

Université de Montréal

Caractérisation d'Ahi-1, une nouvelle protéine impliquée
dans la signalisation du lymphocyte T

par

Walter Rocha

Département de Biologie Moléculaire
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M. Sc.)
en Biologie Moléculaire

Décembre 2000



©Walter Rocha

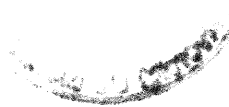
QH

506

U54

2001

V.022



Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation d'Ahi-1, un nouvelle protéine impliquée
dans la signalisation du lymphocyte T

Présenté par :

Walter Rocha

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Muriel Aubry, Présidente

Dr. Louise Larose, Membre externe

Dr. Paul Jolicoeur, Directeur de recherche

Mémoire accepté le:.....

SOMMAIRE

Le locus *Ahi-1* (Abelson Helper Integration Site 1) a été identifié comme étant un site d'intégration virale dans le lymphome d'Abelson (cellules pré-B) avec une incidence de 16%. De plus, les souris transgéniques MMTV^D/Myc infectées par le virus MoMuLV, développent des leucémies de type pré-T qui connaissent une intégration provirale dans 14% des cas. Notre laboratoire a identifié un nouveau gène, *Ahi-1* (à ce locus) et émet l'hypothèse que celui-ci pouvait être la cible de mutation insertionnelle, par intégration provirale. La protéine *Ahi-1*, présentant un poids moléculaire approximatif de 120 KDa, est modulaire et comporte notamment les domaines d'interaction protéique SH3 et WD, et des séquences de localisation nucléaire. Même si la surexpression d'*Ahi-1* est modérée dans les tumeurs présentant une intégration provirale au niveau du locus, les caractéristiques de cette protéine laissent à penser qu'elle aurait un rôle probable dans la signalisation cellulaire et de fait dans la tumorigénèse, cela de façon directe ou indirecte. L'ARN *Ahi-1* est exprimé dans le thymus et plus particulièrement dans le cortex de cet organe (où se localisent les cellules T immatures); aussi avons-nous investigué un rôle hypothétique d'*Ahi-1* dans la signalisation de la cellule T au niveau de thymocytes murins.

Dans ce projet, nous avons démontré qu'*Ahi-1* interagit avec des protéines phosphorylées sur tyrosine dans les thymocytes murins et de façon constitutive ou induite en stimulant la voie de signalisation du TCR. De plus, il a été mis en évidence qu'*Ahi-1* interagit avec une kinase spécifique des

résidus tyrosine et qu'elle même est phosphorylée par celle-ci sur les mêmes résidus. Enfin nous avons mis au point un modèle de souris transgéniques CD4C/AHI-1 qui expriment Ahi-1 dans le thymus au niveau des cellules double-positives CD4⁺CD8⁺ immatures et simple-positives CD4⁺ matures. Nous avons ainsi générées trois lignées de souris qui expriment Ahi-1 à des niveaux différents. Les souris transgéniques à date, n'ont pas développé de thymomes. Elles demeurent cependant un modèle d'étude d'Ahi-1 *in vivo* permettant d'élucider l'implication de celui-ci au niveau de la cellule T et de manière générale dans la fonction immunitaire normale et pathologique.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
SOMMAIRE.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XI
REMERCIEMENTS.....	XIII
EPIGRAPHE.....	XIV
I-INTRODUCTION.....	1
1 LES RÉTROVIRUS : GÉNÉRALITÉS.....	2
2 LES RÉTROVIRUS, DES MUTAGÈNES BIOLOGIQUES.....	3
2.1 Le cycle de réplication des rétrovirus.....	3
2.2 Les différents mécanismes de mutation par insertion.....	7
3 LES LEUCÉMIES INDUITES PAR LES VIRUS LEUKÉMOGÈNES MURINS.....	9
3.1 Évènements pré-leucémiques.....	9
3.1.1 Gp55 et phase précoce de la maladie de Friend.....	10
3.1.2 Production de virus MCF et phase précoce des leucémies induites par les MuLVs.....	11
3.2 Étapes tardives dans les leucémies induites par les MuLVs : les mutations par insertion.....	12
3.2.1 Les tumeurs des cellules T induites par les MuLVs.....	13
3.2.1.1 Les gènes <i>c-myc</i> et <i>N-myc</i>	13

3.2.1.2 Le gène <i>Pim-1</i>	14
3.2.1.3 Les autres sites d'insertion.....	14
3.2.2 Les tumeurs des cellules B induites par les MuLVs.....	15
3.2.2.1 Le Locus <i>Evi-3</i>	16
3.2.2.2 Le locus <i>Bmi-1</i>	16
3.2.2.3 Le locus <i>Bla-1</i>	17
3.2.2.4 Le locus <i>Pal-1</i>	17
3.2.2.5 Les loci <i>Dis-1</i> et <i>Dis-2</i>	18
4 MISE EN ÉVIDENCE D' <i>AHI-1</i> (Abelson Helper Integration-site 1).....	18
4.1 Introduction.....	18
4.2 Le locus <i>Ahi-1</i>	19
4.3 Le gène <i>Ahi-1</i>	20
4.4 La protéine Ahi-1.....	21
5 PROBLÉMATIQUE.....	24
5.1 Le thymus et ontogénie des cellules T.....	25
5.2 La signalisation via le TCR.....	26
5.3 Les objectifs.....	27
II-MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	28
1 CONSTRUCTION PLASMIDIQUE.....	29
1.1 pcDNA3 Ahi-1 3,55 Kb.....	29
1.2 pcDNA3 Ahi-1 ^{ΔWD}	29
1.3 pBabe puro Ahi-1 ^{ΔWD}	30

1.4	pEGFP-Ahi1.....	30
2	CULTURE CELLULAIRE.....	31
2.1	Les cellules 293T.....	31
2.2	Les cellules Jurkat.....	31
3	DESCRIPTION DES ANTICORPS.....	32
4	STIMULATION DES CELLULES.....	32
5	TRANSFECTION DES CELLULES.....	32
6	EXTRACTION DES PROTÉINES.....	33
7	ÉLECTROPHORÈSE ET TRANSFERT DES PROTÉINES.....	34
7.1	Électrophorèse des protéines.....	34
7.2	Électrotransfert des protéines sur membrane.....	34
7.3	Le buvardage de type Western.....	35
7.3.1	Immunoblot anti-Ahi.....	35
7.3.2	Immunoblot anti-phosphotyrosine.....	35
8	IMMUNOPRÉCIPITATION.....	36
9	TEST D'ACTIVITÉ KINASE.....	36
10	ANALYSE DES SITES DE PHOSPHORYLATIONS.....	37
11	CRIBLAGE DES SOURIS TRANSGÉNIQUES CD4C / AHI-1.....	38
11.1	Obtention de l'ADN génomique de souris.....	38
11.2	Digestion de l'ADN génomique et électrophorèse.....	39
11.3	Transfert sur membrane.....	39
11.4	Hybridation.....	40
11.5	Rinçages de la membrane et exposition.....	41

12 EXPRESSION DE L'ARN _m D'AH1-1 DANS LES SOURIS TRANSGÉNIQUES	
CD4C/AHI-1.....	41
12.1 Extraction de l'ARN.....	41
12.2 Électrophorèse de l'ARN, transfert sur membrane et hybridation.....	42
 III-RÉSULTATS.....	 43
1 PARTICIPATION D'AH1-1 A UN COMPLEXE COMPRENANT DES PROTEINES PHOSPHORYLEES SUR TYROSINE.....	44
2 PARTICIPATION D'AH1-1 A UN COMPLEXE PROTEIQUE ARBORRANT UNE ACTIVITE PROTEINE KINASE.....	48
3 AH1-1 EST UN DES SUBSTRATS DE LA KINASE PARTICIPANT AU COMPLEXE PROTEIQUE.....	51
4 AH1-1 FAIT PARTIE D'UN COMPLEXE PROTEIQUE PRESENTANT UNE ACTIVITE KINASE SPECIFIQUE DES RESIDUS TYROSINES.....	55
4.1 Les phosphorylations sont résistantes au traitement alcalin.....	55
4.2 La kinase est spécifique des résidus tyrosine.....	55
5 GÉNÉRATION DU MUTANT AH1 ^{ΔWD}	61
5.1 Construction du mutant Ahi-1 ^{ΔWD}	61
5.2 Expression du mutant Ahi-1 ^{ΔWD} dans les cellules 293T.....	61
6 LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE LA PROTÉINE AH1-1.....	67
7 LES SOURIS TRANSGÉNIQUES CD4C/AHI-1.....	71
7.1 Criblage des souris transgéniques CD4C/Ahi-1.....	71

7.2 Expression d'Ahi-1 des différentes lignées de souris transgéniques	
CD4C/Ahi-1.....	75
7.2.1 Expression de l'ARNm.....	75
7.2.2 Expression protéique.....	78
7.2.3 Analyse phénotypique des souris CD4C/Ahi-1.....	82
IV-DISCUSSION.....	84
1 AHI-1, UNE NOUVELLE MOLÉCULE DE SIGNALISATION.....	86
1.1 Les phosphorylations sur tyrosine.....	86
1.2 La kinase spécifique des résidus tyrosine.....	87
2 AHI-1 <i>IN VIVO</i>	90
2.1 <i>Ahi-1</i> , un nouvel oncogène.....	90
2.1.1 Influence de la souche de souris.....	90
2.1.2 Influence du promoteur.....	91
2.1.3 <i>Ahi-1</i> est-il suffisant pour induire un thymome.....	92
3 CONCLUSION.....	93
V-RÉFÉRENCES.....	95

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle de réplication des rétrovirus.....	4
Figure 2 : Structure de la protéine Ahi-1.....	22
Figure 3 : La protéine Ahi-1 immunoprécipite avec des protéines phosphorylées sur résidus tyrosine dans les thymocytes murins.....	45
Figure 4 : Participation d'Ahi-1 à un complexe présentant une activité kinase dans les thymocytes murins dans les thymocytes murins.....	49
Figure 5 : La protéine Ahi-1 est un substrat d'une (ou plusieurs) kinase(s) du complexe.....	53
Figure 6 : Étape initiale de l'identification des résidus phosphorylés par la kinase appartenant au complexe protéique contenant Ahi-1, dans les thymocytes murins	57
Figure 7 : Ahi-1 appartient à un complexe protéique présentant une activité kinase spécifique des résidus tyrosines	59
Figure 8 : Représentation schématique du mutant Ahi-1 ^{ΔWD}	61
Figure 9 : Détermination de la taille apparente du mutant Ahi-1 ^{ΔWD}	63
Figure 10 : Localisation d'Ahi-1 dans les cellules 293T par protéine de fusion GFP-Ahi-1.....	67
Figure 11 : Criblage des souris transgéniques CD4C/Ahi-1.....	70
Figure 12 : Expression de l'ARN dans différentes lignées de souris transgéniques CD4C/Ahi-1.....	73
Figure 13 : Expression de la protéine Ahi-1 dans les différentes lignées de souris transgéniques CD4C/Ahi-1.....	76

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

ALV: Avian Leukosis Virus

A-MuLV: Abelson murine leukemia virus

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ATP: adénosine triphosphate

BSA: Albumine sérique bovine

BLV: Bovine leukosis virus

Brij 96 ou **97:** polyoxyethylene 10 oleyl ether

CAT: Transporteur des acides aminés cationiques

CTP: cytosine triphosphate

DP: (cellule) double-positive

DEPC: diéthylpyrocarbonate

EpoR: Récepteur de l'érythropoïétine

EDTA: disodium ethylenediaminetetra-acetate dihydrate

FLV: Virus de la leucémie féline

F-MuLV: Friend murine leukemia virus

FV: Friend virus

g: gramme

GFP: Green fluorescent protein

gp: glycoprotéine

H: heure

HEPES: N-[2[Hydroxyethyl] piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid]]

HRP: peroxydase du raifort

HTLV: Human T-cell lymphotropic virus

Il-2,3,...: Interleukine-2, interleukine-3...

IP: Immunoprécipitation

Kb: kilobases

KDa: Kilodalton

L: litre

LTR: Long terminal repeats

M: molaire ou mole par litre

mA: milliAmpère

MCF: Mink-Cell focus forming

mg: milligramme

min: minute

mL: millilitre

mM: millimolaire

MOPS: 3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid

MMTV: Mouse Mammary Tumor Virus

M-MuLV: Moloney –murine leukemia virus

μ: micro

μg: microgramme

μL: microlitre

MuLV: Murine leukosis (ou leukemia) virus

nt: nucléotides

PBS: tampon phosphate salin

PCR: Réaction de Polymérisation en Chaîne

PIPES: piperazine-*N, N'*-bis [2-ethanesulfonic acid]

PVDF: polvynyl di fluoride

qsp: quantité suffisante pour

rpm: rotation par minute

SDS: dodécyl sulfate de sodium

sec: seconde

SP : (cellule) simple positive

SSC: salt sodium citrate

SFFV: Spleen-focus forming virus

TAE: tampon tris-acétate/EDTA

TBS: tampon tris salin

TE: tampon tris-EDTA

TCR: Récepteur des cellules T

V: volt

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Dr Paul Jolicœur qui m'a encadré durant ces deux années de maîtrise.

Je remercie Mathieu Arcand, étudiant en doctorat du laboratoire du Dr Sylvain Meloche, pour sa collaboration dans l'analyse des acides aminés phosphorylés d'Ahi-1.

Je remercie Benoit Laganière pour l'exécution des constructions pCDNA3-Ahi^{ΔWD} et pBabe puro Ahi^{ΔWD}.

Je voudrais aussi dire ma reconnaissance à l'ensemble du laboratoire: l'équipe technique (Ginette, Karina, Eléna, Evelyne, Paule, Yan, Patrick et Stéphane), Les stagiaires post-doctoraux (Fatiha et Pavel), les chercheurs (Johanne, Xiaodoan, Ping, Ezéquier, Mohammadi, Marc, Zaher et Denis) et Mme Rita Gingras, secrétaire, pour leur aide, leur soutien et leur amitié.

Je souhaiterais dire ma profonde sympathie à l'ensemble des étudiants (Isabelle, Marie-Chantale, Yaoping, Xu-jie, Mathieu, Patrick et François) qui ont donné non seulement une dimension professionnelle mais aussi une dimension humaine à l'exercice de la recherche. Qu'ils en soient tous remerciés.

Enfin, je ne voudrais pas oublier Mme Viviane Jodoin, secrétaire du département de Biologie Moléculaire, qui a souvent pris sur son temps pour m'aider à résoudre divers problèmes. Merci.

Le scientifique navigue entre deux pôles : le désirable et le possible. Sans possible, le désirable n'est que rêve. Sans désirable, le possible n'est qu'ennui. Il est souvent difficile de résister au rêve, mais l'expérimentation permet de contenir l'imagination. A chaque étape, le scientifique est obligé de s'exposer à la critique et à l'expérience pour limiter la part du rêve dans la représentation du monde qu'il élabore. La démarche scientifique consiste à confronter sans cesse ce qui pourrait être et ce qui est.

François Jacob, *La souris, la mouche et l'homme*. (1997) Ed. Odile Jacob.

I-INTRODUCTION

1 LES RÉTROVIRUS: GÉNÉRALITÉS

Les rétrovirus oncogéniques peuvent être la cause de cancer et ce, dans de nombreuses espèces incluant les félins, les oiseaux et les rongeurs. Ils sont généralement divisés en deux catégories qui présentent des caractéristiques pathogéniques distinctes.

Les rétrovirus à transformation rapide, induisent des tumeurs polyclonales deux à trois semaines post-inoculation chez l'hôte et sont de plus capables de transformer des cellules *in vitro*.

De manière différente, les rétrovirus à transformation lente provoquent l'apparition de tumeurs mono ou oligoclonales après une latence de plusieurs mois et sont habituellement incapables de transformer des cellules en culture (Bishop, 1987; Varmus, 1984). Ces différences flagrantes dans les propriétés pathogéniques de ces deux sortes de rétrovirus reflètent deux mécanismes moléculaires de la tumorigénèse rétrovirale. En effet, les rétrovirus à transformation rapide ont intégré dans leur génome un gène cellulaire de l'hôte. Celui-ci peut être entier ou tronqué. L'expression de ce gène ou oncogène viral est responsable de leur activité oncogénique.

Les rétrovirus à transformation lente arborent un génome dépourvu d'oncogène. Ils induisent donc des néoplasmes selon un autre mode, à savoir leur intégration sous forme d'ADN viral ou provirus dans le génome de la cellule hôte. De cette intégration peut résulter une mutation ou une activation transcriptionnelle du gène flanquant le site ciblé.

Si les mutations causées par l'intégration rétrovirale confèrent un avantage sélectif favorisant la croissance cellulaire, la cellule infectée va croître et se multiplier clonalement. En raison de cette relation causale entre l'insertion provirale et la tumorigénèse, le profil d'intégration virale dans les tumeurs induites par les rétrovirus à transformation lente apparaît clonal ou oligoclonal tandis que les tissus normaux infectés présentent une distribution randomisée des provirus dans leur ADN (Cohen et al., 1979; Steffen and Weinberg, 1978). En 1981, Hayward et al. démontrent que les rétrovirus à

transformation lente peuvent être utilisés non seulement comme des mutagènes par insertion mais aussi comme "balises moléculaires" (Hayward et al., 1981). Depuis, un bon nombre de gènes impliqués dans l'oncogénèse a été identifié en clonant les régions d'ADN jouxtant l'insertion provirale par les techniques conventionnelles (Goff, 1987) ou par amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Sorensen et al., 1993). Bien que les études initiales furent menées sur les leucémies aviaires induites par le virus de la leucémie aviaire ALV (Avian Leukosis Virus), cette approche a connu de nombreuses et fructueuses applications dans différents modèles de tumeurs murines. Une quantité impressionnante de sites d'insertion a été mise en évidence, d'une part pour les virus leukémogènes dans les maladies du système hématopoïétique, d'autre part pour le virus MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) dans les carcinomes mammaires.

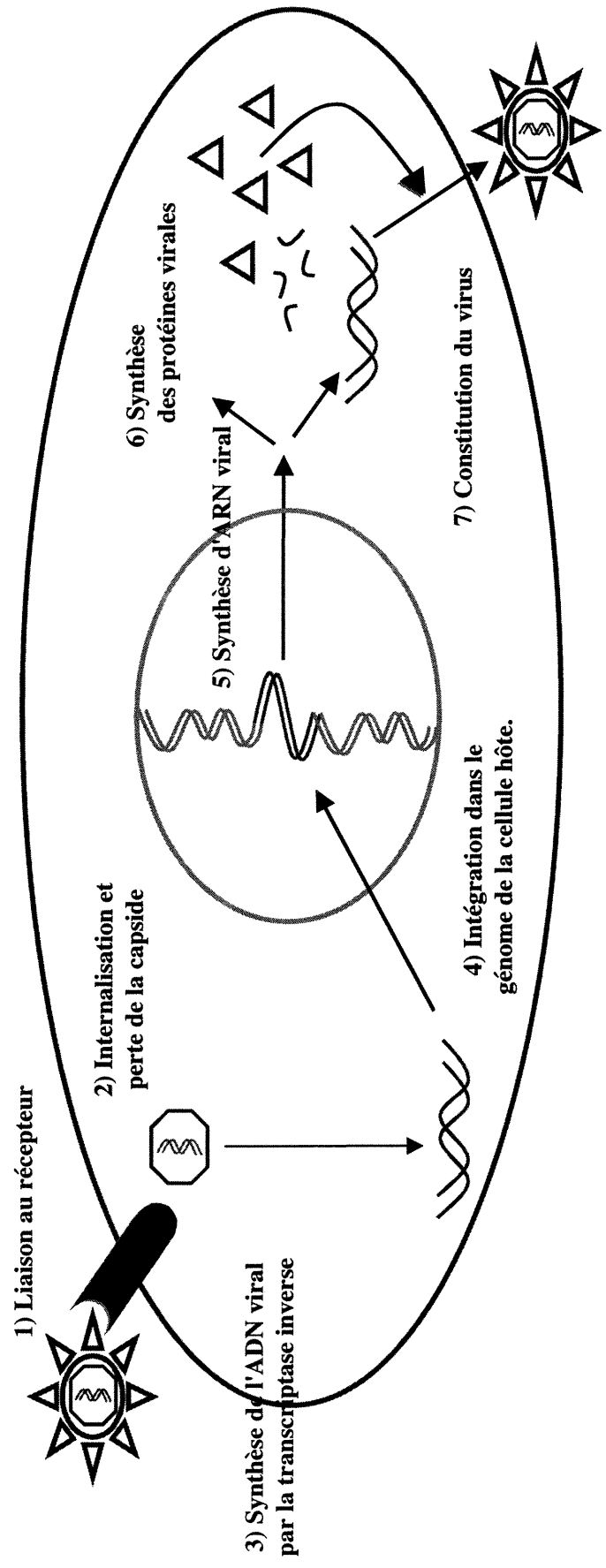
2 LES RÉTROVIRUS, DES MUTAGÈNES BIOLOGIQUES

2.1 Le cycle de réplication des rétrovirus

L'entité virale ou virion contient deux molécules d'ARN monocaténaire, de sens transcriptionnel positif et deux enzymes cruciales pour la réplication : la transcriptase inverse virale ou RT (Reverse Transcriptase) et l'intégrase virale ou IN. L'infection rétrovirale est initiée par l'interaction de la glycoprotéine de l'enveloppe virale avec un récepteur à la surface cellulaire (Cf. figure 1, section *I-Introduction*). Les récepteurs de plusieurs rétrovirus ont été identifiés (Weiss and Taylor, 1995).

En ce qui concerne le récepteur pour les virus murins leukémogènes écotropiques, un transporteur d'acides aminés cationiques ou CAT (Cationic Aminoacid Transporter) a été caractérisé (Kavanaugh et al., 1994). Fait intéressant, la liaison de la glycoprotéine d'enveloppe au récepteur CAT n'inhibe pas totalement la fonction du récepteur. Il reste à établir si la survie cellulaire post-infection est rendue possible grâce à l'occlusion partielle du

Figure 1 : Cycle de réplication des rétrovirus. Après interaction avec leur récepteur spécifique, les rétrovirus sont internalisés dans la cellule hôte. A ce stade, ils perdent leur capsid, libérant leur ARN génomique et l'enzyme indispensable à leur réplication : la transcriptase inverse. L'ARN viral est copié en ADN double brin qui subit une translocation au noyau et s'intègre dans l'ADN génomique de celle-ci. Enfin l'ADN viral est transcrit puis traduit dans le but de produire des virions infectieux.



récepteur ou grâce à l'existence d'une redondance fonctionnelle parmi le système de transporteur cellulaire. Après son entrée dans la cellule hôte l'ARN viral est copié en ADN linéaire double brins par la RT. L'ADN viral est légèrement plus long que l'ARN, et contient deux segments identiques aux extrémités 5' et 3' : les LTRs (Long Terminal Repeats). La prochaine étape dans l'infection passe par l'importation de l'ADN viral du cytoplasme au noyau et son intégration dans l'ADN génomique de la cellule hôte. Ce processus est dépendant de la division cellulaire qui engendre une dislocation de la membrane nucléaire durant la mitose. (Lewis and Emerman, 1994; Roe et al., 1993). Le phénomène d'intégration est catalysé par l'IN virale résultant en un rétrovirus intégré, appelé à ce stade provirus. Le provirus est retenu de manière stable dans le génome cellulaire comme un locus mendélien classique (Goff, 1992). Le processus d'intégration semble plus ou moins aléatoire dans le génome même si les régions transcriptionnellement actives de la chromatine semblent être préférées (Mooslehner et al., 1990; Scherdin et al., 1990).

Une fois le provirus intégré, celui-ci sert de matrice pour la production d'ARN messagers (ARNm) viraux et de protéines virales. Tous les rétrovirus contiennent au moins trois gènes, *gag* (codant pour les protéines de structure), *pol* (codant pour la RT et l'IN) et *env* (codant pour la glycoprotéine d'enveloppe). Ceux-ci sont nécessaires à la formation de nouveaux virions infectieux. Les éléments *cis* requis pour l'initiation, la terminaison et la modulation de la transcription des gènes rétroviraux résident dans les LTRs, tandis que les facteurs *trans* indispensables à la transcription et à la traduction sont fournis par la cellule hôte. Deux types d'ARNm se retrouvent abondamment dans les cellules infectées. L'ARN principalement épissé est l'ARNm de la protéine Env assurant ainsi une quantité adéquate, exprimée au niveau de la membrane qui englobe ensuite la particule virale. L'épissage des ARNm sous-génomiques permet la délétion du signal d'encapsidation empêchant la formation de virus défectifs. L'ARN non-épissé ou génomique, arborant le signal d'encapsidation, est quant à lui, acheminé dans la particule

virale qui bourgeonne ensuite à la surface de la membrane cytoplasmique. Dans la plupart des cas, les virus sont relargués sans effets cytopathiques.

La capacité de propagation des rétrovirus dans un type cellulaire donné est principalement régie par la spécificité tissulaire des séquences régulatrices du LTR et de la protéine d'enveloppe Env. De par leur tropisme, les rétrovirus murins leukémogènes peuvent être distingués en plusieurs catégories. Les virus écotropiques n'infectent que les cellules murines tandis que le xénotropiques ne peuvent se propager que dans les cellules non-murines. Les virus amphotropiques sont capables d'infecter les cellules murines, humaines et d'autres espèces.

2.2 Les différents mécanismes de mutation par insertion

La propriété qu'ont les provirus intégrés à activer les gènes situés dans les régions flanquantes, est médiée par la présence de séquences de contrôle de la transcription dans les LTRs (Bergeron et al., 1991). En fonction du site d'intégration et de l'orientation transcriptionnelle du provirus par rapport au gène cellulaire, ces séquences sont capables d'initier, d'augmenter et/ou de terminer la transcription ARNm de l'hôte, menant soit à la surexpression de hauts niveaux d'ARN codant pour des protéines intactes, soit à l'expression de transcrits aberrants codant pour des protéines mutantes (Fan, 1997; Jonkers and Berns, 1996).

L'activation de gènes par le mécanisme "d'insertion de promoteur" nécessite l'intégration du provirus dans le même sens transcriptionnel que le gène ciblé. La transcription est initiée dans le promoteur viral à partir du LTR en 5', ou de celui en 3'. L'activation par le LTR en 3' est souvent associée à une délétion du provirus en son LTR en 5'. Cette observation suggère une interférence néfaste entre les deux LTRs ou une régulation négative du LTR en 5' sur celui en 3' (Cullen et al., 1984). Quand le LTR en 5' est utilisé, la transcription résulte en la formation de transcrits de fusion contenant des séquences virales et cellulaires. Ceci est dû à un changement du cadre de lecture au niveau du site de polyadénylation présent dans le LTR en 3' et d'un

épissage subséquent utilisant un site donneur dans l'ARN subgénomique ou un site d'épissage cryptique (Coffin and Moore, 1990; Herman and Coffin, 1986; Swain and Coffin, 1993).

L'augmentation du taux de transcription est sans doute le mécanisme d'activation de gène le plus fréquemment rencontré dans le cadre des mutations par insertion. Cette incidence élevée semble avoir une explication dans le fait que l'activation d'un gène par stimulation de la transcription offre plus de flexibilité eu égard à l'orientation du provirus et la distance séparant le provirus du gène ciblé (Jasin, 1996; Krimpenfort et al., 1988). En effet, un fragment très étendu d'ADN peut servir de cible pour les intégrations provirales. Les transcrits issus d'un gène activé par ce mécanisme sont initiés à partir du site normal de transcription du gène suggérant que des éléments activateurs rétroviraux fonctionnant en *cis* accroissent l'efficacité du promoteur. Les mutations par augmentation de la transcription impliquent une intégration provirale en amont du gène et ce dans le sens anti-transcriptionnel du gène, ou en aval dans la même orientation transcriptionnelle. Quand le provirus est intégré en aval du gène, dans le sens transcriptionnel, dans les régions non-traduites du proto-oncogène, le transcrit est clivé au site de polyadénylation du LTR en 5'. Cette polyadénylation prématurée, dans certain cas peut produire des messagers plus stables parce que ne possédant plus des régions déstabilisatrices (par exemple AUUUA) qui sont communément présentes dans les séquences non traduites en 3' des ARNm de demi-vie courte (Shaw and Kamen, 1986).

Les intégrations virales dans l'unité de transcription d'un gène peuvent altérer la protéine produite. Si l'insertion rompt les régions codantes, le gène peut être complètement inactivé ou muté. Dans ce dernier cas, le produit du gène est une protéine présentant une activité biologique anormale.

L'activation en *cis* de gènes de la cellule hôte apparaît comme un mécanisme prédominant par lequel les rétrovirus à transformation lente exercent leur pouvoir transformant. Cependant certains rétrovirus de cette classe à savoir BLV (Bovine Leukosis Virus) et HTLV (Human T-cell

Lymphotropic Virus) sont capables d'activer en *trans* tant des gènes rétroviraux que des gènes de la cellule hôte par la protéine Tax codée par le génome rétroviral (Sodroski et al., 1985; Sodroski et al., 1984).

3 LES LEUCÉMIES INDUITES PAR LES MuLVs

Les rétrovirus leukémogènes murins ou MuLVs (Murine Leukosis Virus) induisent des tumeurs après une période relativement longue. Les animaux inoculés présentent les signes d'infection virale bien avant que la tumeur n'apparaisse. Ces observations indiquent que plusieurs étapes sont impliquées dans le développement de la maladie.

3.1 Événements pré-leucémiques.

L'activation de proto-oncogènes cellulaires par insertions provirales semble être un événement relativement tardif dans la tumorigénèse des cellules lymphocytaires (O'Donnell et al., 1985; van der Lugt et al., 1995). Dans les leucémies induites par MuLV chez la souris, des virus MCF (Mink Cell Focus-forming) (Hartley et al., 1977) sont invariablement produits et laissent à penser que ceux-ci jouent un rôle décisif dans le processus pathologique. Les virus MCF sont la conséquence d'une recombinaison entre des séquences endogènes de type xénotropique et le virus écotropique exogène. Les virus MCF sont à double tropisme et ont par là-même la capacité de surinfecter des cellules déjà infectées par le virus écotropique MuLV. Certains de ces virus MCF sont leukémogènes quand ils sont inoculés à des souris susceptibles (Chesebro and Wehrly, 1985; Ishimoto et al., 1981; van Griensven and Vogt, 1980) et y causent des néoplasmes spécifiques. Dans d'autres cas, il a été démontré que les virus MCFs pouvaient agir de manière synergique avec le virus MuLV dans la progression de la leucémie en favorisant une hyperplasie pré-leucémique. Cependant, il est intéressant de noter que M-MuLV est leukémogène quand il est inoculé à un rat bien que le

génomique de celui-ci soit dépourvu de séquences endogènes xénotropiques (Bellacosa et al., 1989; Lemay and Jolicoeur, 1984; Tschlis et al., 1983).

Afin de comprendre par quels mécanismes les virus MCF peuvent causer une hyperplasie, événement avant-coureur et préparant l'installation de la leucémie, il est utile de décrire brièvement le développement de la maladie de Friend.

3.1.1 Gp55 et phase précoce de la maladie de Friend.

Dans l'érythroleucémie induite par le complexe viral de Friend (FV), les événements pré-néoplasiques ont été décortiqués en détail. La maladie de Friend peut être divisée en deux grandes étapes à savoir la "phase mitogénique" et la "phase d'immortalisation". L'infection de souris susceptibles avec le virus de Friend conduit en dedans de trois semaines à une splénomégalie due à une prolifération rapide et polyclonale de pro-érythroblastes. Ces cellules ont une capacité d'auto-renouvellement limitée et ne sont pas tumorigéniques quand elles sont injectées dans des souris syngéniques et ne peuvent servir à l'établissement de lignée cellulaire immortalisée (Ben David and Bernstein, 1991). Cependant après quatre à six semaines, se développe une expansion clonale maligne à partir d'un ou plusieurs précurseurs dans laquelle des oncogènes sont activés par intégration provirale.

Le complexe viral de Friend est composé de deux virus : le SFFV (Spleen-Focus Forming Virus) qui est un virus déficient ou incapable de se répliquer de manière autonome et le virus écotropique "helper" ou auxiliaire F-MuLV (Friend Murine Leukemia Virus) qui permet la réplication du précédent. Il apparaît que la composante déficiente du complexe détient la majeure partie des propriétés transformantes. En effet, des stocks viraux dénués de toute activité de réplication, c'est à dire dépourvu de F-MuLV peuvent provoquer non seulement la phase hyperproliférative initiale mais aussi la phase finale d'immortalisation des érythroblastes (Chung et al., 1989). Le déterminant oncogénique de SFFV est en fait sa glycoprotéine

d'enveloppe mutante gp55 codée par le gène *env* (Aizawa et al., 1990; Wolff and Ruscetti, 1988). Gp55 présente la propriété d'initier le processus de prolifération. En effet, celle-ci a la capacité d'interagir avec le récepteur à l'érythropoïétine (EpoR) des cellules infectées (Hoatlin et al., 1990; Li et al., 1990; Ruscetti et al., 1990). De plus, un EpoR constitutivement activé peut supplanter le complexe EpoR / gp55, en accord avec le modèle précédemment énoncé (Yoshimura et al., 1990). Enfin, des expériences de transfection ont mis en exergue les caractéristiques importantes de la gp55. Premièrement, l'érythropoïétine (Epo) et gp55 possèdent des sites distincts de liaison pour EpoR. Par là-même, Epo médie l'interaction ("crosslink") de la gp55 avec EpoR (Casadevall et al., 1991). Deuxièmement, la présence de gp55 prolonge la demi-vie de EpoR et des mutants de gp55 suggèrent que l'activité mitogénique nécessite l'interaction de ces deux protéines (Ferro, Jr. et al., 1993).

3.1.2 Production de virus MCF et phase précoce des leucémies induites par les MuLVs

Le concept d'hyperprolifération pré-leucémique médiée par une protéine virale d'enveloppe ne saurait être exclusif à la maladie de Friend. Des analyses de séquence ont mis en évidence des régions homologues entre le gène *env* des SFFV et celui des virus MCF (Amanuma et al., 1983; Bestwick et al., 1984; Clark and Mak, 1983; Wolff et al., 1983). De plus, il est envisagé que la gp55 de SFFV interagisse avec le récepteur de MCF et prévienne ainsi une superinfection (Chesebro and Wehrly, 1985; Li et al., 1987). Li et Baltimore ont démontré que la protéine gp70 codée par le gène *env* du virus MCF dans un contexte de leucémie induite par M-MuLV, peut se lier à EpoR et que cette interaction donne une indépendance envers les facteurs de croissance dans une lignée dépendante de l'interleukine-3 (l'I-3) (Li and Baltimore, 1991). Allant dans ce sens Tsichlis et Bear ont montré qu'une lignée de thymome de rat dépendante de l'I-2 pour sa croissance et sa survie, peut s'en passer après infection par le virus MCF (Tsichlis and

Bear, 1991). Des indices additionnels permettent d'établir que MCF est responsable de l'hyperprolifération pré-leucémique. L'utilisation d'un virus M-MuLV recombinant contenant des séquences régulatrices du virus polyoma dans son LTR a donné la preuve qu'il n'y a pas de production de virus MCF (car aucune recombinaison n'est possible avec les séquences xénotropiques endogènes) et qu'il n'y a pas de phase hyperproliférative pré-leucémique (Brightman et al., 1991).

Bien que différentes voies de recherche semblent établir que les virus MCF déclenchent une hyperplasie via leurs glycoprotéines d'enveloppe, le rôle exact des virus MCF dans les leucémies induites par les virus MuLV demeure non élucidé. Cependant, le gène du récepteur cellulaire du virus MCF a récemment été découvert par Yang et al (1999). Celui-ci se trouve sur le chromosome 1 murin au niveau du locus *Rmc-1*. Son expression dans des cellules résistantes à l'infection de MCF les rend infectables. *Rmc-1* code pour une protéine membranaire homologue à la protéine Syg1p présente chez *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 Étapes tardives dans les leucémies induites par MuLV: les mutations par insertions.

De façon contrastée avec l'expansion polyclonale durant la phase précoce observée dans les souris infectées par MuLV, la phase tardive se caractérise par l'apparition de tumeurs. Celles-ci sont généralement constituées d'un ou plusieurs clones arborant des intégrations provirales dans des régions distinctes de leur génome. Les sites d'insertion sont des loci occupés par des provirus dans plusieurs tumeurs indépendantes. De nombreux sites d'intégration ont été identifiés et parmi eux plusieurs loci contiennent des gènes affectés par l'intégration. Les produits de ces gènes sont invariablement des protéines régulatrices incluant des facteurs de transcription, des facteurs de croissance, des récepteurs aux facteurs de croissance, des kinases cytoplasmiques, des GTPases et des cyclines.

Plusieurs de ces gènes correspondent à des oncogènes capturés par des rétrovirus à transformation rapide.

3.2.1 Les tumeurs des cellules T induites par les MuLVs

Un très grand nombre de sites d'intégration a été mis en évidence dans ce type de leucémie. Les gènes *myc* et *pim-1* y sont les plus fréquemment affectés dans les leucémies des cellules T induites par les MuLVs ; néanmoins plusieurs autres sites seront détaillés.

3.2.1.1 Les gènes *c-myc* et *N-myc*

Les gènes *c-myc* et *N-myc* codent pour des protéines se liant à l'ADN au niveau de séquences consensus spécifiques. En plus d'un domaine liant l'ADN, la protéine Myc détient un domaine de trans-activation transcriptionnelle ainsi que des domaines de dimérisation. Ces derniers lui assurent une interaction avec des partenaires, offrant différentes fonctions (Marcu et al., 1992). L'activation du gène *myc* est très souvent observée, et ce dans de nombreuses espèces. Ainsi ce gène est fréquemment activé dans les lymphomes des cellules B et T induits par ALV chez l'oiseau (Hayward et al., 1981), par FLV chez le chat (Neil et al., 1984) et par F-MuLV ou M-MuLV chez la souris (Corcoran et al., 1984; Dreyfus et al., 1990; Selten et al., 1984).

L'activation du gène *c-myc* par insertion de promoteur et par augmentation du taux de transcription par les LTRs rétroviraux résultent en de hauts niveaux d'expression de la protéine Myc de type sauvage (Kung et al., 1991). La surexpression de *c-myc* est aussi associée à des intégrations provirales dans deux autres loci : le locus *Pvt-1 / Mlvi-1 / Mis-1*, qui est situé 270 kilobases (Kb) en aval de *c-myc* et le locus *Mlvi-4* qui se trouve à 30 Kb de *c-myc*. Ces deux sites d'intégration démontrent combien l'espace séparant le locus d'intégration et le gène affecté peut varier et que MuLV peut activer des gènes malgré de grandes distances.

Les intégrations rétrovirales au niveau du gène *N-myc* sont condensées sur une portion d'ADN s'étendant sur 100 pb (paires de base), dans la région non traduite en 3'. Celles-ci ont pour effet d'augmenter l'expression d'un ARNm *N-myc* tronqué mais codant cependant pour une protéine N-Myc sauvage. En résumé, ces données indiquent que la tumorigenèse des cellules T nécessite une expression constitutive élevée de *c-myc* ou *N-myc* et ce dans une vaste majorité de lymphomes induits par des rétrovirus.

3.2.1.2 Le gène *pim-1*

Le gène *pim-1* fut initialement identifié comme un site d'intégration virale dans 50% des lymphomes de cellules T induits par M-MuLV (Cuypers et al., 1984). Les insertions provirales en proximité du gène modifient à la hausse l'expression du gène et ainsi la quantité de protéine Pim-1 sauvage. Pim-1 est une kinase cytoplasmique spécifique des sérines et des thréonines (Saris et al., 1991). Son rôle dans la transduction du signal n'est toujours pas clairement défini. Des souris transgéniques *Eμ-pim-1* développent des tumeurs avec une incidence plus élevée comparativement à des souris normales, après infection par M-MuLV (van Lohuizen et al., 1989). De façon intéressante, les souris transgéniques *Eμ-pim-1* qui expriment considérablement le transgène (rendu possible par l'insertion du transgène dans une région active de la chromatine qui offre une efficacité optimale du promoteur) ne peuvent servir à de futurs croisements en raison d'une mortalité élevée due à l'apparition précoce de lymphomes (Saris et al., 1991).

3.2.1.3 Les autres sites d'insertion

Il existe de nombreux sites d'insertion et le paragraphe suivant ne saurait être une liste exhaustive.

Le locus *Vin-1* a été découvert dans un très faible pourcentage de lymphomes à cellules T causés par le virus BL/VL3, qui est induit par irradiation (Tremblay et al., 1992; Van Lohuizen et al., 1989). Les provirus intégrés au niveau de ce locus sont tous dans la même orientation, proches

des îlots CpG flanquant une unité de transcription codant pour un ARNm de 6Kb. Le séquençage de l'ADNc de *vin-1* révéla une similarité parfaite avec le gène *cycline D2* qui appartient à la famille de gènes *cycline D*, impliqués dans la régulation de la transition G₁ à S du cycle cellulaire (Hanna et al., 1993; Matsushime et al., 1991; Motokura et al., 1991; Xiong et al., 1991). Les intégrations provirales dans *vin-1* résultent en une transcription élevée et traduction subséquente de la protéine sauvage Cycline D2, par un mécanisme d'activation de la transcription par les régions régulatrices du LTR (Hanna et al., 1993).

Un autre locus où siège un gène de cette famille a été mis en évidence. En effet, le locus *Fis-1* est ciblé par F-MuLV dans les leucémies et contient le gène *cycline D1* (Silver and Kozak, 1986). Bien que l'expression de ce gène ne soit pas détectable dans la cellule T normale, de hauts niveaux d'expression sont constatés dans les leucémies arborant une intégration provirale de F-MuLV en *Fis-1* (Lammie et al., 1992). Les souris transgéniques *Eμ-cycline D1* démontrent que l'expression constitutive de la Cycline D1 est leukémogène et les croisements avec des souris transgéniques indiquent une collaboration évidente avec *myc* (Bodrug et al., 1994).

3.2.2 Les tumeurs des cellules B

Dans le but d'identifier des sites communs d'insertion impliqués dans la leukémogénèse des cellules B, des souches de souris, prédisposées pour ce type de cancer ont été générées. En effet, les souris issues du croisement des souris AKR/J avec DBA/2J, soit AKXDRI, connaissent une ségrégation de gènes qui affectent la susceptibilité aux lymphomes induits par les MuLVs. Bien que les souris AKR/J développent majoritairement des lymphomes des cellules T, quelques souches AKXDRI ont développé des lymphomes des cellules B. Un nombre important de sites d'intégration pour virus écotropiques a été cloné à partir des tumeurs issues des souches AKXDRI

(Gilbert et al., 1993; Mucenski et al., 1986; Mucenski et al., 1987; Mucenski et al., 1988a; Mucenski et al., 1988b).

3.2.2.1 Le locus *Evi-3*

Le site commun d'insertion *Evi-3* (Ecotropic virus insertion site-3) est réarrangé dans les lymphomes de cellules immatures pré-B et de cellules matures B et non dans les autres leucémies (Justice et al., 1994). Les insertions provirales dans *Evi-3* sont localisées sur une région couvrant 200 bp riches en bases CpG. Dans le voisinage d'*Evi-3*, ont été identifiées deux régions codant pour des ARNm; cependant, le mécanisme par lequel les insertions provirales affectent leur expression n'est toujours pas résolu.

Des souris transgéniques surexprimant *c-myc* dans les cellules B sous la dépendance d'un promoteur contenant une séquence régulatrice du promoteur des chaînes lourdes des immunoglobulines ($E\mu$), ont été générées. Celles-ci présentent des lymphomes clonaux des cellules B avec une fréquence élevée, après un laps de temps important. Ceci suggère que d'autres événements sont nécessaires à la leukémogénèse (Adams et al., 1985; Harris et al., 1988). De plus, la longue latence d'apparition des lymphomes B dans ces souris, en fait un bon modèle pour identifier les autres gènes coopérant avec *c-myc* dans le processus de tumorigénèse. C'est pourquoi, ces souris ont été infectées par M-MuLV. Par ce biais, il a été découvert que l'oncogène *Pim-1* est activé par les insertions provirales dans 35% des tumeurs. De plus, trois nouveaux sites d'intégration ont été observés (Haupt et al., 1991; van Lohuizen et al., 1991). Trois tumeurs sur quatre présentent une intégration dans un des quatre loci.

3.2.2.2 Le locus *Bmi-1*

Le locus *Bmi-1* (B-cell specific M-MuLV integration-site 1) a été identifié et analysé indépendamment dans deux laboratoires (Haupt et al., 1991; van Lohuizen et al., 1991). Tandis que 35 à 47% des lymphomes pré-B présentent des intégrations dans *Bmi-1*, aucune intégration à ce locus n'a pu

être détectée dans les lymphomes T. Les intégrations se font de manière prédominante au niveau du premier exon du gène *Bmi-1*, conduisant à une forte expression de son ARNm, expliquée par l'intercalation du promoteur en LTR 3' viral. Le gène *bmi-1* a un potentiel oncogénique fort car il induit des lymphomes B et T après une très courte latence quand il est surexprimé dans les populations lymphoïdes de souris transgéniques (Alkema et al., 1995). Le gène *bmi-1* code pour une protéine nucléaire contenant un motif en doigt de zinc et un domaine hélice-tour-hélice. *Bmi-1* semble remplir un rôle développemental important car des souris transgéniques exprimant un gène *bmi-1* non fonctionnel affichent une postériorisation des vertèbres (van der Lugt et al., 1994). De plus, des souris transgéniques qui surexpriment *bmi-1* durant le développement embryonnaire présentent le phénotype inverse à savoir une antériorisation des vertèbres (Alkema et al., 1995).

3.2.2.3 Le locus *Bla-1*

Les intégrations provirales dans *Bla-1* augmentent l'expression de *bmi-1*. De manière intéressante, les intégrations dans *Bmi-1* et *Bla-1* sont mutuellement exclusives, c'est-à-dire qu'aucune tumeur ne présente une double intégration dans ces deux loci (van Lohuizen et al., 1991). Ces observations suggèrent que les provirus intégrés dans *Bla-1* puissent activer *bmi-1* en *cis* par l'intermédiaire des séquences régulatrices dans les LTRs viraux.

3.2.2.4 Le locus *Pal-1*

Le locus *Pal-1* (Proviral activation in lymphomas 1) qui se trouve sur le chromosome 5 murin a été mis en évidence par occupation rétrovirale dans 28% des tumeurs des cellules pré-B (van Lohuizen et al., 1991). Ce locus s'étend sur 50 Kb et semble avoir un rôle prédominant dans la tumorigénèse des cellules lymphoïdes puisqu'il se trouve être réarrangé dans les mêmes proportions que *c-myc* et *Bmi-1* dans les leucémies des cellules T induites par les MuLVs. À ce locus se trouve le gène *gfi-1* (Growth factor independence-

1) qui a été découvert dans des sous-clones dérivés de lymphomes de cellule T de rat, induits par M-MuLV. Ces sous-clones émergent après une privation en IL-2 (Gilks et al., 1993).

3.2.2.5 Les loci *Dis-1* et *Dis-2*

Les rétrovirus MuLV ont la capacité d'induire des lymphomes chez la souris conséquemment à l'activation de proto-oncogènes cellulaires en s'intégrant dans le génome de la cellule hôte. Dans le laboratoire, Huang et al. (1995) ont émis l'hypothèse que le virus MAIDS (Murine AIDS) pouvait être mutagène. Ce rétrovirus est responsable d'une immunodéficience chez la souris par dysfonctionnement des cellules T et B. Celui-ci est responsable d'une expansion polyclonale des cellules B qui devient oligoclonale dans les derniers stades de la maladie, signifiant que d'autres événements génétiques sont impliqués. Deux sites d'insertion, *Dis-1* et *Dis-2* ont été identifiés. Le locus *Dis-1* couvre le gène *Spfi-1*, qui code pour un facteur de transcription. L'ARNm de celui-ci est surexprimé dans les cellules contenant le provirus et pourrait bien contribuer à l'expansion polyclonale (Huang et al., 1995).

4 MISE EN EVIDENCE D'AH1-1

4.1 Introduction

Le rétrovirus leukémogène murin Abelson ou A-MuLV est un virus déficient dont le génome est remplacé en grande majorité par l'oncogène *v-abl* (Abelson and Rabstein, 1970). Ce virus est donc dépendant pour sa réplication et sa propagation d'une complémentation en *trans* par un rétrovirus "helper" ou auxiliaire compétent. Quand A-MuLV est inoculé à des souris, il y induit des lymphomes de cellules pré-B après une période assez courte de vingt à quarante jours (Alt et al., 1981; Boss et al., 1979) Cependant ces tumeurs sont clonales ou oligoclonales et laissent à penser que

d'autres événements sont requis pour la pleine transformation des cellules. Notre laboratoire a mis en évidence que la région U3 du LTR du rétrovirus auxiliaire M-MuLV contenait des éléments déterminants dans la pathologie induite par A-MuLV (Savard et al., 1987).

4.2 Le locus *Ahi-1*

Notre laboratoire a donc émis l'hypothèse selon laquelle M-MuLV pouvait agir comme mutagène par insertion. Dans ce but, des souris ayant connu une primo-infection avec A-MuLV, furent soumises à une seconde infection par M-MuLV afin de mettre en évidence des sites préférentiels d'insertion de M-MuLV dans le contexte d'une transformation induite par *v-abl* (Poirier et al., 1988).

Dans 16% des tumeurs des cellules pré-B, le locus baptisé *Ahi-1* pour Abelson Helper Integration-site 1 est occupé par un rétrovirus M-MuLV. L'incidence élevée d'intégration au niveau du locus et l'orientation transcriptionnelle des provirus, suggèrent que cette étape est un pré-requis à la transformation (Poirier et al., 1988). Cependant le taux d'intégration dans *Ahi-1* n'est pas de 100% et suppose que divers mécanismes peuvent agir en synergie avec l'action de *v-abl* dans la transformation des cellules pré-B. En outre, Poirier et al. (1988) ont démontré que les loci communs d'intégration, à savoir *Pim-1*, *Mis-1*, *myc* et *Gin-1* ne connaissent pas d'insertion rétrovirale. Ceci démontre qu'*Ahi-1* est un locus d'intégration distinct et que d'autres sites demeurent non identifiés. Par ailleurs, Poirier et al. (1988) ont localisé *Ahi-1* au niveau du chromosome 10 murin à proximité du gène *c-myb*. Enfin, Jiang et al. (*en préparation*) dans le laboratoire ont situé *Ahi-1* dans une région située à 35 Kb en aval de *myb*. Néanmoins, l'intégration de M-MuLV au niveau d'*Ahi-1* ne semble affecter en rien la quantité d'ARNm de *myb* dans les tumeurs, suggérant l'existence d'un mécanisme de transformation indépendant de la surexpression de celui-ci. De plus, Villeneuve et al. (1993) dans le laboratoire ont identifié un nouveau site d'intégration, *Mis-2*, séparé de *myb* par 160 Kb et à proximité d'*Ahi-1*. Ceci laisse à penser que cette

courte région jouxtant *myb*, offre un avantage sélectif aux tumeurs quand elle est affectée par une intégration provirale.

Plus récemment, des souris MMTV^D/*myc* (Paquette et al., 1992) développant des tumeurs clonales et oligoclonales des cellules thymiques ont été infectées avec M-MuLV par Girard et al. (1995) dans le laboratoire, afin de mettre en évidence les oncogènes coopérant avec *myc* dans la progression tumorale. Si *Notch1* a été identifié comme site d'intégration provirale dans 52% des thymomes, il n'en demeure pas moins qu'*Ahi-1* connaît lui aussi des insertions dans 14% des tumeurs (Girard et al., 1996). Les provirus au niveau d'*Ahi-1* comme dans les tumeurs induites par A-MuLV, sont tous intégrés dans le sens anti-transcriptionnel d'*Ahi-1*. En définitive *Ahi-1* semble être impliqué dans la progression de tumeurs issues de divers types cellulaires en l'occurrence des cellules d'origine lymphoïde. Allant dans ce sens, il a été rapporté par deux équipes qu'*Ahi-1* était ciblé par des insertions rétrovirales avec une incidence de 4%, dans les tumeurs des cellules pré-B de souris transgéniques E μ /*myc* induites par M-MuLV (Haupt et al., 1991; van Lohuizen et al., 1991).

4.3 Le gène *ahi-1*

Dès lors, Jiang et al. (*en préparation*) ont suspecté la présence d'un gène au niveau du locus *Ahi-1* dont la fonction ou l'expression serait affectée par les intégrations provirales, apportant de fait un avantage sélectif à la croissance tumorale. Dans ce sens, une région couvrant 70 Kb d'ADN génomique de souris contenant *Ahi-1* a été clonée, cartographiée et soumise à l'analyse par amplification d'exons décrite par Buckler et al. (1991). Des exons potentiels ont été découverts et permettant la préparation de sondes pour i) confirmer l'existence d'un messager par buvardage de type Northern dans divers organes, notamment le cerveau et le testicule ii) cribler une banque d'ADNc de cerveau de rat puis de souris.

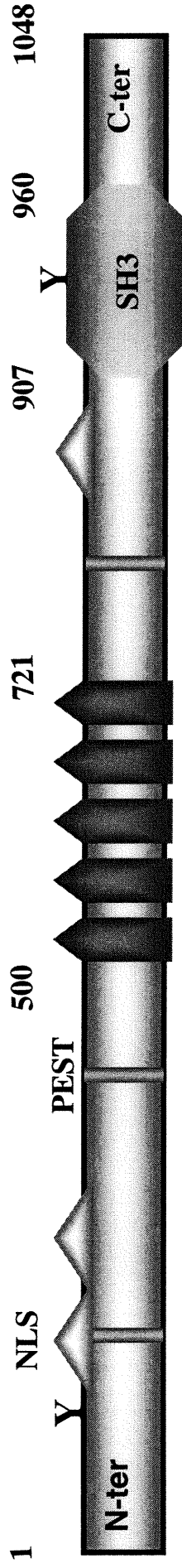
En définitive, le locus *Ahi-1* contient un cadre de lecture ouvert dont l'orientation transcriptionnelle est l'inverse de celle de *myb*. L'ADNc de

pleine longueur est de 4750 pb comprenant deux régions non traduites, en 5' de 258 bp et en 3' de 1,4 Kb. Un ARNm de 5 Kb est exprimé très fortement dans le testicule et le cerveau, modérément dans le thymus et divers organes. Un ARNm de 3,5 Kb se retrouve fortement exprimée dans le cerveau et un autre de 4,2 Kb dans le testicule suggérant un épissage alternatif du gène. Des hybridations *in situ* ont démontré la présence du messager *ahi-1* dans le cortex thymique et dans le cerveau précisément au niveau des neurones (Jiang et al., *en préparation*).

4.4 La protéine Ahi-1

L'ADNc d'*ahi-1* code pour une protéine de 1048 aminoacides (Cf figure 2, dans la partie *I-Introduction*). Par homologie avec des protéines contenues dans les banques de données, il a été déterminé qu'Ahi-1 présente à son extrémité C-terminale un domaine SH3 (Src Homology 3 (Jiang et al., *en préparation*)). Ce type de domaine est impliqué dans les interactions protéine-protéine spécifiques, en reconnaissant le site consensus PxxP retrouvé sur de nombreuses molécules de signalisation (Schlessinger, 1994). De plus, Ahi-1 arbore un domaine à cinq répétitions tryptophane-aspartate ou WD (WD repeat) qui est présent dans des protéines médiant la transduction du signal par le biais d'interactions protéine-protéine spécifiques (Smith et al., 1999). Les protéines contenant ce type de domaine ont des fonctions très variées chez les eucaryotes. Certaines sont impliquées dans la formation de complexes ribonucléoprotéiques (snRNP ou small nuclear ribonucleoprotein) réglant la synthèse des ARN (Bjorn et al., 1989). Un autre groupe fait partie du complexe d'initiation de la transcription, comme le facteur de transcription II D (TFIID) (Hoey et al., 1993; Keleher et al., 1992; Williams et al., 1991).

Figure 2 : Structure de la protéine Ahi-1. Ahi-1 est une protéine de 1048 acides aminés. Par homologie de séquence, différents domaines ont été mis en évidence. La protéine contient trois domaines PEST (barres verticales) impliqués dans le contrôle de la demi-vie de la protéine. Trois domaines de localisation nucléaire ou NLS (triangles) sont répartis sur la longueur de celle-ci. De plus, des domaines d'interaction protéine-protéine à savoir cinq répétitions WD (pentagones) dans la partie centrale de la protéine et SH3 (hexagone) à l'extrémité C-terminale sont présents. Enfin, la protéine Ahi-1 comprend deux sites consensus de phosphorylation sur tyrosine (Y), l'un à l'extrémité N-terminale et l'autre dans le domaine SH3.



Domaine WD

Enfin d'autres protéines contenant un domaine WD participent à l'assemblage du cytosquelette (Vaisman et al., 1995), à la formation des vésicules, au trafic intracellulaire de celles-ci (Pryer et al., 1993) et au contrôle de la division cellulaire (Feldman et al., 1997).

De façon intéressante Ahi-1 contient trois séquences de localisation nucléaire (Moroianu, 1997) (NLS, Nuclear Localization Sequence) à savoir deux NLS juxtaposées en N-terminal et un NLS entre le domaine WD et SH3 en C-terminal. Ahi-1 affiche de plus des séquences consensus contrôlant la dégradation ou durée de vie de la protéine, communément appelées séquences PEST car celles-ci sont riches en acides aminés proline (P), glutamate (E), sérine (S), thréonine (T) (Rechsteiner and Rogers, 1996). Enfin, la protéine Ahi-1 comporte de nombreux motifs de modifications post-traductionnelles dont notamment des sites de phosphorylation sur tyrosine souvent impliqués dans la transduction du signal. En effet, les phosphotyrosines modifient des interactions intra- ou intermoléculaires entre protéines et par-là même modulent les interactions protéine-protéine ou le fonctionnement d'enzymes comme les kinases Src (Williams et al., 1998).

5 PROBLÉMATIQUE

Le locus *Ahi-1* a été découvert dans deux contextes : i) des tumeurs de cellules pré-B issues de souris infectées par A-MuLV et complémenté en *trans* par M-MuLV. ii) des tumeurs thymiques issues de souris MMTV^D/myc infectées par le rétrovirus M-MuLV. Des intégrations provirales sont observées au niveau du locus *Ahi-1* dans 16% des lymphomes pré-B et 14% des thymomes. L'incidence élevée d'intégration et l'orientation conservée des rétrovirus dans le sens inverse de la transcription du gène *ahi-1* suggèrent un rôle important de celui-ci dans la progression tumorale. L'expression en ARNm d'*ahi-1* est retrouvée entre autre dans le cortex thymique. De plus la protéine Ahi-1 présentent les motifs (de phosphorylation sur tyrosine) et

domaines (WD, SH3), caractéristiques d'une protéine adaptatrice impliquée dans la signalisation cellulaire.

Nous nous proposons donc dans ce projet de vérifier si Ahi-1 est une nouvelle protéine impliquée dans la signalisation de la cellule T, en particulier les thymocytes. Au préalable, il est bon de faire rapidement le point sur l'ontogénie des cellules T et la voie majeure de signalisation mise en jeu dans les cellules T : la voie du récepteur à l'antigène ou TCR.

5.1 Le thymus et ontogénie des cellules T

Le thymus est un organe lymphoïde primaire bilobé, situé dans le médiastin. Celui-ci est organisé en lobules séparés entre eux par du tissu conjonctif. A l'intérieur de chaque lobules, les thymocytes sont organisés de l'extérieur ou cortex vers la profondeur ou médulla.

Les thymocytes immatures en prolifération se trouvent dans le cortex alors que les cellules matures sont dans la médulla, impliquant un gradient de différenciation du cortex vers la médulla. Le thymus connaît une colonisation par des cellules souches pré-T qui sont attirées par des facteurs chimotaxiques. La différenciation des cellules pré-T passe par plusieurs stades : i) Le stade à cellules négatives pour les deux marqueurs de surface CD4 et CD8 communément appelées "double-négatives" (DN) $CD4^-CD8^-$, où les thymocytes réarrangent le gène de la chaîne β du TCR. ii) Le stade à cellules qui expriment les deux marqueurs CD4 et CD8 ou double-positives (DP) $CD4^+CD8^+$ qui comptent pour 90% des cellules du thymus. Les gènes codant pour la chaîne α du TCR sont réarrangés. Les chaînes α β du TCR sont désormais faiblement exprimées à la surface de la cellule en association avec le marqueur CD3, cofacteur du TCR. iii) Le dernier stade est caractérisé par un expression élevée à la surface du TCR en association avec CD3. Les thymocytes sont à présent des cellules positives pour un seul marqueur ou simple-positives (SP). Elles sont soit $CD4^+$, soit $CD8^+$. Elles se situent à présent dans la médulla thymique.

Les thymocytes connaissent des recombinaisons somatiques dans leur gènes α β du TCR produisant une diversité de récepteurs capables de réagir contre une diversité antigénique. Au cours du développement des thymocytes, l'interaction du TCR avec le complexe majeur d'histocompatibilité lié à l'antigène (CMH classe II) régie la survie cellulaire. En effet, les interactions de faibles affinité et de fortes affinité entre le TCR et le CMH classe II conduisent à l'apoptose du thymocyte. A la sortie du thymus, les lymphocytes T SP CD4+ et CD8+ sont phénotypiquement matures et sont capables de générer une réponse immunitaire (Roitt et al., 1998).

5.2 La signalisation via le TCR

L'interaction du TCR avec son antigène spécifique initie une cascade intracellulaire de signaux qui convergent et agissent conjointement dans la différenciation et la prolifération des cellules T. L'événement le plus précoce de la cascade de signalisation est la phosphorylation de résidus tyrosine des sous-unités constituant le TCR, notamment les chaînes ζ , au sein d'une séquence consensus appelée ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) (Kane et al., 2000). Phosphorylées par les membres de la famille des kinases de type Src, Lck et Fyn, les ITAMs servent "d'amarrage" à d'autres tyrosine kinases, ZAP-70 et Syk. ZAP-70 et Syk interagissent avec le TCR par leur domaine SH2 qui reconnaissent les tyrosines phosphorylées (van Leeuwen and Samelson, 1999). Cette interaction permet l'activation subséquente des ces enzymes par phosphorylation sur tyrosine. Par le jeu de phosphorylations, de nombreux adaptateurs (Rudd, 1999) sont recrutés à savoir PLC γ 1, Cbl, Vav et SLP76. Les majeurs effets retrouvés en aval sont l'augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la voie Ras (Alberola-Ila et al., 1997). Ces deux types de signaux sont suffisants pour stimuler la prolifération *via* la voie AP-1 et induire l'expression de protéines effectrices essentielles comme la cytokine IL-2.

5.3 Les objectifs

Afin d'appréhender le rôle hypothétique d'Ahi-1 dans la signalisation de la cellule T, nous avons choisi de façon générale, d'étudier la fonction de la protéine Ahi-1 dans le contexte des cellules thymiques murines *ex vivo*. De plus, des souris CD4C/Ahi-1 exprimant *ahi-1* dans les cellules T CD4⁺ ont été générées dans le laboratoire afin d'étudier la fonction de la protéine Ahi-1 *in vivo*.

II-MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES

1.1 pCDNA3 Ahi-1 3,55 Kb

L'ADNc d'Ahi-1 d'une longueur de 3,55 Kb, cloné dans les sites *Eco* RI et *Kpn* I de pGEM-3, a été digéré par les enzymes de restriction i) *Eco*RI (Gibco) et *Hind* III (Gibco) générant un fragment de 1Kb ii) *Hind* III et *Xba* I générant un deuxième fragment de 2,55 Kb; ce dernier site n'étant pas présent dans la séquence d'Ahi-1 mais ce trouvant cependant dans la cassette de clonage de pGEM-3 en aval de *Kpn* I. Enfin, le vecteur pCDNA3 (Invitrogen) est linéarisé par digestion avec les enzymes de restriction *Eco* RI et *Xba* I. Les deux fragments *Eco* RI/*Hind* III de 1Kb et *Hind* III/*Xba* I de 2,55 Kb et le vecteur digéré sont ligaturés en présence de la ligase du bactériophage T4 (New England Biolabs). Rappelons que chaque fragment d'ADN fait l'objet d'une migration dans un gel d'agarose 1% et d'une purification de la bande en utilisant la "trousse d'extraction" Quiaex (Quiagen) en conformité avec les recommandations du manufacturier.

1.2 pCDNA3 Ahi^{ΔWD}

Le mutant Ahi-1 délété du domaine WD a été généré en plusieurs étapes. D'une part, le plasmide pGEM-3 Ahi-1 3,55 Kb a été digéré par les enzymes de restriction *Acc* I et *Xba* I générant un fragment d'ADNc d'Ahi-1 de 1,37 Kb. Ce fragment ainsi qu'un oligomère de *Eco* RI/*Pvu* I-*Acc* I faisant office d'adaptateur (préservant le cadre de lecture ouvert) sont sous-clonés dans le vecteur Litmus 29 (New England Biolabs) au niveau des sites de restriction *Eco* RI et *Xba* I générant le plasmide Litmus Ahi *Pvu* I/*Acc* I-*Xba* I. D'autre part, le plasmide pGEM-3 Ahi-1 3,55 Kb a été digéré par les enzymes de restriction *Eco* RI et *Pvu* I générant un fragment d'une longueur de 1,54 Kb. Rappelons ici que *Pvu* I (nt 1805) se situe en amont du domaine WD-40, tandis qu' *Acc* I est localisé en aval (nt 2407). La digestion à ces sites permet donc une délétion de la portion d'ADNc d'Ahi-1 codant pour ce domaine. Enfin, le plasmide Litmus Ahi *Pvu* I/*Acc* I-*Xba* I a été digéré par

les enzymes de restriction *Pvu* I et *Xba* I générant un fragment de 1,37 Kb. Ce dernier est ligaturé avec le fragment de l'ADNc d'Ahi-1 *Eco* RI/*Pvu* I de 1,54 Kb, au niveau des sites *Eco* RI et *Xba* I de pCDNA3 préalablement linéarisé par ces enzymes (Cf. Fig.8, section 5.1 dans III-*Résultats*).

1.3 pBabe-puro Ahi-1^{AWD}

Le vecteur pBabe puro est un vecteur rétroviral dont le promoteur contrôlant l'expression génique est le LTR de M-MuLV. Celui-ci est très utile dans le cadre de l'introduction d'un transgène dans des cellules en suspension ou en règle générale dans les cellules difficilement transfectables par les méthodes classiques. Afin d'introduire le mutant Ahi-1^{AWD}, plusieurs étapes ont été nécessaires. Premièrement, le plasmide pBabe puro-Ahi-1, disponible au laboratoire est digéré par les enzymes de restriction *Bam*H I et *Pvu* I générant un fragment de 1,54 Kb. Deuxièmement, de façon similaire à la construction de pCDNA3 Ahi^{AWD} (cf. section 1.2, II-*Matériel et Méthodes*), le plasmide Litmus Ahi *Pvu* I/*Acc* I-*Xba* I a été digéré par les enzymes de restriction *Pvu* I et *Xho* I générant un fragment de 1,37 Kb délété du domaine WD. Enfin les fragments *Bam*H I/*Pvu* I de 1,54 Kb et *Pvu* I/*Xho* I de 1,37 Kb ont été ligaturés au niveau des sites de restriction *Bam*H I et *Sal* I du vecteur pBabe-puro préalablement digéré par ces enzymes.

1.4 pEGFP-Ahi-1

Le vecteur pEGFP-N1 permet de fusionner des protéines à l'extrémité N-terminale de GFP (Green Fluorescent Protein). Cette dernière permet le "balisage" de la protéine d'intérêt, en l'occurrence Ahi-1. En effet, quand la protéine GFP est excitée par la lumière UV, elle émet une lumière verte observable au microscope permettant de localiser sub-cellulairement la protéine fusionnée. Dans ce but, le plasmide pBabe puro-Ahi-1 est digéré par les enzymes de restriction *Eco* RI et *Hind* III générant un fragment de 0,95 Kb. De plus, le plasmide pGEM-3 Ahi-1 4,6 Kb (contenant la région non traduite en 3' d'Ahi-1) a été digéré par les enzymes de restriction *Hind* III et

BamH I produisant un fragment de 2 Kb. Ces deux fragments sont ligaturés au vecteur pEGFP-N1 préalablement digéré par les enzymes de restriction *Eco* RI et *BamH* I. La jonction Ahi-1-GFP au niveau du site *BamH* I préserve évidemment le cadre de lecture de GFP.

2 CULTURE CELLULAIRE

2.1 Les cellules 293T

Les cellules 293T sont des cellules embryonnaires rénales humaines transformées par l'antigène T du virus simien SV40. Celles-ci sont maintenues dans du milieu de culture DMEM (Gibco BRL) complété avec 5% de sérum de veau fœtal (Fetal Calf Serum, FCS) dans une atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO₂

2.2 Les cellules Jurkat

Les cellules Jurkat E6.1 proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection). Celles-ci sont des cellules T matures immortalisées dérivées d'une leucémie aiguë humaine. Les cellules Jurkat sont mises en culture dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de FCS, de la glutamine à 2 mM et du β -mercaptoéthanol à 50 μ M et entretenues à une concentration de 1×10^5 à 1×10^6 cellules par mL.

3 DESCRIPTION DES ANTICORPS

Les anticorps anti-Ahi-1 ont été générés dans le laboratoire par Normand Beaulieu. L'anticorps anti-Ahi-1, 1824-1 BL4, est un anticorps dirigée contre la région C- terminale d'Ahi-1, généré en injectant à un lapin la protéine GST-B310 qui contient 68 aa situés en aval du domaine SH3 d'Ahi-1 fusionnés à la protéine GST. L'anticorps 1783 est dirigé contre une région de 110 aa entre le domaine WD et le domaine SH3. L'anti-CD3 ϵ murin

monoconal (1 µg/mL) a été purifié dans le laboratoire par Stéphane Gagnon à partir de surnageant d'une culture d'hybridome 1452C11 généré chez le hamster. L'anti-Nef a été produit dans le laboratoire par Patrick Vincent en injectant à des lapins GST-Nef. L'anti-CD3ε humain monoclonal (1 µg/mL) a été purifié à partir de surnageant de l'hybridome OKT3 (ATCC). L'anticorps antiphosphotyrosine utilisé est issue de l'hybridome 4G10 (Upstate Biotechnology) et a été purifié par Stéphane Gagnon dans le laboratoire.

4 STIMULATION DES CELLULES

Les thymocytes obtenus à partir de souris C3H sauvages et les cellules Jurkat sont mises en suspension dans du milieu de culture modifié: RPMI 1640 contenant 0.1% de BSA-fraction V (Boehringer-Mannheim), et HEPES (N-[2[Hydroxyethyl] piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid]]) 25 mM à pH 7,4, à 4°C et pré-incubées 10 min à 37°C. Les thymocytes murins sont stimulés en rajoutant dans le milieu 7 µg d'anti-CD3ε murin (1452C11) et incubés 5 min à 37°C. Les cellules Jurkat sont stimulées en leur ajoutant 4 µg d'anti-CD3ε humain (OKT3) et en les incubant 5 min à 37°C. Après stimulation, les cellules sont centrifugées 30 sec à 12500 rpm à 4°C (MicroCentrifuge 235C, FisherScientific) et resuspendues dans la solution de lyse (Cf section 6, II-*Matériel et méthodes*).

5 TRANSFECTION DES CELLULES

Les cellules 293T sont cultivées jusqu'à 80% de confluence dans un pétri de 100 mm (Nunc) et transfectées avec 10 µg d'ADN plasmidique précipité au calcium phosphate. En bref, l'ADN est resuspendu dans 1 mL de CaCl₂ 125 mM final. Le précipité est formé en mélangeant la solution d'ADN à 1 mL de solution HBS (HEPES 50 mM à pH 7,05, KCl 10 mM, glucose 12 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM). Après 5 min d'incubation à

température ambiante, le précipité de 2 mL est ajouté aux cellules qui sont remises 24 H en culture. Après cette période, le surnageant des cellules est aspiré et remplacé par 10 mL de milieu. Les cellules sont remises en culture pendant 24 H. Puis les cellules sont récoltées en les détachant avec une spatule de caoutchouc et centrifugées 5 min à 1000 rpm. Celles-ci sont resuspendues dans 10 mL de PBS 1X et centrifugées 5 min à 1000 rpm et ce, deux fois.

En ce qui concerne la localisation d'Ahi, les cellules sont transfectées comme ci-dessus avec 10 µg de pEGFP-Ahi-1 ou pEGFP en contrôle. Vingt-quatre heures après transfection, le surnageant des cellules est aspiré et remplacé par 10 mL de milieu. Quarante-huit heures après transfection, les cellules sont observées au microscope à inversion (Axiophot, Zeiss) aux grossissements 20X et 40X et des photos sont prises à l'aide d'une caméra et numérisées par le logiciel NorthernEclipse.

6 EXTRACTION DES PROTÉINES

Les cellules sont resuspendues dans 500 µL de tampon de lyse Brij 96 (Tris-HCl 25mM à pH 7,6, NaCl 150 mM, Brij 96 1% (Sigma), EDTA (disodium ethylenediaminetetra-acetate dihydrate) 5mM et différents inhibiteurs de protéases : Aprotinine 2 µg / mL (Sigma), Leupeptine 2 µg / mL (Sigma), Pepstatine 1µg / mL (Sigma), et TLCK 50µg / mL (Sigma), et inhibiteurs de phosphatases: NaVO₄ 2mM (Sigma) et NaF 5mM (Fisher). Après une incubation de 30 min sur glace, s'en suit une centrifugation à 12500 rpm et à 4°C afin de clarifier le lysat protéique. Les concentrations protéiques sont ensuite déterminées par dosage colorimétrique selon la méthode de micro-BCA (Bicinchoninic Acid, Pierce) en respectant les recommandations du manufacturier.

7 ÉLECTROPHORÈSE ET TRANSFERT DES PROTÉINES

7.1 Électrophorèse des protéines

Une quantité moyenne de 150 µg de protéines est resuspendue dans un volume approprié de tampon de chargement (Tris 200 mM à pH 6,8, dodécyl sulfate de sodium (SDS) 2%, glycérol 20%, Bleu de bromophénol 0,015%, β-mercaptoéthanol (Sigma) 1.43 M) et dénaturée 5 min à 90°C. Les protéines sont ensuite chargées sur gel dénaturant de polyacrylamide avec une concentration en polyacrylamide (de 7,5 à 10%) adaptée à la ou les protéines étudiée(s). Ceux-ci contiennent une concentration finale en SDS de 0.1%. La migration est effectuée à 80V en utilisant un appareil électrophorétique de Biorad ("Mini-PROTEAN II") jusqu'à sortie du bleu.

7.2 Electrotransfert des protéines sur membrane

Le gel est équilibré dans la solution d'anode II (Tris-HCl 25 mM à pH 10,4) pendant 10 min. Pendant ce temps la membrane PVDF (polyvinylidène difluoride) Immobilon (Millipore) de 10 x 6.5 cm est immergée 30 sec. dans 20 mL de méthanol et équilibrée 5 min dans 100 mL de solution d'anode II. Le transfert semi-sec est réalisé grâce à l'appareil de Schleicher and Schuell dont le montage "en sandwich" s'ordonne comme suit: i) en contact avec l'anode en graphite, préalablement humidifiée avec la solution d'anode I (Tris-HCl 0,3M à pH 10,4), sont déposées 2 feuilles absorbantes (Schleicher & Schuell) équilibrées antérieurement 3 min dans 50 mL de solution d'anode I. ii) en contact avec les deux feuilles d'anode I est déposée une feuille absorbante équilibrée comme précédemment, mais dans la solution d'anode II. iii) ensuite est déposée la membrane, puis le gel. iv) sur le gel sont mises trois feuilles absorbantes équilibrées dans la solution de cathode (Tris-HCl 25 mM à pH 9,4, Glycine 40 mM). v) enfin la cathode en graphite, équilibrée avec de la solution de cathode, est mise en place. Le

transfert se déroule à 100 mA constant (par membrane de 60 cm²) pendant 1 heure.

7.3 Le buvardage de type Western

La membrane est séchée 15 min à l'air libre puis traitée au méthanol. Celle-ci est ensuite plongée 5 min dans 100 mL d'eau. Enfin, la membrane est équilibrée 10 min dans 50 mL de TBS (tampon tris-salin) (Tris-HCl à 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM) contenant du Tween à 0.2% (v/v) (TBST). La membrane est bloquée différemment en fonction de l'anticorps utilisé.

7.3.1 Immunoblot anti-Ahi

La membrane est bloquée dans 100 mL de TBST contenant 4% (p/v) de lait écrémé et 1% de BSA-fraction V, deux heures à température ambiante avec une faible agitation. La liaison de l'anticorps primaire est effectuée en incubant la membrane dans 10 mL de TBST contenant 0,4 % de lait et 0,1% de BSA et 5 µL d'anticorps anti-Ahi-1 (1824-1 Bl. 4), deux heures à température ambiante. La membrane est ensuite lavée quatre fois dans 50 mL de TBST contenant 0,4 % de lait et 0,1% de BSA. Le marquage secondaire est réalisé pendant 45 min à température ambiante avec un anti-IgG de lapin couplé à HRP (péroxydase du raifort), généré chez la chèvre (Sigma), utilisé à une dilution de 1.5/10000 dans 10 mL de TBST contenant 0,4% de lait et 0,1% de BSA. La membrane est rincée une fois dans 50 mL de TBST puis quatre fois dans du TBS à raison de 10 min par rinçage. Le marquage est révélé avec le substrat luminogène de la trousse "Renaissance" (NEN) puis exposé au contact d'un film X-OMAT (Kodak).

7.3.2 Immunoblot anti-phosphotyrosine

La membrane est bloquée dans 100 mL de TBST contenant 3% (p/v) de BSA-Fraction V (Boehringer-Mannheim), 30 min à température ambiante. La liaison de l'anticorps primaire est effectuée en incubant la membrane dans 10 mL de TBST contenant 0.3% de BSA et 9 µL d'anticorps anti-phosphotyrosine 4G10, 2 heures à température ambiante. La membrane est

ensuite lavée quatre fois dans 50 mL de TBST, à raison de 5 min par lavage. Le marquage secondaire est réalisé pendant 45 min à température ambiante avec un anti-IgG de souris couplé à HRP, générée chez le lapin (Dakko), utilisé à une dilution de 1,5/10 000 dans 10 mL de TBST contenant 0.3% de BSA. La suite du protocole se déroule comme décrit çï-dessus (Cf. section 7.3.1, II-*Matériel et Méthode*)

8 IMMUNOPRÉCIPITATION

Pour chaque immunoprécipitation, 1 mg de protéine est mélangé à 10 µL de sérum (anti-Ahi-1 (1824-1 Bl. 4), sérum pré-immun en contrôle, anti-Nef) et 20 µL d'un mélange 50% de billes d'agarose couplées à des protéines G (Sigma). Après 12 heures d'immunoprécipitation, les billes sont sédimentées au fond du tube par centrifugation rapide de 30 sec à 4°C (MicroCentrifuge 235C, FisherScientific). Celles-ci sont ensuite soumises à trois cycles de lavage dans 200 µL de tampon de lyse Brij 96 et centrifugation afin de rincer les billes. Les billes sont resuspendues dans 50 µL de tampon de chargement et les protéines sont dénaturées (Cf. section 7.1, II-*Matériel et Méthodes*). Les billes sont ensuite sédimentées au fond du tube par centrifugation, 3 min à 12500 rpm (Sorval MC12V), puis le surnageant est déposé sur gel évitant les billes lesquelles peuvent altérer la migration.

9 TEST D'ACTIVITÉ KINASE

Après 12 heures d'immunoprécipitation, les billes sont sédimentées au fond du tube par centrifugation (MicroCentrifuge 235C, FisherScientific) rapide de 30" à 4°C. Après un lavage dans 200 µL de tampon de lyse Brij 96, celles-ci sont soumises à trois lavages dans 200 µL de tampon TN (Tris-HCl 50 mM à pH 7,2, NaCl 150 mM). Ce protocole est une version adaptée de

celui réalisé par B. Sefton (2000). A la fin de ces différentes étapes de lavages, l'immunoprécipitat est resuspendu dans 10 μ L de tampon de kinase : PIPES (piperazine-*N*, *N'*-bis [2-ethanesulfonic acid]) 40 mM à pH 7,0, $MnCl_2$ 10 mM. L'échantillon est gardé sur glace jusqu'à utilisation. L'essai kinase est réalisé en ajoutant à l'échantillon 10 μ L de tampon de kinase contenant 10 μ Ci, soit 1 μ L de [γ ^{32}P]-ATP (adénosine triphosphate). Les billes sont mises en suspension et le test d'activité kinase est effectué par une incubation de 10 min à 30°C. La réaction est arrêtée par ajout de 1 mL de tampon TN contenant 0.01% de NP40 (Sigma). Les billes sont centrifugées 30" à 12500 rpm et le surnageant est aspiré. Les billes sont finalement resuspendues dans 50 μ L de tampon de chargement et soumises à une électrophorèse comme décrit antérieurement (Cf section 7.1, II-*Matériel et Méthodes*). Après migration le gel est déposé dans 100 mL de solution de fixation (isopropanol 20%, acide acétique 10%) et incubé 10 min à température ambiante. Le gel est ensuite coloré afin de visualiser les protéines, dans 100 mL de solution de coloration (Acide acétique 10% (v/v), Bleu de Coomassie-G520 (Sigma) 0.012% (p/v)) et ce pendant 30 min à température ambiante. Enfin les protéines sont révélées par plusieurs lavages successifs dans une solution de décoloration (Acide acétique 10% (v/v)). Le gel est ensuite séché 45 min à 80°C (Gel dryer 583, Biorad) puis exposé dans une cassette de phosphorimager-Storm et analysé.

10 ANALYSE DES SITES DE PHOSPHORYLATIONS

Après le test d'activité kinase et migration dans un gel de polyacrylamide dénaturant, les protéines sont transférées sur membrane comme décrit précédemment (Cf. section 7.2, II-*Matériel et Méthodes*). Après le transfert, la membrane est exposée au contact d'un film X-OMAT (Kodak) afin de repérer les protéines marquées au ^{32}P . Après repérage des bandes, celles-ci sont découpées à l'aide d'une lame de rasoir et déposées

individuellement dans un microtube (Eppendorff). Le reste de l'expérience est réalisée en grande partie par Mathieu Arcand, étudiant dans le laboratoire du Dr Sylvain Meloche. Chaque membrane est humidifiée avec 200 μ L de méthanol pendant 30 sec, puis agitée au vortex durant une minute. Le méthanol est jeté puis remplacé par 800 μ L d'eau afin de réhydrater la membrane. Celle-ci est à nouveau agitée au vortex pendant une minute. Le surnageant est jeté puis la membrane est lavée deux fois avec 1 mL d'eau. Enfin sont ajoutés 200 μ L d'HCl 5,7N et la membrane est incubée dans cette solution à 110°C durant 60 min afin d'hydrolyser les protéines. Les tubes sont refroidis sur glace et le surnageant recueilli. Ce dernier est déposé dans un microtube propre percé au niveau du bouchon et est lyophilisé durant 2 H. Le culôt asséché est dissout dans 6 μ L de tampon de migration (Acide formique, acide acétique, pyridine). Chaque extrait est déposé sur plaque de cellulose (EM Science) pour chromatographie sur fine couche et mis à migrer 45 min à 20 mA. La plaque est séchée à température ambiante et les standards de migration (phosphotyrosine, phosphosérine, phosphothréonine) sont visualisés par pulvérisation de ninhydrine 0,25%. La plaque est ensuite exposée dans une cassette de phosphorImager (Molecular Dynamics).

11 CRIBLAGE DES SOURIS TRANSGÉNIQUES CD4C/AHI-1

11.1 Obtention de l'ADN génomique de souris

Les souris transgéniques CD4C/AHI-1 générées préalablement dans le laboratoire par Benoit Laganière et Michel Robillard, sont croisées avec des souris de souche C3H (Charles River). Les souris âgées de 21 jours sont criblées afin de savoir si celles-ci ont intégré le transgène à leur génome. Un centimètre de queue est prélevé, déposé dans 500 μ L solution de lyse (Tris 100 mM à pH 8,0, EDTA 5 mM, SDS 0,2%, NaCl 200 mM, protéinase K à 100 μ g / mL (Boehringer Mannheim)), dans une plaque de 96 puits (Beckman) et incubé une nuit à 65°C, sous rotation constante. Le lysat est

ensuite clarifié par centrifugation à 2500 rpm, à une température de 30°C. Le surnageant est transféré dans une nouvelle plaque de 96 puits. L'ADN est précipité en rajoutant 500 µL d'isopranoanol et le précipité est centrifugé à 2500 rpm à température ambiante. L'ADN est resuspendu durant une nuit à 65°C dans 200 µL de TE (Tris 10 mM à pH 8,0, EDTA 1 mM).

11.2 Digestion de l'ADN génomique et électrophorèse

Pour une digestion d'environ 20 µg d'ADN, 25 µL de la solution d'ADN en suspension obtenue précédemment sont mélangés à 5 µL de spermidine 0,1 M, 50 unités d'enzyme *BamH* I (New England Biolab), 8 µL de tampon de digestion (Gibco) et 50 µL d'eau bidistillée dans un volume final de 100 µL. La réaction de digestion est effectuée durant quatre heures à 37°C. La digestion terminée, 8 µL de tampon de chargement (bleu de bromophénol 0,25%, xylène cyanol 0,25% glycérol 30%) sont ajoutés au 100 µL précédents. 80 µL de cette dernière solution sont déposés sur gel d'agarose 1% (20 x 23 cm) puis soumis à une migration à 50 V pendant 16H dans du tampon de migration TAE 1X (Tris 40 mM à pH 7,7, acétate de sodium 5 mM, EDTA 1 mM).

11.3 Transfert sur membrane

Après migration, le gel est incubé 30 min dans un bain de dénaturation (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) puis équilibré pendant 30 min dans environ 1 L de solution de neutralisation (Tris 0,5 M à pH 7,0, NaCl 3 M). L'ADN est ensuite transféré sur membrane selon la méthode de Southern (). En effet, le gel est déposé sur 6 feuilles de papier (3 MM, Whatman) saturées de solution SSC (Salt Sodium Citrate) 20X (NaCl 3M, citrate de sodium 0,3M, pH 7,0). Le gel est recouvert par une membrane de nylon d'une épaisseur de 0,45 µm (MSI) humidifiée à l'eau nanopure. Celle-ci est recouverte d'une feuille de papier (1MM, Whatman) humidifiée à l'eau nanopure. Le tout est recouvert de 10 cm de papier absorbant et d'un poids. Le transfert dure ainsi au

minimum 4H. Le transfert terminé, la membrane est séchée 10 min à 65°C et l'ADN fixé aux U.V. pendant 3 min

11.4 Hybridation

Une fois l'ADN fixé à la membrane de nylon, cette dernière est réhumidifiée avec de l'eau nanopure, puis préhybridée dans 10 mL de solution de Denhart (SSC 5X, SDS 0,5%, Denhart 5X (fait à partir d'une solution Denhart 100X (Ficoll 400 10g, polyvinylpyrrolidone 10g, BSA-fraction V 10g, eau qsp 500 mL)) contenant 200 µL de sperme de saumon soniqué, à 2,5 mg / mL et préalablement dénaturé 3 min à 100°C. La préhybridation est effectuée à 65°C durant 2H. Pendant la préhybridation la sonde est marquée : 200 ng du fragment EcoRI de 2 Kb d'ADNc d'Ahi-1, issu du plasmide pGEM3 Ahi-1 4,6 Kb, dans 8 µL d'eau bidistillée sont dénaturés 3 min à 100°C puis mis sur glace afin de conserver l'état monocaténaire de l'ADN. La sonde est marquée radioactivement avec 1µL de [α -³²P]dATP et 1µL de [α -³²P]dCTP (DuPont NEN) en présence d'hexamères oligonucléotidiques aléatoires et 1 µL de fragment kleenow de la polymérase I de l'ADN (trousse "Oligolabelling kit", Pharmacia Biotech). Après 2H d'incubation à température ambiante, 4 µL d'ARNt (5 mg/mL) et 55 µL de NaCl 0,3 M sont ajoutés. 2 µL de cette solution sont ajoutés à 1 mL de la solution de précipitation (Acide trichloroacétique 12,5%, sodium pyrophosphate 10 mM) et ce à température de la glace. Cette solution est filtré sur un disque de membrane de nylon (MSI) puis rincée à l'acide trichloroacétique 5%. Le filtre est mis dans 10 mL de liquide à scintillation et l'activité spécifique déterminée à l'aide d'un compteur de particules β .

La sonde est précipitée avec 200 µL d'éthanol 95% et incubée 20 min sur la carboglace. Après centrifugation de la sonde, celle-ci est resuspendue dans 100 µL de TE. La membrane est mise dans 10 mL de solution de Denhart contenant 200 µL de sperme de saumon dénaturés et 100 µL de sonde dénaturée 3 min à 100°C. L'hybridation dure tout une nuit à 65°C.

11.5 Rinçages de la membrane et exposition

La solution d'hybridation est jetée. La membrane est incubée deux fois durant 10 min à température ambiante dans la solution SSC 2X. Ensuite, celle-ci est lavée une heure à 65°C dans la solution SSC 0,1X, SDS 0,15%. Enfin, la membrane est rincée abondamment avec la solution SSC 0,1X. Après avoir séchée la membrane 10 min à 65°C, cette dernière est exposée 16 H. au contact d'un film X-OMAT (Kodak) à -80°C puis révélée.

12 EXPRESSION DE L'ARNm D'AH1-1 DANS LES SOURIS CD4C/AH1-1

12.1 Extraction de l'ARN

Après sacrifice de la souris par asphyxie au CO₂, le thymus, la rate et le rein sont prélevés et déposés dans du PBS 1X sur glace. Les organes sont ensuite découpés en portion de 50 à 100 mg puis congelés directement dans l'azote liquide. Enfin ceux-ci sont stockés à -80°C jusqu'à extraction de l'ARN. Lors de l'extraction de l'ARN, une pièce d'organe de 50 à 100 mg est décongelée directement dans 1 mL de Trizol (Gibco BRL). Le protocole d'extraction est conforme aux recommandations du manufacturier. En bref, l'organe est broyé et homogénéisé pendant 30 sec. à l'aide d'un broyeur d'organe ou TISSUMIZER (Tekmar). Après une incubation de 5 min à température de la pièce, 200 µL de chloroforme sont ajoutés. Après une agitation vigoureuse et une incubation supplémentaire de 3 min, le mélange ainsi obtenu est centrifugé (MicroCentrifuge 235C, Fisher Scientific) pendant 15 min à 12500 rpm à 4°C. La phase supérieure est recueillie et additionnée à 500 µL d'isopropanol afin de précipiter l'ARN total. Après une incubation de 10 min à température de la pièce et une centrifugation de 10 min à 12500 rpm à 4°C, le culôt d'ARN est lavé dans 1 mL d'éthanol 75% puis centrifugé à nouveau à 7500 rpm à 4°C pendant 5 min. Le culôt d'ARN asséché à l'air libre pendant 10 min, est resuspendu dans 50 µL d'eau traitée avec 0,1%

(v/v) de DEPC (diéthylpyrocarbonate). La concentration en ARN est déterminée par dosage spectrophotométrique à 260 nM.

12.2 Électrophorèse de l'ARN, transfert sur membrane et hybridation

Après détermination de la quantité d'ARN, 15 à 20 µg d'ARN contenus dans 4,5 µL d'eau DEPC sont mélangés à 11,5 µL de tampon de chargement (glycérol 12,5%, EDTA 0,25 mM, bleu de bromophénol 0,02% (p/v), xylène cyanol 0,02% (p/v), formaldéhyde 7,4%, formamide déionisée, MOPS 1,5X). Après une incubation à 65°C durant 15 min, est ajouté 1 µL de bromure d'éthidium à 1mg/mL. Le tout est ensuite déposé sur un gel d'agarose 1% contenant du tampon MOPS 1X (MOPS (3-[N-Morpholino] acide propanesulfonique) 20 mM à pH 7,0, acétate de sodium 50 mM, EDTA 2 mM, DEPC 0,1% (v/v)), et 2% de formaldéhyde. L'électrophorèse est conduite à 120V dans le tampon de migration contenant du MOPS 1X et 2% de formaldéhyde. Le transfert sur membrane est réalisé comme précédemment en otant les étapes de dénaturation et renaturation. Les étapes d'hybridation et de lavages sont réalisées comme décrit plus-haut (Cf. sections 11.3, 11.4, 11.5, *II-Matériel et Méthodes*).

III-RÉSULTATS

1 PARTICIPATION D'AH1-1 A UN COMPLEXE COMPRENANT DES PROTÉINES PHOSPHORYLÉES SUR TYROSINES

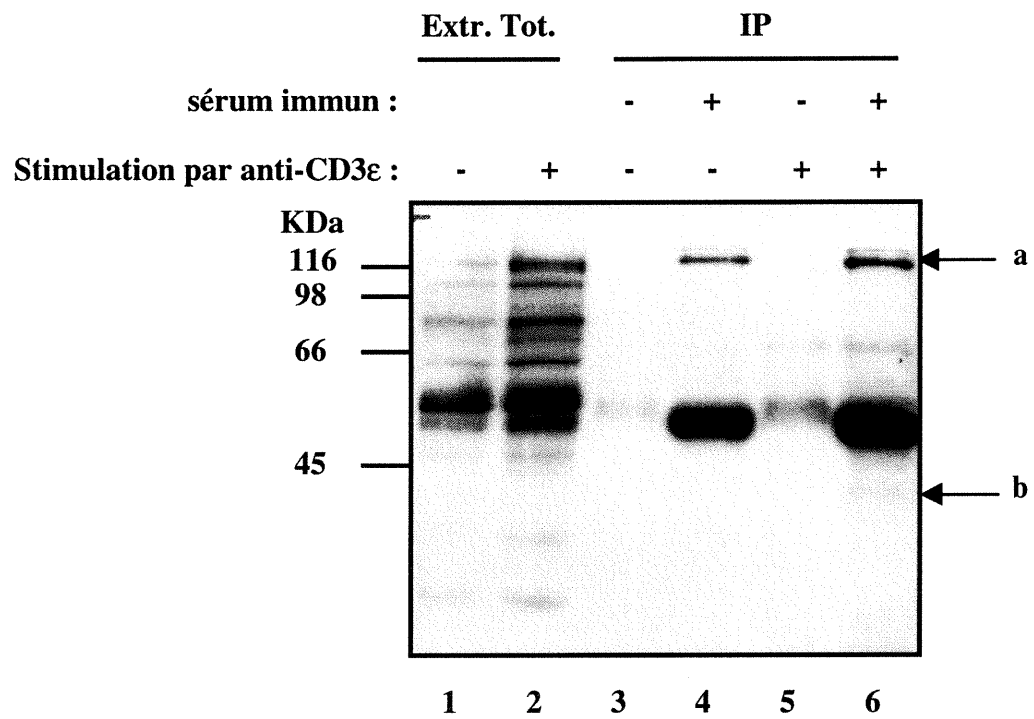
L'ARNm d'*Ahi-1* d'une taille de 5 Kb est exprimé dans le thymus murin. De plus, *Ahi-1* présente toutes les caractéristiques structurales d'une molécule de signalisation à savoir un domaine WD et SH3 (Jiang et al., *en préparation*). En outre, *Ahi-1* est la seule protéine découverte jusqu'à présent, qui contienne ces deux domaines. La modification majeure des protéines suivant l'interaction du TCR avec son antigène propre est la phosphorylation sur tyrosine. Compte tenu de l'implication hypothétique d'*Ahi-1* dans la signalisation induite par le TCR ; nous avons envisagé que celle-ci pouvait interagir avec des protéines phosphorylées sur tyrosine dans les thymocytes murins, subséquemment à l'activation via le TCR.

Des thymus de souris C3H ont été réduits à l'état de suspension cellulaire. Les thymocytes sont stimulés 5 min avec 7 µg d'anticorps anti-CD3ε murins monoclonaux à 37°C. La chaîne CD3ε est une unité du TCR ; l'utilisation d'un anti-CD3ε rapproche ou dimérise dans un même environnement deux TCRs mimant l'activation cellulaire par un antigène en initiant la cascade de phosphorylation. Après stimulation et extraction des protéines dans du tampon Brij 96, *Ahi-1* est immunoprécipité avec l'anticorps anti-*Ahi-1* 1824-1 B14. L'immunoprécipitat est dénaturé et les protéines chargées sur gel de polyacrylamide (7,5%) dénaturant. Les protéines sont transférées sur membrane et celles d'entre-elles qui sont phosphorylées sur tyrosine sont détectées par immunobuvardage de type Western avec un anticorps anti-phosphotyrosine (4G10) (Fig.3).

Après stimulation, des quantités plus importantes de protéines phosphorylées sur tyrosine apparaissent par rapport aux cellules non stimulées (Fig.3 pistes 1 et 2).

Figure 3 : La protéine Ahi-1 immunoprécipite avec des protéines phosphorylées sur résidus tyrosine dans les thymocytes murins. Les thymus de souris C3H sont prélevés et réduits à l'état de suspension cellulaire dans du milieu RPMI modifié (Cf. Section II *matériel et méthodes*). Après stimulation pendant 5 min avec 7 µg d'anti-CD3ε monoclonal murin à 37°C, les protéines sont extraites puis immunoprécipitées avec l'anticorps anti-Ahi-1 ou du sérum de pré-immunisation. Après SDS-PAGE, les protéines sont révélées à l'aide d'un anticorps anti-phosphotyrosine monoclonal (9 / 10 000, 4G10).

En contrôle, des protéines (Extr. Tot.) issues de cellules stimulées ou non, sont déposées sur gel. Les protéines immunoprécipitées par l'intermédiaire d'Ahi-1 (sérum immun +) avec (+) ou sans (-) stimulation sont indiquées par a) et b) et n'apparaissent pas avec un sérum de pré-immunisation (sérum -).



De plus, des protéines phosphorylées *de novo* sont visibles (Fig.3, piste2), en cohérence avec la dynamique des phosphorylations après initiation de la voie du TCR.

Il est mis en évidence Fig.3 qu'Ahi-1 interagit avec un doublet protéique de 120 KDa phosphorylées sur tyrosine de manière constitutive (piste 4, flèche a) et une protéine de 40 KDa après stimulation de la voie du TCR (piste 6, flèche b). Remarquons aussi la présence dans l'immunoprécipitat, une protéine à 70 KDa après stimulation du TCR. Cependant celle-ci semble être présente quand le sérum non-immun est utilisé. Aussi l'étude de celle-ci a été écartée. Le doublet de 120 KDa comigre avec Ahi-1 dans d'autres expériences (résultats non montrés). Il est à noter qu'il y a une protéine majeure de 55 KDa qui apparaît avant et après stimulation. Celles-ci sont possiblement les chaînes lourdes des immunoglobulines du sérum car elles se superposent exactement avec les mêmes chaînes colorées au bleu de Coomassie. Il est à noter que ces dernières ne se retrouvent pas dans le sérum de pré-immunisation ou seulement à de très faibles concentrations comme les pistes 3 et 5 le montrent. Dans des expériences ultérieures, nous avons émis l'hypothèse que la p55 pouvait être en fait Lck (57 KDa). Aussi avons-nous réalisé une réimmunoprécipitation de cette protéine. La protéine est immunoprécipitée quelque soit l'anticorps utilisée (anti-Lck, anti-Lat, anti-Ras, anti IgG) indiquant que cette protéine peut se lier aux protéines G. De fait, la p55 paraît être les immunoglobulines; celles-ci seraient phosphorylées sur tyrosine *in vivo* chez le lapin (résultats non montrés). Cependant il n'est pas exclu qu'une protéine de 55 Kb interagisse avec Ahi-1 et que celle-ci soit complètement masquée par le signal des immunoglobulines. Signalons l'existence d'autres protéines, en concentration plus faible, qui se retrouvent associées à Ahi-1 constitutivement (indépendamment de la stimulation via le TCR). Celles-ci ne sont détectables qu'après une longue exposition (résultats non montrés).

2 PARTICIPATION D'AH1-1 A UN COMPLEXE PROTEIQUE ARBORRANT UNE ACTIVITE PROTEINE-KINASE

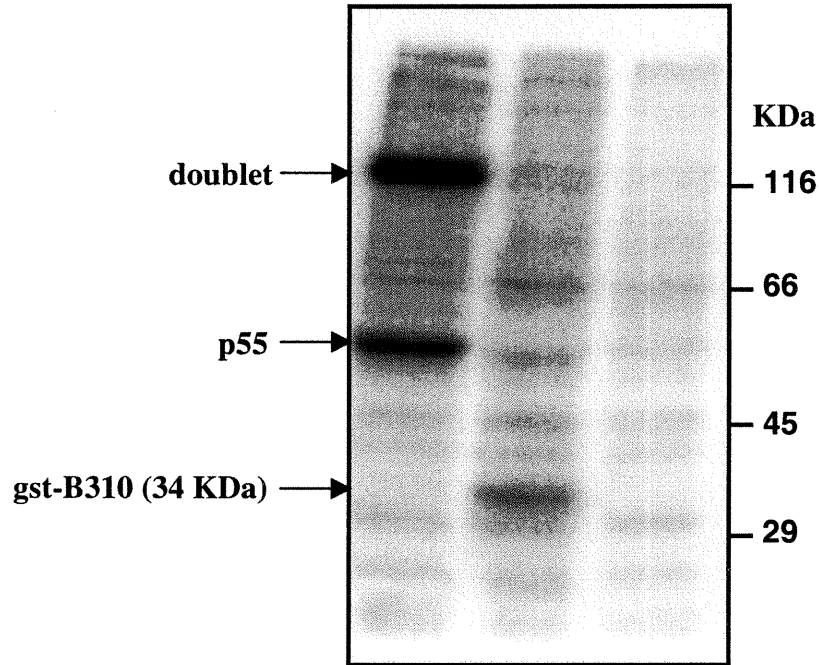
Ahi-1 présente toutes les caractéristiques d'une protéine adaptatrice notamment par la présence de deux domaines principaux d'interaction protéine-protéine WD et SH3. Dans la signalisation du TCR, ces adaptateurs permettent la concentration dans un environnement limité des effecteurs offrant une régulation fine et concertée de la signalisation (Rudd, 1999). Ces molécules font souvent le lien entre un substrat et une enzyme, une kinase par exemple. De plus, des résultats à confirmer, de transfection de cellules de thymomes murins laissent à penser qu'une surexpression d'Ahi-1 pourrait augmenter le seuil basal de phosphorylation des tyrosines. Aussi, avons-nous réalisé un essai kinase afin de mettre en évidence une telle interaction.

Des protéines de thymocytes murins ont été extraites et Ahi-1 immunoprécipité afin de réaliser l'essai kinase (Cf. section 9, II *Matériel et Méthodes*).

La figure 4 met en évidence la participation d'Ahi-1 à un complexe protéique présentant une activité kinase, par l'apparition de protéines phosphorylées *de novo* (piste 1) : un doublet protéique à 120 KDa, un autre doublet à 55 KDa dont le degré de séparation entre les deux bandes protéiques varie considérablement d'un gel à l'autre (doublet peu visible ici). L'intégration d'Ahi-1 dans un complexe comprenant une kinase est démontrée par les faits suivants : i) une immunoprécipitation avec du sérum de pré-immunisation ne révèle aucune activité kinase (piste 2), ii) l'activité kinase est absente quand l'immunoprécipitation est réalisée en ajoutant 2 µg de peptide ayant permis de générer l'anticorps anti-Ahi-1 (1824-1 B14) en compétition avec Ahi-1, (piste 3). Nous nous concentrerons par la suite sur les bandes majoritaires.

Figure 4 : Participation d'Ahi-1 à un complexe présentant une activité kinase dans les thymocytes murins. Après extraction des protéines 1 mg de protéine est utilisée pour chaque condition d'IP laquelle est suivie d'un essai kinase *in vitro* et une migration sur gel de polyacrylamide dénaturant (10%). La piste 1 correspond à une IP avec un anticorps anti-Ahi-1 (1824-1 B14). La piste 2 est le résultat d'une IP avec l'anti-Ahi-1 en présence de l'épitope de celui-ci, gst-B310, ayant servi d'antigène pour générer l'anticorps anti-Ahi-1. Enfin la piste 3 représente le contrôle négatif à savoir une IP réalisée avec le sérum de pré-immunisation. Les protéines majoritaires nouvellement phosphorylées à savoir deux doublets de 120 KDa et 55 KDa sont indiquées par des flèches.

	1	2	3
Sérum immun:	+	+	-
Compétition:	-	+	-



3 AHI-1 EST UN DES SUBSTRATS DE LA KINASE PARTICIPANT AU COMPLEXE PROTEIQUE

Les résultats suggèrent qu'Ahi-1 est intégré à un complexe présentant une activité kinase dans les thymocytes murins. Nous savons en outre qu'Ahi-1 comigre avec le doublet de 120 KDa (résultats non-montrés). Un bon moyen pour montrer qu'Ahi-1 était un substrat d'une kinase, fut de profiter du marquage qu'offrait l'essai kinase. Ainsi après immunoprécipitation avec un anticorps anti-Ahi-1 à partir de protéines de thymocytes, un essai kinase sur l'immunoprécipité, puis une migration sur gel dénaturant, la bande de gel correspondant au doublet est excisée et laissée à diffuser dans du tampon de lyse Brij 96. Après deux jours de diffusion à température ambiante, des immunoprécipitations sont réalisées.

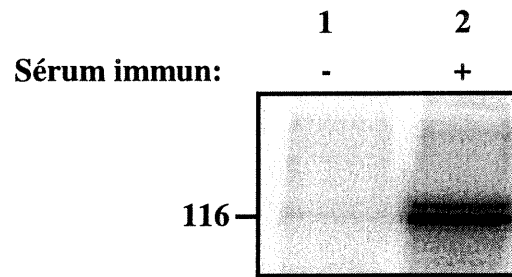
La figure 5B montre que le doublet de 120 KDa est Ahi-1 elle-même puisque celle-ci est immunoprécipitée avec deux anticorps anti-Ahi-1 (1783 et 1824.1 B14) dirigés contre des domaines différents de la protéine. De plus, un anticorps anti-Nef dirigé contre une protéine du virus de l'immunodéficiência humaine (VIH) ne peut immunoprécipiter Ahi-1, réalisant en quelque sorte un contrôle isotypique du sérum anti-Ahi. Nous n'avons trouvé dans les banques de données aucune homologie entre Ahi-1 et les domaines kinases connus. De plus des tests d'autophosphorylation d'Ahi-1 dans le cadre d'un essai kinase à même le gel se sont avérés négatifs (résultats non montrés). Aussi, dans le cadre des limites de nos expériences, nous avons écarté la possibilité qu'Ahi-1 soit elle-même une kinase.

Suite à l'identification du doublet de 120 KDa, nous avons voulu identifier par le même type d'expérience, le doublet à 55 KDa en l'immunoprécipitant avec divers anticorps spécifiques de protéines appartenant à la voie de signalisation du TCR présentant ce poids moléculaire apparent. Le doublet s'est retrouvé immunoprécipité non seulement avec tous les anticorps utilisés mais aussi avec les protéines G. Nous avons conclu que

ce doublet était la chaîne lourde des immunoglobulines de lapin. Cependant nous n'excluons pas qu'il puisse y avoir colocalisation avec d'autres protéines dont le signal serait masqué par celui des immunoglobulines.

Figure 5 : La protéine Ahi-1 est un substrat d'une (ou plusieurs) kinase(s) du complexe. La figure 5A représente schématiquement le protocole mis en place pour identifier Ahi-1. Des IPs avec 1 mg de protéines issues de thymocytes murins, suivies d'essais kinase *in vitro* avec 10 μ Ci d'ATP [α -³²P], ont été réalisées avec un anti-Ahi-1 (1824-1 B14) (piste 2) ou avec du sérum de pré-immunisation en contrôle (piste 1). Contrairement aux essais kinase antérieurs, le gel est exposé directement au contact d'un film durant une heure. Après repérage du doublet d'une taille de 120 KDa, la bande de gel le contenant est découpée puis laissée à diffuser durant deux jours dans du tampon de lyse Brij 96. Le surnageant a été de nouveau soumis à de nouvelles IPs. La figure 5B montre le résultat de ces IPs : i) en présence d'un premier anti-Ahi-1 (anti-Ahi-1 A ou 1783) dirigée contre la région entre les domaines WD et SH3 d'Ahi-1. ii) en présence d'un second anti-Ahi-1 (anti-Ahi-1 B ou 1824-1 B14). iii) en présence d'un anticorps anti-Nef généré similairement aux anti-Ahi-1, chez le lapin servant de contrôle négatif.

A)



1) Découpage du gel



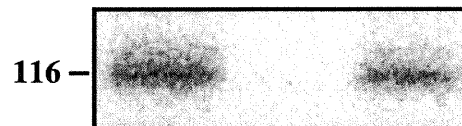
2) Diffusion des protéines

3) Immunoprécipitation

4) Migration sur gel de polyacrylamide

B)

IP avec anti: Ahi-1 (A) Nef Ahi-1 (B)



4 AHI-1 FAIT PARTIE D'UN COMPLEXE PROTEIQUE PRESENTANT UNE ACTIVITE KINASE SPÉCIFIQUE DES RÉSIDUS TYROSINES

4.1 Les phosphorylations sont résistantes au traitement alcalin

Jusqu'à présent, nous avons fait la preuve de l'intégration d'Ahi-1 à un complexe protéique arborant une activité kinase. En outre, nous avons déterminé qu'Ahi-1 était un substrat d'une (ou des) kinase(s) présente(s) dans ce complexe protéique. L'étape suivante était de préciser la spécificité de site de la kinase, c'est à dire quel(s) résidu(s), sérines, tyrosines ou thréonines elle phosphoryle. Après immunoprécipitation d'extraits de thymocytes murins avec un anticorps anti-Ahi-1 (1824-1 B14), l'immunoprécipitat est employé à un essai kinase (figure 6, partie de gauche). De façon reproductible, les doublets de 120 KDa et de 55 KDa sont mis en évidence lors d'une immunoprécipitation avec l'anti-Ahi-1 et ne se retrouvent pas avec le sérum de pré-immunisation. En seconde étape, le gel séché est immergé dans une solution de KOH 1M durant deux heures à 55°C. Le gel est ensuite séché une nouvelle fois, puis réexposé. Il est connu que la liaison des phosphates aux résidus thréonines et sérines est labile dans de telles conditions

La figure 6 (partie de droite) montre que les phosphorylations sont résistantes au traitement. Cette expérience préliminaire indique simplement que la kinase est sûrement spécifique des résidus tyrosines.

4.2 La kinase est spécifique des résidus tyrosine

Dans le but de mettre en évidence sans ambiguïté la spécificité de la kinase, nous avons entrepris d'identifier les phosphoaminoacides d'Ahi-1 et de la p55.

Après immunoprécipitation d'extraits protéiques de thymocytes murins à l'aide d'un anticorps anti-Ahi-1 (1824-1 B14) et un essai kinase (Fig. 7A), les bandes a, b, c sont découpées à même la membrane. Les protéines contenues à leur surface sont hydrolysées par un traitement à l'acide chlorhydrique. Les acides aminés issus de cette dégradation sont soumis à

une chromatographie sur fine couche de cellulose. Seuls les résidus contenant un phosphate radioactif incorporé lors de l'essai kinase sont visualisés.

La figure 7B montre que la quasi-totalité des résidus phosphorylés sont des tyrosines et ce pour les deux espèces analysées à savoir le doublet de 120 KDa et le doublet de 55 KDa. Aussi pouvons-nous affirmer que la kinase est spécifique des tyrosines. Par la même occasion, nous pouvons aussi avancer que la protéine Ahi-1 est phosphorylée sur tyrosine par la (ou les) kinase(s) du complexe protéique. Ceci est cohérent avec le fait qu'Ahi-1 contient deux sites consensus de phosphorylation sur tyrosine, situés en N-terminal et en C-terminal.

Figure 6: Étape initiale de l'identification des résidus phosphorylés par la kinase appartenant au complexe protéique contenant Ahi-1, dans les thymocytes murins. De manière analogue à l'expérience de la figure 4, après IP suivie d'un essai kinase (à gauche), le gel est soumis à un traitement au KOH 1M pendant 2 H à une température de 55°C., puis coloré au bleu de Coomassie, séché et enfin exposé dans une cassette de PhosphorImager. La piste 1 représente le contrôle négatif à savoir une IP avec du sérum de pré-immunisation, tandis que la piste 2 est le résultat d'une IP menée avec un anticorps anti-Ahi-1 (1824-1 B14). Les protéines précédemment décrites, indiquées par des flèches, présentent des phosphorylations résistantes au traitement alcalin (à droite).

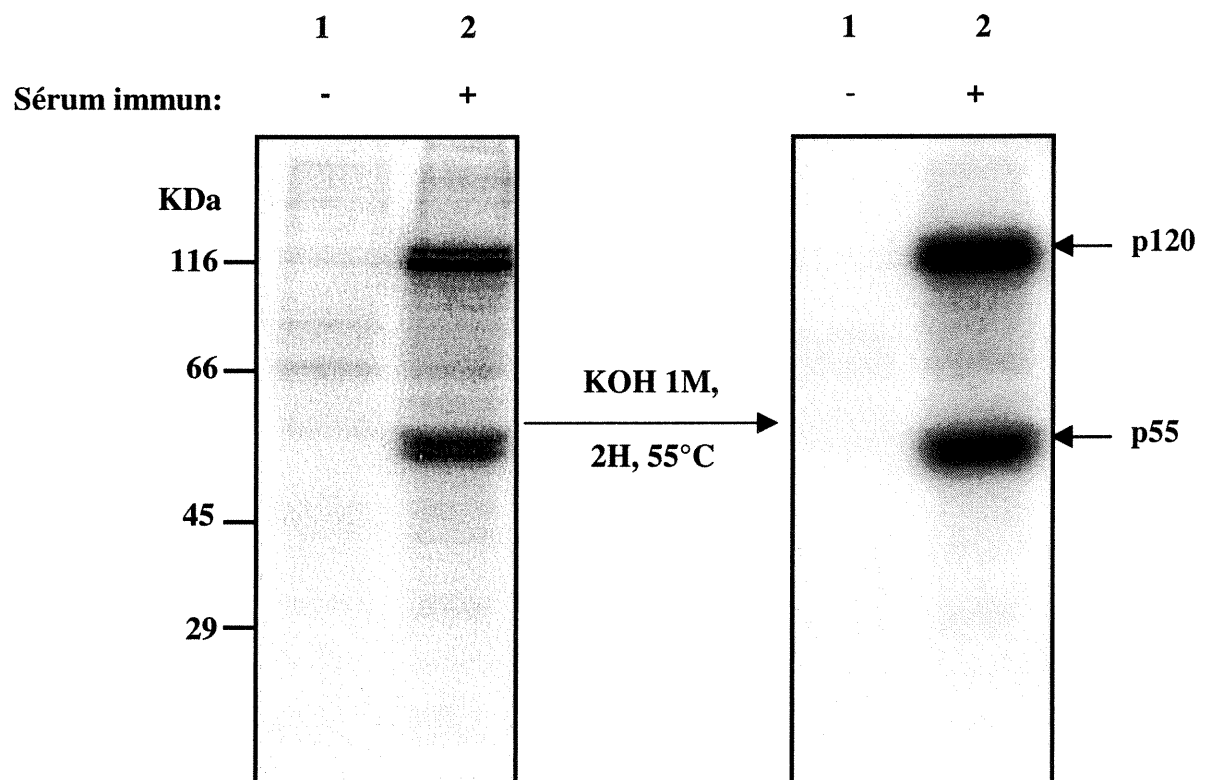
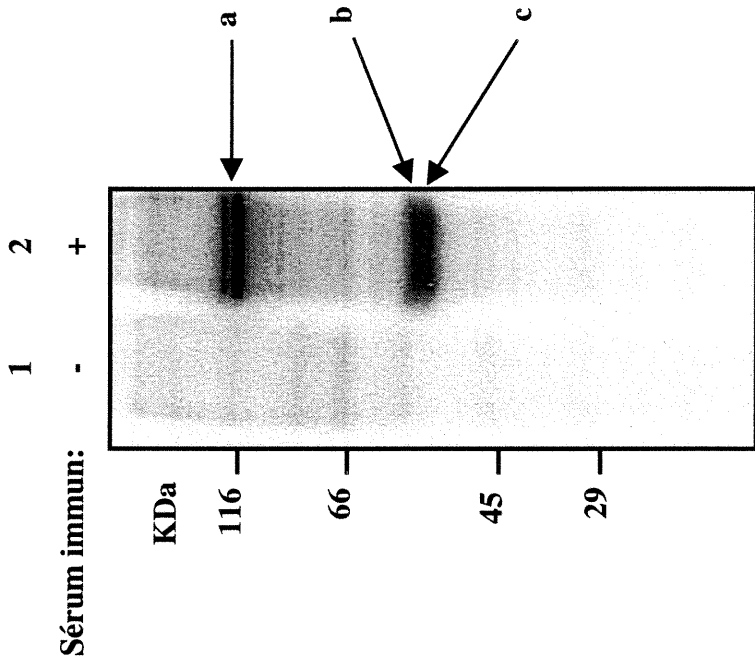
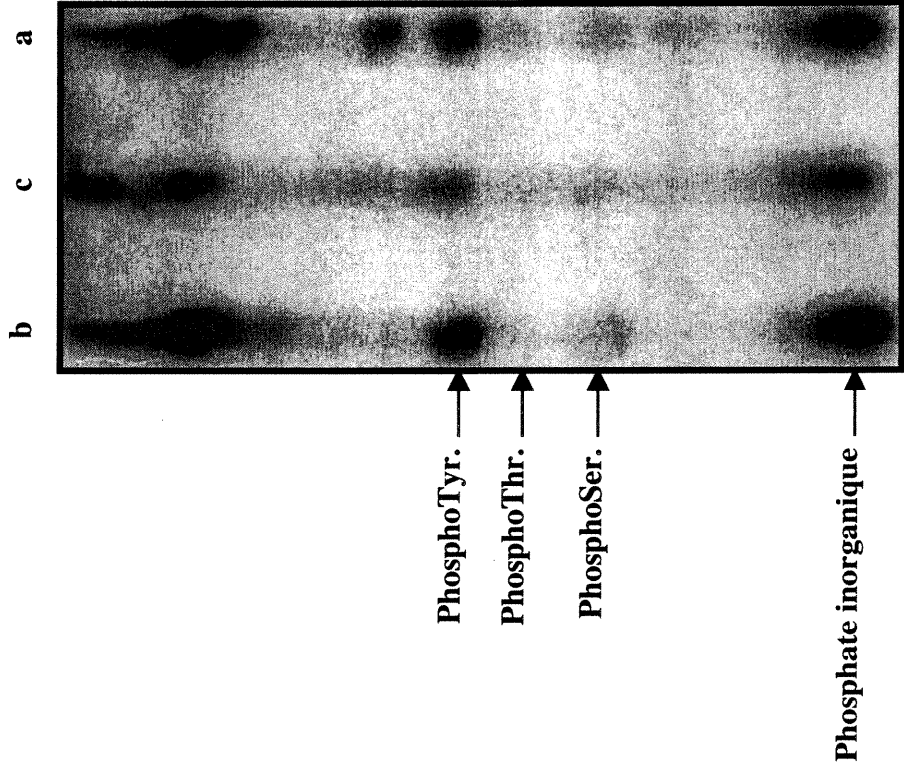


Figure 7 : Ahi-1 appartient à un complexe protéique présentant une activité kinase spécifique des résidus tyrosines. Les protéines de thymocytes murins ont été extraites dans du tampon de lyse Brij 96. Ahi-1 a ensuite été immunoprécipité à partir de 1 mg de protéines, avec 10 μ L d'anticorps anti-Ahi-1 (1824-1 B14). Un essai kinase *in vitro* a été réalisé à partir de l'immunoprécipitat avec 10 μ Ci d'ATP [α - 32 P]. Ce dernier a été dénaturé puis chargé sur gel de polyacrylamide (10%) dénaturant et les protéines transférées sur membrane PVDF. Après exposition de la membrane au contact d'un film X-OMAT (Kodak), les bandes correspondant aux protéines majoritairement phosphorylées sont récupérées. Celles-ci sont représentées sur la figure 7A désignées par les flèches a (120 KDa), b et c (doublet à 55 KDa; b est la protéine supérieure, c la protéine inférieure).

A)



B)



5 GÉNÉRATION DU MUTANT AHI-1^{ΔWD}

Ahi-1 interagit avec des protéines phosphorylées sur tyrosine de manière constitutive ou après stimulation de la voie de signalisation du TCR (p40). De plus, dans les thymocytes murins, Ahi-1 participe à un complexe présentant une activité kinase spécifique des résidus tyrosines. Nous avons démontré qu'Ahi-1 est un substrat de cette activité kinase. Dans le but de comprendre la fonction d'Ahi-1 dans la cellule T, il a été décidé de générer différents mutants d'Ahi-1 en particulier une protéine mutante délétée de son domaine WD et une autre délétée de son domaine SH3. Ces mutants devraient nous permettre dans un premier temps de situer les domaines d'interaction avec la kinase et avec les protéines phosphorylées sur tyrosine.

5.1 Construction du mutant Ahi-1^{ΔWD}

Le mutant Ahi-1^{ΔWD} a été délété de son domaine WD comme décrit précédemment (Cf. Section dans *Matériel et Méthodes*). Brièvement, l'ADNc d'Ahi-1 d'une taille de 3,55 Kb a été digéré par les enzymes de restriction *Eco* RI et *Pvu* I (fragment de 1,54 Kb), *Pvu* I se trouvant à la limite N-terminale du domaine. Puis ce même ADNc a été digéré par les enzymes *Acc* I (nt 2407) et *Xba* I. (fragment de 1,37 Kb) ; *Acc* I se trouve à la limite C-terminale du domaine. Les deux fragments ainsi générés sont ligaturés ensemble en utilisant un oligonucléotide d'adaptateur, soit dans le vecteur d'expression pcDNA3, soit dans le vecteur rétroviral pBabe puro. Les deux types de construction ont été séquencés afin de vérifier la conservation du cadre de lecture ouvert. Le mutant Ahi-1^{ΔWD} est schématisé figure 8.

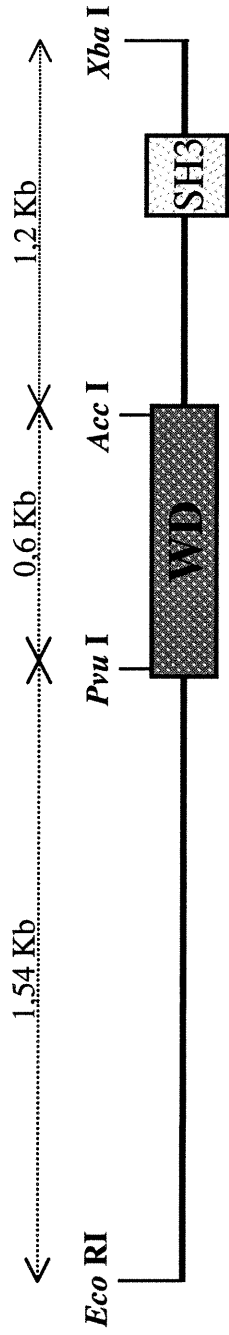
5.2 Expression du mutant Ahi-1^{ΔWD} dans les cellules 293T

Les cellules 293T ont été transfectées par précipitation au calcium/phosphate, avec 10 µg de chacune des constructions suivantes : pcDNA3 Ahi-1 3,55 Kb et pcDNA3 Ahi-1^{ΔWD}. Quarante-huit heures après

transfection, les cellules sont lysées. Ahi-1 et Ahi-1^{ΔWD} sont immunoprécipitées en utilisant l'anticorps 1824-1 B14 dirigé contre la partie

Figure 8 : Représentation schématique du mutant Ahi-1^{ΔWD}. L'ADNc d'Ahi-1 d'une taille de 3,55 Kb a été digéré par les enzymes de restriction *Eco* RI et *Pvu* I (fragment de 1,54 Kb), *Pvu* I se trouvant à la limite N-terminale du domaine. Puis ce même ADNc a été digéré par les enzymes *Acc* I (nt 2407) et *Xba* I. (fragment de 1,37 Kb) ; *Acc* I se trouve à la limite C-terminale du domaine. Les deux fragments ainsi générés sont ligaturés ensemble en utilisant un oligonucléotide *Pvu* I/*Acc* I faisant office d'adaptateur.

A) ADNc d'Ahi-1



B) Le mutant Ahi-1^{ΔWD}

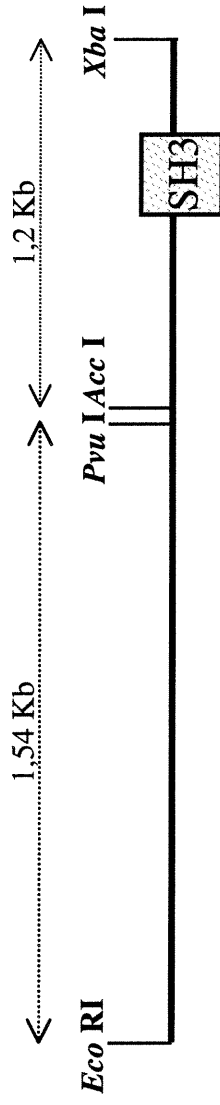
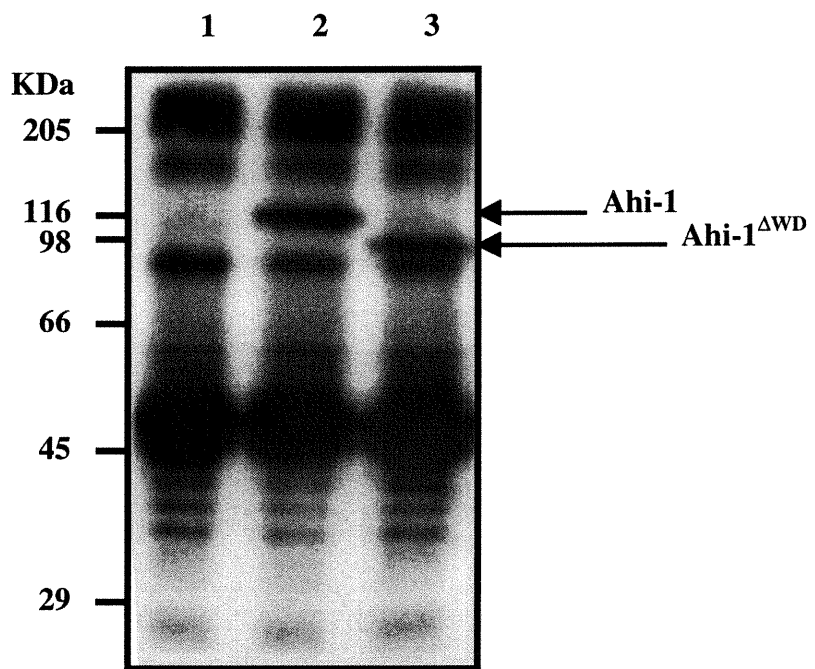


Figure 9 : Détermination de la taille apparente du mutant Ahi-1^{ΔWD}. Des cellules 293T ont été transfectées avec pcDNA3 ou pcDNA3-Ahi-1 ou pcDNA3-Ahi-1^{ΔWD}. Quarante-huit heures après transfection, les protéines sont extraites dans du tampon de lyse Brij 96 puis immunoprécipitées (avec l'anticorps anti-Ahi-1 1824-1 B14). Celles-ci sont ensuite soumises à une électrophorèse dans un gel d'acrylamide (10%) et transférées sur membrane. Les protéines Ahi-1 sauvage et mutante sont mises en évidence avec l'anti-Ahi-1 1824-1 B14. La protéine Ahi-1 apparaît aux environs de 120 KDa (piste2) alors que la protéine Ahi-1^{ΔWD} mutante migre à hauteur de 98 KDa (piste 3) en accord avec le témoin issu d'une transfection des cellules 293T transfectées avec le vecteur seul (piste 1).



C-terminale de la protéine, donc en dehors du domaine WD. Après migration et électrotransfert sur membrane, Ahi-1 et Ahi-1^{ΔWD} sont détectées en effectuant un immunobuvardage de type Western avec un anticorps anti-Ahi-1 (1824-1 B14).

La figure 9 met en évidence que la protéine mutante Ahi-1^{ΔWD} a un poids moléculaire apparent d'environ 98 KDa (piste 3). Ceci est cohérent avec la taille attendue, le domaine WD étant de 200 aa soit environ 20 KDa. La protéine Ahi-1 migre à hauteur de 120 KDa environ (piste 2) comparativement au contrôle représenté par des cellules 293T transfectées avec le vecteur pcDNA3 sans insert. La protéine AHi-1 endogène n'est pas détectée en accord avec des analyses northern réalisées antérieurement qui semblent montrer que le messenger Ahi-1 n'est pas présent dans les cellules 293T (résultats non montrés).

Nous avons également infecté des cellules T murines issues de thymomes avec des rétrovirus recombinants pBabe puro Ahi-1^{ΔWD}. Des résultats préliminaires indiquent que l'expression d'Ahi-1^{ΔWD} modifie à la baisse le profile de phosphorylation. Des études similaires sont en cours dans différentes lignées de cellules T en particulier les cellules humaines matures Jurkat qui demeurent le modèle le plus largement utilisé dans la compréhension de la voie de signalisation du TCR.

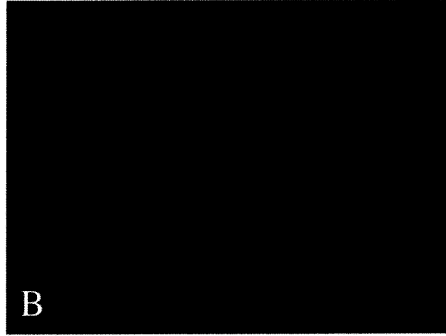
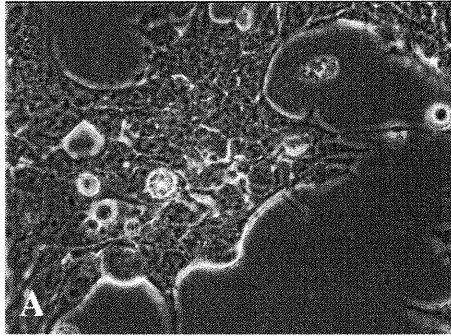
6 LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE LA PROTÉINE AHI-1

La fonction d'une protéine nouvelle est analysée classiquement en identifiant les protéines interagissant avec elle ainsi que ses modifications postraductionnelles. Une autre approche est de localiser subcellulairement la protéine d'intérêt. De plus Ahi-1 comporte trois domaines de localisation nucléaire NLS laissant présager une fonction hypothétique nucléaire. Dans le but de localiser Ahi-1, une protéine fusion GFP-Ahi-1 a été générée. La fusion ainsi générée dispose Ahi-1 proximement et GFP en position C-

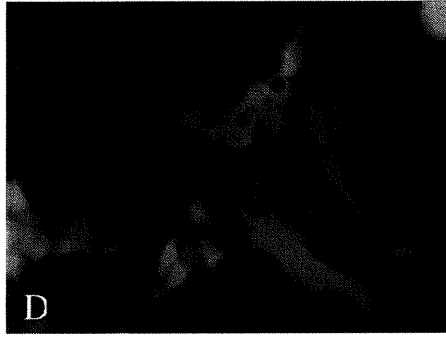
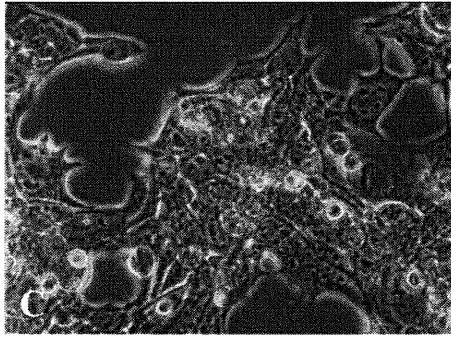
terminale d'Ahi-1. Le plasmide pEGFP-Ahi-1 a ensuite été transfecté dans les cellules 293T par précipitation au phosphate de calcium. Il en a été de même pour le vecteur nu pEGFP-N1, servant de contrôle. Quarante-huit heures après transfection, les cellules sont observées sous lumière UV .

Les cellules non transfectées ne sont pas visibles sous la lumière UV, elles ne contiennent pas de protéine fluorescente (Fig. 10B). Les cellules 293T transfectées avec pEGFP-N1, montrées à la figure 10D connaissent apparemment une coloration cytoplasmique (les noyaux sont visibles) due à la présence attendue de GFP dans le cytoplasme. Les cellules 293T transfectées avec pEGFP-Ahi ont une fluorescence hétérogène, semble t-il dans le cytoplasme (Fig. 10F, H). Aussi, il apparaît que la répartition d'Ahi-1 dans la cellule se fait en amas et ce de façon reproductible. Cependant une coloration du noyau serait nécessaire ainsi que l'utilisation des cellules à plus faible confluence permettant de mieux visualiser les contours et les modifications hypothétique de la répartition d'Ahi-1 lors de contacts cellulaires. Des transfections de pEGFP-Ahi-1 dans des cellules T (Jurkat) sont actuellement en cours afin de localiser Ahi-1 dans un environnement plus physiologique. De plus, nous inclueront dorénavant une coloration des noyaux au DAPI, permettant une superposition des fluorescences.

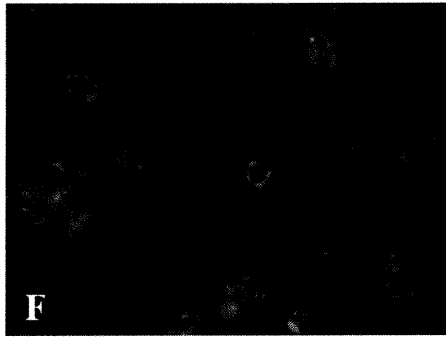
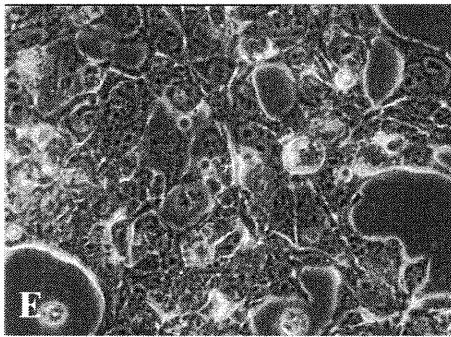
Figure 10 : Localisation d'Ahi-1 dans les cellules 293T par protéine de fusion GFP-Ahi-1. Afin de localiser Ahi-1 subcellulairement, 10 μ g du plasmide pEGFP-Ahi-1 ont été transfectés après précipitation au calcium/phosphate dans les cellules 293T. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules sont observées au microscope à inversion (Axiophot, Zeiss) à la lumière visible (partie de gauche) et UV (partie de droite) et les photos numérisées sont analysées à l'aide du logiciel NorthernEclipse. La figure 10 met en évidence la localisation de GFP seule (Fig. 10D) et d'Ahi-1 aux grossissements 20X (Fig. 10F) et 40X (Fig. 10H). Le contrôle représentant les cellules 293T non transfectées, est montré à la figure 10B.



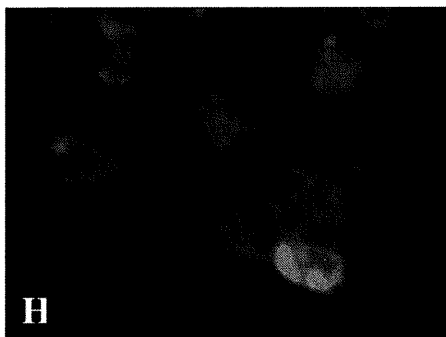
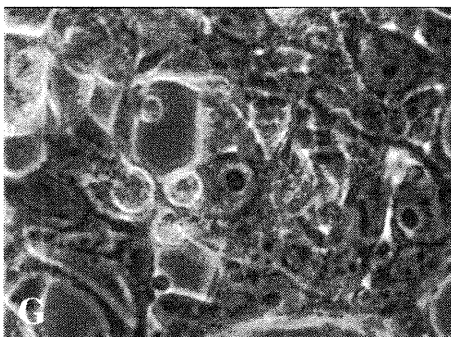
20X



20X



20X



40X

7 LES SOURIS TRANSGÉNIQUES CD4C/AHI-1

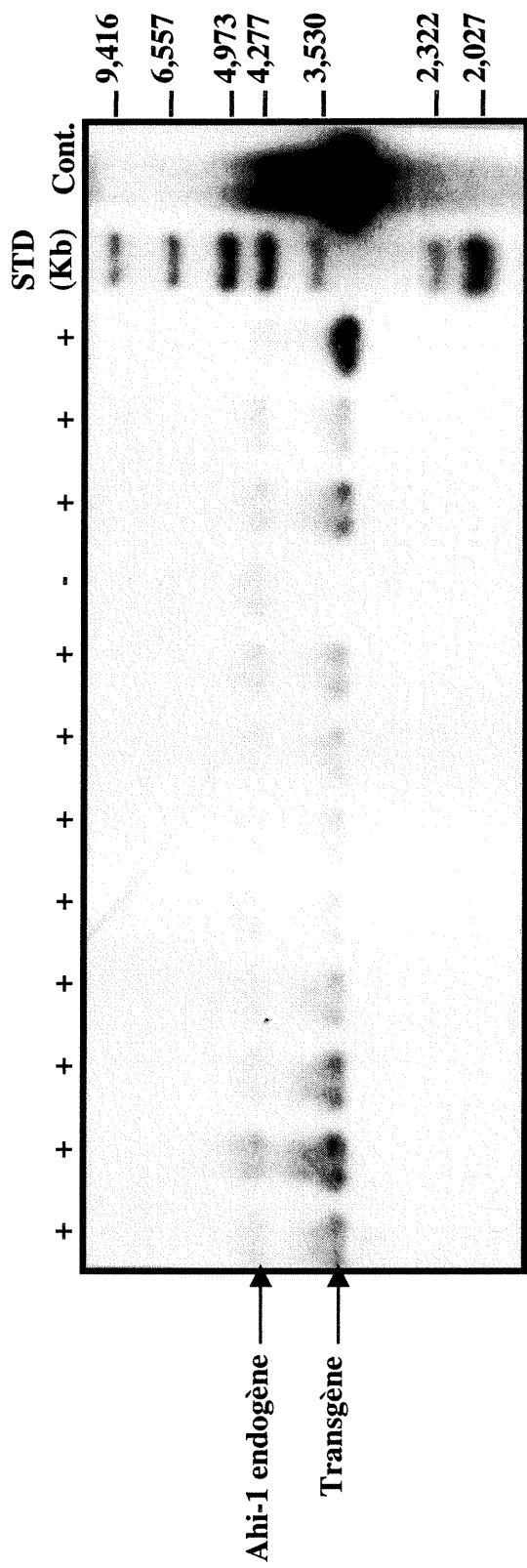
Les cellules T issues de thymomes induits par M-MuLV chez les souris transgéniques MMTV^D/Myc présentent un phénotype immature (Girard *et al.*, 1995). En effet, celles-ci sont DP CD4⁺CD8⁺, c'est à dire qu'elles expriment les protéines de surface CD4 et CD8. Ce stade précède le stade de maturation terminale dans le thymus où les cellules deviennent SP CD4⁺ ou CD8⁺. Le locus *Ahi-1* est occupé par un rétrovirus dans 14% des tumeurs. Aussi avons-nous suspecté qu'*Ahi-1* pouvait être un facteur progresseur de tumeur. Dans le but d'étudier une telle hypothèse *in vivo*, nous avons envisagé de surexprimer *Ahi-1* dans les cellules CD4⁺, par le biais du promoteur CD4C, mis au point et utilisé avec succès dans le laboratoire (Hanna *et al.*, 1994). Les souris CD4C/*Ahi-1* ont été générées dans le laboratoire. Brièvement, l'ADNc *Ahi-1* de 3,55 Kb a été introduit en aval du promoteur CD4C. lequel est une fusion entre le promoteur du gène CD4 humain, et des séquences régulatrices d'amont issues du promoteur du gène CD4 murin. La séquence de polyadénylation d'*Ahi-1* a été remplacée par celle du virus simien SV40. L'expression des transgènes par ce promoteur est spécifique aux cellules CD4⁺ : les cellules T immatures double-positives, les cellules T matures simple-positives CD4⁺ et les cellules de la lignée monocyte/macrophage qui expriment faiblement le marqueur de surface CD4.

7.1 Criblage des souris transgéniques CD4C/*Ahi-1*

Vingt et un jour post-partum, un centimètre de queue de chaque souris des trois différentes lignées obtenues (41865, 41899, 42717) est coupé. Après extraction de l'ADN génomique, le génotype des souris est effectuée par buvardage de type Southern. La figure 11 met en évidence que le gène *Ahi-1* endogène apparaît à une hauteur de 4,3 Kb alors que le transgène migre à hauteur de 3 Kb. Pour des raisons de simplicité, nous montrons ici un

buvardage de type southern pour la seule lignée 41899, les autres présentant un profile similaire.

Figure 11 : Criblage des souris transgéniques CD4C/Ahi-1. Les souriceaux issues du croisement des souris C3H et des souris transgéniques sont criblées vingt et un jours après leur naissance. Une portion de queue est coupée servant à obtenir facilement de l'ADN génomique. Vingt microgrammes de celui-ci sont ensuite digérés par l'enzyme de restriction *Bam* HI. Après migration dans un gel d'agarose 1%, l'ADN est transféré sur membrane de Nylon puis hybridé avec la sonde *Eco* RI de 2 Kb issue de pGEM3 Ahi-1 4,6Kb marquée à l'ATP [α - 32 P]. Le transgène *Ahi-1* est visualisé à une hauteur de 3 Kb, tandis que le gène *Ahi-1* endogène apparaît à 4,3 Kb. Ici est seulement représentée la lignée 41899.



Les souris transgéniques CD4C/Ahi-1 sont donc détectables par apparition des deux bandes tandis que seule la forme endogène d'Ahi-1 apparaît chez les souris non transgéniques.

7.2 Expression d'Ahi-1 des différentes lignées de souris CD4C/Ahi-1

7.2.1 Expression de l'ARNm

L'expression d'un transgène est modulée par son intégration. En effet, l'état de condensation de la chromatine régit la transcription des gènes. Aussi un transgène intégré dans la chromatine active ou euchromatine aura tendance à être beaucoup plus exprimé qu'un transgène intégré dans l'hétérochromatine. L'intégration se faisant *a priori* de manière aléatoire, nous avons entrepris de déterminer l'expression en ARNm de nos différentes lignées, préalablement à l'analyse phénotypique. Dans ce but, les souris sont sacrifiées entre 21 jours postnataux (date à laquelle elles sont criblées) et deux mois (début de la régression thymique).

Le thymus, le rein et dans certains cas la rate, sont prélevés, découpés et congelés à -80°C jusqu'à utilisation. L'extraction de l'ARN est effectuée dans du Trizol (GIBCO) en accord avec les recommandations du manufacturier (Cf.section 12.1, II-*Matériel et Méthodes*). Vingt microgrammes sont chargés et soumis à électrophorèse dans un gel d'agarose 1% dénaturant. Les ARNs sont ensuite transférés sur membrane de nylon et hybridés avec la sonde d'ADNc d'Ahi-1 *Eco* RI 2Kb marquée au ³²P.

La figure 12A représente l'expression du transgène Ahi-1 dans les organes où les cellules T exprimant la protéine de surface CD4, sont logées à savoir le thymus (T) et la rate (R). Le rein (Re) sert de contrôle interne négatif car celui-ci n'est pas un organe lymphoïde. L'expression a été réalisée dans les trois lignées de souris transgéniques : 41865, 41899, 42717. Nous avons inclus un contrôle positif, de l'ARN de cerveau de souris où le gène Ahi-1 est exprimé naturellement sous forme de deux messagers.

Figure 12 : Expression de l'ARN dans différentes lignées de souris transgéniques CD4C/Ahi-1. Vingt et un jours après la naissance, le thymus, le rein et dans certains cas la rate sont prélevés et soumis à l'extraction d'ARN total dans du Trizol. Vingt microgrammes d'ARN par organe sont chargés sur un gel d'agarose 1% et transférés sur membrane de Nylon, précédant une hybridation avec la sonde *Eco* RI de 2 Kb issue de pGEM3 Ahi-1 4,6 Kb marquée à l'ATP [α - 32 P]. La figure 12A représente l'expression du transgène Ahi-1 dans les organes dans lesquels le promoteur CD4C est actif à savoir le thymus (T) et la rate (R). L'ARN du rein (Re) sert de contrôle interne négatif. L'expression du transgène Ahi-1 est retrouvée à différents niveaux dans les souris transgéniques (Tg +) dans les différentes lignées (41865, 41899, 42717). En guise de contrôle positif, 20 μ g d'ARNm de cerveau (C) sont déposés sur gel et montrent les deux transcrits d'Ahi-1 dans ce tissu. La figure 12B est un contrôle qualitatif et quantitatif de l'ARN total extrait. En effet, avant le transfert sur membrane, les ARNs ribosomiaux colorés au bromure d'éthidium sont visualisés sous lumière UV. Les ARNs ribosomiques 28S et 18S servent de plus de standards de migration.

L'expression d'Ahi-1 est contrôlée dans les souris transgénique (Tg +) et non transgéniques (Tg -) issues de la même fratrie et ayant vécu dans la même cage. Enfin, les ARN ribosomiaux 28S et 18S sont présentés figure 12B et sont des contrôles internes. Ils permettent d'apprécier la qualité de l'extraction en particulier la dégradation et/ou la présence de contamination par l'ADN génomique. Ils favorisent la comparaison des expressions entre elles en la normalisant. Comparativement aux ARNs ribosomiaux, les deux lignées 41865 et 42717 expriment fortement le transgène dans le thymus. La lignée 41899 l'exprime très peu probablement due à une intégration dans une région de la chromatine moins active transcriptionnellement. Il est aussi observable comme attendu que le rein et les souris non transgéniques n'expriment pas le transgène. De plus, le transcrit endogène d'*ahi-1* de 5 Kb est parfois visible dans ces trois organes. Il est possible que compte tenu de son faible niveau d'expression dans certains organes, une certaine variabilité dans l'efficacité de transfert explique la difficulté de le détecter sur certaines membranes.

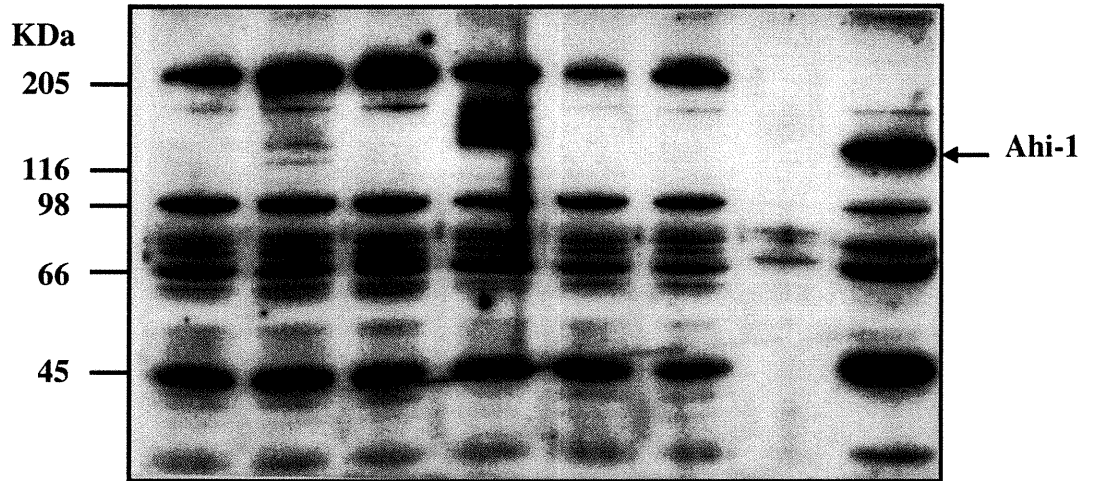
7.2.2 Expression protéique

L'expression du transgène au niveau transcriptionnel est un bon indice permettant de différencier les lignées de souris transgéniques de façon sommaire. Cela offre la possibilité de suivre facilement l'expression du transgène dans les différents organes suspectés. Cependant, il est un niveau de contrôle qui n'est pas pris en compte dans ce type d'expérience : la régulation de l'expression génique post-transcriptionnelle. Dans notre cas, il est improbable que l'expression du messager soit modulée au niveau traductionnel puisque les séquences non traduites de l'ADNc ont été excisées. Néanmoins, la demi-vie des protéines est contrôlée dans la cellule. En outre Ahi-1 comprend des séquences PEST impliquées dans la dégradation des protéines. Aussi avons-nous déterminé l'expression en protéine des différentes lignées de souris CD4C/Ahi-1.

Dans ce but, des thymus de souris transgéniques (Tg +) et de souris non transgéniques (Tg -) en contrôle ont été prélevés.

Figure 13 : Expression de la protéine Ahi-1 dans les différentes lignées de souris transgéniques CD4C/Ahi-1. Vingt et un jours après la naissance, les thymus de souris transgéniques (Tg +) et non transgéniques (en contrôle négatif) des différentes lignées (41865, 41899, 42717) sont prélevés. L'extraction est réalisée dans du tampon de lyse Brij 96 et 150 µg de protéines totales sont soumis à électrophorèse dans un gel de polyacrylamide (7,5%) dénaturant. Après migration les protéines sont transférées sur membrane PVDF et la protéine Ahi-1 visualisée par immunobuvardage de type Western en utilisant l'anticorps anti-Ahi-1 (1824-1 B14, dilution 5 / 10 000). En contrôles positif et négatif, ont été déposés sur gel 150 µg d'extrait protéique de cellules 293T transfectées respectivement par pCDNA3 Ahi-1 3.55 Kb (293T-A) et pCDNA3 (293T). La protéine Ahi-1 d'une masse apparente de 120 Ka, est indiquée par une flèche.

Lignées	41865		42717		41899		293T	293T-A
Tg	-	+	-	+	-	+		



Une fois les thymocytes obtenus, les protéines sont extraites dans du tampon de lyse Brij 96 et une quantité de 150 µg soumise à électrophorèse. Les protéines sont transférées sur membrane et Ahi-1 est détectée par immunobuvardage de type Western en utilisant l'anticorps anti-Ahi-1 1824-1 B14. En contrôle positif a été inclus 150 µg issus de protéines de 293T transfectées avec pcDNA3-Ahi-1 3.55 Kb ou pcDNA3 sans insert en contrôle.

La figure 13 montre que le transgène est exprimé fortement dans le thymus des souris transgéniques de la lignée 42717. Étonnement, il est exprimé plus faiblement dans la lignée 41865 qui présentait une expression en ARNm comparable à la lignée 42717. Il est sans doute envisageable que la comparaison de l'expression en ARNm de ces deux lignées a été faussée par une saturation du signal émis après coloration au bromure d'éthidium. De plus, dans la lignée 42717, la protéine Ahi-1 semble être sous différentes formes ou a été l'objet d'une distorsion de migration. Enfin, la lignée 41899 présente des niveaux d'expression détectable seulement après une longue exposition. Les thymus obtenus de souris non transgéniques ne présentent pas la bande du transgène ; l'expression endogène est difficilement détectable sans immunoprécipitation.

7.2.3 Analyse phénotypique des souris CD4C/Ahi-1

Les souris CD4C/Ahi-1 issues des trois lignées ont été observées jusqu'à l'âge approximatif de seize mois. A cette date, aucune tumeur du système immunitaire, à savoir un thymome ou un lymphome, n'a été constatée. De plus, aucune hyperplasie des organes lymphoïdes n'a été détectée et les souris n'ont montré aucune altération évidente du comportement dans le contexte d'une vie en cage et d'une exposition limitée aux pathogènes.

En outre, des analyses par cytométrie en flux (résultats non montrés) n'ont révélés aucune anomalie dans la composition cellulaire des organes lymphoïdes comme le thymus, la rate et les ganglions périphériques.

Signalons que l'étude a porté sur le marquage des cellules T, CD4⁺, CD8⁺ (simples et doubles-positives), B, des cellules présentatrices d'antigènes. Nous ne pouvons donc exclure un phénotype plus subtil au niveau de sous-populations exprimant d'autres marqueurs de surface.

Cependant, des études en cours laissent à penser que les souris transgéniques présentent un niveau basal de phosphorylation sur tyrosine plus élevé et ce de manière constitutive dans les thymocytes. L'effet d'une telle élévation au niveau de la physiologie des cellules T est en cours d'étude.

IV-DISCUSSION

Le locus *Ahi-1* a été identifié grâce à un "criblage génétique" par mutations aléatoires en utilisant un rétrovirus à transformation lente, M-MuLV. Celui-ci, par sa propriété d'insertion dans le génome de la cellule hôte, est leukémogène. *Ahi-1* est occupé dans 16% et 14% des lymphomes d'Abelson des cellules B (induits par A-MuLV) et des tumeurs des cellules T (développées par les souris MMTV^D/myc), respectivement (Poirier et al., 1988; Girard et al., 1995). Tous les rétrovirus au niveau d'*Ahi-1* connaissent une intégration conservée, dans le sens anti-transcriptionnel du gène. Ceci présuppose un mécanisme efficace conférant à la tumeur un avantage sélectif. L'ARNm d'*Ahi-1*, dans les tumeurs arborant une intégration rétrovirale semble surexprimé de manière modérée. Même si le mécanisme moléculaire mettant en jeu *Ahi-1* n'est à ce jour pas élucidé, il n'est pas exclu qu'une augmentation minimale et difficilement appréciable par northern-blot, soit une étape décisive dans la progression tumorale. En revanche, il est connu que le gène *Ahi-1* est exprimé dans le thymus notamment dans le cortex de cet organe lymphoïde où siègent les thymocytes immatures. La protéine Ahi-1 comporte deux domaines d'interaction protéine-protéine : WD et SH3 qui sont des signatures d'appartenance aux molécules de signalisation. Ahi-1 présente aussi des motifs de localisation nucléaires (NLS) en plus des motifs impliqués dans l'aiguillage des protéines vers le catabolisme. Enfin Ahi-1 comprend deux sites consensus de phosphorylation sur tyrosine (Jiang et al., *en préparation*). Ahi-1 affiche donc toutes les caractéristiques structurales d'une protéine impliquée dans la signalisation cellulaire.

En intégrant l'historique de la découverte du gène *Ahi-1*, son expression thymique et la structure de la protéine, nous avons émis l'hypothèse qu'*Ahi-1* soit une nouvelle molécule de signalisation de la cellule T.

1 AHI-1, UNE NOUVELLE MOLÉCULE DE SIGNALISATION

1.1 Les phosphorylations sur tyrosine

Les modifications des protéines rentrant en jeu après la stimulation des cellules T via le TCR sont les phosphorylations des protéines de signalisation au niveau de résidus tyrosine (Kane et al., 2000). Afin de vérifier si Ahi-1 participe à la signalisation, nous avons naturellement cherché d'une part, si celle-ci interagit avec des protéines phosphorylées sur tyrosine et d'autre part si celle-ci est elle-même phosphorylée sur tyrosine dans des thymocytes murins, dans des conditions de stimulation du TCR.

Nous avons démontré qu'Ahi-1 coimmunoprécipite avec des protéines phosphorylées sur tyrosine de manière constitutive (visible seulement après une longue exposition) c'est dire que la cellule soit stimulée ou pas. Cependant, une protéine de 40 KDa interagit avec Ahi-1 après stimulation du TCR. Or, nous avons mis en évidence qu'Ahi-1 est phosphorylée sur tyrosine et migre dans un gel de polyacrylamide sous forme d'un doublet à hauteur de 120 KDa. Ahi-1 arbore deux sites de phosphorylation sur tyrosine (Jiang et al., *en préparation*). La bande supérieure du doublet, par conséquent, représenterait la forme bisphosphorylée. En effet, celle-ci contenant une charge négative de plus que la forme monophosphorylée (bande supérieure), apportée par le groupement phosphate, est retardée dans sa migration dans un gel de polyacrylamide. Par conséquent, il serait donc envisageable que l'activation de la voie du TCR permette le passage d'Ahi-1 d'une forme monophosphorylée sur la tyrosine N-terminale à une forme monophosphorylée sur la tyrosine C-terminale (ou inversement) sans que ceci ne soit visible après migration dans un gel de polyacrylamide ; ce dernier ne permettant pas une discrimination entre une forme monophosphorylée plutôt qu'une autre.

Un tel changement d'état d'Ahi-1 sous stimulation du TCR serait en cohérence avec l'interaction retrouvée avec une protéine p40 phosphorylée elle-aussi sur tyrosine (Cf. Fig 3, ligne 6). En effet, les tyrosines phosphorylées sont des motifs reconnus par les domaines SH2 des protéines et permettent une

interaction contrôlée entre deux protéines et la transduction du signal en activant une fonction enzymatique et ou une localisation .

Ainsi LAT (Linker for Activation of T-cells), protéine transmembranaire, est phosphorylée sur tyrosine après stimulation par la voie du TCR (Zhang et al., 1998). La forme phosphorylée attire la phospholipase-C- γ 1 (PLC- γ 1) à la membrane. Celle-ci peut y exercer sa fonction première à savoir l'hydrolyse de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) (Finco et al., 1998). Ces deux dernières molécules sont des messagers cellulaires qui médient la transduction du signal vers l'activation entre autres de la protéine kinase C (PKC).

En outre, il est envisageable qu'Ahi-1 soit constitutivement sous une forme monophosphorylée et qu'une protéine non phosphorylée sur tyrosine (donc non visible après immunobuvardage anti-phosphotyrosine) interagisse avec Ahi-1 seulement après stimulation du TCR et joue le rôle d'adaptateur entre celle ci et la p40, par exemple. Rappelons aussi que le site de phosphorylation sur tyrosine C-terminale se situe dans le domaine SH3. Il est donc possible qu'une phosphorylation C-terminale module les interactions protéine-protéine réalisées par un tel domaine.

Enfin, nous n'excluons pas que la p40 puisse être un produit de clivage d'Ahi-1 (p120) avec une fonction qui resterait à déterminer. Dans ce sens, un marquage métabolique de la protéine à la méthionine ³⁵S et une immunoprécipitation d'Ahi-1 avec différents anticorps (anti-région N-terminale, centrale et C-terminale) seraient appropriés pour le vérifier.

1.2 La kinase spécifique des résidus tyrosine

Des résultats préliminaires de surexpression d'Ahi-1 dans des cellules de thymome murin, révèlent une élévation du niveau global de phosphorylation sur tyrosine avant et après stimulation du TCR avec un anticorps monoclonal anti-CD3 ϵ (résultats non montrés). Après stimulation du TCR, des molécules adaptatrices interagissent avec des kinases impliquées dans la transduction du signal intracellulaire afin de les activer et de les colocaliser avec leur substrat.

Ainsi la stimulation du TCR, induit la phosphorylation de ZAP70, une kinase spécifique des résidus tyrosine, qui phosphoryle à son tour SLP76 (Wardenburg et al., 1996). Une fois phosphorylée sur tyrosine, SLP76 peut être reconnue par une autre kinase spécifique des tyrosines, Itk (Su et al., 1999). Cette dernière joue un rôle dans la régulation de, la mobilisation du calcium intracellulaire.

Aussi avons-nous légitimement émis l'hypothèse selon laquelle Ahi-1 interagit avec une kinase. Dans ce sens, nous avons réalisé des essais kinases après immunoprécipitation d'Ahi-1. Effectivement, Ahi-1 participe à un complexe arborant une activité kinase qui ne semble pas varier après stimulation du TCR eu égard les espèces et l'intensité des bandes phosphorylées *de novo*. Enfin, nous avons déterminé que l'activité kinase était spécifique des résidus tyrosine. En outre, les kinases spécifiques des résidus tyrosine sont des enzymes proximales dans la voie de signalisation de la cellule T après stimulation du TCR et suggère un rôle prometteur d'Ahi-1 dans le fonctionnement de celle-ci.

L'étape suivante est l'identification de cette kinase. Dans ce but, nous avons mis en évidence que celle-ci demeure active après dénaturation de l'immunoprécipitat dans l'urée 5M et dialyse du complexe (résultats non montrés). Cette caractéristique pourra être mise à profit dans la purification de la kinase par chromatographie sur gel en conditions dénaturantes, par exemple. Cependant, afin d'identifier la fraction contenant la kinase purifiée, l'utilisation d'un peptide Ahi-1 synthétique ou d'une partie de la protéine Ahi-1 fusionnée avec GST contenant le site consensus de phosphorylation sur tyrosine sera nécessaire.

Nous avons en revanche réalisé différents essais afin de déterminer le poids moléculaire de la kinase qui est un bon indice pouvant conduire à son identification. Premièrement, nous avons mis en place des essais kinase à même le gel en suivant le protocole mis au point par Wang (1999). De plus, nous avons développé un essai kinase à même la membrane après transfert des

protéines de l'immunoprécipitat en suivant le protocole décrit par Ferrell et Martin (1989; 1990). Dans ces deux types d'expérience, nous avons été incapables de mettre en évidence une activité kinase forte et distincte, même si quelques protéines phosphorylées *de novo* semblent être présentes. Cependant, ces deux types de méthode reposent sur l'hypothèse que la kinase s'autophosphoryle sur tyrosine puisqu'aucun substrat exogène n'est ajouté. Aussi, l'identification et la mise au point d'un substrat demeurent une étape cruciale. Deuxièmement, nous avons réalisé des essais kinase dans les cellules Jurkat, qui sont les cellules les plus utilisées dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la signalisation du TCR. Le gène *ahi-1* murin est conservé chez l'humain (Jiang et al., *en préparation*). Nous avons donc testé l'activité kinase après immunoprécipitation d'Ahi-1 dans les cellules Jurkat. L'activité kinase est retrouvée dans ces cellules suggérant que cette interaction a lieu dans les cellules T humaines. Ceci présente les avantages suivants : i) la purification de la kinase sera facilitée par une quantité illimitée de matériel biologique. ii) la signalisation des cellules Jurkat est très détaillée dans la littérature et permet l'établissement de modèles d'étude. iii) De nombreux clones de cellules Jurkat, mutés au niveau de différentes protéines de la signalisation ont été générées par l'équipe de Weiss et seront utiles à l'identification des partenaires potentiels d'Ahi-1 (Goldsmith and Weiss, 1988). Dans ce sens, nous avons réalisé un essai kinase à partir des cellules mutantes Jurkat, JCaM-1 dépourvues de Lck (Straus and Weiss, 1992). Malheureusement, l'activité kinase demeure intacte et indique qu'Lck n'est pas la kinase présente dans le complexe protéique contenant Ahi-1 (résultats non montrés).

Une fois la kinase identifiée, les études ultérieures permettront de localiser les sites de liaison réciproques entre la kinase et Ahi-1. Si la kinase est déjà connue, l'identification des substrats sera facilitée. Si elle est inconnue, l'identification des substrats est envisagée dans un projet à plus long terme. Egalement à plus long terme, la compréhension de la fonction du complexe

Ahi-1/kinase dans la signalisation de la cellules T facilitera la caractérisation du rôle physiologique et pathologique d'Ahi-1.

2 AHI-1 IN VIVO

Afin de connaître la fonction d'Ahi-1 *in vivo*, nous avons généré un modèle de souris transgéniques surexprimant Ahi-1 dans les cellules CD4⁺. Rappelons que le transgène CD4C/Ahi-1 est constitué de l'ADNc d'*ahi-1* placé sous contrôle transcriptionnel du promoteur chimérique CD4C mis au point dans le laboratoire (Hanna et al., 1994). Le promoteur CD4C constitué du promoteur du gène CD4 humain et d'une séquence régulatrice du gène CD4 murin dirige l'expression dans les cellules T DP immatures CD4⁺CD8⁺ et matures CD4⁺.

2.1 Ahi-1, un nouvel oncogène ?

Nous avons obtenu différentes lignées exprimant *ahi-1* dans les organes lymphoïdes tels le thymus et la rate. Les lignées 42717 et 41865 expriment fortement le transgène, tandis que la lignée 41899 l'exprime faiblement et ce en raison des variations d'intégration du transgène. Après une durée moyenne de seize mois, aucune tumeur n'est constatée et les souris semblent évoluer normalement. L'absence de tumeur ne remet pas en cause un quelconque rôle d'*ahi-1* dans la transformation cellulaire car l'oncogénicité d'un gène *in vivo* dépend de la souche de souris utilisée, de la spécificité du promoteur et évidemment du gène étudié. En outre, la transformation cellulaire est souvent associée à de nombreuses altérations génétiques plutôt qu'à une seule comme la surexpression d'un oncogène.

2.1.1 Influence de la souche de souris

Il est envisageable que la souche de souris utilisée à savoir la souche C3H ne convienne pas au développement de tumeurs induites par une surexpression d'*Ahi-1*. En effet, les souris transgéniques MMTV^D/myc de

souche CD1 développent, dans près de 100% des cas un thymome à cellules T CD4⁺CD8⁺ après une latence de 90 à 120 jours (Paquette et al. 1992). Ceci suggère que la souche CD1 est permissive. En outre, le gène *ahi-1* a été découvert par infection de souris MMTVD/myc de souche CD1 par M-MuLV. La souche CD1 présenterait une base génétique favorisant l'apparition des tumeurs induites par Ahi-1. Afin de vérifier une telle hypothèse, des croisements entre des souris CD4C/Ahi-1 (C3H) et des souris CD1 sont en cours.

2.1.2 Influence du promoteur

Le promoteur utilisé dans les souris CD4C dirige l'expression d'*ahi-1* dans les cellules T DP CD4⁺CD8⁺ et SP CD4⁺. Il n'est pas exclu que l'expression du gène *ahi-1* ne permette pas la formation de tumeur, car à ces deux stades les cellules ne connaissent plus de division. Il est possible que l'absence de division cellulaire ne permette pas l'acquisition de nouvelles mutations somatiques et de fait l'émergence de tumeurs.

Les cellules CD4⁺ matures ou cellules T auxiliaires de la périphérie, prolifèrent clonalement quand elles sont confrontées avec l'antigène qui leur est spécifique. Aussi la génération de souris double-transgéniques obtenues par le croisement des souris CD4C/Ahi-1 avec les souris exprimant un TCR spécifique seraient une voie alternative. Ces souris possèdent la chaîne alpha du TCR spécifique du cytochrome c de pigeon (Berg et al., 1989). L'injection de l'antigène à savoir le cytochrome de pigeon à ces souris double-transgéniques, entraînera une prolifération de toutes les cellules T, favorisant ainsi l'apparition de mutations génétiques, propices au développement d'une tumeur.

En outre, il est probable qu'une expression plus précoce d'*ahi-1* puisse mener à l'apparition de tumeurs. Dans ce sens, le choix du promoteur MMTV^D, utilisé antérieurement dans les souris transgéniques MMTV^D/myc serait peut être plus favorable. Le promoteur MMTV^D permet l'expression des transgènes dès le quatorzième jour de l'ontogénie des cellules T, précédant ainsi

l'expression du TCR, de CD4 et CD8 (Doyon et al., 1994). Pour les mêmes raisons, le promoteur Lck proximal pourrait aussi être un promoteur candidat dans la génération de souris transgéniques Lck/Ahi-1. En effet, le promoteur Lck proximal permet une expression dans les cellules T double-négatives CD4⁻CD8⁻ (Calnan et al., 1995; Miyazaki and Lemonnier, 1998), c'est-à-dire à un stade plus immature que ne le peut le promoteur CD4C.

2.1.3 *Ahi-1* est-il suffisant pour induire un thymome?

La formation d'une tumeur nécessite plusieurs étapes de modifications génétiques, chacune d'entre-elles conférant un avantage sélectif à la cellule, laquelle échappe peu à peu aux contrôles de croissance, d'inhibition de contact et d'apoptose. Dans le cadre des souris transgéniques CD4C/Ahi-1, il est concevable qu'*ahi-1* ne soit pas suffisant et ne soit pas équivalent, par exemple à un oncogène comme *c-myc*. Il se peut qu'*ahi-1* soit un oncogène modéré nécessitant au préalable l'acquisition par la cellule de mutations et serait de fait plus un "facteur progresseur" qu'un "facteur générateur" de tumeur.

Aussi, il serait utile après transfert du transgène CD4C/Ahi-1 dans une souche CD1, de croiser ces mêmes souris avec les souris MMTV^D/*myc* afin de constater si les progénitures double-transgéniques développent des thymomes avec une latence inférieure à 90 jours. Ceci démontrerait une coopération entre *myc* et *ahi-1* dans la tumorigénèse et de fait la potentialité oncogénique d'*ahi-1*. Une autre approche est de mettre en évidence que les souris CD4C/Ahi-1 sont prédisposées aux thymomes.

Premièrement, l'injection du carcinogène chimique N-éthyl-N-nitrosourée (ENU) qui a une action mutagène plus spécifique au niveau des cellules T, a déjà fait ses preuves. En effet, 10% seulement des souris transgéniques pim-1 développent des lymphomes T sur une période de 240 jours. Le traitement de ces souris avec une dose faible dose unique d'ENU provoque l'apparition de lymphomes T dans près de 100% des cas, comparativement à 15% pour souris sauvages (Breuer et al., 1989).

Dans un autre système, cette approche a connu aussi un franc succès. Les souris MMTV/Cdc25B surexprimant le gène Cdc25, fortement exprimé dans les tumeurs mammaires humaines, ne développent aucune tumeur jusqu'à l'âge de dix-huit mois. En revanche, ces souris sont plus susceptibles que les souris contrôle à l'effet du carcinogène 9,10-diméthyl-1,2-benzanthracène (DMBA) connu pour action tumorigène dans les glandes mammaires (Yao et al., 1999).

Deuxièmement, il est possible d'utiliser le rétrovirus M-MuLV afin de mettre en évidence une susceptibilité accrue des souris CD4C/Ahi-1 aux lymphomes. M-MuLV est un rétrovirus à transformation lente qui est leukémogène chez la souris et est très utilisé dans la découverte des oncogènes impliqués dans les tumeurs lymphoïdes (Cf, section dans *I-Introduction*). Récemment, Jonkers et al. (1999) ont mis en évidence que les souris surexprimant Frat-1, un gène ciblé par M-MuLV, dans les tumeurs des cellules T des souris transgéniques E μ /pim-1, ne développent pas spontanément des lymphomes. En revanche, si les souris sont infectées par M-MuLV, elles développent des lymphomes avec une incidence plus élevée que les souris sauvages.

En conclusion, ces deux approches par carcinogènes chimique et biologique constituent un système pertinent pour tester l'oncogénicité potentielle, même faible d'Ahi-1.

3 CONCLUSION

Ahi-1 a été découvert par insertions rétrovirales tant dans les lymphomes des cellules B que les leucémies de type T. Nous avons choisi de mettre en évidence la fonction d'Ahi-1, qui a une structure unique (colinéarité des domaines WD et SH3), dans la signalisation de la cellule T, dans un contexte *in vitro* et *in vivo*. Les résultats que nous avons obtenus semblent dans ce sens prometteur. En effet, nous avons démontré qu'Ahi-1 interagit avec des

protéines phosphorylées sur tyrosine. De plus, Ahi-1 interagit avec une kinase spécifique des résidus tyrosine laquelle la phosphoryle sur ces même résidus. La mise en place d'expériences complémentaires décrites dans la partie IV-*Discussion* devraient nous informer d'avantage sur la fonction de cette protéine et son implication dans l'émergence des tumeurs lymphocytaires. Malgré l'absence de tumeur dans les souris transgéniques CD4C/Ahi-1, celles-ci pourraient bien confirmer l'oncogénicité d'Ahi-1 ou la nécessité de coopération avec d'autres oncogènes. En outre, Elles demeurent utiles à la compréhension de la fonction d'Ahi-1 *in vivo*, dans la cinétique de la signalisation du TCR, notamment par l'interaction d'Ahi-1 avec une kinase.

V-RÉFÉRENCES

- Abelson,H.T. and Rabstein,L.S. (1970). Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res.* 30, 2213-2222.
- Adams,J.M., Harris,A.W., Pinkert,C.A., Corcoran,L.M., Alexander,W.S., Cory,S., Palmiter,R.D., and Brinster,R.L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533-538.
- Aizawa,S., Suda,Y., Furuta,Y., Yagi,T., Takeda,N., Watanabe,N., Nagayoshi,M., and Ikawa,Y. (1990). Env-derived gp55 gene of Friend spleen focus-forming virus specifically induces neoplastic proliferation of erythroid progenitor cells. *EMBO J.* 9, 2107-2116.
- Alberola-Ila,J., Takaki,S., Kerner,J.D., and Perlmutter,R.M. (1997). Differential signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 125-154.
- Alkema,M.J., van der Lugt,N.M., Bobeldijk,R.C., Berns,A., and van Lohuizen,M. (1995). Transformation of axial skeleton due to overexpression of bmi-1 in transgenic mice. *Nature* 374, 724-727.
- Alt,F., Rosenberg,N., Lewis,S., Thomas,E., and Baltimore,D. (1981). Organization and reorganization of immunoglobulin genes in A-MULV-transformed cells: rearrangement of heavy but not light chain genes. *Cell* 27, 381-390.
- Amanuma,H., Katori,A., Obata,M., Sagata,N., and Ikawa,Y. (1983). Complete nucleotide sequence of the gene for the specific glycoprotein (gp55) of Friend spleen focus-forming virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80, 3913-3917.
- Bellacosa,A., Lazo,P.A., Bear,S.E., Shinton,S., and Tschlis,P.N. (1989). Induction of multiple independent T-cell lymphomas in rats inoculated with MOloney murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 4269-4272.
- Ben David,Y. and Bernstein,A. (1991). Friend virus-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer. *Cell* 66, 831-834.
- Bergeron,D., Poliquin,L., Kozak,C.A., and Rassart,E. (1991). Identification of a common viral integration region in Cas-Br-E murine leukemia virus-induced non-T-, non-B-cell lymphomas. *J. Virol.* 65, 7-15.
- Bestwick,R.K., Boswell,B.A., and Kabat,D. (1984). Molecular cloning of biologically active Rauscher spleen focus-forming virus and the sequences of its env gene and long terminal repeat. *J. Virol.* 51, 695-705.
- Bishop,J.M. (1987). The molecular genetics of cancer. *Science* 235, 305-311.

- Bjorn, S.P., Soltyk, A., Beggs, J.D., and Friesen, J.D. (1989). PRP4 (RNA4) from *Saccharomyces cerevisiae*: its gene product is associated with the U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Mol. Cell Biol.* 9, 3698-3709.
- Bodrug, S.E., Warner, B.J., Bath, M.L., Lindeman, G.J., Harris, A.W., and Adams, J.M. (1994). Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J.* 13, 2124-2130.
- Boss, M., Greaves, M., and Teich, N. (1979). Abelson virus-transformed haematopoietic cell lines with pre-B-cell characteristics. *Nature* 278, 551-553.
- Breuer, M., Slebos, R., Verbeek, S., van Lohuizen, M., Wientjens, E., and Berns, A. (1989). Very high frequency of lymphoma induction by a chemical carcinogen in pim-1 transgenic mice. *Nature* 340, 61-63.
- Brightman, B.K., Rein, A., Trepp, D.J., and Fan, H. (1991). An enhancer variant of Moloney murine leukemia virus defective in leukemogenesis does not generate detectable mink cell focus-inducing virus in vivo [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Jun 1;88(11):5066]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 2264-2268.
- Buckler, A.J., Chang, D.D., Graw, S.L., Brook, J.D., Haber, D.A., Sharp, P.A., Housman, D.E. (1991). Exon amplification: a strategy to isolate mammalian genes based on RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4005-4009
- Calnan, B.J., Szychowski, S., Chan, F.K., Cado, D., and Winoto, A. (1995). A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity.* 3, 273-282.
- Casadevall, N., Lacombe, C., Muller, O., Gisselbrecht, S., and Mayeux, P. (1991). Multimeric structure of the membrane erythropoietin receptor of murine erythroleukemia cells (Friend cells). Cross-linking of erythropoietin with the spleen focus-forming virus envelope protein. *J. Biol. Chem.* 266, 16015-16020.
- Chesebro, B. and Wehrly, K. (1985). Different murine cell lines manifest unique patterns of interference to superinfection by murine leukemia viruses. *Virology* 141, 119-129.
- Chung, S.W., Wolff, L., and Ruscetti, S.K. (1989). Transmembrane domain of the envelope gene of a polycythemia-inducing retrovirus determines erythropoietin-independent growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 7957-7960.

Clark,S.P. and Mak,T.W. (1983). Complete nucleotide sequence of an infectious clone of Friend spleen focus-forming provirus: gp55 is an envelope fusion glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80, 5037-5041.

Coffin,J.M. and Moore,C. (1990). Determination of 3' end processing in retroelements. *Trends Genet.* 6, 276-277.

Cohen,J.C., Shank,P.R., Morris,V.L., Cardiff,R., and Varmus,H.E. (1979). Integration of the DNA of mouse mammary tumor virus in virus-infected normal and neoplastic tissue of the mouse. *Cell* 16, 333-345.

Corcoran,L.M., Adams,J.M., Dunn,A.R., and Cory,S. (1984). Murine T lymphomas in which the cellular myc oncogene has been activated by retroviral insertion. *Cell* 37, 113-122.

Cullen,B.R., Lomedico,P.T., and Ju,G. (1984). Transcriptional interference in avian retroviruses--implications for the promoter insertion model of leukaemogenesis. *Nature* 307, 241-245.

Cuypers,H.T., Selten,G., Quint,W., Zijlstra,M., Maandag,E.R., Boelens,W., van Wezenbeek,P., Melief,C., and Berns,A. (1984). Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell* 37, 141-150.

Doyon,L., Hanna,Z., Jolicoeur,P., and Sekaly,R.P. (1994). Early expression of human CD4 delays thymic differentiation in transgenic mice. *Res. Immunol.* 145, 5-16.

Dreyfus,F., Sola,B., Fichelson,S., Varlet,P., Charon,M., Tambourin,P., Wendling,F., and Gisselbrecht,S. (1990). Rearrangements of the Pim-1, c-myc, and p53 genes in Friend helper virus-induced mouse erythroleukemias. *Leukemia* 4, 590-594.

Fan,H. (1997). Leukemogenesis by Moloney murine leukemia virus: a multistep process. *Trends Microbiol.* 5, 74-82.

Berg,L.J., Fazekas de St Groth,B., Ivars,F., Goodnow,C.C., Gilfillan,S., Garcho,H.J. and Davis,M.M. (1989). Expression of T-cell receptor alpha-chain in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 8, 5459-5469.

Feldman,R.M., Correll,C.C., Kaplan,K.B., and Deshaies,R.J. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p [see comments]. *Cell* 91, 221-230.

Ferrell,J.E. and Martin,G.S. (1991). Assessing activities of blotted protein kinases. *Methods Enzymol* 200, 430-435.

- Ferro, F.E., Jr., Kozak, S.L., Hoatlin, M.E., and Kabat, D. (1993). Cell surface site for mitogenic interaction of erythropoietin receptors with the membrane glycoprotein encoded by Friend erythroleukemia virus. *J. Biol. Chem.* *268*, 5741-5747.
- Gilbert, D.J., Neumann, P.E., Taylor, B.A., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (1993). Susceptibility of AKXD recombinant inbred mouse strains to lymphomas. *J. Virol.* *67*, 2083-2090.
- Gilks, C.B., Bear, S.E., Grimes, H.L., and Tschlis, P.N. (1993). Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein. *Mol. Cell Biol.* *13*, 1759-1768.
- Girard, L., Hanna, Z., Beaulieu, N., Hoemann, C.D., Simard, C., Kozak, C.A., and Jolicoeur, P. (1996). Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis. *Genes Dev.* *10*, 1930-1944.
- Goff, S.P. (1987). Insertional mutagenesis to isolate genes. *Methods Enzymol.* *151*, 489-502.
- Goff, S.P. (1992). Genetics of retroviral integration. *Annu. Rev. Genet.* *26*, 527-544.
- Goldsmith, M.A. and Weiss, A. (1988). Generation and analysis of a T-lymphocyte somatic mutant for studying molecular aspects of signal transduction by the antigen receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *546*, 91-103.
- Hanna, Z., Jankowski, M., Tremblay, P., Jiang, X., Milatovich, A., Francke, U., and Jolicoeur, P. (1993). The Vin-1 gene, identified by provirus insertional mutagenesis, is the cyclin D2. *Oncogene* *8*, 1661-1666.
- Hanna, Z., Simard, C., Laperriere, A., and Jolicoeur, P. (1994). Specific expression of the human CD4 gene in mature CD4+ CD8- and immature CD4+ CD8+ T cells and in macrophages of transgenic mice. *Mol. Cell Biol.* *14*, 1084-1094.
- Harris, A.W., Pinkert, C.A., Crawford, M., Langdon, W.Y., Brinster, R.L., and Adams, J.M. (1988). The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells. *J. Exp. Med.* *167*, 353-371.
- Hartley, J.W., Wolford, N.K., Old, L.J., and Rowe, W.P. (1977). A new class of murine leukemia virus associated with development of spontaneous lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *74*, 789-792.

Haupt, Y., Alexander, W.S., Barri, G., Klinken, S.P., and Adams, J.M. (1991). Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice [see comments]. *Cell* 65, 753-763.

Hayward, W.S., Neel, B.G., and Astrin, S.M. (1981). Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature* 290, 475-480.

Herman, S.A. and Coffin, J.M. (1986). Differential transcription from the long terminal repeats of integrated avian leukemia virus DNA. *J. Virol.* 60, 497-505.

Hoatlin, M.E., Kozak, S.L., Lilly, F., Chakraborti, A., Kozak, C.A., and Kabat, D. (1990). Activation of erythropoietin receptors by Friend viral gp55 and by erythropoietin and down-modulation by the murine Fv-2r resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 9985-9989.

Hoey, T., Weinzierl, R.O., Gill, G., Chen, J.L., Dynlacht, B.D., and Tjian, R. (1993). Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* 72, 247-260.

Huang, M., Takac, M., Kozak, C.A. and Jolicoeur, P. (1995). The murine AIDS defective provirus acts as an insertional mutagen in its infected target B cells. *J. Virol.* 69, 4069-4078.

Ishimoto, A., Adachi, A., Sakai, K., Yorifuji, T., and Tsuruta, S. (1981). Rapid emergence of mink cell focus-forming (MCF) virus in various mice infected with NB-tropic friend virus. *Virology* 113, 644-655.

Jasin, M. (1996). Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet.* 12, 224-228.

Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Taylor, B.A., Bedigian, H.G., and Lee, B.K. (1982). Ecotropic murine leukemia virus DNA content of normal and lymphomatous tissues of BXH-2 recombinant inbred mice. *J. Virol.* 42, 379-388.

Jiang, X., Hanna, Z., Beaulieu, N., Girard, L. and Jolicoeur, P. The *Ahi-1* gene, identified by provirus insertional mutagenesis, encodes a modular protein containing WD and SH3 domains. *En préparation.*

Jonkers, J. and Berns, A. (1996). Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1287, 29-57.

Justice, M.J., Morse, H.C., III, Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (1994). Identification of Evi-3, a novel common site of retroviral integration in mouse AKXD B-cell lymphomas. *J. Virol.* 68, 1293-1300.

- Kane,L.P., Lin,J., and Weiss,A. (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 242-249.
- Kavanaugh,M.P., Wang,H., Boyd,C.A., North,R.A., and Kabat,D. (1994). Cell surface receptor for ecotropic host-range mouse retroviruses: a cationic amino acid transporter. *Arch. Virol. Suppl* *9*, 485-494.
- Keleher,C.A., Redd,M.J., Schultz,J., Carlson,M., and Johnson,A.D. (1992). Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* *68*, 709-719.
- Krimpenfort,P., de Jong,R., Uematsu,Y., Dembic,Z., Ryser,S., von Boehmer,H., Steinmetz,M., and Berns,A. (1988). Transcription of T cell receptor beta-chain genes is controlled by a downstream regulatory element. *EMBO J.* *7*, 745-750.
- Kung,H.J., Boerkoel,C., and Carter,T.H. (1991). Retroviral mutagenesis of cellular oncogenes: a review with insights into the mechanisms of insertional activation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *171*, 1-25.
- Lammie,G.A., Smith,R., Silver,J., Brookes,S., Dickson,C., and Peters,G. (1992). Proviral insertions near cyclin D1 in mouse lymphomas: a parallel for BCL1 translocations in human B-cell neoplasms. *Oncogene* *7*, 2381-2387.
- Lemay,G. and Jolicoeur,P. (1984). Rearrangement of a DNA sequence homologous to a cell-virus junction fragment in several Moloney murine leukemia virus-induced rat thymomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 38-42.
- Lewis,P.F. and Emerman,M. (1994). Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* *68*, 510-516.
- Li,J.P. and Baltimore,D. (1991). Mechanism of leukemogenesis induced by mink cell focus-forming murine leukemia viruses. *J. Virol.* *65*, 2408-2414.
- Li,J.P., Bestwick,R.K., Spiro,C., and Kabat,D. (1987). The membrane glycoprotein of Friend spleen focus-forming virus: evidence that the cell surface component is required for pathogenesis and that it binds to a receptor. *J. Virol.* *61*, 2782-2792.
- Li,J.P., D'Andrea,A.D., Lodish,H.F., and Baltimore,D. (1990). Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor. *Nature* *343*, 762-764.
- Marcu,K.B., Bossone,S.A., and Patel,A.J. (1992). myc function and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* *61*, 809-860.

Matsushime,H., Roussel,M.F., Ashmun,R.A., and Sherr,C.J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65, 701-713.

Miyazaki,T. and Lemonnier,F.A. (1998). Modulation of thymic selection by expression of an immediate-early gene, early growth response 1 (Egr-1). *J. Exp. Med.* 188, 715-723.

Mooslehner,K., Karls,U., and Harbers,K. (1990). Retroviral integration sites in transgenic Mov mice frequently map in the vicinity of transcribed DNA regions. *J. Virol.* 64, 3056-3058.

Moroianu,J. (1997). Molecular mechanisms of nuclear protein transport. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 7, 61-72.

Motokura,T., Bloom,T., Kim,H.G., Juppner,H., Ruderman,J.V., Kronenberg,H.M., and Arnold,A. (1991). A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene [see comments]. *Nature* 350, 512-515.

Mucenski,M.L., Bedigian,H.G., Shull,M.M., Copeland,N.G., and Jenkins,N.A. (1988a). Comparative molecular genetic analysis of lymphomas from six inbred mouse strains. *J. Virol.* 62, 839-846.

Mucenski,M.L., Gilbert,D.J., Taylor,B.A., Jenkins,N.A., and Copeland,N.G. (1987). Common sites of viral integration in lymphomas arising in AKXD recombinant inbred mouse strains. *Oncogene Res.* 2, 33-48.

Mucenski,M.L., Taylor,B.A., Ihle,J.N., Hartley,J.W., Morse,H.C., III, Jenkins,N.A., and Copeland,N.G. (1988b). Identification of a common ecotropic viral integration site, Evi-1, in the DNA of AKXD murine myeloid tumors. *Mol. Cell Biol.* 8, 301-308.

Mucenski,M.L., Taylor,B.A., Jenkins,N.A., and Copeland,N.G. (1986). AKXD recombinant inbred strains: models for studying the molecular genetic basis of murine lymphomas. *Mol. Cell Biol.* 6, 4236-4243.

Neil,J.C., Hughes,D., McFarlane,R., Wilkie,N.M., Onions,D.E., Lees,G., and Jarrett,O. (1984). Transduction and rearrangement of the myc gene by feline leukaemia virus in naturally occurring T-cell leukaemias. *Nature* 308, 814-820.

O'Donnell,P.V., Fleissner,E., Lonial,H., Koehne,C.F., and Reicin,A. (1985). Early clonality and high-frequency proviral integration into the c-myc locus in AKR leukemias. *J. Virol.* 55, 500-503.

Paquette,Y., Doyon,L., Laperriere,A., Hanna,Z., Ball,J., Sekaly,R.P., and Jolicoeur,P. (1992). A viral long terminal repeat expressed in CD4+CD8+

precursors is downregulated in mature peripheral CD4-CD8+ or CD4+CD8-T cells. *Mol. Cell Biol.* *12*, 3522-3530.

Poirier, Y., Kozak, C., and Jolicoeur, P. (1988). Identification of a common helper provirus integration site in Abelson murine leukemia virus-induced lymphoma DNA. *J. Virol.* *62*, 3985-3992.

Pryer, N.K., Salama, N.R., Schekman, R., and Kaiser, C.A. (1993). Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum in vitro. *J. Cell Biol.* *120*, 865-875.

Rechsteiner, M. and Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 267-271.

Roe, T., Reynolds, T.C., Yu, G., and Brown, P.O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* *12*, 2099-2108.

Roitt, Y., Brostoff, J., Male, D. (1998). Development of the immune system. In *Immunology*, Mosby, ed., pp. 158-161.

Rudd, C.E. (1999). Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. *Cell* *96*, 5-8.

Ruscetti, S.K., Janesch, N.J., Chakraborti, A., Sawyer, S.T., and Hankins, W.D. (1990). Friend spleen focus-forming virus induces factor independence in an erythropoietin-dependent erythroleukemia cell line. *J. Virol.* *64*, 1057-1062.

Saris, C.J., Domen, J., and Berns, A. (1991). The pim-1 oncogene encodes two related protein-serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG. *EMBO J.* *10*, 655-664.

Savard, P., DesGroseillers, L., Rassart, E., Poirier, Y., and Jolicoeur, P. (1987). Important role of the long terminal repeat of the helper Moloney murine leukemia virus in Abelson virus-induced lymphoma. *J. Virol.* *61*, 3266-3275.

Scherdin, U., Rhodes, K., and Breindl, M. (1990). Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration. *J. Virol.* *64*, 907-912.

Schlessinger, J. (1994). SH2/SH3 signaling proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *4*, 25-30.

Sefton, B. (2000). Bart's Cookbook. Phosphoamino acid analysis. Web site: http://pingu.salk.edu/users/Sefton_web/hyper_protocols/

Selten, G., Cuypers, H.T., Zijlstra, M., Melief, C., and Berns, A. (1984). Involvement of c-myc in MuLV-induced T cell lymphomas in mice: frequency and mechanisms of activation. *EMBO J.* *3*, 3215-3222.

- Shaw,G. and Kamen,R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46, 659-667.
- Silver,J. and Kozak,C. (1986). Common proviral integration region on mouse chromosome 7 in lymphomas and myelogenous leukemias induced by Friend murine leukemia virus. *J. Virol.* 57, 526-533.
- Smith,T.F., Gaitatzes,C., Saxena,K., and Neer,E.J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 24, 181-185.
- Sodroski,J., Patarca,R., Rosen,C., Wong-Staal,F., and Haseltine,W. (1985). Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* 229, 74-77.
- Sodroski,J.G., Rosen,C.A., and Haseltine,W.A. (1984). Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. *Science* 225, 381-385.
- Sorensen,A.B., Duch,M., Jorgensen,P., and Pedersen,F.S. (1993). Amplification and sequence analysis of DNA flanking integrated proviruses by a simple two-step polymerase chain reaction method. *J. Virol.* 67, 7118-7124.
- Steffen,D. and Weinberg,R.A. (1978). The integrated genome of murine leukemia virus. *Cell* 15, 1003-1010.
- Straus,D.B. and Weiss,A. (1992). Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70, 585-593.
- Su,Y.W., Zhang,Y., Schweikert,J., Koretzky,G.A., Reth,M., and Wienands,J. (1999). Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases. *Eur. J. Immunol.* 29, 3702-3711.
- Swain,A. and Coffin,J.M. (1993). Influence of sequences in the long terminal repeat and flanking cell DNA on polyadenylation of retroviral transcripts. *J. Virol.* 67, 6265-6269.
- Tremblay,P.J., Kozak,C.A. and Jolicoeur,P. (1992). Identification of a novel gene Vin-1, in murine leukemia virus-induced T-cell leukemias by provirus insertional mutagenesis. *J. Virol.* 66, 1344-1353.
- Tsichlis,P.N. and Bear,S.E. (1991). Infection by mink cell focus-forming viruses confers interleukin 2 (IL-2) independence to an IL-2-dependent rat T-cell lymphoma line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 4611-4615.

- Tsichlis,P.N., Strauss,P.G., and Hu,L.F. (1983). A common region for proviral DNA integration in MoMuLV-induced rat thymic lymphomas. *Nature* 302, 445-449.
- Vaisman,N., Tsouladze,A., Robzyk,K., Ben Yehuda,S., Kupiec,M., and Kassir,Y. (1995). The role of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc40p in DNA replication and mitotic spindle formation and/or maintenance. *Mol. Gen. Genet.* 247, 123-136.
- van der Lugt,N.M., Domen,J., Linders,K., van Roon,M., Robanus-Maandag,E., te,R.H., van,d., V, Deschamps,J., Sofroniew,M., and van Lohuizen,M. (1994). Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the *bmi-1* proto-oncogene. *Genes Dev.* 8, 757-769.
- van der Lugt,N.M., Domen,J., Verhoeven,E., Linders,K., van der,G.H., Allen,J., and Berns,A. (1995). Proviral tagging in E mu-myc transgenic mice lacking the *Pim-1* proto- oncogene leads to compensatory activation of *Pim-2*. *EMBO J.* 14, 2536-2544.
- van Griensven,L.J. and Vogt,M. (1980). Rauscher "mink cell focus-inducing" (MCF) virus causes erythroleukemia in mice: its isolation and properties. *Virology* 101, 376-388.
- van Leeuwen,J.E. and Samelson,L.E. (1999). T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 242-248.
- van Lohuizen,M., Verbeek,S., Krimpenfort,P., Domen,J., Saris,C., Radaszkiewicz,T., and Berns,A. (1989). Predisposition to lymphomagenesis in *pim-1* transgenic mice: cooperation with *c-myc* and *N-myc* in murine leukemia virus-induced tumors. *Cell* 56, 673-682.
- van Lohuizen,M., Verbeek,S., Scheijen,B., Wientjens,E., van der,G.H., and Berns,A. (1991). Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging [see comments]. *Cell* 65, 737-752.
- Varmus,H.E. (1984). The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annu. Rev. Genet.* 18, 553-612.
- Wang,H.C. (2000). Recovery of protein kinases from renatured SDS-polyacrylamide gel for biochemical studies. *Biotechniques* 28, 232-238
- Wardenburg,J.B., Fu,C., Jackman,J.K., Flotow,H., Wilkinson,S.E., Williams,D.H., Johnson,R., Kong,G., Chan,A.C., and Findell,P.R. (1996). Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J. Biol. Chem.* 271, 19641-19644.
- Weiss,R.A. and Taylor,C.S. (1995). Retrovirus receptors. *Cell* 82, 531-533.

Williams,F.E., Varanasi,U., and Trumbly,R.J. (1991). The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex. *Mol. Cell Biol.* *11*, 3307-3316.

Williams,J.C., Wierenga,R.K., and Saraste,M. (1998). Insights into Src kinase functions: structural comparisons. *Trends Biochem. Sci.* *23*, 179-184.

Wolff,L. and Ruscetti,S. (1988). The spleen focus-forming virus (SFFV) envelope gene, when introduced into mice in the absence of other SFFV genes, induces acute erythroleukemia. *J. Virol.* *62*, 2158-2163.

Wolff,L., Scolnick,E., and Ruscetti,S. (1983). Envelope gene of the Friend spleen focus-forming virus: deletion and insertions in 3' gp70/p15E-encoding region have resulted in unique features in the primary structure of its protein product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *80*, 4718-4722.

Xiong,Y., Connolly,T., Futcher,B., and Beach,D. (1991). Human D-type cyclin. *Cell* *65*, 691-699.

Yao,Y., Slosberg,E.D., Wang,L., Hibshoosh,H., Zhang,Y.J., Xing,W.Q., Santella,R.M., and Weinstein,I.B. (1999). Increased susceptibility to carcinogen-induced mammary tumors in MMTV- Cdc25B transgenic mice. *Oncogene* *18*, 5159-5166.

Yoshimura,A., Longmore,G., and Lodish,H.F. (1990). Point mutation in the extracellular domain of the erythropoietin receptor resulting in hormone-independent activation and tumorigenicity. *Nature* *348*, 647-649.