study, we have evaluated the *in vitro* capacity of H-1 PV to destroy primary breast tumor cells. Our data clearly demonstrate that a certain number of short-term cultures derived from freshly excised breast tumors are sensitive to H-1 PV-induced CPE (Figs. 2, 4, 5, and Table 2). H-1 PV exerts its cytotoxic effects in a dose-dependent manner: cytolysis is much greater at MOI 10 and MOI 100 than at MOI 1 (Figs. 2, 4). Most often, to obtain a significant effect, we had to use large quantities of virus (starting at MOI 10 up to MOI 100). This is in contradiction with many studies describing H-1 PV-induced CPE on a variety of cell lines, where low virus doses were

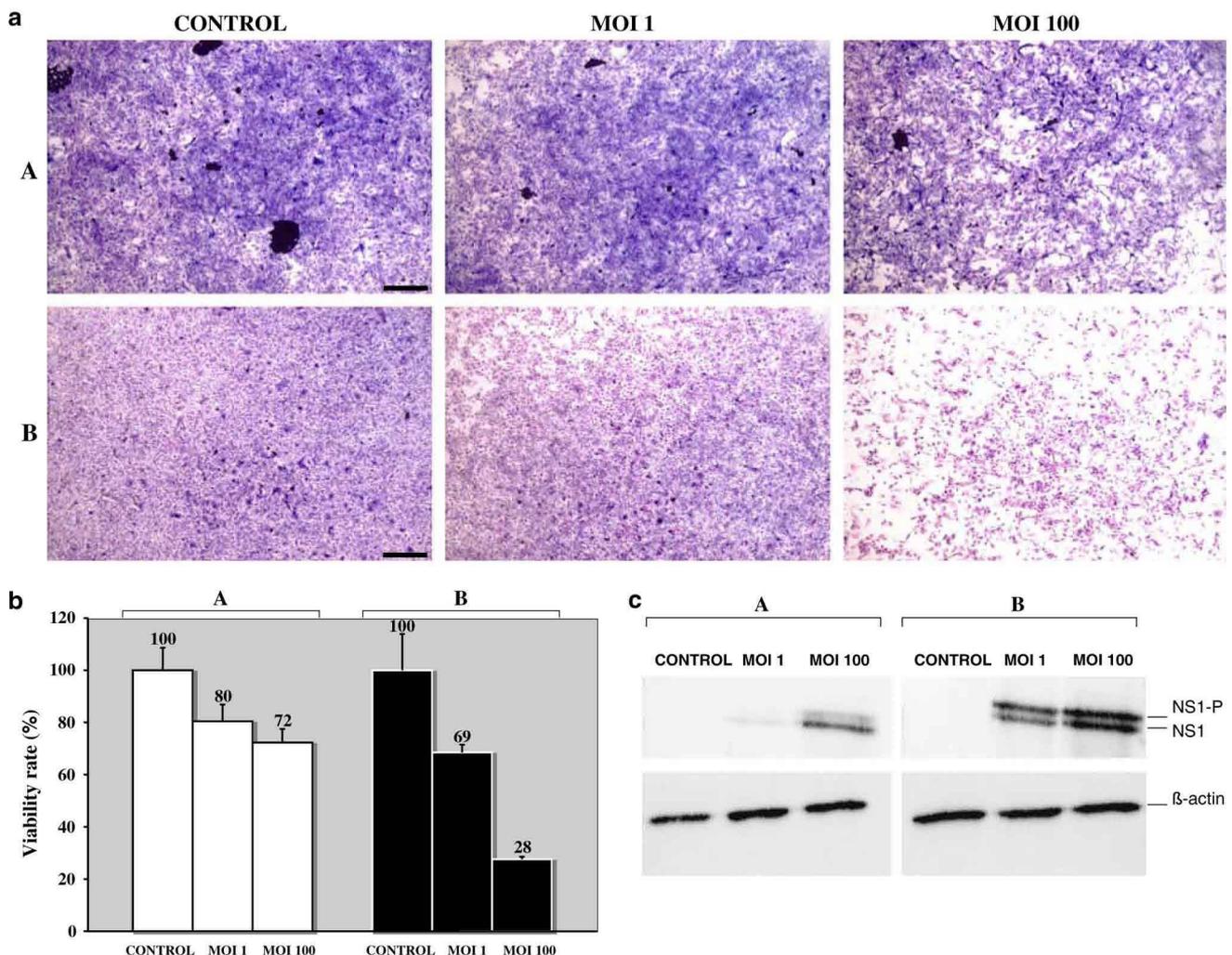


Fig. 4 Comparison of the effects exerted by H-1 PV on cultures derived from tumoral and normal breast tissue. Cultures derived from normal breast tissue (**A**) and from an invasive ductal carcinoma (**B**). **a** H-1 PV-induced CPE 7 days postinfection (MOI 1 or 100) and mock-treated cells (control) after Giemsa staining. Scale bar represents 200 μ m. **b** Quantitative analysis of H-1 PV-induced oncolysis with an

MTT viability assay. **c** NS1 and β -actin western blot analysis on cell extracts from cultures inoculated with H-1 PV (lanes MOI 1 and MOI 100) or from mock-treated cultures (control lanes) 48 h postinfection. The experiment was repeated at least 4 times with each type of cultures

sufficient to cause effective cell killing [7, 27]. Our own data show very efficient H-1 PV-induced cytolysis in cultures derived from model HeLa-GFP tumors established in SCID-mice (Fig. 1a). H-1 PV effect is also massive with MDA-MB-231 and SK-BR-7 cells starting at MOI 1, with almost no viable cells left at MOI 5 and 10 (Fig. 3). The use of primary cells might explain this discrepancy, such cells generally cycle less rapidly than cell lines in vitro. It is known that full H-1 PV replication, resulting in final cell killing, strongly depends on cell factors available for efficient cells cycling [28]. In this respect, our statistical analysis applied to the histopathologic characteristics of the tumors from which H-1 PV-sensitive cell cultures were obtained, showed a trend toward a higher number of mitoses in such tumors ($P = 0.07$). The need for higher

quantities of H-1 PV to induce efficient cytolysis in tumor-derived cells might also be explained by the fact that viral propagation is limited (as measured for few tumor-derived cultures, data not shown). Although it was shown in [17] that H-1 PV sensitivity does not rely directly on the capacity of propagation of the virus i.e., HT1080 cells with low viral amplification are more severely killed by H-1 PV than KMST-6 cells with higher viral amplification rate.

Of the successfully established cultures from breast tumor samples that were assessed in our study, 47% up to 67% were considered sensitive to H-1 PV-induced CPE. A previous study describing H-1 PV-induced CPE on short-term breast tumor-derived cell cultures ($n = 19$) established the success rate at 32% [21]. Our better success rate is probably due to the larger quantities of virus we used.

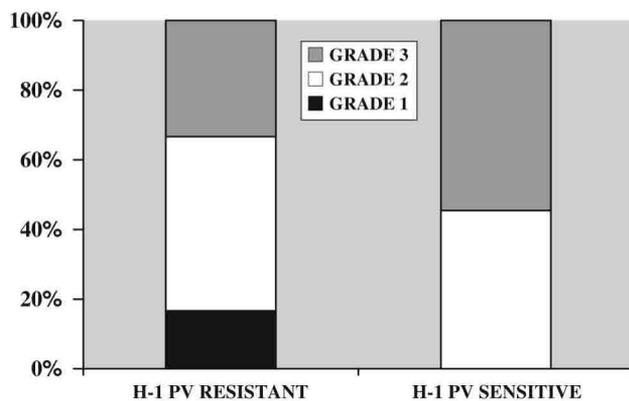


Fig. 5 Tumor characteristics predictive of H-1 PV sensitivity. $P = 0.03$ when correlation between H-1 PV sensitivity and tumor histopathologic grade was made. Grade 1 tumors (lower grade) correspond to well-differentiated less-aggressive tumors, grade 2 tumors are quite undifferentiated and aggressive tumors, and grade 3 tumors (higher grade) are the most undifferentiated and very aggressive tumors

When comparing our own data between cultures where H-1 PV doses up to MOI 25 were tested (Table 2) with cultures assayed with doses reaching up to MOI 100 we obtained much more higher rate of H-1 PV-induced CPE in the latter case. Thus, this dose effect seems quite relevant, and it was correlated with the levels of expression of NS1, with higher amounts of NS1 at MOI 100 rather than MOI 10 for example (data not shown).

If in vitro assays on short-term tumor-derived cell cultures reflect (and predict) the in vivo H-1 PV effects on breast tumors, our results suggest that with high doses of injected H-1 PV, most tumors may be sensitive to its cytotoxic effect.

Yet given the current H-1 PV production capacity, such doses would be difficult to reach in vivo. However, if the virus is to be injected into or close to the tumor, a high number of virus particles per tumor cell could be reached for an average-sized tumor. Multiple injections might likewise be an appropriate way to reach effective doses [29].

The overall histopathologic characteristics of the tumors analyzed in our study are representative of invasive breast cancer in whole population. We sought to determine whether there was any correlation between sensitivity to H-1 PV-induced CPE and the histopathological subtype of the tumors from which a culture was derived. If so, any observed correlations might provide interesting criteria for the recruitment of patients into a future clinical trial. Van Pachterbeke et al. [21] have shown the presence of estrogen receptors to be a factor predictive of H-1 PV sensitivity. In our study, we found no such correlation. Instead, we found that cultures established from higher tumor grades (Nottingham combined histopathologic grade 2 or 3) show

significantly greater sensitivity toward H-1 PV-induced cytolysis ($P = 0.03$). Such grades indicate that tumoral cells present in these samples are quite undifferentiated. Undifferentiated malignant cells [14] are often assumed to be particularly sensitive to H-1 PV-induced killing, though so far no transcription factor or growth factor or any other molecular element associated with the cell differentiation status has clearly surfaced.

NS1, a key multifunctional parvoviral protein, is particularly important in initiating replication of the viral genome [30] and producing new virions [31]. It is also critically involved in the cytotoxicity caused by the virus [15, 16]. Our data confirm this involvement, as we find NS1 expression, and especially the ratio of NS1 to P-NS1, to differ in cells derived from breast tumors and normal breast tissue (Fig. 4). In cultures of the latter (which are resistant to H-1 PV-induced CPE), NS1 was barely detectable at low MOI. At MOI 100 it was expressed, but seemed not to be correctly processed, since its phosphorylated (active) form was either absent or present at a much lower level than either NS1 or NS1-P in sensitive cultures, even when corresponding blots were produced 48 h after inoculation of H-1 PV at MOI 1.

NS-1 expression is under the control of the parvoviral promoter P4, the activation of which seems to depend on cell factors restricted to the S phase [19, 32]. Anouja et al. [33] have shown with a vector driving inducible, P4-independent NS-1 expression that only the nonphosphorylated form is expressed during the G₁/S transition. This suggests that NS-1 phosphorylation also depends on cell factors available during the S phase [33], hence the enhanced parvovirus activation observed in actively cycling cells. In our study, the tumors from which H-1 PV-sensitive cultures were derived showed higher mitotic grades than expected for normal breast tissue (not measured in the normal tissue samples we examined). This might explain the better production and phosphorylation of NS1 in tumor-derived cultures.

In conclusion, our study using an in vitro assay to estimate the effect of H-1 PV on cells derived from patients' tumor tissue constitutes a first validation step toward proof-of-concept that H-1 PV may be an effective viral anti-cancer agent. We confirm here what has been shown so far mostly with tumor cell lines, since up to 67% of the cultures successfully derived from breast tumors (such cultures are more representative of the heterogenic nature of patients' tumors) were sensitive to H-1 PV-induced CPE depending on the doses of virus assayed.

Our study also indicates that cells derived from tumors with a high mitotic grade (actively cycling cells), and more particularly those showing lower levels of differentiation (identified by higher Nottingham combined histologic grades; $P = 0.03$), are most sensitive to H-1 PV-induced

CPE. Patients with such tumors could be given priority for inclusion in a phase I clinical study based on the use of H-1 PV.

Our study confirms H-1 PV as a serious candidate for use in viral anticancer therapy, especially if it is associated with standard chemotherapy or radiotherapy [6, 34].

Acknowledgments This work was financially supported by foundations (l'ARC, la Ligue contre le Cancer- Comité du Nord, la Ligue contre le Cancer, GEFLUC) and by the Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais.

References

- Vaha-Koskela MJ, Heikkilä JE, Hinkkanen AE (2007) Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer Lett* 254(2):178–216
- Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM (1991) Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 252(5007):854–856
- Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, Martuza RL (1995) Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med* 1(9):938–943
- Coffey MC, Strong JE, Forsyth PA, Lee PW (1998) Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282(5392):1332–1334
- Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A, McCormick F (1996) An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274(5286):373–376
- Di Piazza M, Mader C, Geletneky K, Herrero YCM, Weber E, Schlehofer J, Deleu L, Rommelaere J (2007) Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. *J Virol* 81(8):4186–4198
- Moehler M, Blechacz B, Weiskopf N, Zeidler M, Stremmel W, Rommelaere J, Galle PR, Cornelis JJ (2001) Effective infection, apoptotic cell killing and gene transfer of human hepatoma cells but not primary hepatocytes by parvovirus H1 and derived vectors. *Cancer Gene Ther* 8(3):158–167
- Rommelaere J, Cornelis JJ (2001) Autonomous parvoviruses. In: Hernaiz Driever P, Rabkin SD (eds) *Monographs in virology*. Karger, Basel, pp 100–129
- Siegl G (1984) Biology and pathogenicity of autonomous parvoviruses. In: Berns KI (ed) *The parvoviruses*. Plenum Press, New York, pp 279–362
- Toolan HW, Saunders EL, Southam CM, Moore AE, Levin AG (1965) H-1 virus viremia in the human. *Proc Soc Exp Biol Med* 119:711–715
- Dupressoir T, Vanacker JM, Cornelis JJ, Duponchel N, 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(12):3203–3208
- Faisst S, Guittard D, Benner A, Cesbron JY, Schlehofer JR, Rommelaere J, Dupressoir T (1998) Dose-dependent regression of HeLa cell-derived tumours in SCID mice after parvovirus H-1 infection. *Int J Cancer* 75(4):584–589
- Caillet-Fauquet P, Perros M, Brandenburger A, Spegelaere P, Rommelaere J (1990) Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J* 9(9):2989–2995
- Cornelis JJ, Chen YQ, Spruyt N, Duponchel N, Cotmore SF, Tattersall P, 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(6):2537–2544
- Lachmann S, Bar S, Rommelaere J, Nuesch JP (2008) Parvovirus interference with intracellular signalling: mechanism of PKC α activation in MVM-infected A9 fibroblasts. *Cell Microbiol* 10(3):755–769
- Nuesch JP, Rommelaere J (2007) A viral adaptor protein modulating casein kinase II activity induces cytopathic effects in permissive cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(30):12482–12487
- Cornelis JJ, Becquart P, Duponchel N, Salome N, Avalosse BL, Namba M, Rommelaere J (1988) Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and minute virus of mice. *J Virol* 62(5):1679–1686
- Chen YQ, Tuynder MC, Cornelis JJ, Boukamp P, Fusenig NE, 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(1):163–167
- Bashir T, Rommelaere J, Cziepluch C (2001) In vivo accumulation of cyclin A and cellular replication factors in autonomous parvovirus minute virus of mice-associated replication bodies. *J Virol* 75(9):4394–4398
- Van Pachterbeke C, Tuynder M, Cosyn JP, Lespagnard L, Larsimont D, Rommelaere J (1993) Parvovirus H-1 inhibits growth of short-term tumor-derived but not normal mammary tissue cultures. *Int J Cancer* 55(4):672–677
- Van Pachterbeke C, Tuynder M, Brandenburger A, Leclercq G, Borras M, Rommelaere J (1997) Varying sensitivity of human mammary carcinoma cells to the toxic effect of parvovirus H-1. *Eur J Cancer* 33(10):1648–1653
- Wrzesinski C, Tesfay L, Salome N, Jauniaux JC, Rommelaere J, Cornelis JJ, Dinsart C (2003) Chimeric and pseudotyped parvoviruses minimize the contamination of recombinant stocks with replication-competent viruses and identify a DNA sequence that restricts parvovirus H-1 in mouse cells. *J Virol* 77(6):3851–3858
- Chen YQ, de Foresta F, Hertoghs J, Avalosse BL, Cornelis JJ, Rommelaere J (1986) Selective killing of simian virus 40-transformed human fibroblasts by parvovirus H-1. *Cancer Res* 46(7):3574–3579
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1–2):55–63
- Pellicci G, Giordano S, Zhen Z, Salcini AE, Lanfrancone L, Bardelli A, Panayotou G, Waterfield MD, Ponzetto C, Pellicci PG et al (1995) The mitogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein. *Oncogene* 10(8):1631–1638
- Faisst S, Faisst SR, Dupressoir T, Plaza S, Pujol A, Jauniaux JC, Rhode SL, Rommelaere J (1995) Isolation of a fully infectious variant of parvovirus H-1 supplanting the standard strain in human cells. *J Virol* 69(7):4538–4543
- Herrero YCM, Cornelis JJ, Herold-Mende C, Rommelaere J, Schlehofer JR, Geletneky K (2004) Parvovirus H-1 infection of human glioma cells leads to complete viral replication and efficient cell killing. *Int J Cancer* 109(1):76–84
- Berns KI (1996) Parvoviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 2173–2197
- Currier MA, Adams LC, Mahller YY, Cripe TP (2005) Widespread intratumoral virus distribution with fractionated injection enables local control of large human rhabdomyosarcoma xenografts by oncolytic herpes simplex viruses. *Cancer Gene Ther* 12(4):407–416

30. Cotmore SF, Gottlieb RL, Tattersall P (2007) Replication initiator protein NS1 of the parvovirus minute virus of mice binds to modular divergent sites distributed throughout duplex viral DNA. *J Virol* 81(23):13015–13027
31. Legendre D, Rommelaere J (1994) Targeting of promoters for trans activation by a carboxy-terminal domain of the NS-I protein of the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* 68(12):7974–7985
32. Deleu L, Pujol A, Faisst S, Rommelaere J (1999) Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J Virol* 73(5):3877–3885
33. Anouja F, Wattiez R, Mousset S, Caillet-Fauquet P (1997) The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins. *J Virol* 71(6):4671–4678
34. Raykov Z, Grekova S, Galabov AS, Balboni G, Koch U, Arahamian M, Rommelaere J (2007) Combined oncolytic and vaccination activities of parvovirus H-1 in a metastatic tumor model. *Oncol Rep* 17(6):1493–1499

Discussion générale

D. 1. A propos du « projet NS1 »

D.1.1. Modèles d'expression de NS1

Plusieurs auteurs ont, avant nous, utilisé divers systèmes permettant l'expression de la protéine NS1 sans avoir recours à l'infection par le parvovirus H-1. Ainsi, Jürg Nüesch a employé un virus recombinant de la vaccine, dans lequel le gène de la thymidine kinase a été remplacé par celui codant la protéine NS1 de MVM. Le gène codant NS1 est placé sous le contrôle du promoteur du bactériophage T7 et les cellules sont co-infectées avec un autre virus recombinant de la vaccine, fournissant l'ARN polymérase du phage T7. Ce système a permis l'expression de la protéine NS1 de MVM fonctionnelle, effectivement translocalisée dans le noyau de cellules humaines [174]. Gary M. Wilson a lui, utilisé un autre vecteur viral, un baculovirus, pour obtenir l'expression de la protéine NS1 du MVM dans des cellules d'insectes. Bien qu'il ait pu obtenir l'expression de NS1 dans ce modèle cellulaire particulier, la protéine n'a pas pu être translocalisée dans le noyau de ces cellules et est restée localisée dans le cytoplasme [112]. Le système mis au point par Jürg Nüesch a permis de mettre en évidence l'importance de la lysine 405 dans la liaison de NS1 à l'ADN parvoviral, et le modèle de Gary M. Wilson a permis d'identifier les activités ATPase et hélicase de NS1. Ces deux modèles ont donc servi à étudier le rôle de NS1 dans ses activités précoces au cours du cycle viral, en relation avec la réplication parvovirale. Ils n'ont pas été employés dans le but d'étudier les effets cytotoxiques de NS1, au contraire des autres modèles décrits ci-après.

Paul Becquart a réussi à sélectionner, après utilisation d'un système rétroviral, des clones dérivés de la lignée de fibroblastes murins transformés Psi-2, qui peuvent exprimer de façon stable les protéines NS1 et NS2 de MVMp (clones PsiNS) ou la protéine NS2 seule (clones PsiNS2). Les cellules PsiNS montrent des anomalies morphologiques et il est difficile d'isoler ces clones (vraisemblablement à cause de l'expression de NS1, toxique pour la cellule). Les cellules PsiNS2, en revanche, présentent des caractéristiques identiques à leurs cellules parentales Psi-2 [175].

L'un des modèles d'expression les plus intéressants, car permettant une analyse fine des effets de NS1 par un contrôle relativement précis de la production de cette protéine, a été mis au point par Perrine Caillet [130]. A partir de la lignée cellulaire humaine, NBE, transformée par SV40, elle a établi des clones ayant stablement intégré un plasmide contenant le gène codant les protéines NS de MVMp, placé sous le contrôle d'un promoteur inductible, le LTR (*Long Terminal Repeat*) du MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*). Dans

ce système, l'induction de la production de NS1 est déclenchée par l'incubation des cellules en présence de dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique auquel répond le LTR du MMTV. Ce système a permis d'identifier l'apparition d'effets cytotoxiques engendrés par la stimulation de la production de NS1. Toutefois, le LTR du MMTV est un promoteur relativement faible, et il est à cet égard intéressant de noter que l'apparition d'effets cytotoxiques n'est observée que plusieurs jours après induction au dexaméthasone. Ce système inductible a été mis à profit quelques années plus tard par Suzanne Mousset pour étudier les effets de l'expression de NS1 dans des fibroblastes de rat considérés comme présentant un phénotype non transformé [131]. Dans ces cellules, l'expression de NS1 s'avère être non toxique.

Chacun des modèles précédemment utilisés, exposés ci-dessus, présente un certain nombre d'avantages. Mais aucun d'entre eux n'a été décrit comme permettant d'obtenir rapidement de hauts niveaux d'expression de la protéine NS1 du parvovirus H-1 dans des cellules humaines non transformées, au contraire du système de nucléofection que nous avons utilisé dans les cellules MRC-5. Nous avons initialement envisagé la mise au point d'un système inductible permettant un haut niveau d'expression de NS1 dans les MRC-5. Mais les stratégies de développement d'un tel outil auraient exigé la sélection de clones ayant intégré le système d'expression. Or, les délais d'obtention de tels clones sont incompatibles avec la durée de vie des MRC-5, qui, en tant que cellules non immortalisées, seraient entrées en sénescence rapidement, vraisemblablement avant que nous puissions réaliser notre étude des effets de l'expression de NS1. Nous ne souhaitons pas immortaliser ces cellules afin de disposer d'un modèle le plus proche possible de cellules humaines présentant un phénotype normal.

D.1.2. Nos résultats permettraient-ils une extension aux cellules humaines normales de travaux précédents effectués sur des cellules transformées ?

Nos travaux portant sur l'expression ectopique transitoire de NS1 dans les cellules MRC-5 montrent pour la première fois que des cellules humaines non transformées, non susceptibles à l'infection par le parvovirus H-1, peuvent fournir un contexte favorable à l'exercice des effets cytopathiques de la protéine NS1.

Selon le modèle « à verrous successifs » que nous avons préalablement décrit (voir [Figure R1.1](#) et [texte page 32](#)), l'expression de NS1 est suivie de l'activation des fonctions cytotoxiques de cette protéine, par phosphorylation(s) sur certains acides aminés spécifiques. Différents auteurs ont montré qu'au moins huit résidus de NS1 (Ser283, Thr363, Lys405, Thr435, Thr463, Ser473, Thr585 et Ser588) étaient impliqués dans la mise en œuvre et/ou la régulation des fonctions cytotoxiques [140, 147, 148, 176], et que cinq d'entre

eux (Ser283, Lys405 et Thr463 étant exclus) étaient phosphorylés par des membres de la famille des PKC [140, 147, 148]. Parmi eux, la Ser473 semble jouer un rôle central. En effet, d'une part, sa mutation aboutit à une forme non toxique de NS1 [140], et d'autre part, il a été montré qu'elle exerce un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette. Ainsi, dans les fibroblastes murins transformés A9 infectés par MVM, cette Ser473 sert d'adaptateur protéique, permettant à la sous-unité catalytique α de la caséine kinase II (CKII α) de changer de substrat de phosphorylation, ce qui induit des perturbations de l'organisation du cytosquelette qui sont fatales pour la cellule-hôte [55, 148, 153, 154]. Tous ces travaux ont été effectués jusqu'à ce jour uniquement sur des cellules transformées.

Nous n'avons actuellement pas de preuve directe que, dans les cellules MRC-5, NS1 est effectivement phosphorylée par la protéine kinase C λ au niveau de la sérine 473 et que l'interaction entre NS1 et CKII α se produit, d'une part, et est à l'origine des modifications de l'organisation du réseau d'actine que nous avons observées, d'autre part. Il est toutefois intéressant de noter que la simple mutation de la Ser473 est suffisante pour que le profil d'expression de NS1 dans les MRC-5 ne montre plus qu'une seule bande en Western blot. De plus, les phénomènes observés avec la forme native de NS1 (réorganisation du réseau d'actine et induction de la mort cellulaire) sont complètement abolis lorsqu'on exprime la forme mutante de NS1 dans cette lignée.

D.1.3. Vers une définition plus large de l'oncotropisme ?

Si l'on reprend notre modèle « à verrous successifs », il semblerait en première analyse que le seul facteur limitant l'expression de la cytotoxicité induite par NS1 dans les cellules MRC-5 soit l'activation du promoteur parvoviral P4. Toutefois, la comparaison des phénomènes observés lors de l'expression des formes native (NS1wt) et mutée (NS1-S473A) de la protéine NS1 dans les deux lignées, non transformée (MRC-5) et transformée (MRC-5 SV2), met en évidence certaines différences.

Nous discuterons ici notamment de la notion de « seuil » d'expression de NS1, et de la notion de « cibles » de NS1, terme utilisé notamment pour désigner ses partenaires protéiques au sein de la cellule-hôte. Nous montrerons pourquoi nous envisageons que ces éléments puissent participer à une définition plus large de l'oncotropisme parvoviral.

D.1.3.1. Notion de « seuil » d'expression de NS1

Dès 1990, avec son modèle d'expression inductible, Perrine Caillet a souligné l'importance de la quantité de NS1 produite pour l'apparition d'effets cytotoxiques. Elle a observé que certains clones, résistants à l'apparition d'effets cytotoxiques, sont capables de produire la protéine NS1 à des niveaux d'expression qui s'avèrent être fatals pour d'autres clones. Ces expériences ont fait émerger la notion de « seuil » de production de NS1, qui doit être rajoutée au modèle « à verrous successifs » : les effets cytotoxiques ne sont induits par NS1 que lorsque celle-ci a atteint un certain niveau d'expression, appelé « seuil », vraisemblablement variable selon les cellules envisagées. Perrine Caillet a d'ailleurs observé que l'apparition d'effets cytotoxiques ne se produit que plusieurs jours après induction, suggérant que ce délai est nécessaire pour arriver à atteindre le « seuil » de production de NS1 [130]. Ceci supposerait toutefois que la protéine NS1 ne soit pas dégradée par la cellule-hôte avant d'avoir pu exercer ses fonctions cytotoxiques, ou au moins que la balance entre sa production et sa dégradation assure le maintien d'un niveau croissant d'expression. Il serait alors possible que, dans ce modèle cellulaire, la protéine NS1 ait une demi-vie plus longue que celle habituellement observée (6 à 8 heures).

Il est intéressant de mettre en relation la notion de concentration intracellulaire de NS1 avec la nécessité pour celle-ci de former des oligomères pour exercer certaines de ses fonctions. Il a en effet été observé que l'activité hélicase de NS1 nécessite qu'elle s'auto-assemble en hexamères [111] et que, au moins dans certains modèles cellulaires, NS1 ne devient cytotoxique que lorsqu'elle est sous forme de dimères [153]. Il en découle que de plus fortes concentrations de NS1 pourraient au moins en partie augmenter la probabilité de formation d'oligomères, et donc la probabilité d'activation de ces fonctions.

Si NS1wt induit une cytotoxicité dans les deux lignées cellulaires de notre modèle, celle-ci est plus prononcée chez les cellules transformées MRC-5 SV2 que chez les MRC-5. A quantité égale d'ADN de plasmide pNS1wt transfecté, la viabilité cellulaire des MRC-5 SV2 est toujours plus faible que celle des MRC-5 (**Figures 1a et 1b** en regard de la page 42). De plus, la diminution de la viabilité cellulaire est déjà de presque 20% lorsqu'on transfecte 500 000 cellules MRC-5 SV2 avec 0,1µg de pNS1wt, alors que la même quantité de plasmide n'induit qu'une faible diminution de viabilité (5%) chez les MRC-5 ($p=0,0078$). Pour observer chez les MRC-5 une toxicité comparable à celle observée avec 0,1µg de pNS1wt chez les MRC-5 SV2 (soit une mort d'environ 20% de la population cellulaire), il faut employer 0,5µg de plasmide ($p=0,0067$). La différence la plus frappante entre les deux lignées est observée avec la plus grande quantité de plasmide : 500 000 cellules MRC-5 ayant reçu 2µg de plasmide pNS1wt présentent une viabilité légèrement inférieure à 60% alors que les cellules MRC-5 SV2, dans les mêmes conditions, ne présentent une viabilité que de 35% ($p=0,0052$).

Nos résultats suggèrent ainsi que le seuil de production de NS1 pourrait être une différence déterminante entre cellules humaines transformées et non transformées. Toutefois, certaines réserves doivent être émises quant à cette conclusion. Nous raisonnons ici en terme de quantité d'ADN plasmidique mise en présence de cellules, et non pas directement en terme de quantité de protéine NS1 produite. Nos résultats (article présenté dans ce manuscrit) montrent bien une corrélation entre l'augmentation de la quantité de plasmide pNS1wt et l'intensité des bandes assignées à la protéine NS1. Mais nous n'avons pas réalisé d'analyse quantitative des résultats de ce Western blot, notamment parce qu'il est relativement difficile d'obtenir une relation linéaire entre l'intensité de la (ou des) bande(s) observée(s) et la quantité effective de protéine produite. En effet, l'anticorps dirigé contre NS1 que nous utilisons en Western blot (appelé SP8) est certes très spécifique, mais également très sensible, et l'on arrive donc assez vite à des conditions de saturation de la détection. Des expériences de spectrométrie de masse, notamment, pourraient permettre d'obtenir une quantification plus précise de la production de NS1.

D.1.3.2. Importance des partenaires cellulaires de NS1 : La théorie des cibles

De manière intéressante, l'absence d'effets toxiques dans des cellules transformées malgré l'expression de NS1, phénomène initialement observé *in vitro* chez certains clones obtenus par Perrine Caillet, a été confirmée par des expériences en contexte viral. En effet, ces clones particuliers se sont également avérés être résistants à l'infection par le MVMp. Ces résultats soulèvent un autre point important du processus d'apparition de la cytotoxicité induite par NS1. Ce point correspond au « troisième verrou » dans notre modèle, c'est-à-dire à l'interaction de la protéine NS1 avec des partenaires protéiques dans la cellule-hôte (pour rappel, **Figure R1.1** en regard de la page 32). A ce jour, il n'a encore jamais été démontré que NS1 induit la mort cellulaire par sa seule présence. En revanche, elle interagit avec des protéines qui vont participer à l'induction de la mort cellulaire. En d'autres termes, l'une des façons d'envisager le mode de fonctionnement de NS1 est de considérer qu'elle ne peut exercer ses fonctions cytotoxiques que si elle peut interagir avec des partenaires protéiques appropriés au sein de la cellule-hôte.

Certains des partenaires cellulaires de NS1 ont déjà été identifiés dans les cellules transformées. Ainsi, NS1 est connue pour interférer avec des protéines impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire, et en particulier avec la famille des protéines kinases C [51, 52, 55, 140, 143, 144, 148, 153, 154], ainsi qu'avec d'autres kinases cellulaires, dont la caséine kinase II [148, 153]. Elle peut également interagir avec d'autres protéines cellulaires, dont certaines entrent dans la constitution du cytosquelette, telles que l'actine, la vimentine

et la tropomyosine [55, 148, 153], ou interagissent avec les composants de celui-ci, comme la gelsoline et les protéines de la famille ERM (pour *Ezrin*, *Radixin*, *Moesin*) [51, 52].

Nous distinguerons deux types de partenaires cellulaires de NS1. Les premiers partenaires sont ceux qui agissent sur NS1. Il s'agit majoritairement des membres de la famille des protéines kinases C, qui activent les fonctions cytotoxiques de NS1 en la phosphorylant. Ils correspondent au deuxième « verrou » dans notre modèle. Les seconds partenaires sont les protéines sur lesquelles NS1 agit, et que nous appellerons « cibles » de NS1. Ces cibles correspondent au troisième « verrou ».

D.1.3.2.1. NS1 est elle-même une cible de protéines de la cellule-hôte

Le profil de phosphorylation de NS1 évolue au cours du cycle viral lors de l'infection de cellules sensibles, et la phosphorylation de NS1 sur certains résidus spécifiques est en partie responsable de l'activation de ses différentes fonctions (pour revue, [111] et paragraphe I.4.3.2 page 24).

Le remplacement, par une alanine, de la sérine en position 473, qui fait partie d'un motif consensus de phosphorylation par les PKC, supprime au moins en partie l'activité cytotoxique de NS1, comme d'autres auteurs [140] et nous (article présenté dans ce manuscrit) l'avons montré. A l'égard de cette mutation, désignée S473A, il est intéressant de noter que nos résultats soulèvent une différence frappante entre cellules transformées et cellules non transformées. En effet, alors que la mutation S473A est suffisante pour abolir toute activité toxique induite par NS1 dans les cellules non transformées MRC-5, elle ne fait qu'atténuer cette activité cytotoxique dans les cellules MRC-5 SV2.

Au total, la littérature mentionne à ce jour huit résidus pouvant jouer un rôle dans la cytotoxicité induite par NS1, dont cinq d'entre eux sont phosphorylés par les PKC. Tant dans les cellules MRC-5 que MRC-5 SV2, la sérine 473 semble être un site de phosphorylation majeure, puisque la transfection de ces cellules par le plasmide pNS1-S473A provoque la disparition d'une bande sur le profil d'expression de NS1 en Western Blot, par rapport aux cellules transfectées par le plasmide pNS1wt. Mais il est possible que la phosphorylation d'autres résidus se produise.

Les différences observées entre MRC-5 et MRC-5 SV2 pourraient alors être notamment imputées à une phosphorylation différentielle de NS1 dans ces deux lignées. Par exemple, il se pourrait que la phosphorylation d'autres acides aminés que la Ser473 ne se produise que dans les cellules MRC-5 SV2, activant les fonctions cytotoxiques malgré la mutation S473A. Il se pourrait également que la phosphorylation d'autres résidus de NS1 se produise dans les deux lignées cellulaires, mais avec une fréquence plus forte dans les MRC-5 SV2. Nous employons le terme de « fréquence » de phosphorylation de NS1 pour désigner le ratio entre

le nombre de protéines phosphorylées et non phosphorylées sur un résidu donné, au sein du *pool* total de NS1.

Plusieurs résidus de NS1 sont impliqués dans ses fonctions cytotoxiques, parce qu'ils constituent des sites de phosphorylation par les PKC. Toutefois, à ce jour, aucun modèle n'a décrit que la suppression de la phosphorylation de l'un d'eux puisse être « compensée » par la phosphorylation d'un (ou plusieurs) autre(s) site(s), bien que cela reste envisageable.

Concernant l'implication des autres résidus de NS1 dans la cytotoxicité, les auteurs ont décrit plusieurs modes de fonctionnement qui pourraient expliquer les différences que nous observons entre MRC-5 et MRC-5 SV2.

Des modulations de l'effet cytotoxique de NS1 ont été décrites dans un contexte d'infection par le parvovirus MVMp. En effet, Laurent Daeffler a montré que la thréonine 585 et la sérine 588 avaient des effets antagonistes sur la toxicité induite par NS1, la première exerçant un contrôle positif alors que la seconde exerçait un contrôle négatif [147].

Jürg Nüesch a montré que, dans les fibroblastes A9 infectés par MVM, la thréonine 363 est impliquée dans une interaction entre NS1, la caséine kinase II α et la tropomyosine 5. Cette interaction autorise une réorganisation du cytosquelette qui sera fatale pour la cellule-hôte [148, 153].

L'importance des résidus de thréonine en position 435 et 463 dans la cytotoxicité a été démontrée par Romuald Corbau, puisque la mutation de ces résidus supprime au moins en partie l'activité toxique de NS1. A l'inverse, cet auteur montre que la mutation de la sérine en position 293 augmente le potentiel cytotoxique de NS1 [140], suggérant que ce résidu exerce un rôle similaire à celui de la thréonine 585 [147]. Cependant, la phosphorylation de la Ser293 n'a pas encore été démontrée à ce jour. De plus, le rôle exact de ces résidus, et notamment la nature des interactions dans lesquelles ils pourraient être impliqués, ne sont pas encore connus.

Dans tous les cas, il pourrait être intéressant d'étudier, dans les MRC-5 et MRC-5 SV2, l'effet possible des mutations ponctuelles de chacun de ces acides aminés, par nucléofection de plasmides codant des formes de NS1 portant une ou plusieurs de ces mutations.

D.1.3.2.2. NS1 interagit avec des cibles protéiques au sein de la cellule-hôte

La diversité des cibles de NS1 peut expliquer que la voie de mort cellulaire mise en jeu lors de l'infection parvovirale soit largement dépendante du type cellulaire et/ou du tissu concerné. Dans une cellule donnée, NS1 utilise un ou plusieurs partenaire(s) cellulaire(s) donné(s) pour induire la cytotoxicité, ce qui conditionne les signaux de transduction situés en aval, et donc la voie de mort cellulaire mise en jeu.

Une approche finaliste consisterait à dire que NS1 pourra interagir avec une cible donnée si : 1) cette cible est exprimée dans la cellule, 2) la concentration de cette cible est suffisante, afin d'augmenter sa probabilité de mise en contact avec NS1, et 3) cette cible est à un moment donné colocalisée avec NS1 pour que l'interaction puisse effectivement avoir lieu. Ainsi, l'expression et l'activation de NS1 seraient nécessaires mais pas suffisantes pour l'induction de la toxicité, qui nécessiterait également que les trois conditions précitées, intimement liées les unes aux autres, soient remplies. De ce raisonnement découlent alors plusieurs obstacles supplémentaires à l'apparition d'une cytotoxicité induite par NS1. En effet, les cibles peuvent ne pas être exprimées du tout ou ne pas être exprimées en concentration suffisante. Elles peuvent également être exprimées, à un instant donné du cycle cellulaire, dans un compartiment cellulaire différent de celui dans lequel se trouve NS1, sans possibilité d'être transportées ailleurs ou sans que NS1 ne soit elle-même transportée dans ce compartiment.

Ainsi, la nécessité d'interaction de NS1 avec ses cibles, et les obstacles qui peuvent se présenter, peuvent expliquer en partie les différences de réponse à une même quantité de plasmide pNS1wt, que nous avons observées entre cellules MRC-5 et cellules MRC-5 SV2. Les cibles de NS1 présentes dans les MRC-5 SV2 peuvent tout simplement être absentes des cellules MRC-5. Si elles existent malgré tout, on pourrait envisager que la concentration de la (ou des) cible(s) cellulaire(s) de NS1 dans ce type de fibroblastes est plus faible dans les cellules normales MRC-5 que dans leurs homologues transformées. Ceci nécessiterait alors de plus hauts niveaux d'expression de NS1, donc une plus forte concentration cellulaire de NS1, pour obtenir une probabilité équivalente de rencontre entre celle-ci et ses cibles. On peut également concevoir que le nombre de cibles potentielles de NS1, non pas en terme de concentration protéique, mais en terme de diversité des cibles, soit différent entre cellules non transformées et transformées. Si NS1 n'est capable d'interagir qu'avec un nombre très restreint de protéines dans les MRC-5, et est au contraire en mesure de dialoguer avec plusieurs protéines de nature différente dans les MRC-5 SV2, alors cela augmenterait d'autant les probabilités d'interaction de NS1 avec des partenaires protéiques cellulaires dans les MRC-5 SV2.

Ces considérations, mettant en rapport un plein exercice des fonctions cytotoxiques portées par NS1 avec la transformation cellulaire, ont déjà été en partie évoquées par Suzanne Mousset [131]. Il existe cependant une différence majeure entre les résultats obtenus par cet auteur et les nôtres. Les expériences de Suzanne Mousset ont mis à profit le modèle d'expression inductible, hormono-dépendant, mis au point par Perrine Caillet [130]. Elles ont montré que l'expression de NS1 n'induisait pas de toxicité dans des clones, appelés FRNS, dérivés de la lignée de fibroblastes de rat FR3T3 (cellules considérées comme présentant un

phénotype normal). La toxicité induite par NS1 n'apparaissait que lorsque ces clones FRNS étaient transformés par divers agents, dont l'oncogène c-Ha-ras ou l'oncogène du polyomavirus, sans que cette transformation n'ait un impact significatif sur le niveau d'expression de NS1. En revanche, nos travaux démontrent que l'expression de NS1 dans les cellules humaines normales MRC-5 peut induire l'apparition d'une cytotoxicité.

Pour les raisons déjà évoquées plus haut (fin du paragraphe D.1.3.1, page 71), il est difficile de comparer de façon quantitative le niveau d'expression de NS1 que nous avons obtenu avec celui obtenu lors des précédents travaux de Suzanne Mousset et Perrine Caillet. Cependant, la possibilité d'un niveau d'expression plus élevé avec notre modèle est envisageable, le LTR du MMTV utilisé lors des précédents travaux étant un promoteur plus faible que le promoteur du CMV que nous avons utilisé. Nous envisageons également la possibilité que NS1 puisse interagir avec des cibles cellulaires qui induisent la mort de la cellule-hôte dans les cellules MRC-5 alors que ce n'était pas le cas dans les cellules FR3T3. Il est également intéressant de noter que ces auteurs ne sont pas parvenus à isoler de clones FRNS transformés par l'antigène T de SV40. Ils avancent l'hypothèse que les faibles quantités de dexaméthasone, inducteur du LTR du MMTV, déjà présentes dans le sérum, induisent l'expression d'un niveau basal de NS1 qui serait suffisant pour détruire ces cellules. Ceci montre donc que le « seuil » d'expression de NS1 nécessaire à l'apparition d'effets toxiques dépend non seulement du type cellulaire, de son état de transformation, mais aussi de l'agent transformant employé.

D.1.3.3. D'autres paramètres à prendre en compte

D.1.3.3.1. Localisation intracellulaire de NS1

Nous avons initialement prévu d'examiner la localisation intracellulaire de NS1 dans les cellules transfectées par les deux types de plasmide. En effet, la régulation des activités de NS1 s'effectue également au niveau de sa localisation et de son trafic intracellulaires. Certains auteurs ont ainsi suggéré que, au moins dans le contexte de l'infection de cellules murines par le parvovirus MVM, il puisse y avoir, au cours du cycle viral, un basculement entre les fonctions précoces et les fonctions tardives de NS1 [147]. Les fonctions dites « précoces » sont celles en rapport avec la réplication virale et la transactivation de promoteurs viraux et cellulaires, et se produisent donc dans le noyau. Les fonctions dites « tardives » sont celles en rapport avec la cytotoxicité et la formation et l'acheminement de nouveaux virions, et se produisent dans le cytosol ([139, 145], passés en revue dans [111]).

Malheureusement, nos tentatives d'utilisation de l'anticorps SP8, dirigé contre NS1, dans des expériences de marquage par immunofluorescence n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Cela est principalement dû à l'impossibilité de réduire de façon significative un marquage non spécifique dans les conditions que nous avons testées. Le rapport signal/bruit n'a pas pu être augmenté, même dans le cas d'expériences conduites avec les MRC-5 SV2 infectées par une large gamme de multiplicités d'infection du parvovirus H-1. Cet argument est plutôt en faveur de l'utilisation d'un anticorps non optimisé pour des expériences d'immunofluorescence, plus que de la surexpression de NS1 dans nos conditions de transfection. Nous aurions cependant pu envisager de réaliser une construction permettant de coder la protéine NS1 marquée par un *tag* peptidique, mais nous souhaitons, au moins dans un premier temps, travailler avec une forme de NS1 qui soit la plus proche possible de la forme native.

L'étude de la localisation intracellulaire de NS1 pourrait apporter certaines explications aux différences observées entre cellules normales et cellules transformées. On pourrait par exemple imaginer que le trafic de NS1 soit différent dans ces deux cellules, permettant l'interaction de NS1 avec ses cibles dans un type cellulaire et pas dans l'autre. Hypothétiquement, il se pourrait que, dans le cas des cellules MRC-5, la mutation S473A empêche le transport de NS1 vers le cytoplasme, et donc empêche l'exercice de ses fonctions toxiques. Cependant, l'importance de la Ser473 dans le trafic intracellulaire de NS1 n'a encore jamais été décrite. On peut également concevoir que la phosphorylation de NS1 sur certains résidus autres que la Ser473 permette le transport de NS1 spécifiquement dans les cellules transformées. Nous n'avons actuellement aucune donnée à cet égard, mais la littérature indique que la partie carboxyterminale de NS1 semble jouer un rôle dans sa localisation intracellulaire. En effet, dans des conditions où la protéine NS1 est exprimée sous forme native, 70% du *pool* de NS1 est présent dans le noyau, les 30% restants étant localisés dans le cytoplasme. La délétion des 67 derniers acides aminés perturbe largement cette répartition en faveur d'une localisation nucléaire, et il ne reste alors plus que 5% du pool de NS1 dans le cytoplasme [136]. De manière intéressante, Catherine Legendre a montré que des formes mutantes de NS1, qui ne possèdent pas ces 67 résidus carboxyterminaux, sont moins toxiques que la forme native dans des cellules humaines transformées [125].

D.1.3.3.2. Coopération avec NS2

La lecture de la carte des constructions que nous avons utilisées (pour rappel, [Figure R.1.5](#) en regard de la page 36) montre que nos plasmides pNS1wt et pNS1-S473A peuvent permettre l'expression d'une forme tronquée de la protéine NS2, à laquelle il manquerait les

6 derniers acides aminés carboxyterminaux. Dans les cellules humaines, le rôle de NS2 est encore mal connu, mais cette protéine ne semble en tout cas pas indispensable pour l'exécution d'un cycle parvoviral complet [105, 106]. Cependant, certains travaux de Catherine Legrand montrent que l'expression de NS2 est requise pour que la toxicité induite par NS1 soit maximale dans des lignées cellulaires humaines transformées. Il s'agit vraisemblablement plus d'une collaboration entre NS1 et NS2 que d'une activité propre à NS2, puisque, lorsque NS2 est exprimée seule, la cytotoxicité observée est faible (d'après les travaux de Catherine Legrand dans des cellules humaines [110]) voire absente (d'après les travaux de Paul Becquart dans des cellules murines [175]).

Nous n'avons pas été en mesure de déterminer si la protéine NS2 est effectivement produite dans notre modèle, ceci étant dû à des problèmes de marquage non spécifique avec notre anticorps dirigé contre NS2. Il est d'autant plus difficile de détecter cette protéine qu'elle est particulièrement labile. Etant rapidement dégradée par la machinerie du protéasome [177], la protéine NS2 montre une demi-vie approximative de 90 minutes alors que celle de NS1 est de 6 à 8 heures [111].

Cependant, il est important de préciser que, en raison de l'épissage d'un grand intron dans le transcrit R2, codant la protéine NS2, le résidu Ser473 de NS1 n'est pas retrouvé dans NS2 et est donc propre à NS1. La simple mutation S473A est suffisante pour abolir la cytotoxicité dans les cellules MRC-5. Il est donc peu probable que la protéine NS2 joue un rôle dans la toxicité observée lorsque ces cellules sont transfectées par le plasmide pNS1wt. La participation de NS2 pourrait en revanche être l'une des raisons expliquant que la toxicité ne soit pas complètement supprimée dans les cellules MRC-5 SV2 transfectées par pNS1-S473A. La participation de NS2 aux phénomènes cytotoxiques n'est pas encore précisément décrite mais elle semble liée à la partie aminoterminal de celle-ci, qui est donc intacte dans notre modèle si toutefois la protéine NS2 est exprimée. Cependant, la littérature ne mentionne pas si une forme tronquée de NS2 peut participer à la cytotoxicité induite par NS1, et il est possible que cette forme tronquée soit encore plus rapidement dégradée que la forme native.

D.1.3.4. Conclusion

Nos travaux, en complément de ceux déjà effectués par d'autres auteurs et détaillés dans les paragraphes précédents, nous laissent envisager que la diversité des partenaires cellulaires de NS1 soit un des facteurs déterminants de l'oncotropisme, à condition d'y attacher une définition plus large. Nous utiliserions alors le terme « oncotropisme » pour désigner non plus uniquement une répllication préférentielle du PVH-1 dans les cellules transformées, mais également la sensibilité accrue d'une cellule transformée à l'action

cytotoxique de NS1. Le PVH-1 aurait alors pour hôte préférentiel les cellules transformées parce qu'elles fournissent, au contraire des cellules normales, des conditions plus favorables à l'expression des fonctions cytotoxiques de NS1, et donc, à terme, à la propagation du virus. Cette définition de l'oncotropisme parvoviral telle que nous la proposons engloberait alors la notion d'oncotropisme telle que définie par Jan Cornelis et Jean Rommelaere et celle d'oncolyse.

Cette définition ferait ainsi intervenir le contenu cellulaire, qui est un déterminant majeur des possibilités d'interaction de NS1 avec la cellule-hôte, elles-mêmes définissant la capacité du parvovirus H-1 à adapter et détourner les processus cellulaires pour sa propre propagation. Le processus de transformation cellulaire implique de profonds changements, parmi lesquels on compte des modifications de l'expression d'un grand nombre de protéines. Ainsi, certaines voies de signalisation peuvent être spécifiquement activées dans les cellules transformées. L'expression de certains membres de la famille protéines kinases C peut se trouver augmentée [178], de même que leur localisation peut être modifiée, au cours de la transformation cellulaire [179, 180]. Il est par ailleurs intéressant de noter que la PKC λ , en dehors de tout contexte d'infection parvovirale, participe aux modifications du cytosquelette observées lors de la transformation cellulaire, notamment parce que la PKC λ est activée par Ras [181]. Généralement, les cellules transformées et non transformées montrent des morphologies différentes, notamment à la suite de modifications d'expression de composants du cytosquelette. Jürg Nüesch avait par ailleurs observé, dans ses travaux mettant en lumière l'interaction entre NS1, CKII α et tropomyosines, que les isoformes de tropomyosine exprimés dans les fibroblastes murins transformés sont différents de ceux exprimés dans les cellules normales [148]. Ceci rejoint des travaux plus généraux montrant que ces modifications d'expression se produisent lors de la transformation cellulaire de fibroblastes murins, aviaires et humains [182]. Cela pourrait expliquer pourquoi la mutation S473A empêche la désorganisation du réseau d'actine observée avec la forme native de NS1, et ce dans les deux lignées MRC-5 et MRC-5 SV2, mais n'empêche pas l'induction de la mort cellulaire dans les MRC-5 SV2. En effet, cela suggère encore une fois, dans ces deux lignées, des interactions de NS1 différentes qui engageraient des voies différentes d'induction de la mort cellulaire.

Certains auteurs désignent par le terme « interactome » l'ensemble des interactions cellulaires se produisant au sein d'une cellule [183]. L'étude de l'interactome dans les cellules humaines normales et transformées, et des perturbations de cet interactome lorsqu'on y ajoute une donnée supplémentaire, à savoir l'introduction de la protéine parvovirale NS1 dans le système, représente donc sans aucun doute un des challenges majeurs dans le futur de la recherche fondamentale sur les parvovirus.

D. 2. A propos du « projet Netrin-1 »

Le projet « Netrin-1 » a malheureusement été suspendu prématurément, principalement pour des raisons techniques. Cependant, certaines des données déjà obtenues mettent en lumière des connexions intéressantes, aussi bien avec les travaux effectués par de précédents auteurs qu'avec ceux que notre laboratoire a publié. Nous détaillerons ici ces points, qui ne sont toutefois actuellement que des conjectures.

D.2.1. Sensibilité des cellules à l'infection par le parvovirus H-1

Nos travaux montrent que la vitesse de croissance des cellules, qui est notamment fonction du milieu de croissance dans lequel elles évoluent, influe sur la sensibilité des cellules à l'infection par le parvovirus H-1. En particulier, plus la vitesse de croissance des cellules est élevée, plus les cellules sont sensibles aux effets toxiques induits par le virus. Les travaux de Ghaffar Muharram (notre laboratoire, article présenté dans ce manuscrit) montrent que ce phénomène, observé sur les lignées cellulaires SK-BR-7 et T-47D, est reproductible sur des cellules provenant de prélèvements de patients. En effet, il existe une corrélation entre l'index mitotique et la sensibilité à l'infection par le PVH-1 de cellules issues de 96 échantillons de carcinomes mammaires, collectés chez des patientes traitées au Centre Oscar Lambret de Lille.

La haute dépendance du parvovirus H-1 à des facteurs exprimés lors de la phase S du cycle cellulaire [28, 29] explique au moins en partie que des cellules qui se divisent activement soient sensibles à l'infection. Il est cependant connu depuis longtemps que le passage en phase S est une condition nécessaire mais pas suffisante. La sensibilité « maximale » aux effets cytopathiques du PVH-1 est généralement observée avec des cellules transformées, puisque ce sont elles qui fournissent les conditions optimales d'activation du promoteur parvoviral P4 (pour revue : [75]). Les travaux de Jan Cornelis ont démontré que la sensibilisation de cellules humaines transformées à l'action lytique du PVH-1 est corrélée à l'augmentation de l'expression des transcrits parvoviraux et des protéines non structurales et structurales qui en sont issues. Les différences de sensibilité qui peuvent être observées entre différentes lignées cellulaires ne sont en revanche pas corrélées à l'entrée du virus, à l'amplification de l'ADN viral ou à la stabilité des ARNm viraux [33].

On peut également considérer la notion de « seuil » de production de NS1 (largement abordée dans le paragraphe D.1.3.1. page 70) : peut-être que ce seuil est plus bas et/ou est plus rapidement atteint dans les cellules SK-BR-7 qu'il ne l'est dans les autres cellules

(T-47D ou MDA-MB-231) que nous avons testées, expliquant les différences de sensibilité observées.

Jan Cornelis a également montré que l'état de différenciation de la cellule a un impact sur la sensibilité des cellules à l'infection parvovirale : généralement, moins une cellule est différenciée, plus elle est sensible [33]. Ghaffar Muharram a observé que les cellules sensibles à l'infection parvovirale proviennent d'échantillons de tumeurs classées grade II et III (selon le grade histologique combiné de Nottingham) et donc considérées comme peu différenciées. A cet égard, on notera que, parmi les cellules exprimant la netrin-1 et son récepteur UNC5H, les cellules T-47D sont différenciées [184] alors que les SK-BR-7 le sont peu [185], et que ce sont justement ces dernières qui sont les plus sensibles.

Les cellules SK-BR-7 sont par ailleurs issues d'un carcinome mammaire particulièrement invasif chez la patiente, et donnent de nombreuses métastases chez l'animal [186]. Cette capacité de migration a justement été mise en relation avec le taux d'expression de la netrin-1 observé par Julien Fitamant dans cette lignée, plus élevé que dans les cellules T-47D [169]. Nous envisageons une possible relation entre l'agressivité tumorale, la capacité métastatique, le niveau d'expression de la netrin-1 et la sensibilité à l'infection par le PVH-1, mais nos travaux à ce sujet sont encore en cours.

D.2.2. Protéine NS1 et mort cellulaire

D.2.2.1. Profil d'expression de NS1

Nos résultats montrent clairement l'expression de la protéine NS1 lors de l'infection des cellules SK-BR-7 et T-47D par le parvovirus H-1. Le profil d'expression de NS1 en Western blot montre la présence de deux bandes. Ceci suggère, à défaut de preuve directe, que la phosphorylation de cette protéine ait effectivement lieu et qu'elle soit complète. Par phosphorylation « complète », nous entendons qu'elle se produise *a priori* de la façon classiquement observée pour des cellules sensibles à l'infection, c'est-à-dire sur tous les résidus impliqués dans la régulation de ses activités, contrairement au profil à une seule bande que nous observons lors de la transfection de cellules avec une forme mutée de NS1. Dans les travaux effectués sur des prélèvements issus de patientes (article présenté dans ce manuscrit, pages 56 à 66), on observe que les cellules issues de tissu sain sont beaucoup moins sensibles que celles issues de tissu tumoral. Cela peut probablement être corrélé aux différences de profils d'expression de NS1 obtenus dans ces deux types de tissus, après infection par le parvovirus H-1. D'une part, le niveau d'expression de NS1 est beaucoup plus faible dans le tissu normal. En effet, NS1 est à peine décelable lorsque les cellules issues de tissu sain sont infectées à M.O.I. 1 (voir [Figure 4c](#) en page 63 de ce manuscrit). Cela est

vraisemblablement lié à une activation préférentielle du promoteur parvoviral P4 dans les cellules transformées, comme cela a déjà été démontré en lignée cellulaire (pour revue : [75]). D'autre part, le ratio d'intensité des deux bandes de NS1 exprimée après infection est nettement différent entre tissu sain (partie A de la Figure 4c page 63) et tissu tumoral (partie B de cette figure). En effet, dans le tissu normal infecté, la forme hypophosphorylée de NS1 (bande du bas) est majoritaire, alors que l'intensité des deux bandes est la même, voire légèrement plus forte pour la forme hyperphosphorylée (bande du haut) à M.O.I. 1, dans le tissu tumoral infecté.

Ces résultats montrent une correspondance intéressante avec ceux que nous avons obtenu lors de l'expression de NS1 dans les cellules MRC-5 et MRC-5 SV2. En effet, aux quantités de plasmide pNS1wt pour lesquelles la toxicité observée n'est pas maximale (soit 0,1 et 0,5µg d'ADN, dans les deux lignées), le ratio d'intensité entre les deux bandes de NS1 est en faveur de la bande hypophosphorylée (bande du bas, sur les Figures 2a et 2b en regard de la page 43). Dans les deux lignées, l'utilisation du plasmide pNS1-S473A, codant une forme mutée de NS1, donne un profil d'expression en Western blot qui ne montre plus qu'une seule bande. De manière intéressante, cette modification du profil d'expression est à mettre en rapport avec une toxicité moins importante (pour les MRC-5 SV2) voire complètement abolie (pour les MRC-5).

Il pourrait donc y avoir un lien entre le profil d'expression de NS1, et en particulier l'état de phosphorylation global du *pool* de cette protéine, et la sensibilité des cellules à la cytotoxicité induite par NS1, aussi bien en lignée cellulaire humaine (cas des MRC-5 et MRC-5 SV2) que sur cellules issues de patientes.

D.2.2.2. Mort cellulaire induite par NS1

Les cellules SK-BR-7 nous ont semblé être un modèle intéressant d'étude des voies de mort cellulaire induites par le parvovirus H-1, notamment parce qu'elles montrent une inhibition constitutive d'une voie particulière d'apoptose. Nous n'avons cependant pas réussi à déterminer précisément le type de mort cellulaire induite par NS1 lors de l'infection de ces cellules. L'activation de la caspase 3 ne semble pas se produire. Le fait que l'induction de son activation n'a pas été possible avec l'inhibiteur du système netrin-1 / UNC5H, appelé DCC-5Fbn, nous empêche cependant de conclure fermement, faute d'avoir à disposition un contrôle positif d'activation de la caspase 3 dans cette lignée. Lors d'expériences de cytométrie en flux, que nous n'avons pas présentées dans ce manuscrit, nous n'avons pas détecté l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) membranaire, qui est un autre marqueur de l'apoptose [187]. L'utilisation de composés connus pour induire l'apoptose dans des cellules de cancer du sein, tels que la staurosporine [188-190], l'aphidicoline [191], le

paclitaxel [192, 193] et le tamoxifène [194, 195], n'a pas non plus donné lieu à la détection de l'activation de la caspase 3 ou de l'externalisation de la PS membranaire dans les cellules SK-BR-7 ou T-47D.

Les effets cytopathiques observés dans ces cellules après infection sont vraisemblablement liés à l'interaction de la protéine parvovirale NS1 phosphorylée avec des cibles cellulaires. Nous avons identifié des modifications de la morphologie cellulaire des SK-BR-7 suite à l'infection par le PVH-1. Il serait intéressant de voir si ces modifications peuvent être liées à l'interaction de NS1 avec les composants du cytosquelette et/ou les protéines impliquées dans la formation et l'organisation de celui-ci, comme cela a été observé par Jürg Nüesch [148, 153] ou suggéré lors de nos travaux sur les cellules nucléofectées (partie R1 de ce manuscrit).

Conclusion générale

Le but de cette thèse était de tenter de répondre, au moins en partie, à deux questions primordiales qui se posent si l'on souhaite envisager l'inclusion du parvovirus H-1 dans l'arsenal des thérapies qui existent déjà pour lutter contre le cancer.

La première de ces questions était : comment le parvovirus H-1 se comporte-t-il dans une cellule humaine normale ? Comme expliqué lors de l'introduction de ce manuscrit, les réponses à cette question, posée telle quelle, sont déjà en grande partie connues. Dans des cellules humaines normales, même lorsqu'elles sont en division active, le promoteur P4 du parvovirus H-1 n'est pas activé. Il n'y a donc pas production des protéines parvovirales, notamment pas de production de la protéine NS1 qui est la principale responsable des effets cytotoxiques induits par l'infection chez des cellules transformées. Nous nous sommes alors posés la question de l'interaction entre le parvovirus H-1 et les cellules normales de cette manière : Comment se comporterait la protéine NS1 si elle venait à être produite dans une cellule humaine normale ?

Nos travaux se sont limités à l'étude d'un seul modèle cellulaire, les cellules humaines MRC-5 possédant un phénotype normal et leurs dérivés MRC-5 SV2, transformées par SV40. En utilisant ce modèle, et une technique de transfection transitoire particulièrement efficace qui nous a permis l'expression d'une forme native de la protéine NS1, nous avons montré que cette protéine pouvait induire des phénomènes conduisant à la mort cellulaire dans les cellules normales. De nombreux arguments montrent toutefois que le comportement de NS1 est largement dépendant de l'état de transformation de la cellule dans laquelle elle est exprimée. Ces travaux demanderaient à être reproduits dans d'autres modèles cellulaires, qu'il s'agisse de lignées commerciales humaines ou de cellules issues de tissu sain prélevé chez des patients. Cela permettrait d'affiner nos résultats et de déterminer si le couple MRC-5 / MRC-5 SV2 reste une exception ou si une généralisation est envisageable. Dans l'état actuel des choses, nous sommes tentés de répondre à la question posée en disant que certaines cellules humaines normales peuvent fournir des conditions favorables à l'exercice de la toxicité de NS1, à condition que celle-ci soit exprimée. Aucune pathologie humaine associée au parvovirus H-1 n'a été détectée à ce jour. Cependant, nous n'excluons pas l'hypothèse que certains contextes pathologiques puissent permettre l'activation du promoteur P4, et donc éventuellement aboutir à la destruction de cellules qui ne seraient pas la cible première de ce virus. Du point de vue de la recherche fondamentale, l'analyse fine des événements qui se produisent lorsque NS1 est exprimée dans une cellule normale, que ce soit ses modifications post-traductionnelles ou les voies qu'elle est capable de mettre en jeu en interagissant avec des partenaires protéiques cellulaires, représente un nouveau challenge qui améliorera notamment la définition de l'oncotropisme parvoviral.

La seconde question qui était posée était : le parvovirus H-1 peut-il être efficace contre des tumeurs résistantes à certains traitements classiques ? De nombreux travaux, notamment effectués par l'ensemble des équipes du *Deutsches Krebsforschung Zentrum* (DKFZ), à Heidelberg, montrent que c'est le cas, notamment pour certains gliomes et cancers du pancréas. La question telle qu'a été posée peut paraître ambitieuse, notamment au vu du modèle que nous avons utilisé. En effet, ce modèle reste purement *in vitro* et correspond en fait à un système dans lequel une voie d'apoptose particulière est inhibée, mais l'apoptose n'est pas nécessairement le seul moyen employé par les traitements actuels pour induire la destruction des cellules cancéreuses. Nos travaux montrent que le parvovirus H-1 peut détruire efficacement les cellules de lignées issues de cancers agressifs et à haut pouvoir métastatique. Cela représente déjà un bel espoir thérapeutique.

Nous souhaitions initialement utiliser ce modèle impliquant des récepteurs de dépendance pour étudier plus en détail les mécanismes de mort induite par le parvovirus H-1. Nous avons imaginé que ce virus puisse interférer avec ce système d'inhibition constitutive de l'apoptose, et le rétablisse en induisant à nouveau l'apoptose, ou le contourne afin de provoquer malgré tout la mort cellulaire. Le parvovirus H-1 induit la mort des cellules SK-BR-7. Mais il nous est pour l'instant difficile de trancher quant aux mécanismes employés par le virus, notamment au vu des problèmes techniques et d'approvisionnement en inhibiteur du système que nous avons rencontrés. Mais la récente publication, par l'équipe de Patrick Mehlen, d'un article sur le DCC-5Fbn [173], signifiant sa nouvelle disponibilité, nous laisse à nouveau entrevoir de belles perspectives d'examen de ce modèle, avec à la clé une progression de la connaissance des mécanismes de la cytotoxicité induite par le parvovirus H-1 dans les cellules transformées.

Annexes

A. 1. Matériel et Méthodes

NB : Sauf mention contraire, tous les produits désignés dans cette section du manuscrit ont été achetés chez Life Technologies, Inc. (anciennement Invitrogen).

A.1.1. Cellules

A.1.1.1. Lignées cellulaires et milieux de culture

Nom	Origine	Milieu de culture	Compléments
MRC-5	ATCC (Réf. CCL-171)	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) with GlutaMAX-I</i>	<i>Fetal Bovine Serum 20% v/v</i> <i>MEM NEAA 0.1 mM</i> <i>Penicillin 50 U/ml</i> <i>Streptomycin 50 µg/ml</i>
MRC-5 SV2	ECACC (Réf. 84100401)	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) with GlutaMAX-I</i>	<i>Fetal Bovine Serum 10%</i> <i>MEM NEAA 0.1 mM</i> <i>Penicillin 50 U/ml</i> <i>Streptomycin 50 µg/ml</i>
MDA-MB-231		<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) with GlutaMAX-I</i>	<i>Fetal Bovine Serum 10%</i> <i>MEM NEAA 0.1 mM</i> <i>Penicillin 50 U/ml</i> <i>Streptomycin 50 µg/ml</i>
T-47D	Dons de l'équipe de P. Mehlen (CNRS UMR 5238, Centre Léon Bérard, Lyon)		
SK-BR-7		<i>RPMI 1640 with GlutaMAX-I</i>	<i>Fetal Bovine Serum 10%</i> <i>MEM NEAA 0.1 mM</i> <i>Penicillin 50 U/ml</i> <i>Streptomycin 50 µg/ml</i>
STL2	Développée au laboratoire	<i>PFHM (Protein-Free Hybridoma Medium)</i>	<i>L-Glutamine 2mM</i> <i>Gentamycin 8µg/ml</i>

A.1.1.2. Entretien des lignées

L'entretien des cellules adhérentes (toutes les lignées sauf STL2) s'effectue en « repiquant » les cellules lorsqu'elles atteignent au maximum 80% de confluence dans leur support. Les volumes sont donnés pour une boîte de culture de diamètre 100 mm (Corning). Le surnageant de culture est prélevé et éliminé, et les cellules sont rincées 2 fois avec 2 ml de PBS 1X. Les cellules sont ensuite incubées en présence d'une « solution de détachement » (PBS 1X, trypsine 1g/L, EDTA 1g/L, rouge de phénol 1% v/v, gentamycine 8µg/ml, NaOH 0,12 %) 3 à 10 minutes, le temps qu'elles se détachent du support de culture. Les 2ml de « solution de détachement » sont ensuite neutralisés par ajout de 10 ml de milieu de culture. La solution obtenue est ainsi répartie dans 2 à 8 boîtes contenant déjà du milieu de culture (q.s.p. 12 à 14 ml), selon la lignée utilisée et le temps d'incubation souhaité. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 36 à 72 h, sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

L'entretien des cellules STL2, qui prolifèrent en suspension dans des flasques (Corning) remplies de 100ml de milieu, s'effectue en remplaçant un volume donné de solution, contenant milieu de culture et cellules, par un volume équivalent de milieu frais. Si les cellules doivent être incubées pendant 48h, le volume remplacé est de 50 ml (soit une dilution au 1/2). Si elles sont incubées pendant 72h, le volume remplacé est de 60 ml (soit une dilution au 3/5). L'incubation s'effectue dans les mêmes conditions que pour les autres lignées (37°C, atmosphère humidifiée à 5% de CO₂). Ces dilutions assurent un maintien de la densité cellulaire entre les deux valeurs limites de leur phase exponentielle de croissance (de 4.10⁵ à 1,2.10⁶ cellules / ml).

A.1.2. Expériences en contexte d'infection virale

Le parvovirus H-1 est produit dans la lignée cellulaire humaine STL2, développée au laboratoire et en cours de brevet, à partir du plasmide pSR19 [196] contenant le génome de ce virus. Les stocks de virus sont titrés par la méthode du TCID₅₀ [197]. La multiplicité d'infection (M.O.I.) correspond au nombre de particules virales infectieuses par cellule. La M.O.I. est estimée *a priori* en calculant le rapport entre le nombre de PFU (*Plaque Forming Units*) et le nombre de cellules, pour chaque condition.

A.1.2.1. Procédure d'infection virale

Au jour J-1 avant infection, les cellules sont comptées (*Z2 Particle Size Counter*, Beckman Coulter) et ensemencées afin d'obtenir environ 15 à 25% de confluence lorsqu'elles auront adhéré au support et repris leur morphologie normale (soit un ensemencement 1.10^5 à 5.10^5 cellules par puits en plaques 6 puits, et 1.10^4 à 3.10^4 cellules par puits en plaques 24 puits, selon la lignée considérée). Les « solutions virales » aux différentes M.O.I. sont obtenues en diluant, dans du tampon TE (Tris 50mM, EDTA 5mM, pH 8,7), la solution stock de virus, elle-même déjà préparée dans ce tampon TE et titrée à $2,9.10^8$ PFU/ml. Chaque condition reçoit le même volume de tampon TE, y compris les conditions identifiées « contrôle » (non infectées). La solution « contrôle » et les « solutions virales » sont déposées directement dans les puits ou boîtes qui contiennent déjà les volumes de travail de milieu de culture habituel des cellules (soit 2 ml par puits en plaque 6 puits ou 500 µl par puits en plaque 24 puits). Les cellules sont incubées 2 à 4 heures en présence de cette solution. Ensuite, la solution d'incubation (milieu de culture + « solution virale » ou solution « contrôle ») est prélevée et éliminée, et les cellules sont rincées trois fois au PBS 1X afin d'éliminer tout virus résiduel qui ne serait pas entré dans les cellules. Enfin, les cellules sont incubées dans du milieu de culture frais (2 ml par puits pour une plaque 6 puits ou 500 µl par puits pour une plaque 24 puits) pendant les temps indiqués pour chaque expérience.

A.1.2.2. Coloration au Giemsa

Les volumes sont donnés pour un puits de plaque 6 puits. Le milieu dans lequel les cellules ont été incubées est prélevé et éliminé. Les cellules sont rincées par 3 lavages avec 1 ml de PBS 1X, puis fixées avec 1 ml de méthanol pendant 10 minutes. Après 3 nouveaux lavages (1 ml PBS 1X chacun), elles sont incubées pendant 1 heure dans 1 ml de solution de Giemsa diluée extemporanément au 1/10 dans l'eau du robinet. Les puits sont enfin rincés par trois derniers lavages (2 ml d'eau du robinet chacun) et laissés à l'air libre pour séchage. Les photos sont prises lors de l'observation sous loupe binoculaire (*MZFLIII*, Leica).

A.1.3. Colorimétrie au MTT

La solution stock de MTT (ou bromure de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) est préparée en diluant la poudre fournie par le fabricant (Sigma-Aldrich) dans une solution de PBS 1X pH 7,4 afin d'obtenir une concentration de 5 mg/ml. Après prélèvement et élimination du milieu de culture, les cellules sont incubées 2 à 4 heures (37°C, atmosphère humide contenant 5% de CO₂) dans une « solution de travail » de MTT correspondant à la solution stock diluée au 1/10 dans du milieu de culture frais. Sous

l'action des réductases cellulaires, enzymes actives uniquement dans les cellules viables, le MTT, initialement de couleur jaune, est réduit en formazan, insoluble, de couleur violette. Après prélèvement et élimination de la « solution de travail » de MTT, l'incubation à température ambiante dans une solution de solubilisation (HCl 1N et Isopropanol, 1:23 v/v) pendant 15 à 30 minutes permet la lyse des cellules et la solubilisation du formazan. A l'aide d'un spectromètre, les valeurs d'absorbance à 540 nm et à 620 nm du lysat cellulaire sont mesurées, la différence entre ces deux valeurs étant directement proportionnelle au nombre de cellules viables.

A.1.4. Western Blot

A.1.4.1. *Obtention d'extraits protéiques totaux*

Les volumes sont donnés pour une condition, équivalente à un puits de plaque 6 puits. Le « surnageant de culture » (milieu de culture et éventuelles cellules en suspension) est prélevé et préservé. Les cellules sont rincées deux fois au PBS 1X puis incubées dans 1 ml d'une « solution de détachement » (PBS 1X, trypsine 1g/L, EDTA 1g/L, rouge de phénol 1% v/v, gentamycine 8µg/ml, NaOH 0,12 %) pendant 3 à 10 minutes à 37°C (atmosphère humide contenant 5% de CO₂) jusqu'à ce qu'elles se détachent de leur support. La « solution de détachement », contenant les cellules, est neutralisée par ajout de 10 ml de milieu de culture frais et du surnageant de culture préalablement prélevé. Les cellules ainsi remises en suspension sont centrifugées pendant 5 minutes à 500g. Le surnageant est prélevé et éliminé. Les culots cellulaires obtenus sont lysés par resuspension dans 100 à 200µl de « tampon de lyse » PY (Tris-HCl 20mM, NaCl 50 mM, EDTA 5mM, Triton X-100 1% v/v, Sodium Azide 0,02% v/v, auquel est ajouté du *Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* à raison d'une tablette pour 50ml de tampon de lyse PY). Après incubation pendant 15 minutes, sur glace, dans le tampon de lyse PY contenant le cocktail d'inhibiteurs de protéases, les lysats obtenus sont centrifugés pendant 30 minutes à 11000g. Les surnageants ainsi obtenus, appelés « extraits protéiques totaux », sont stockés à -20°C ou utilisés de suite.

A.1.4.2. *Dosage des extraits protéiques*

La concentration en protéines dans les « extraits protéiques totaux » est déterminée en y ajoutant du *Protein Assay* (Biorad) et en mesurant l'absorbance à 595nm à l'aide d'un spectromètre *Multiskan RC* piloté par le logiciel *Ascent v2.6* (Thermolabs Systems).

A.1.4.3. Préparation des extraits protéiques dosés pour la migration

Les volumes sont donnés pour chaque condition correspondant à un puits lors du dépôt dans la cuve de migration (volume total contenu dans un puits : 37,5 µl). A 26 µl d'extrait protéique dosé, amené à la concentration protéique totale voulue, on ajoute 10 µl de *NuPAGE[®] LDS Sample Buffer (4X)* et 4 µl de *NuPAGE[®] Antioxidant*. Le mélange est incubé 10 minutes au bain-marie thermostaté (70°C) et centrifugé 1 minutes à 13000g. 36 µl de ce mélange sont déposés dans un puits de gel précoulé *NuPAGE[®] Novex 4-12% Bis-Tris Mini*.

A.1.4.4. Migration

La migration s'effectue en cuve *XCell SureLock[®] Mini Cell* dans 800 ml de « tampon de migration » (*NuPAGE[®] MOPS SDS Running Buffer (20X)* ramené à 1X par dilution dans l'eau désionisée, 0,25% v/v de *NuPAGE[®] Sample Reducing Agent (10X)*). Un courant électrique de voltage constant (200 V) est appliqué pendant 1 heure à l'aide d'un générateur (*PowerPac 1000*, Biorad).

A.1.4.5. Transfert

Après migration, les protéines contenues dans le gel sont transférées sur membranes de PVDF grâce au système de transfert à sec *iBlot[™] Gel Transfer Device* et à ses *iBlot[™] Transfer Stack, PVDF* en utilisant le programme P3 (20 V, 7 minutes).

A.1.4.6. Saturation des sites aspécifiques (« Blocage »)

Les membranes sont incubées dans une « solution de blocage » (*Aurora[™] Blocking Reagent (MP Biomedicals)* 2mg/ml dans PBS 1X, Tween 20 0,1% v/v) pendant 1h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

A.1.4.7. Incubation dans des solutions d'anticorps primaire

Les « solutions d'incubation » d'anticorps contiennent la solution d'anticorps primaire proprement dite, diluée dans la « solution de blocage » précédemment décrite. L'incubation se fait en boîte hermétique, sous agitation, selon les conditions décrites page suivante.

Protéine étudiée	Anticorps utilisé	Dilution	Incubation
NS1	SP8 (développé au laboratoire)	1/5000* ou 1/1000†	1 heure à température ambiante ou pendant la nuit à 4°C
Caspase 3	Formes pro-caspase 3 et caspase 3 active (forme clivée)	<i>Active + pro Caspase 3 antibody</i> (Abcam, Réf. ab47131)	6h à température ambiante ou 24h à 4°C
	Caspase 3 active (forme clivée) uniquement	<i>Active Caspase 3 Antibody</i> (Abcam, Réf. ab13847)	

A.1.4.8. Incubation dans des solutions d'anticorps secondaire

Après 3 à 5 lavages, chacun consistant à incuber la membrane dans la « solution de blocage » pendant 10 à 15 minutes en boîte hermétique, sous agitation, la membrane est incubée dans une « solution d'incubation d'anticorps secondaire ». Cette solution est composée de la solution d'anticorps secondaire proprement dite (*ECL Mouse IgG, HRP-Linked Whole Antibody* ou *ECL Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Antibody*) diluée au 1/5000 dans la « solution de blocage ». L'incubation se fait en boîte hermétique pendant 30 minutes à 1h à température ambiante, sous agitation.

A.1.4.9. Détection des protéines

Après 3 à 5 nouveaux lavages identiques à ceux effectués après l'incubation dans la solution d'anticorps primaire, la membrane est encore lavée 3 fois au PBS 1X (5 à 10 minutes d'incubation à température ambiante par lavage), séchée superficiellement sur papier Whatman, puis incubée en présence des composés du kit *Western Lightning Plus ECL* (Perkin-Elmer) pendant une minute. Les protéines sont alors détectées (technique d'électrochimiluminescence) à l'aide du *LAS-3000* piloté par le logiciel *MultiGauge* (Fujifilm).

* si l'extrait protéique provient de cellules infectées

† si l'extrait protéique provient de cellules transfectées

A.1.5. Transfections

A.1.5.1. Lipofections

Les transfections ont été effectuées en plaques 6 puits (Corning), avec les plasmides pcDNA3 vide et pcDNA3 GFP (voir carte) en utilisant soit l'agent *Exgen 500* (Fermentas) soit le couple *Lipofectamine™ LTX Reagent* et *Plus™ Reagent* (Invitrogen), selon les protocoles fournis par le fabricant. Sauf mention contraire dans le texte des résultats, les doses d'ADN employées ont été de 2µg par puits de plaque 6 puits (ensemencées à raison de 1,5 à 2.10⁵ cellules par puits, 12 à 24 heures avant la transfection).

A.1.5.2. Nucléofection

La technique de nucléofection tire son nom de l'appareil utilisé, appelé *Nucleofector®* (Amaxa / Lonza). Nous avons utilisé le *Basic Nucleofector® Kit for Primary Mammalian Fibroblasts* (Lonza), et réalisé la transfection selon le protocole du fabricant. Le lecteur intéressé découvrira plus de détails dans ce protocole, mais, cette technique étant particulière et relativement peu couramment utilisée, nous la décrivons ci-après dans ses grandes lignes.

Les cellules MRC-5 et MRC-5 SV2, cultivées en boîte de diamètre 100mm (Corning) sont détachées de leur support à l'aide d'une « solution de détachement » (voir le paragraphe « Culture cellulaire ») puis comptées (compteur automatique Z2, Beckman Coulter). On prévoit 5.10⁵ cellules pour un puits de plaque 6 puits (les volumes seront donc donnés en conséquence). Les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 90g à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu dans la *Nucleofector® Solution* fournie avec le kit. La durée d'incubation des cellules dans cette solution pure ne doit pas excéder 15 minutes. L'ADN à transférer est ajouté à ces 100µl de *Nucleofector® Solution* contenant les cellules, et le mélange est transféré en cuvettes de nucléofection (fournies par le fabricant). La cuvette est placée dans le *Nucleofector®* et les cellules subissent alors un courant électrique de durée et d'intensité déterminée par le programme choisi (mais tenues secrètes par le fabricant). Immédiatement après application du programme désiré, on ajoute 500µl de milieu de culture RPMI 1640 (Invitrogen) préchauffé à 37°C et l'ensemble du contenu de la cuvette est transféré, à l'aides des micropipettes fournies par le fabricant, dans un puits de plaque 6 puits contenant 4,5 ml de milieu de culture habituel (voir tableau du paragraphe A.1.1. page I) préchauffé à 37°C. Les plaques sont ensuite incubées pendant 24h en étuve thermostatée à 37°C, sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

A.1.6. Immunofluorescence et microscopie confocale

Les cellules ont été préalablement incubées dans des plaques 6 puits dont le fond est tapissé de plusieurs lamelles. 24h après incubation, le surnageant de culture est prélevé et éliminé et nous utilisons de l'*Alexa Fluor 546 phalloidin* (Invitrogen), selon le protocole défini par le fabricant, pour marquer l'actine. Les lamelles sont ensuite déposées sur lame, une goutte de *VectaShield™ Mounting Medium with DAPI* (Vector Laboratories), contenant déjà du DAPI qui permettra de marquer les noyaux cellulaires, étant déposée entre lame et lamelle. Les lames sont ensuite entreposées à 4°C, à l'abri de la lumière, pendant 24h. Les lames sont observées sous microscope confocal à balayage laser (*LSM 710*, Zeiss) piloté par le logiciel *Zen Software v2009 1.0 SP1* (Zeiss).

A.1.7. Construction et préparation des plasmides

A.1.7.1. Construction du vecteur pNS1wt

A.1.7.1.1. Stratégie de construction

Toutes les positions de nucléotides, désignées par le sigle ntd suivi d'un numéro, font référence à la séquence publiée du génome du parvovirus H-1 (référence NCBI NC_001358.1). En quelques mots, la séquence codant NS1, flanquée d'un site BamHI en 5' (site créé lors du clonage) et d'un site Stul en 3' (compatible avec EcoRV, site déjà présent dans la séquence de NS1) est obtenue en associant deux parties. La première, appelée « partie 5' » correspond aux ntd 258 à 1081, et l'autre, appelée « partie 3' », correspond aux ntd 1082 à 2378. Ces deux parties réunies sont insérées dans le plasmide pcDNA3 (Invitrogen), entre les sites BamHI et EcoRV de sa cassette de clonage.

A.1.7.1.2. Réalisation de la construction

Création de la partie 5' (ntd 258 à 1081) :

Elle provient d'une amplification par PCR effectuée dans les conditions suivantes :

- matrice : fragment de 1081 paires de bases (bp), déjà créé au laboratoire, issu de la digestion enzymatique du clone moléculaire du parvovirus H-1, appelé pSR19 [196], par HindIII et EcoRI

- amorce sens = ACCA**AGGATCC**ATGGCT (en gras, création d'un site BamHI par remplacement de 6 nucléotides, en amont du codon ATG commençant au ntd 264)
- amorce antisens = GGTTTTCCAGCACGAC (amorce M13 forward universelle)
- *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Fermentas), contenant l'ADN polymérase et son tampon et les désoxynucléotides triphosphate
- 30 cycles comprenant : 30 secondes de dénaturation à 94°C, 40 secondes d'hybridation à 55°C et 2 minutes d'élongation à 72°C

L'amplification par PCR donne un fragment de 828 bp à bouts francs qui est cloné dans le vecteur *pZero* (Invitrogen) digéré par EcoRV. Les bactéries DH10B (Stratagene) sont transformées par ce vecteur.

Création de la partie 3' (ntd 1082 à 2378) :

Elle est issue d'une double digestion enzymatique du pSR19. Une première digestion par HindIII génère deux fragments, de 4,8 et 2,7 kilobases (kb). Le fragment de 2,7 kb est récupéré et digéré par EcoRI et StuI, pour obtenir un nouveau fragment de 1,3 kb, contenu entre les deux sites de restriction, et correspondant donc aux ntd 1082 à 2378.

Finalisation de la création du pNS1wt :

Les parties 5' et 3' de NS1 sont réassemblées par ligation et insérées dans le pcDNA3. Des bactéries *XL1 Blue* (Stratagene) sont transformées avec ce vecteur et les clones obtenus sont criblés par hybridation avec des oligonucléotides radioactifs.

A.1.7.2. Construction du vecteur pNS1-S473A

Le vecteur pNS1-S473A correspond à une version du pNS1wt dans laquelle les nucléotides 1679 à 1681 de la séquence du parvovirus H-1 sont mutés afin d'introduire la mutation S473A. Pour cela, nous avons utilisé le *Quikchange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene), conformément au protocole du fabricant, et en utilisant les amorces suivantes :
5'- CAAAAGGAAAAGGCG**CC**CAAACAGATTGAACCA-3'
et 5'-TGGTTCAATCTGTTTGGCGCCTTTTCCTTTTGG-3'.

A.1.7.3. Préparation des stocks de plasmide

Les bactéries transformées avec les plasmides pNS1wt et pNS1-S473A sont cultivées dans le milieu 2XTY, pendant 16h à 30°C, sous agitation. Les plasmides sont purifiés à l'aide du *PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit* (Invitrogen) conformément au protocole fourni par le fabricant.

A. 2. Bibliographie

1. Tattersall, P., *The evolution of parvovirus taxonomy*, in *Parvoviruses*, C.S.F. Kerr J.R., Bloom M.E., Linden R.M., Parrish C.R., Editor. 2006, Hodder Arnold: London. p. 5-14.
2. Cotmore, S.F. and P. Tattersall, *Parvoviral host range and cell entry mechanisms*. *Adv Virus Res*, 2007. 70: p. 183-232.
3. Cotmore, S.F. and P. Tattersall, *The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates*. *Adv Virus Res*, 1987. 33: p. 91-174.
4. Nam, H.J., B. Gurda-Whitaker, W.Y. Gan, S. Ilaria, R. McKenna, P. Mehta, R.A. Alvarez, and M. Agbandje-McKenna, *Identification of the sialic acid structures recognized by minute virus of mice and the role of binding affinity in virulence adaptation*. *J Biol Chem*, 2006. 281(35): p. 25670-7.
5. Parker, J.S., W.J. Murphy, D. Wang, S.J. O'Brien, and C.R. Parrish, *Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells*. *J Virol*, 2001. 75(8): p. 3896-902.
6. Daniels, T.R., T. Delgado, J.A. Rodriguez, G. Helguera, and M.L. Penichet, *The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer*. *Clin Immunol*, 2006. 121(2): p. 144-58.
7. Brown, K.E., S.M. Anderson, and N.S. Young, *Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus*. *Science*, 1993. 262(5130): p. 114-7.
8. Padron, E., et al., *Structure of adeno-associated virus type 4*. *J Virol*, 2005. 79(8): p. 5047-58.
9. Belnap, D.M., A. Kumar, J.T. Folk, T.J. Smith, and T.S. Baker, *Low-resolution density maps from atomic models: how stepping "back" can be a step "forward"*. *J Struct Biol*, 1999. 125(2-3): p. 166-75.
10. Ball-Goodrich, L.J. and P. Tattersall, *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*, 1992. 66(6): p. 3415-23.
11. Agbandje, M., R. McKenna, M.G. Rossmann, M.L. Strassheim, and C.R. Parrish, *Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles*. *Proteins*, 1993. 16(2): p. 155-71.
12. Agbandje-McKenna, M., A.L. Llamas-Saiz, F. Wang, P. Tattersall, and M.G. Rossmann, *Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice*. *Structure*, 1998. 6(11): p. 1369-81.
13. Kaufmann, B., A.A. Simpson, and M.G. Rossmann, *The structure of human parvovirus B19*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(32): p. 11628-33.
14. Tsao, J., et al., *The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications*. *Science*, 1991. 251(5000): p. 1456-64.
15. Ros, C., C.J. Burckhardt, and C. Kempf, *Cytoplasmic trafficking of minute virus of mice: low-pH requirement, routing to late endosomes, and proteasome interaction*. *J Virol*, 2002. 76(24): p. 12634-45.
16. Ros, C. and C. Kempf, *The ubiquitin-proteasome machinery is essential for nuclear translocation of incoming minute virus of mice*. *Virology*, 2004. 324(2): p. 350-60.

17. Valle, N.R., L.; Almendral, J.M., *Synthesis, post-translational modification and trafficking of the parvovirus structural polypeptides*, in *Parvoviruses*, C.S.F. Kerr J.R., Bloom M.E., Linden R.M., Parrish C.R., Editor. 2006, Hodder Arnold: London. p. 291-304.
18. Tullis, G.E., L.R. Burger, and D.J. Pintel, *The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity*. *J Virol*, 1993. 67(1): p. 131-41.
19. Canaan, S., Z. Zadori, F. Ghomashchi, J. Bollinger, M. Sadilek, M.E. Moreau, P. Tijssen, and M.H. Gelb, *Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A2*. *J Biol Chem*, 2004. 279(15): p. 14502-8.
20. Vihinen-Ranta, M., S. Suikkanen, and C.R. Parrish, *Pathways of cell infection by parvoviruses and adeno-associated viruses*. *J Virol*, 2004. 78(13): p. 6709-14.
21. Zadori, Z., J. Szelei, M.C. Lacoste, Y. Li, S. Garipey, P. Raymond, M. Allaire, I.R. Nabi, and P. Tijssen, *A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity*. *Dev Cell*, 2001. 1(2): p. 291-302.
22. Lombardo, E., J.C. Ramirez, M. Agbandje-McKenna, and J.M. Almendral, *A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly*. *J Virol*, 2000. 74(8): p. 3804-14.
23. Lombardo, E., J.C. Ramirez, J. Garcia, and J.M. Almendral, *Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection*. *J Virol*, 2002. 76(14): p. 7049-59.
24. Cohen, S. and N. Panté, *Pushing the envelope: microinjection of Minute virus of mice into Xenopus oocytes causes damage to the nuclear envelope*. *The Journal of General Virology*, 2005. 86(Pt 12): p. 3243-52.
25. Cohen, S., A.R. Behzad, J.B. Carroll, and N. Panté, *Parvoviral nuclear import: bypassing the host nuclear-transport machinery*. *The Journal of General Virology*, 2006. 87(Pt 11): p. 3209-13.
26. Cotmore, S.F. and P. Tattersall, *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*, 1988. 62(3): p. 851-60.
27. Cotmore, S.F., M. D'Abramo A, Jr., C.M. Ticknor, and P. Tattersall, *Controlled conformational transitions in the MVM virion expose the VP1 N-terminus and viral genome without particle disassembly*. *Virology*, 1999. 254(1): p. 169-81.
28. Bashir, T., R. Horlein, J. Rommelaere, and K. Willwand, *Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(10): p. 5522-7.
29. Deleu, L., A. Pujol, S. Faisst, and J. Rommelaere, *Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection*. *J Virol*, 1999. 73(5): p. 3877-85.
30. Chen, Y.Q., F. de Foresta, J. Hertoghs, B.L. Avalosse, J.J. Cornelis, and J. Rommelaere, *Selective killing of simian virus 40-transformed human fibroblasts by parvovirus H-1*. *Cancer Res*, 1986. 46(7): p. 3574-9.
31. Chen, Y.Q., M.C. Tuijnder, J.J. Cornelis, P. Boukamp, N.E. Fusenig, and J. Rommelaere, *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*, 1989. 10(1): p. 163-7.

32. Cornelis, J.J., P. Becquart, N. Duponchel, N. Salome, B.L. Avalosse, M. Namba, and J. Rommelaere, *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, 1988. 62(5): p. 1679-86.
33. Cornelis, J.J., Y.Q. Chen, N. Spruyt, N. Duponchel, S.F. Cotmore, P. Tattersall, and J. Rommelaere, *Susceptibility of human cells to killing by the parvoviruses H-1 and minute virus of mice correlates with viral transcription*. J Virol, 1990. 64(6): p. 2537-44.
34. Cornelis, J.J., N. Spruyt, P. Spegelaere, E. Guetta, T. Darawshi, S.F. Cotmore, J. Tal, and J. Rommelaere, *Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression*. J Virol, 1988. 62(9): p. 3438-44.
35. de Foresta, F., J. Deleys-Hertoghs, J. Cornelis, B. Klein, and J. Rommelaere, *[Transformation by SV 40 virus sensitizes fibroblasts of human skin to the lytic action of H-1 parvovirus]*. C R Seances Soc Biol Fil, 1985. 179(2): p. 276-82.
36. Guetta, E., M. Minberg, S. Mousset, C. Bertinchamps, J. Rommelaere, and J. Tal, *Selective killing of transformed rat cells by minute virus of mice does not require infectious virus production*. J Virol, 1990. 64(1): p. 458-62.
37. Mousset, S., J. Cornelis, N. Spruyt, and J. Rommelaere, *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, 1986. 68(7-8): p. 951-5.
38. Cotmore, S.F., Tattersall, P. , *A rolling-hairpin strategy: basic mechanisms of DNA replication in the parvoviruses.*, in *Parvoviruses*, C.S.F. J.R. Kerr, Bloom M.E., Linden R.M., Parrish C.R., Editor. 2006, Hodder Arnold: London. p. 171-88.
39. Tattersall, P. and D.C. Ward, *Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA*. Nature, 1976. 263(5573): p. 106-9.
40. Doermann, A.H., *T4 and the rolling circle model of replication*. Annu Rev Genet, 1973. 7: p. 325-41.
41. Cziepluch, C., S. Lampel, A. Grewenig, C. Grund, P. Lichter, and J. Rommelaere, *H-1 parvovirus-associated replication bodies: a distinct virus-induced nuclear structure*. J Virol, 2000. 74(10): p. 4807-15.
42. Bashir, T., J. Rommelaere, and C. Cziepluch, *In vivo accumulation of cyclin A and cellular replication factors in autonomous parvovirus minute virus of mice-associated replication bodies*. J Virol, 2001. 75(9): p. 4394-8.
43. Qiu, J.Y., Y.; Tullis, G.; Pintel DJ., *Parvovirus RNA processing strategies*, in *Parvoviruses*, C.S.F. Kerr J.R., Bloom M.E., Linden R.M., Parrish C.R., Editor. 2006, Hodder Arnold: London. p. 253-273.
44. Rhode, S.L., 3rd and P.R. Paradiso, *Parvovirus genome: nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation*. J Virol, 1983. 45(1): p. 173-84.
45. Rhode, S.L., 3rd, *Trans-activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein*. J Virol, 1985. 55(3): p. 886-9.
46. Riobobos, L., N. Valle, E. Hernando, B. Maroto, M. Kann, and J.M. Almendral, *Viral Oncolysis Targeting Raf-1 Signalling Control on Nuclear Transport*. J Virol, 2009. [In Press].
47. Riobobos, L., J. Reguera, M.G. Mateu, and J.M. Almendral, *Nuclear transport of trimeric assembly intermediates exerts a morphogenetic control on the icosahedral parvovirus capsid*. J Mol Biol, 2006. 357(3): p. 1026-38.

48. Engelsma, D., N. Valle, A. Fish, N. Salome, J.M. Almendral, and M. Fornerod, *A supraphysiological nuclear export signal is required for parvovirus nuclear export*. Mol Biol Cell, 2008. 19(6): p. 2544-52.
49. Eichwald, V., L. Daeffler, M. Klein, J. Rommelaere, and N. Salome, *The NS2 proteins of parvovirus minute virus of mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells*. J Virol, 2002. 76(20): p. 10307-19.
50. Bodendorf, U., C. Cziepluch, J.C. Jauniaux, J. Rommelaere, and N. Salome, *Nuclear export factor CRM1 interacts with nonstructural proteins NS2 from parvovirus minute virus of mice*. J Virol, 1999. 73(9): p. 7769-79.
51. Bär, S., L. Daeffler, J. Rommelaere, and J.P. Nuesch, *Vesicular egress of non-enveloped lytic parvoviruses depends on gelsolin functioning*. PLoS Pathog, 2008. 4(8): p. e1000126.
52. Nuesch, J.P., S. Bar, S. Lachmann, and J. Rommelaere, *Ezrin-Radixin-Moesin Family Proteins are Involved in Parvovirus Replication and Spreading*. J Virol, 2009.
53. Salome, N., B. van Hille, M. Geuskens, and J. Rommelaere, *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, 1989. 63(11): p. 4797-807.
54. Silacci, P., L. Mazzolai, C. Gauci, N. Stergiopoulos, H.L. Yin, and D. Hayoz, *Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions*. Cell Mol Life Sci, 2004. 61(19-20): p. 2614-23.
55. Nuesch, J.P., S. Lachmann, and J. Rommelaere, *Selective alterations of the host cell architecture upon infection with parvovirus minute virus of mice*. Virology, 2005. 331(1): p. 159-74.
56. Praefcke, G.J. and H.T. McMahon, *The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5(2): p. 133-47.
57. Stamnes, M., *Regulating the actin cytoskeleton during vesicular transport*. Curr Opin Cell Biol, 2002. 14(4): p. 428-33.
58. Maroto, B., J.C. Ramirez, and J.M. Almendral, *Phosphorylation status of the parvovirus minute virus of mice particle: mapping and biological relevance of the major phosphorylation sites*. J Virol, 2000. 74(23): p. 10892-902.
59. Toolan, H.W., G. Dalldore, M. Barclay, S. Chandra, and A.E. Moore, *An Unidentified, Filtrable Agent Isolated from Transplanted Human Tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1960. 46(9): p. 1256-8.
60. Siegl, G., *Biology and pathogenicity of autonomous parvoviruses.*, in *The Parvoviruses*, K. Bern, Editor. 1984, Plenum Press: New York. p. 297-362.
61. Toolan, H.W., *Lack of oncogenic effect of the H-viruses for hamsters*. Nature, 1967. 214(5092): p. 1036.
62. Rommelaere, J. and J.J. Cornelis, *Antineoplastic activity of parvoviruses*. J Virol Methods, 1991. 33(3): p. 233-51.
63. McKisic, M.D., F.X. Paturzo, and A.L. Smith, *Mouse parvovirus infection potentiates rejection of tumor allografts and modulates T cell effector functions*. Transplantation, 1996. 61(2): p. 292-9.

64. McKisic, M.D., J.D. Macy, Jr., M.L. Delano, R.O. Jacoby, F.X. Paturzo, and A.L. Smith, *Mouse parvovirus infection potentiates allogeneic skin graft rejection and induces syngeneic graft rejection*. *Transplantation*, 1998. 65(11): p. 1436-46.
65. McKisic, M.D., D.W. Lancki, G. Otto, P. Padrid, S. Snook, D.C. Cronin, 2nd, P.D. Lohmar, T. Wong, and F.W. Fitch, *Identification and propagation of a putative immunosuppressive orphan parvovirus in cloned T cells*. *J Immunol*, 1993. 150(2): p. 419-28.
66. Ball-Goodrich, L.J., S.E. Leland, E.A. Johnson, F.X. Paturzo, and R.O. Jacoby, *Rat parvovirus type 1: the prototype for a new rodent parvovirus serogroup*. *J Virol*, 1998. 72(4): p. 3289-99.
67. Haag, A., P. Menten, J. Van Damme, C. Dinsart, J. Rommelaere, and J.J. Cornelis, *Highly efficient transduction and expression of cytokine genes in human tumor cells by means of autonomous parvovirus vectors; generation of antitumor responses in recipient mice*. *Hum Gene Ther*, 2000. 11(4): p. 597-609.
68. Giese, N.A., Z. Raykov, L. DeMartino, A. Vecchi, S. Sozzani, C. Dinsart, J.J. Cornelis, and J. Rommelaere, *Suppression of metastatic hemangiosarcoma by a parvovirus MVMP vector transducing the IP-10 chemokine into immunocompetent mice*. *Cancer Gene Ther*, 2002. 9(5): p. 432-42.
69. Lang, S.I. *Rekombinante Parvoviren in der Gentherapie von Krebs: Vektorcharacterisierung und Analyse der Wirksamkeit*. in *Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät*. 2003. Heidelberg: Ruprecht-Karls Universität.
70. Faisst, S., D. Guittard, A. Benner, J.Y. Cesbron, J.R. Schlehofer, J. Rommelaere, and T. Dupressoir, *Dose-dependent regression of HeLa cell-derived tumours in SCID mice after parvovirus H-1 infection*. *Int J Cancer*, 1998. 75(4): p. 584-9.
71. Giese, N., De Martino, L., Haag, A., Dinsart, C., Cornelis, J.J., Rommelaere, J., *Autonomous parvovirus-based vectors: potential for the gene therapy of cancer.*, in *Targeting of Drugs: Strategies for Gene Constructs and Delivery*, B.M. G. Gregoriadis, Editor. 2000, IOS Press: Amsterdam. p. 34-52.
72. Raykov, Z., G. Balboni, M. Aprahamian, and J. Rommelaere, *Carrier cell-mediated delivery of oncolytic parvoviruses for targeting metastases*. *Int J Cancer*, 2004. 109(5): p. 742-9.
73. Angelova, A.L., et al., *Improvement of Gemcitabine-Based Therapy of Pancreatic Carcinoma by Means of Oncolytic Parvovirus H-1PV*. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(2): p. 511-9.
74. Di Piazza, M., C. Mader, K. Geletneky, Y.C.M. Herrero, E. Weber, J. Schlehofer, L. Deleu, and J. Rommelaere, *Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells*. *J Virol*, 2007. 81(8): p. 4186-98.
75. Cornelis, J., *Parvovirus oncosuppression*, in *Parvoviruses*, C.S.F. Kerr J.R., Bloom M.E., Linden R.M., Parrish C.R., Editor. 2006, Hodder Arnold: London. p. 365-378.
76. Dupressoir, T., J.M. Vanacker, J.J. Cornelis, N. Duponchel, and J. Rommelaere, *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*, 1989. 49(12): p. 3203-8.
77. Lang, S.I., N.A. Giese, J. Rommelaere, C. Dinsart, and J.J. Cornelis, *Humoral immune responses against minute virus of mice vectors*. *J Gene Med*, 2006. 8(9): p. 1141-50.
78. Mousset, S. and J. Rommelaere, *Minute virus of mice inhibits cell transformation by simian virus 40*. *Nature*, 1982. 300(5892): p. 537-9.

79. Deleu, L., F. Fuks, D. Spitkovsky, R. Horlein, S. Faisst, and J. Rommelaere, *Opposite transcriptional effects of cyclic AMP-responsive elements in confluent or p27KIP-overexpressing cells versus serum-starved or growing cells*. *Mol Cell Biol*, 1998. 18(1): p. 409-19.
80. Perros, M., L. Deleu, J.M. Vanacker, Z. Kherrouche, N. Spruyt, S. Faisst, and J. Rommelaere, *Upstream CREs participate in the basal activity of minute virus of mice promoter P4 and in its stimulation in ras-transformed cells*. *J Virol*, 1995. 69(9): p. 5506-15.
81. Fuks, F., L. Deleu, C. Dinsart, J. Rommelaere, and S. Faisst, *ras oncogene-dependent activation of the P4 promoter of minute virus of mice through a proximal P4 element interacting with the Ets family of transcription factors*. *J Virol*, 1996. 70(3): p. 1331-9.
82. Spegelaere, P., B. van Hille, N. Spruyt, S. Faisst, J.J. Cornelis, and J. Rommelaere, *Initiation of transcription from the minute virus of mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a c-Ha-ras oncogene*. *J Virol*, 1991. 65(9): p. 4919-28.
83. Plaza, S., A. Boullard, D. Pele, J.J. Cornelis, J. Rommelaere, P.U. Giacomoni, and M. Prunieras, *Unscheduled DNA synthesis: a quantitative indicator of residual immunodetectable pyrimidine dimers in human fibroblasts after ultraviolet-B irradiation*. *Photochem Photobiol*, 1991. 53(2): p. 217-27.
84. Gu, Z., S. Plaza, M. Perros, C. Cziepluch, J. Rommelaere, and J.J. Cornelis, *NF-Y controls transcription of the minute virus of mice P4 promoter through interaction with an unusual binding site*. *J Virol*, 1995. 69(1): p. 239-46.
85. Gu, Z., G. Kuntz-Simon, J. Rommelaere, and J. Cornelis, *Oncogenic transformation-dependent expression of a transcription factor NF-Y subunit*. *Mol Carcinog*, 1999. 24(4): p. 294-9.
86. Ahn, J.K., B.J. Gavin, G. Kumar, and D.C. Ward, *Transcriptional analysis of minute virus of mice P4 promoter mutants*. *J Virol*, 1989. 63(12): p. 5425-39.
87. Faisst, S., M. Perros, L. Deleu, N. Spruyt, and J. Rommelaere, *Mapping of upstream regulatory elements in the P4 promoter of parvovirus minute virus of mice*. *Virology*, 1994. 202(1): p. 466-70.
88. Dempe, S., A.Y. Stroh-Dege, E. Schwarz, J. Rommelaere, and C. Dinsart, *SMAD4: A predictive marker of PDAC cell permissiveness for oncolytic infection with parvovirus H-1PV*. *Int J Cancer*, 2009.
89. Wrzesinski, C., L. Tesfay, N. Salome, J.C. Jauniaux, J. Rommelaere, J. Cornelis, and C. Dinsart, *Chimeric and pseudotyped parvoviruses minimize the contamination of recombinant stocks with replication-competent viruses and identify a DNA sequence that restricts parvovirus H-1 in mouse cells*. *J Virol*, 2003. 77(6): p. 3851-8.
90. Previsani, N., S. Fontana, B. Hirt, and P. Beard, *Growth of the parvovirus minute virus of mice MVMp3 in EL4 lymphocytes is restricted after cell entry and before viral DNA amplification: cell-specific differences in virus uncoating in vitro*. *J Virol*, 1997. 71(10): p. 7769-80.
91. Salome, N., B. van Hille, N. Duponchel, G. Meneguzzi, F. Cuzin, J. Rommelaere, and J.J. Cornelis, *Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMp is restricted to specific oncogenes*. *Oncogene*, 1990. 5(1): p. 123-30.
92. Van Hille, B., N. Duponchel, N. Salome, N. Spruyt, S.F. Cotmore, P. Tattersall, J.J. Cornelis, and J. Rommelaere, *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*, 1989. 171(1): p. 89-97.

93. Tattersall, P. and J. Bratton, *Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice*. J Virol, 1983. 46(3): p. 944-55.
94. Malerba, M., D. Nikolova, J. Cornelis, and R. Iggo, *Targeting of autonomous parvoviruses to colon cancer by insertion of Tcf sites in the P4 promoter*. Cancer Gene Ther, 2006. 13(3): p. 273-80.
95. Malerba, M., L. Daeffler, J. Rommelaere, and R.D. Iggo, *Replicating parvoviruses that target colon cancer cells*. J Virol, 2003. 77(12): p. 6683-91.
96. Telerman, A., M. Tuynder, T. Dupressoir, B. Robaye, F. Sigaux, E. Shaulian, M. Oren, J. Rommelaere, and R. Amson, *A model for tumor suppression using H-1 parvovirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(18): p. 8702-6.
97. Moehler, M., B. Blechacz, N. Weiskopf, M. Zeidler, W. Stremmel, J. Rommelaere, P.R. Galle, and J.J. Cornelis, *Effective infection, apoptotic cell killing and gene transfer of human hepatoma cells but not primary hepatocytes by parvovirus H1 and derived vectors*. Cancer Gene Ther, 2001. 8(3): p. 158-67.
98. Legrand, C., S. Mousset, N. Salome, and J. Rommelaere, *Cooperation of oncogenes in cell transformation and sensitization to killing by the parvovirus minute virus of mice*. J Gen Virol, 1992. 73 (Pt 8): p. 2003-9.
99. Cornelis, J., *Parvovirus oncosuppression*, in *Parvoviruses*, J.R. Kerr, Cotmore S.F., Bloom M.E., Linden R.M., Parrish C.R., Editor. 2006, Hodder Arnold: London. p. 365-78.
100. Tuynder, M., L. Susini, S. Prieur, S. Besse, G. Fiucci, R. Amson, and A. Telerman, *Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(23): p. 14976-81.
101. Sieben, M., K. Herzer, M. Zeidler, V. Heinrichs, B. Leuchs, M. Schuler, J.J. Cornelis, P.R. Galle, J. Rommelaere, and M. Moehler, *Killing of p53-deficient hepatoma cells by parvovirus H-1 and chemotherapeutics requires promyelocytic leukemia protein*. World J Gastroenterol, 2008. 14(24): p. 3819-28.
102. Muharram, G., et al., *Parvovirus H-1 induces cytopathic effects in breast carcinoma-derived cultures*. Breast Cancer Res Treat, 2009. (In press).
103. Van Pachterbeke, C., M. Tuynder, A. Brandenburger, G. Leclercq, M. Borrás, and J. Rommelaere, *Varying sensitivity of human mammary carcinoma cells to the toxic effect of parvovirus H-1*. Eur J Cancer, 1997. 33(10): p. 1648-53.
104. Vanacker, J.M., V. Laudet, G. Adelmant, D. Stehelin, and J. Rommelaere, *Interconnection between thyroid hormone signalling pathways and parvovirus cytotoxic functions*. J Virol, 1993. 67(12): p. 7668-72.
105. Naeger, L.K., J. Cater, and D.J. Pintel, *The small nonstructural protein (NS2) of the parvovirus minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner*. J Virol, 1990. 64(12): p. 6166-75.
106. Li, X. and S.L. Rhode, 3rd, *Nonstructural protein NS2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cells in vivo and in vitro*. Virology, 1991. 184(1): p. 117-30.
107. Miller, C.L. and D.J. Pintel, *Interaction between parvovirus NS2 protein and nuclear export factor Crm1 is important for viral egress from the nucleus of murine cells*. J Virol, 2002. 76(7): p. 3257-66.

108. Brockhaus, K., S. Plaza, D.J. Pintel, J. Rommelaere, and N. Salome, *Nonstructural proteins NS2 of minute virus of mice associate in vivo with 14-3-3 protein family members*. J Virol, 1996. 70(11): p. 7527-34.
109. Brandenburger, A., D. Legendre, B. Avalosse, and J. Rommelaere, *NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp*. Virology, 1990. 174(2): p. 576-84.
110. Legrand, C., J. Rommelaere, and P. Caillet-Fauquet, *MVM(p) NS-2 protein expression is required with NS-1 for maximal cytotoxicity in human transformed cells*. Virology, 1993. 195(1): p. 149-55.
111. Nüesch, J.P.F., *Regulation of non-structural protein functions by differential synthesis, modification and trafficking.*, in *Parvoviruses*, C.S.F. Kerr J.R., Bloom M.E., Linden R.M., Parrish C.R., Editor. 2006, Hodder Arnold: London. p. 275-89.
112. Wilson, G.M., H.K. Jindal, D.E. Yeung, W. Chen, and C.R. Astell, *Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities*. Virology, 1991. 185(1): p. 90-8.
113. Pujol, A., L. Deleu, J.P. Nuesch, C. Cziepluch, J.C. Jauniaux, and J. Rommelaere, *Inhibition of parvovirus minute virus of mice replication by a peptide involved in the oligomerization of nonstructural protein NS1*. J Virol, 1997. 71(10): p. 7393-403.
114. Christensen, J., S.F. Cotmore, and P. Tattersall, *A novel cellular site-specific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication*. J Virol, 1997. 71(2): p. 1405-16.
115. Christensen, J., S.F. Cotmore, and P. Tattersall, *Parvovirus initiation factor PIF: a novel human DNA-binding factor which coordinately recognizes two ACGT motifs*. J Virol, 1997. 71(8): p. 5733-41.
116. Cotmore, S.F., J. Christensen, J.P. Nuesch, and P. Tattersall, *The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]2-3*. J Virol, 1995. 69(3): p. 1652-60.
117. Christensen, J., S.F. Cotmore, and P. Tattersall, *Minute virus of mice initiator protein NS1 and a host KDWK family transcription factor must form a precise ternary complex with origin DNA for nicking to occur*. J Virol, 2001. 75(15): p. 7009-17.
118. Nuesch, J.P., S.F. Cotmore, and P. Tattersall, *Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine*. Virology, 1995. 209(1): p. 122-35.
119. Cotmore, S.F., R.L. Gottlieb, and P. Tattersall, *Replication initiator protein NS1 of the parvovirus minute virus of mice binds to modular divergent sites distributed throughout duplex viral DNA*. J Virol, 2007. 81(23): p. 13015-27.
120. Christensen, J. and P. Tattersall, *Parvovirus initiator protein NS1 and RPA coordinate replication fork progression in a reconstituted DNA replication system*. J Virol, 2002. 76(13): p. 6518-31.
121. Bodnar, J.W., *Sequence organization in regulatory regions of DNA of minute virus of mice*. Virus Genes, 1989. 2(2): p. 167-82.
122. Krady, J.K. and D.C. Ward, *Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1*. Mol Cell Biol, 1995. 15(1): p. 524-33.

123. Lorson, C., J. Pearson, L. Burger, and D.J. Pintel, *An Sp1-binding site and TATA element are sufficient to support full transactivation by proximally bound NS1 protein of minute virus of mice*. *Virology*, 1998. 240(2): p. 326-37.
124. Gavin, B.J. and D.C. Ward, *Positive and negative regulation of the minute virus of mice P38 promoter*. *J Virol*, 1990. 64(5): p. 2057-63.
125. Legendre, D. and J. Rommelaere, *Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition*. *J Virol*, 1992. 66(10): p. 5705-13.
126. Christensen, J., S.F. Cotmore, and P. Tattersall, *Minute virus of mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner*. *J Virol*, 1995. 69(9): p. 5422-30.
127. Lorson, C., L.R. Burger, M. Mouw, and D.J. Pintel, *Efficient transactivation of the minute virus of mice P38 promoter requires upstream binding of NS1*. *J Virol*, 1996. 70(2): p. 834-42.
128. Rhode, S.L., 3rd and S.M. Richard, *Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter*. *J Virol*, 1987. 61(9): p. 2807-15.
129. Faisst, S.R., S. Faisst, C. Grangette, J.R. Schlehofer, and J. Rommelaere, *NF kappa B upstream regulatory sequences of the HIV-1 LTR are involved in the inhibition of HIV-1 promoter activity by the NS proteins of autonomous parvoviruses H-1 and MVMp*. *Virology*, 1993. 197(2): p. 770-3.
130. Caillet-Fauquet, P., M. Perros, A. Brandenburger, P. Spegelaere, and J. Rommelaere, *Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins*. *EMBO J*, 1990. 9(9): p. 2989-95.
131. Mousset, S., Y. Ouadrhiri, P. Caillet-Fauquet, and J. Rommelaere, *The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice nonstructural proteins in FR3T3 rat cells depends on oncogene expression*. *J Virol*, 1994. 68(10): p. 6446-53.
132. Faust, E.A., G. Gloor, M.F. MacIntyre, and R. Nagy, *ATP(GTP)-dependent conversion of MVM parvovirus single-stranded DNA to its replicative form by a purified 10 S species of mouse DNA polymerase alpha*. *Biochim Biophys Acta*, 1984. 781(3): p. 216-24.
133. Jindal, H.K., C.B. Yong, G.M. Wilson, P. Tam, and C.R. Astell, *Mutations in the NTP-binding motif of minute virus of mice (MVM) NS-1 protein uncouple ATPase and DNA helicase functions*. *J Biol Chem*, 1994. 269(5): p. 3283-9.
134. Cotmore, S.F. and P. Tattersall, *The NS-1 polypeptide of the autonomous parvovirus MVM is a nuclear phosphoprotein*. *Virus Res*, 1986. 4(3): p. 243-50.
135. Prado, A., I. Ramos, L.J. Frehlick, A. Muga, and J. Ausio, *Nucleoplasmin: a nuclear chaperone*. *Biochem Cell Biol*, 2004. 82(4): p. 437-45.
136. Nüesch, J.P. and P. Tattersall, *Nuclear targeting of the parvoviral replicator molecule NS1: evidence for self-association prior to nuclear transport*. *Virology*, 1993. 196(2): p. 637-51.
137. Anouja, F., R. Wattiez, S. Mousset, and P. Caillet-Fauquet, *The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins*. *J Virol*, 1997. 71(6): p. 4671-8.
138. Nuesch, J.P., S. Dettwiler, R. Corbau, and J. Rommelaere, *Replicative functions of minute virus of mice NS1 protein are regulated in vitro by phosphorylation through protein kinase C*. *J Virol*, 1998. 72(12): p. 9966-77.

139. Nuesch, J.P., R. Corbau, P. Tattersall, and J. Rommelaere, *Biochemical activities of minute virus of mice nonstructural protein NS1 are modulated In vitro by the phosphorylation state of the polypeptide*. J Virol, 1998. 72(10): p. 8002-12.
140. Corbau, R., V. Duverger, J. Rommelaere, and J.P. Nuesch, *Regulation of MVM NS1 by protein kinase C: impact of mutagenesis at consensus phosphorylation sites on replicative functions and cytopathic effects*. Virology, 2000. 278(1): p. 151-67.
141. Dettwiler, S., J. Rommelaere, and J.P. Nuesch, *DNA unwinding functions of minute virus of mice NS1 protein are modulated specifically by the lambda isoform of protein kinase C*. J Virol, 1999. 73(9): p. 7410-20.
142. Nuesch, J.P., J. Christensen, and J. Rommelaere, *Initiation of minute virus of mice DNA replication is regulated at the level of origin unwinding by atypical protein kinase C phosphorylation of NS1*. J Virol, 2001. 75(13): p. 5730-9.
143. Nuesch, J.P., S. Lachmann, R. Corbau, and J. Rommelaere, *Regulation of minute virus of mice NS1 replicative functions by atypical PKClambda in vivo*. J Virol, 2003. 77(1): p. 433-42.
144. Lachmann, S., J. Rommeleare, and J.P. Nuesch, *Novel PKCeta is required to activate replicative functions of the major nonstructural protein NS1 of minute virus of mice*. J Virol, 2003. 77(14): p. 8048-60.
145. Corbau, R., N. Salomé, J. Rommelaere, and J.P. Nuesch, *Phosphorylation of the viral nonstructural protein NS1 during MVMP infection of A9 cells*. Virology, 1999. 259(2): p. 402-15.
146. Nuesch, J.P., S. Bar, and J. Rommelaere, *Viral proteins killing tumor cells: new weapons in the fight against cancer*. Cancer Biol Ther, 2008. 7(9): p. 1374-6.
147. Daeffler, L., R. Horlein, J. Rommelaere, and J.P. Nuesch, *Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region*. J Virol, 2003. 77(23): p. 12466-78.
148. Nuesch, J.P. and J. Rommelaere, *A viral adaptor protein modulating casein kinase II activity induces cytopathic effects in permissive cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(30): p. 12482-7.
149. Op De Beeck, A., F. Anouja, S. Mousset, J. Rommelaere, and P. Caillet-Fauquet, *The nonstructural proteins of the autonomous parvovirus minute virus of mice interfere with the cell cycle, inducing accumulation in G2*. Cell Growth Differ, 1995. 6(7): p. 781-7.
150. Ohshima, T., M. Iwama, Y. Ueno, F. Sugiyama, T. Nakajima, A. Fukamizu, and K. Yagami, *Induction of apoptosis in vitro and in vivo by H-1 parvovirus infection*. J Gen Virol, 1998. 79 (Pt 12): p. 3067-71.
151. Rayet, B., J.A. Lopez-Guerrero, J. Rommelaere, and C. Dinsart, *Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway*. J Virol, 1998. 72(11): p. 8893-903.
152. Ran, Z., B. Rayet, J. Rommelaere, and S. Faisst, *Parvovirus H-1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis*. Virus Res, 1999. 65(2): p. 161-74.
153. Nuesch, J.P. and J. Rommelaere, *NS1 interaction with CKII alpha: novel protein complex mediating parvovirus-induced cytotoxicity*. J Virol, 2006. 80(10): p. 4729-39.
154. Lachmann, S., S. Bar, J. Rommelaere, and J.P. Nuesch, *Parvovirus interference with intracellular signalling: mechanism of PKCeta activation in MVM-infected A9 fibroblasts*. Cell Microbiol, 2008. 10(3): p. 755-69.

155. Tsukita, S. and S. Yonemura, *Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins*. J Biol Chem, 1999. 274(49): p. 34507-10.
156. Op De Beeck, A. and P. Caillet-Fauquet, *The NS1 protein of the autonomous parvovirus minute virus of mice blocks cellular DNA replication: a consequence of lesions to the chromatin?* J Virol, 1997. 71(7): p. 5323-9.
157. Op De Beeck, A., J. Sobczak-Thepot, H. Sirma, F. Bourgain, C. Brechot, and P. Caillet-Fauquet, *NS1- and minute virus of mice-induced cell cycle arrest: involvement of p53 and p21(cip1)*. J Virol, 2001. 75(22): p. 11071-8.
158. Meek, D.W., *Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response?* Nat Rev Cancer, 2009. 9(10): p. 714-23.
159. Galluzzi, L., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes*. Cell Death Differ, 2009. 16(8): p. 1093-107.
160. Schlehofer, J.R., M. Rentrop, and D.N. Mannel, *Parvoviruses are inefficient in inducing interferon-beta, tumor necrosis factor-alpha, or interleukin-6 in mammalian cells*. Med Microbiol Immunol, 1992. 181(3): p. 153-64.
161. Leist, M., B. Single, A.F. Castoldi, S. Kuhnle, and P. Nicotera, *Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis*. J Exp Med, 1997. 185(8): p. 1481-6.
162. Huschtscha, L.I. and R. Holliday, *Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts*. J Cell Sci, 1983. 63: p. 77-99.
163. Serafini, T., S.A. Colamarino, E.D. Leonardo, H. Wang, R. Beddington, W.C. Skarnes, and M. Tessier-Lavigne, *Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system*. Cell, 1996. 87(6): p. 1001-14.
164. Hong, K., L. Hinck, M. Nishiyama, M.M. Poo, M. Tessier-Lavigne, and E. Stein, *A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion*. Cell, 1999. 97(7): p. 927-41.
165. Llambi, F., F. Causeret, E. Bloch-Gallego, and P. Mehlen, *Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC*. EMBO J, 2001. 20(11): p. 2715-22.
166. Mehlen, P., S. Rabizadeh, S.J. Snipas, N. Assa-Munt, G.S. Salvesen, and D.E. Bredesen, *The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis*. Nature, 1998. 395(6704): p. 801-4.
167. Mehlen, P. and C. Thibert, *Dependence receptors: between life and death*. Cell Mol Life Sci, 2004. 61(15): p. 1854-66.
168. Fearon, E.R., et al., *Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers*. Science, 1990. 247(4938): p. 49-56.
169. Fitamant, J., C. Guenebeaud, M.M. Coissieux, C. Guix, I. Treilleux, J.Y. Scoazec, T. Bachelot, A. Bernet, and P. Mehlen, *Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(12): p. 4850-5.
170. Llambi, F., F.C. Lourenco, D. Gozuacik, C. Guix, L. Pays, G. Del Rio, A. Kimchi, and P. Mehlen, *The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase*. EMBO J, 2005. 24(6): p. 1192-201.
171. Bialik, S. and A. Kimchi, *The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond*. Annu Rev Biochem, 2006. 75: p. 189-210.

172. Forcet, C., X. Ye, L. Granger, V. Corset, H. Shin, D.E. Bredesen, and P. Mehlen, *The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(6): p. 3416-21.
173. Mille, F., F. Llambi, C. Guix, C. Delloye-Bourgeois, C. Guenebeaud, S. Castro-Obregon, D.E. Bredesen, C. Thibert, and P. Mehlen, *Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death*. Cell Death Differ, 2009. 16(10): p. 1344-51.
174. Nüesch, J.P., S.F. Cotmore, and P. Tattersall, *Expression of functional parvoviral NS1 from recombinant vaccinia virus: effects of mutations in the nucleotide-binding motif*. Virology, 1992. 191(1): p. 406-16.
175. Becquart, P., J.M. Vanacker, N. Duponchel, A. Begue, and J. Rommelaere, *Expression of the non-structural proteins of parvovirus MVMp from recombinant retroviruses: predominant role of the parvoviral NS-1 product in host cell disturbance*. Res Virol, 1993. 144(6): p. 465-70.
176. Li, X. and S.L. Rhode, 3rd, *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, 1990. 64(10): p. 4654-60.
177. Miller, C.L. and D.J. Pintel, *The NS2 protein generated by the parvovirus minute virus of mice is degraded by the proteasome in a manner independent of ubiquitin chain elongation or activation*. Virology, 2001. 285(2): p. 346-55.
178. Reyland, M.E., *Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death*. Front Biosci, 2009. 14: p. 2386-99.
179. Ali, A.S., S. Ali, B.F. El-Rayes, P.A. Philip, and F.H. Sarkar, *Exploitation of protein kinase C: a useful target for cancer therapy*. Cancer Treat Rev, 2009. 35(1): p. 1-8.
180. Podar, K., M.S. Raab, D. Chauhan, and K.C. Anderson, *The therapeutic role of targeting protein kinase C in solid and hematologic malignancies*. Expert Opin Investig Drugs, 2007. 16(10): p. 1693-707.
181. Hellbert, K., S. Kampfer, K. Maly, F. Hochholdinger, J. Mwanjewe, G. Baier, F. Uberall, and H.H. Grunicke, *Implication of atypical protein kinase C isozymes lambda and zeta in Ras mediated reorganization of the actin cytoskeleton and cyclin D1-induction*. Adv Enzyme Regul, 2000. 40: p. 49-62.
182. Bhattacharya, B., G.L. Prasad, E.M. Valverius, D.S. Salomon, and H.L. Cooper, *Tropomyosins of human mammary epithelial cells: consistent defects of expression in mammary carcinoma cell lines*. Cancer Res, 1990. 50(7): p. 2105-12.
183. Vidal, M., *A unifying view of 21st century systems biology*. FEBS Lett, 2009. 583(24): p. 3891-4.
184. Cailleau, R., M. Olive, and Q.V. Cruciger, *Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization*. In Vitro, 1978. 14(11): p. 911-5.
185. Fogh, J., N. Dracopoli, J.D. Loveless, and H. Fogh, *Cultured human tumor cells for cancer research: assessment of variation and stability of cultural characteristics*. Prog Clin Biol Res, 1982. 89: p. 191-223.
186. Fogh, J., J.M. Fogh, and T. Orfeo, *One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice*. J Natl Cancer Inst, 1977. 59(1): p. 221-6.
187. Beckman, M., M. Kihlmark, K. Iverfeldt, and E. Hallberg, *Degradation of GFP-labelled POM121, a non-invasive sensor of nuclear apoptosis, precedes clustering of nuclear pores and externalisation of phosphatidylserine*. Apoptosis, 2004. 9(3): p. 363-8.

188. Xue, L.Y., S.M. Chiu, and N.L. Oleinick, *Staurosporine-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a distinction between caspase-3-dependent steps of apoptosis and the critical lethal lesions*. *Exp Cell Res*, 2003. 283(2): p. 135-45.
189. Wu, P., B. Qi, H. Zhu, Y. Zheng, F. Li, and J. Chen, *Suppression of staurosporine-mediated apoptosis in Hs578T breast cells through inhibition of neutral-sphingomyelinase by caveolin-1*. *Cancer Lett*, 2007. 256(1): p. 64-72.
190. McKeague, A.L., D.J. Wilson, and J. Nelson, *Staurosporine-induced apoptosis and hydrogen peroxide-induced necrosis in two human breast cell lines*. *Br J Cancer*, 2003. 88(1): p. 125-31.
191. Kurose, A., T. Tanaka, X. Huang, F. Traganos, W. Dai, and Z. Darzynkiewicz, *Effects of hydroxyurea and aphidicolin on phosphorylation of ataxia telangiectasia mutated on Ser 1981 and histone H2AX on Ser 139 in relation to cell cycle phase and induction of apoptosis*. *Cytometry A*, 2006. 69(4): p. 212-21.
192. Masuda, N., T. Nakayama, J. Yamamura, S. Kamigaki, T. Taguchi, M. Hatta, and J. Sakamoto, *Phase I study of combination therapy with weekly paclitaxel and cyclophosphamide for advanced or recurrent breast cancer*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009.
193. Kovar, J., M. Ehrlichova, B. Smejkalova, I. Zanardi, I. Ojima, and I. Gut, *Comparison of cell death-inducing effect of novel taxane SB-T-1216 and paclitaxel in breast cancer cells*. *Anticancer Res*, 2009. 29(8): p. 2951-60.
194. de Medina, P., S. Silvente-Poirot, and M. Poirot, *Tamoxifen and AEBS ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation*. *Autophagy*, 2009. 5(7): p. 1066-7.
195. Moriai, R., N. Tsuji, M. Moriai, D. Kobayashi, and N. Watanabe, *Survivin plays as a resistant factor against tamoxifen-induced apoptosis in human breast cancer cells*. *Breast Cancer Res Treat*, 2009. 117(2): p. 261-71.
196. Faisst, S., S.R. Faisst, T. Dupressoir, S. Plaza, A. Pujol, J.C. Jauniaux, S.L. Rhode, and J. Rommelaere, *Isolation of a fully infectious variant of parvovirus H-1 supplanting the standard strain in human cells*. *J Virol*, 1995. 69(7): p. 4538-43.
197. LaBarre, D.D. and R.J. Lowy, *Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID50 and plaque assays*. *J Virol Methods*, 2001. 96(2): p. 107-26.
198. Hanson, N.D. and Rhode S.L. III, *Parvovirus NS1 stimulates P4 expression by interaction with the terminal repeats and through DNA amplification*. *J Virol*, 1991. 65(8): p. 4325-4333.

A. 3. Abréviations

AAV	<i>Adeno Associated Viruses</i>	PIF	<i>Parvovirus Initiation Factor</i>
APAR	<i>Autonomous Parvovirus-Associated Replication bodies</i>	PKC	Protéine(s) kinase(s) C
ADN	acide désoxyribonucléique	PKCλ	Protéine kinase C λ
ARN	acide ribonucléique	PKCη	Protéine kinase C η
ATF/CREB	<i>Activating Transcription Factor / cAMP Response Element Binding</i>	PML	<i>promyelocytic leukemia protein</i>
bp	paire(s) de bases	PS	Phosphatidylsérine
BPV	<i>Bovine Parvovirus</i>	PVH-1	Parvovirus H-1
cdk	<i>Cyclin-dependent kinases</i>	q.s.p.	quantité suffisante pour
CKII	Caséine Kinase II	RPA	<i>Replication Protein A</i>
CKIIα	Sous-unité α de la Caséine Kinase II	RPV-1	<i>Rat Parvovirus 1</i>
CPV	<i>Canine Parvovirus</i>	RSV	<i>Rous Sarcoma Virus</i>
ERM	<i>Ezrin, Radixin, Moesin (family)</i>	Ser283	résidu de sérine en position 283 de la séquence en acides aminés de NS1
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Sérum bovin foetal)	Ser473	résidu de sérine en position 473 de la séquence en acides aminés de NS1
FPV	<i>Feline Parvovirus</i>	Ser588	résidu de sérine en position 588 de la séquence en acides aminés de NS1
GMEB	<i>Glucocorticoid-Modulating Element Binding</i>	SV40	<i>Simian Virus 40</i>
HBoV	<i>Human Bocavirus</i>	tar	<i>transactivation responsive element</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>	Tcf	<i>T-cell Factor</i>
kb	kilobases(s)	TfR	<i>Transferrin Receptor</i>
kDa	kiloDalton(s)	TGN	<i>trans Golgi network</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>	Thr363	résidu de thréonine en position 363 de la séquence en acides aminés de NS1
Lys405	résidu de lysine en position 405 de la séquence en acides aminés de NS1	Thr394	résidu de thréonine en position 394 de la séquence en acides aminés de NS1
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>	Thr403	résidu de thréonine en position 403 de la séquence en acides aminés de NS1
μm	micromètre(s)	Thr435	résidu de thréonine en position 435 de la séquence en acides aminés de NS1
MMTV	<i>Mouse Mammary Tumor Virus</i>	Thr585	résidu de thréonine en position 585 de la séquence en acides aminés de NS1
MPV-1	<i>Mouse Parvovirus 1</i>	TM2	isoforme 2 de la tropomyosine
MVM	<i>Minute Virus of Mice</i>	TM5	isoforme 5 de la tropomyosine
NAD	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>	TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>	USF	<i>Upstream transcription Factor</i>
NF-Y	<i>Nuclear Factor Y</i>	VP	<i>Viral Protein(s)</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>	VP1	<i>Viral Protein 1</i>
NLM	<i>Nuclear Localization Motif</i>	VP1up	<i>Viral Protein 1 unique part</i>
NPC	<i>Nuclear Pore Complex</i>	VP2	<i>Viral Protein 2</i>
nm	nanomètre(s)	v/v	volume à volume
NS	<i>Non-Structural protein(s)</i>	WASP	<i>Wiscott-Aldrich Syndrome Protein</i>
NS1	<i>Non-Structural protein 1</i>		
NS2	<i>Non-Structural protein 2</i>		
ntd	nucléotide(s)		
ORF	<i>Open Reading Frame(s)</i> (= Phase(s) ouverte(s) de lecture)		
PARP	<i>poly ADP-ribose polymerase</i>		
PDK-1	<i>Phosphoinositol Dependent Kinase-1</i>		