

Université de Montréal

**Étude moléculaire des événements associés à la
transformation par l'antigène grand T du virus de
polyome (PyLT-Ag)**

**An analysis of molecular events associated with transformation
by polyomavirus large T antigen (PyLT-Ag)**

par

Francis Rodier

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Docteur
en Biologie Moléculaire

Décembre 2004

© Francis Rodier, 2004



QH

506

U54

2005

v. 002

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude moléculaire des événements associés à la
transformation par l'antigène grand T du virus de
polyome (PyLT-Ag)**

présentée par :
Francis Rodier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Richard Bertrand, président-rapporteur
Anne-Marie Mes-Masson, directeur de recherche
Gilbert Bernier, membre du jury
William Muller, examinateur externe
Diane Provencher, représentante du doyen de la FES

Résumé

En culture, une cellule dite “normale” doit subir deux événements phénotypiques majeurs pour devenir cancéreuse. L’acquisition d’une capacité de division illimitée, ou immortalisation, doit être accompagnée par un processus de transformation qui va rendre la cellule plus invasive dans le micro environnement du tissu. Ces 2 événements entrelacés impliquent plusieurs changements génétiques/épigénétiques dans le métabolisme cellulaire. L’antigène grand-T du virus de polyome (PyLT-Ag), un oncogène viral, est une nucléophosphoprotéine essentielle pour réguler l’expression génique virale et peut moduler le cycle cellulaire ainsi qu’immortaliser les cellules primaires en culture. Il est aussi responsable de la résistance au faible sérum des cellules transformées par le virus de polyome murin (Py). Cet oncogène peut immortaliser mais ne transforme pas les cellules de mammifères maintenues en culture. Nous avons préalablement démontré que le traitement de cellules de Sertoli dérivées de souris transgéniques exprimant PyLT-Ag avec un anticorps agoniste anti-FasR (FasR(Ab)) induit un arrêt de croissance sans apoptose. Il existe d’autres protéines virales tel que E1B19K et Crma qui sont très efficaces pour inhiber la mort cellulaire programmée. Dans ce travail, nous démontrons que l’expression stable de PyLT-Ag dans des lignées cellulaires de Sertoli murine (TM4) et des hybridomes murins (NSO) protège contre l’apoptose induite par un traitement avec FasR(Ab). La protection est maintenue pendant 48 heures si l’on maintient les cellules en présence de FasR(Ab). L’effet protecteur de PyLT-Ag est associé avec une diminution séquentielle de l’activité des caspases-8 et -3 après le traitement au FasR(Ab). Nous avons aussi détecté une interaction entre PyLT-Ag et des éléments du DISC (death-inducing signaling complex) dans des expériences d’immunoprécipitation. Nous proposons que PyLT-Ag empêche le recrutement ou l’activation de la procaspase-8 sur le récepteur FAS. Cet événement indépendant de l’immortalisation cellulaire pourrait contribuer à la progression cancéreuse en présence de PyLT-Ag. PyLT-Ag est une protéine multi-domaines qui

interagit avec diverses protéines endogènes pour modifier les fonctions cellulaires. Jusqu'à maintenant, aucune analyse concertée des changements d'expression génique associés à l'expression de PyLT-Ag au cours de la progression tumorale n'a été réalisée. Pour adresser cette question nous avons appliqué la technologie des micropuces Affymetrix sur de l'ARN isolé de cellules NIH3T3 spontanément immortalisées exprimant ou non PyLT-Ag. Puisque dans ces cellules les événements associés à l'immortalisation cellulaire se sont déjà produits en absence de PyLT-Ag, nous cherchons à identifier des événements supplémentaires associés à la transformation précoce. Notre analyse globale révèle des modulations intéressantes dans des voies métaboliques conformes aux divers rôles de PyLT-Ag. De plus, en utilisant divers modèles de souris transgéniques ainsi que deux autres oncogènes viraux nous transposons nos données de culture cellulaire vers l'animal. Notre modèle cellulaire peut donc potentiellement être utilisé pour identifier des événements génétiques/épigénétiques associés à la carcinogénèse chez l'animal et chez l'homme.

Mots-clés : Carcinogénèse, étapes multiples, immortalisation, transformation, polyome murin, SV40, antigène grand-T

Abstract

In vitro, cellular immortalization and transformation define a model for multistep carcinogenesis and current ongoing challenges include the identification of specific molecular events associated with steps along this oncogenic pathway. Polyomavirus large T antigen (PyLT-Ag), a nucleophosphoprotein essential for regulating viral gene expression, modulates the cell cycle by binding to the Rb tumor suppressor gene product. PyLT-Ag/Rb binding is essential for *in vitro* immortalization. However, the effect of PyLT-Ag on apoptosis has not been extensively studied. We have previously reported that FasR agonist antibodies (FasR(Ab)) treatment of Sertoli cells derived from transgenic mice expressing PyLT-Ag induces the growth arrest of these cells without concomitant apoptosis. Here we show that stable expression of PyLT-Ag in murine Sertoli TM4 and hybridoma NSO cell lines confers protection from FasR(Ab)-induced apoptosis. The protection was maintained up to 48 h when cells were grown continuously in the presence of FasR(Ab). Removal of the death stimulus after 24 h exposure was sufficient to allow full recovery of the PyLT-Ag expressing cells. The protective effect conferred by PyLT-Ag was associated with a delay in the sequential activation of caspase-8 and -3 after FasR(Ab) treatment. PyLT-Ag co-precipitated following immunoprecipitation of procaspase-8 or FADD, both components of the DISC. Based on these results we suggest that PyLT-Ag directly impedes the recruitment or activation of procaspase-8 by the FasR. PyLT-Ag expression in TM4 cells was also associated with protection from TNF- α - and taxol-induced apoptosis. Taken together, these results indicate that PyLT-Ag can be a potent inhibitor of FasR(Ab)-, TNF- α - and taxol-induced apoptosis and we propose that this event may contribute to carcinogenesis in the context of PyLT-Ag expression. Based on the expression of polyomavirus large-T antigen (PyLT-Ag), we coupled cell culture and genomic approaches to target post-immortalization events associated with transformation. Within groups of genes that were consistently up or down regulated in the presence of PyLT-Ag, alterations

in the expression of α -sm-actin and several actin-regulating genes correlated with loss of cellular actin cytoskeleton integrity and resulted in cytoskeleton reorganization. Additionally, expression profiles influenced by PyLT-Ag were compared to re-analyzed/published datasets for cell culture and mouse models expressing PyLT-Ag, SV40LT-Ag or E1A and revealed multiple overlapping candidates including Necdin, Hip1r, Hells, Peg3 and members of gene families such as Idb, myb and mcm. In particular, we noted that Necdin is up regulated in transgenic mouse brain and prostate tissues expressing LT-Ags. Essentially, a cell culture model can be used to identify events associated with multistep cancer progression in various animal tissues and cross comparisons between these models allowed us to make several interesting observations related to the hierarchy of events in multistep carcinogenesis.

Keywords : Carcinogenesis, multistep, immortalization, transformation, polyoma virus, SV40, Large-T antigen

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xiii
Dédicace	xv
Remerciements	xvi
CHAPITRE I-Introduction	1
1.1 Le cancer	1
1.2 Le cancer, une maladie moléculaire	3
1.3 L'apoptose	7
1.4 L'environnement microtissulaire	13
1.5 Le concept de carcinogenèse multiples étapes	16
1.6 Les virus et le cancer	22
1.7 La carcinogenèse virale	23
1.8 Les polyomavirus	24
1.9 Les transcrits précoces ou antigènes T des polyomavirus	25
1.10 L'antigène grand-T	27
1.11 Modéliser la carcinogenèse à multiples étapes : les oncogènes viraux	36
1.12 Les objectifs : Identifier les événements associés à la transformation	39

CHAPITRE II- Polyomavirus large T antigen protects mouse cells from Fas-, TNF- α and taxol-induced apoptosis.	43
CHAPITRE III- Large T-antigen gene expression analysis reveals cytoskeletal effects and identifies modulated targets in transgenic mice	75
CHAPITRE IV-Discussion	110
4.1 Validation de la synergie entre FasR et PyLT-Ag	111
4.1.1 PyLT-Ag protège temporairement contre l'apoptose induite par FasR	112
4.1.2 Le concept des régulateurs apoptotiques	113
4.1.3 PyLT-Ag bloque un signal au niveau du DISC	114
4.1.4 PyLT-Ag retarde la dégradation de l'ADN génomique	115
4.1.5 Rôle de PyLT-Ag au niveau des interactions directes protéine-protéine	116
4.1.6 PyLT-Ag, apoptose et carcinogénèse	119
4.2 La réalisation d'une publication sur le cancer de l'ovaire pour raffiner l'utilisation de la technologie Affymetrix appliquée à des phénotypes complexes	120
4.3 Événements précoces de la carcinogénèse multiples étapes associée à l'expression de PyLT-Ag	125
4.3.1 Mise au point d'un nouveau modèle pour identifier des événements indépendants de l'immortalisation et associés à PyLT-Ag	126

4.3.2 Identification des gènes modulés par PyLT-Ag dans des fibroblastes murins immortalisés spontanément	127
4.3.3 Comparaison des profils d'expression associés à PyLT-Ag et SV40LT-Ag	130
4.3.4 Comparaison des profils d'expression associés aux oncogènes viraux entre des plateformes expérimentales différentes	131
4.3.5 Les familles de gènes modulés par les LT-Ag	134
4.3.5.1 Nectin	135
4.3.5.2 Le cytosquelette d'actine	137
4.3.6 La dichotomie entre les modèles de souris et le cancer humain	140
4.3.7 Plusieurs candidats identifiés dans notre étude sont associés à des cancers humains	144
4.3.8.1 Perspectives reliées à l'apoptose	145
4.3.8.2 Perspectives reliées aux candidats précoces associés à la transformation précoce par PyLT-Ag	147
CHAPITRE V- Conclusion	150
Bibliographie des chapitre I-IV et V	153
Annexe I	179

Liste des figures

CHAPITRE I-Introduction

- Figure 1 Schématisation simplifiée des voies de signalisation apoptotiques principales 9
- Figure 2 Schématisation des protéines interagissant avec SV40LT-Ag et PyLT-Ag 29
- Figure 3 Carcinogenèse multiples étapes *in vitro* 37

CHAPITRE II-Article 1

- Figure 1 Expression of PyLT-Ag and FasR in transfected TM4 and NSO cells by Northern and Western blot analysis 69
- Figure 2 The effect of PyLT-Ag expression on DNA fragmentation induced by FasR(Ab) stimulation 70
- Figure 3 The effect of PyLT-Ag expression on DNA fragmentation induced by TNF- α , taxol and camptothecin 71

Figure 4 Sequential caspase activation in TM4 and TM4-PGKLT5 cells stimulated by FasR(Ab) or Taxol 72

Figure 5 PyLT-Ag interacts with FADD / Caspase-8 and this interaction is enhanced by FasR stimulation 73

Figure 6 Model of PyLT-Ag anti-apoptotic activity 74

CHAPITRE III-Article 2

Figure 1 Analysis of mRNA expression levels and validation of Affymetrix microarray data for selected genes in NIH3T3 and TM4 clones 104

Figure 2 Validation of microarray identified candidate genes by Northern blot analysis on an independent extended clone set and in PyLT-Ag transgenic animal 105

Figure 3 Candidate genes and group A genes modulated by PyLT-Ag in mouse NIH3T3 fibroblast 106

Figure 4 Venn diagram representing candidate intersect comparisons between different model systems 107

Figure 5 Western blot analysis of protein expression for selected genes in cell culture and in tissues from PyLT-Ag transgenic animal 108

Figure 6 Candidate genes modulated by PyLT-Ag at the transcriptional level can also have functional significance at the protein level 109

CHAPITRE IV-Discussion

Figure 4 Schématisation simplifiée des voies de signalisation apoptotiques principales et localisation potentielle des activités de PyLT-Ag 117

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BK	Polyomavirus humain BK
BKLT-Ag	Antigène grand-T du virus de BK (Large T)
DD	Death domain
DISC	Death-inducing signaling complex
E2F's	Réfère aux facteurs de transcription de la famille E2F
EBV	Virus de Epstein-Barr
FasR	Récepteur Fas
FasR(Ab)	Anticorps agoniste anti-FasR
HPV	Papillomavirus humains
JC	Polyomavirus humain Jamestown canyon
JCLT-Ag	Antigène grand-T du virus de JC (Large T)
kDA	Kilo dalton
K19	Kératine 19
LT-Ag	Antigène grand-T (Large T)
MEFs	Fibroblastes embryonnaires primaires de souris
MMTV	Mouse mammary tumor virus
MT-Ag	Antigène moyen-T (Middle T)
Mt	Metallothionéine
NGFr	Nerve growth factor receptor
NIH3T3	Fibroblastes de souris immortalisés spontanément
Nues (souris)	Souris athymiques
p53	Le gène suppresseur de tumeur associès au syndrome de Li Fraumeni
pRb ou Rb1	Le gène suppresseur de tumeur Rb associé au rétinoblastome ou p105

pRB's	Réfère aux trois membres de la famille du gène du rétinoblastome
Py	Virus de polyome Murin
PyLT-Ag	Antigène grand-T du virus de polyome (Large T)
PyMT-Ag	Antigène moyen-T du virus de polyome (Middle T)
PyST-Ag	Antigène petit-T du virus de polyome (Small T)
PyTT-Ag	Antigène minuscule-T du virus de polyome (Tiny T)
Rb2	p107 de la famille du suppresseur de tumeur Rb associé au rétinoblastome
Rb3	p130 de la famille du suppresseur de tumeur Rb associé au rétinoblastome
ST-Ag	Antigène petit-T (Small T)
SV40	virus de singe rhésus 40 (simian virus 40)
SV40LT-Ag	Antigène grand-T du virus SV40 (Large T)
SV40ST-Ag	Antigène petit-T du virus SV40 (Small T)
T-Ag	Antigène-T (tumor associated antigen)
TM4	Lignée cellulaire de Sertoli murine
TNF- α	Tumeur necrosis factor alpha
TNF-R1	Récepteur TNF
TT-Ag	Antigène minuscule-T, mini-T (Tiny T)

J'aimerais dédier cette thèse à ma famille qui m'a toujours démontré un support infailible. Particulièrement à mon père Yvon Rodier, ma mère Louissette Isabel Rodier et à mon frère Michel Rodier. Avec une attention toute spéciale, je désire aussi inclure ma femme et compagne d'aventures, Marie-Eve Robillard. Elle a parcouru beaucoup de chemin avec moi durant ces dernières années et ce n'est qu'un début.

Remerciements

J'aimerais remercier particulièrement mon directeur de thèse, Anne-Marie Mes-Masson, pour tout le support et la liberté qu'elle m'a accordé durant les six années de mes études graduées dans son laboratoire. Si c'était à refaire, et je dis bien SI, je n'hésiterais pas à recommencer. J'aimerais remercier aussi la grande famille de l'Institut du cancer de Montréal qui a permis à ces six années d'être particulièrement agréables. À un niveau plus scientifique, la collaboration avec les laboratoires du docteur Rashmi Kothary et du docteur Lee Wall a été inestimable et d'un grand plaisir. Je ne peux m'empêcher de mentionner la perte d'un mentor et d'un ami en la personne de Lee Wall. Bien que je ne comprenne pas encore toutes ses blagues, elles ont certainement rafraîchi mes journées au labo. Bien sûr, mon collaborateur principal des trois premières années, Richard Bertrand, a été absolument indispensable. Finalement, j'aimerais remercier tous les étudiants, médecins, chercheurs et techniciens qui ont traversé le laboratoire d'Anne-Marie durant mon séjour (la liste est longue!). Louise Champoux, Michela Bossolasco, Michel Lebel, Hafida Lounis, Diane Provencher, Fred Saad, Julie Lambert, Véronique Ouellette, Laurent 'Larry' Lessard, Julie Lafontaine, François 'Capitaine' Veillette, Christine Maugard, Susan Ren, Magda, Phil Gannon, Jean-Simon 'In my room' Dialo, Anne Fejes, Lise Portelance et Manon Deladurantaye. Dans cette liste, je désire souligner François et Julie qui ont été d'une grande aide pour compléter ma dernière année. Finalement, je dois remercier ma mère, Louise, pour la correction finale de mon super français et mon frère pour son aide lors de mon dépôt.

Introduction

1.1 Le Cancer

Le cancer est une maladie initiée lorsqu'un groupe de cellules se multiplie d'une façon non contrôlée dans le cadre d'un organisme complexe et organisé. Ces cellules vont perturber le bon fonctionnement du métabolisme global et envahir des tissus sains pour éventuellement mettre en péril la survie de l'organisme hôte. Plus de 100 types de cancers sont répertoriés chez l'homme. Le cancer est présent chez la plupart des espèces animales et dans beaucoup de végétaux aussi bien que chez les mammifères. Il peut se déclarer dans toutes les tranches d'âge de la population humaine et devient plus prépondérant chez les personnes âgées. Sans traitements appropriés, la plupart des cancers sont mortels et conséquemment la maladie est une des principales causes de décès dans beaucoup de pays, surtout dans les pays développés où l'espérance de vie est plus élevée. Les probabilités d'apparition du cancer sont environ égales entre les hommes et les femmes. La maladie peut attaquer n'importe laquelle partie du corps et peut ensuite se propager. Les sites primaires les plus souvent affectés sont la peau, les organes digestifs, les poumons, la prostate chez l'homme et les seins chez la femme. La majorité des cancers primaires se développent dans des organes qui sont composés de cellules au potentiel prolifératif élevé, mais la maladie à un stade plus avancé peut se propager virtuellement n'importe où dans le corps avec une prépondérance pour les organes comme les poumons et les organes lymphatiques (La Vecchia et al., 2000; Weir et al., 2003).

Toute cellule dite "normale" est susceptible de devenir cancéreuse et contient des instructions chimiques complexes, entre autres les chaînes d'acide désoxyribonucléique ou ADN (matériel génétique). Ces instructions, combinées aux signaux provenant du microenvironnement de la cellule, dirigent la croissance et la reproduction contrôlées de cette cellule. Le cancer surgit quand ces instructions chimiques sont altérées ce qui permet

aux cellules de se multiplier d'une façon erratique. L'altération des instructions propres à la cellule doit souvent être combinée avec des variations ou réponses du microenvironnement tissulaire pour finalement permettre l'apparition du cancer. L'accumulation de ces diverses altérations dans les instructions cellulaires et microenvironnementales définit un processus nommé carcinogenèse. Ce processus évolutif représente la progression d'une cellule ou d'une population de cellules normales vers un état de cellules cancéreuses agressives et envahissantes (Adams and Cory, 1991; Balmain, 2002). Les trois facteurs de risque les plus importants pour le développement du cancer chez l'homme sont l'exposition directe à des substances carcinogènes, l'hérédité et l'âge (Grant, 2001; Shields and Harris, 2000; Sinha and Caporaso, 1999). Certaines substances chimiques, biologiques et les rayonnements énergétiques (radiations) dans l'environnement englobent la catégorie des substances exogènes qui peuvent endommager l'ADN et provoquer des mutations carcinogènes. Ces mutations peuvent soit; activer des proto-oncogènes et promouvoir la prolifération incontrôlée, inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs qui eux empêchent cette prolifération, ou causer des réorganisations majeures dans le matériel génétique (Solomon et al., 1991). En plus des agents chimiques, la catégorie des substances carcinogènes contient des agents biologiques tels que les virus qui peuvent eux aussi activer des oncogènes et inactiver des suppresseurs de tumeurs. De forte dose et/ou des expositions répétées-chroniques à tous ces carcinogènes ont le potentiel d'altérer les instructions cellulaires et de causer un cancer. Les cancers de types héréditaires sont causés par le transfert parents/enfants de proto-oncogènes activés (oncogènes) ou par le transfert d'un gène suppresseur de tumeurs défectif (Guilford, 2000; Solomon et al., 1991). Le transfert héréditaire peut aussi être constitué d'un problème épigénétique, ou de régulation au niveau de l'expression de ces oncogènes/suppresseurs de tumeurs, ce qui peut entraîner le même résultat final (Macaluso et al., 2003; Pulford et al., 1999). De façon similaire à l'exposition chronique, une accumulation constante de dommages avec l'âge est probablement responsable de l'augmentation de la carcinogenèse associée avec le vieillissement (Balducci and Beghe, 2001; Campisi, 2003; Franceschi and La Vecchia, 2001).

Sans traitement approprié, la plupart des cancers sont mortels. En conséquence, les méthodes de diagnostiquer et de traiter la maladie se sont améliorées considérablement depuis le milieu du XXe siècle. Environ la moitié de tous les patients atteints de cancer survivent maintenant au moins cinq ans après traitements (Weir et al., 2003). Parce que la maladie est très difficile à traiter quand elle atteint un stade avancé et qu'elle reste encore souvent indétectable avant ce stade, il est très important de pouvoir l'identifier rapidement ou même de pouvoir la prédire (Furberg and Ambrosone, 2001). Ceci représente aujourd'hui un champ de recherche extrêmement actif. Certainement, une meilleure connaissance des processus précoces entraînant une cellule normale à perdre ses freins prolifératifs pour devenir cancéreuse pourrait grandement aider à développer des stratégies de prévention de la maladie. Cette recherche d'une meilleure compréhension du processus de carcinogenèse cellulaire fait l'objet de cette thèse.

1.2 Le cancer, une maladie moléculaire

Cette section tente de résumer, très brièvement, les connaissances accumulées sur la progression d'un cancer chez un vertébré. On peut résumer le processus néoplasique d'une tumeur réelle par le modèle suivant qui peut s'initier dans n'importe quel tissu prédisposé au cancer: acquisition de quelques mutations carcinogéniques initiatrices favorisant la croissance dans une seule cellule et contribution potentielle de l'environnement cellulaire pour favoriser la croissance de cette cellule activée. Tôt durant le processus néoplasique, les cellules clonales dérivées de cette cellule activée se développent en petite masse limitée à une taille d'environ 1-2 mm par manque de nutriments. La croissance continue qui dépasse cette taille de 1-2 mm *in vivo* dans un organe dépend entre autres, des capacités de la néoplasie à attirer des vaisseaux sanguins, à évader le système immunitaire et à envahir les tissus normaux environnants. La progression de la maladie vers un stade plus avancé

implique que les tumeurs acquièrent des capacités métastatiques aux endroits distants dans l'organisme (Balmain, 2002) (Adams and Cory, 1991; Hanahan and Weinberg, 2000; Macaluso et al., 2003). Finalement, la perturbation du bon fonctionnement d'un organe vital ou du métabolisme global entraîne la mort de l'organisme hôte. Tous ces événements peuvent être considérés comme des propriétés essentielles au développement d'un cancer potentiellement léthal. Ces étapes grossières représentent des caractéristiques pathologiques associées à la progression du cancer, mais elles peuvent aussi être décrites au niveau moléculaire.

Le cancer est essentiellement basé sur l'acquisition par quelques cellules de caractéristiques liées à la croissance cellulaire non contrôlée. Normalement, dans le contexte d'un tissu sain, un nombre limité de cellules vont proliférer et ce dans des conditions très précises, comme la réparation d'une blessure. La plupart des mécanismes moléculaires identifiés comme étant impliqués dans le développement du cancer concernent l'altération de la balance entre la quiescence cellulaire et la croissance, entre la perte et le gain de cellules dans un environnement restreint. L'accumulation de changements moléculaires va ainsi permettre à une masse de cellules, la néoplasie, de générer plus de cellules qu'elle n'en perd. Plusieurs gènes ont été identifiés et associés à des altérations de cette balance en faveur de la progression néoplasique.

Les principaux médiateurs du contrôle de la croissance cellulaire sont des gènes nommés oncogènes et suppresseurs de tumeurs. Bien que ces deux familles de gènes comprennent maintenant chacune une multitude de membres, il convient de mentionner un oncogène typique; RAS, et les deux suppresseurs de tumeurs les plus étudiés; p53 et pRb. Alors que le gène p53 est directement muté dans plus de 50% des cancers humains, l'inactivation directe ou indirecte de l'activité de pRb se retrouve probablement dans plus

de 90% des cancers (Sherr and McCormick, 2002). Les suppresseurs de tumeurs de la famille du rétinoblastome (pRb's réfère aux trois membres de la famille soit p105 ou Rb ou Rb1, p107 ou Rb2 et p130 ou Rb3) sont des régulateurs négatifs essentiels du cycle cellulaire (Sage et al., 2000). La perte de fonction héréditaire d'un seul allèle de pRb chez l'homme cause de façon invariable l'apparition de rétinoblastome à un âge très jeune. Son ablation génétique chez la souris est invariablement létale au niveau embryonnaire (Sage et al., 2000). Par contre, au niveau cellulaire, l'ablation ou l'inactivation de pRb ou de plusieurs membres de cette famille entraîne une perte des freins prolifératifs et provoque une entrée rapide dans le cycle cellulaire et la prolifération des cellules (Sage et al., 2000). Il est clair que les pRb's ont un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Une cellule en voie de devenir cancéreuse doit absolument trouver un moyen de les inactiver, soit par mutations, délétions au niveau de l'ADN, ou soit par des mécanismes épigénétiques qui vont entraîner une perte de fonction de ces gènes. Similairement à pRb, le suppresseur de tumeurs p53 a essentiellement été impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (voir section 1.3) (Hickman et al., 2002; Oren, 2003). Mais surtout, on le considère comme le gardien du génome. L'ablation génétique de p53 chez la souris génère des phénotypes qui varient entre la mort prématurée embryonnaire et l'apparition précoce du cancer (Sherr and McCormick, 2002). Chez l'homme, les mutations de p53 sont associées au syndrome de Li Fraumeni et prédisposent fortement au cancer (Varley, 2003). Le consensus actuel est que la perte de p53 entraîne une instabilité génomique active qui va promouvoir l'accumulation de mutations lors de la division cellulaire et par conséquent, le développement du cancer (Sherr and McCormick, 2002).

Le nom oncogène représente un groupe de gènes qui ont une activité contraire à celle des suppresseurs de tumeurs. Ce sont des gènes qui vont promouvoir de façon active la division cellulaire. Dans le cancer, ils sont soit mutés, pour augmenter leur activité, ou leur niveau d'expression est augmenté ce qui entraîne le même résultat, la stimulation de la

croissance cellulaire. La plupart des oncogènes mitogéniques, c'est-à-dire ceux qui suscitent la division cellulaire, font partie de voie de signalisation intracellulaire émanant de la surface de la cellule. Ils représentent des éléments critiques de ces voies et vont généralement en multiplier le signal final. L'oncogène Ras, qui est une petite GTPase normalement associée à certains récepteurs membranaires, en est un exemple parfait. Sa surexpression ou la simple expression d'une version mutée et constitutivement active va altérer la cascade de signalisation cellulaire émanant normalement des récepteurs pour les facteurs de croissance (Pronk and Bos, 1994). Cette perturbation va permettre à la cellule de croître même si les facteurs de croissance qui lui étaient préalablement essentiels sont absents de l'environnement. Cette perte de la dépendance aux facteurs de croissance stimule fortement la croissance, mais peut aussi causer un arrêt brusque et permanent de la croissance cellulaire en présence de certains suppresseurs de tumeurs (Serrano et al., 1997). Parce que les suppresseurs de tumeurs sont extrêmement efficaces dans leur travail de prévention de la croissance, l'ordre d'activation-inactivation et les différentes combinaisons d'oncogènes-suppresseurs de tumeurs peut définir le destin d'une cellule cancéreuse. On peut retrouver cette combinaison d'inactivation de certains suppresseurs de tumeurs et d'activation de certains oncogènes dans tout cancer. De plus, l'identité de ces combinaisons d'oncogènes-suppresseurs de tumeurs peut changer de façon spécifique dépendamment du type de tissus où le cancer se développe. Ces altérations vont causer une perte du statut de différenciation terminale de la cellule et une réorientation du processus de différenciation normale vers la croissance cellulaire incontrôlée. On peut considérer une cellule ayant subie une ou quelques unes de ces altérations génétiques comme étant activée, ou prénéoplasique. Autrement dit, l'accumulation de plus de mutations et/ou l'apparition de conditions favorables dans le microenvironnement seront nécessaires au développement d'un cancer à partir de cette cellule activée. Les sections suivantes vont décrire plusieurs de ces processus qui vont permettre à une ou un groupe de cellules de continuer leur progression cancéreuse.

1.3 L'apoptose

Pour maintenir un équilibre constant dans le nombre des cellules qui le compose et préserver son homéostasie, le corps humain doit avoir des mécanismes stricts de contrôle de sa population cellulaire. Il doit se débarrasser des cellules mortes, trop vieilles, ou endommagées, sans toutefois nuire à celles qui sont en bonne santé. Nous savons maintenant qu'il existe deux façons bien distinctes de mourir pour une cellule; elle peut soit être détruite par une agression mécanique environnementale, et mourir par "nécrose", ou elle peut aussi répondre à un signal biologique moléculaire extérieur ou interne et déclencher son programme de mort cellulaire programmée, l'apoptose. Lors de la nécrose, la cellule se fractionne et ses organelles internes ainsi que son contenu cytoplasmique sont éjectés dans le fluide extracellulaire. Les cellules environnantes ne sont pas épargnées parce que des composés actifs normalement séquestrés dans la cellule se retrouvent libres. Cette activité destructrice alerte le système immunitaire qui y répond par une réaction inflammatoire. C'est cette partie de la réponse immunitaire qui est la plus dommageable pour les tissus environnants car les cellules du système immunitaire ingèrent les cellules mortes, et les vivantes. Ce phénomène de mort cellulaire est mécaniquement passif, si on ne tient pas compte de la réaction inflammatoire. Contrairement, lors du processus d'apoptose, la cellule prend les mesures nécessaires pour s'assurer de sa propre éradication. Lorsque la cellule s'engage sur la voie de l'apoptose, il n'y a pas de retour en arrière, elle diminue en volume, son information génétique se condense à la périphérie du noyau et celui-ci se fragmente en morceaux. La cellule elle-même se brise ensuite en fragments nommés corps apoptotiques sans toutefois libérer son contenu dans l'environnement. Ces parcelles de ce qui fût la cellule sont absorbées par ses voisines sans déclencher d'alerte générale au système immunitaire. C'est une mort propre qui ne laisse pas de trace. L'apoptose est un processus naturel qui permet à l'organisme de se débarrasser efficacement et sans inflammation des cellules inutiles ou endommagées. C'est aussi un phénomène essentiel durant le développement, la

sélection du système immunitaire, l'homéostasie de l'adulte et le vieillissement. Des perturbations dans les processus apoptotiques sont associées avec une multitude de maladies humaines incluant le cancer (Mountz et al., 1997; Thompson, 1995; Vaux and Korsmeyer, 1999). Plusieurs défauts génétiques dans des éléments clés de ce programme sont assez graves pour entraîner la mort prématurée chez des souris manipulées génétiquement (Hakem et al., 1998; Honarpour et al., 2000; Kuida et al., 1998). Le signal apoptotique initiateur peut provenir de l'extérieur de la cellule, principalement par l'activation de récepteurs de mort cellulaire à la membrane cytoplasmique (Nagata, 1997; Ozoren and El-Deiry, 2003; Schmitz et al., 2000), ou de l'intérieur, par des dommages à l'ADN ou d'autres perturbations métaboliques majeures (Kaina, 2003). Cette signalisation apoptotique procède ensuite vers l'éradication de la cellule en activant des cascades de protéases intracellulaires (Leist and Jaattela, 2001). Bien qu'elles ne soient pas seules, les principales protéases impliquées dans cette signalisation se nomment les caspases. La cascade d'activation de ces protéases entraîne le clivage séquentiel d'une grande variété de substrats intracellulaires. Ultimement, cette cascade active des nucléases spécifiques au processus apoptotique qui vont dégrader l'ADN génomique. La mitochondrie, organelle essentielle de la respiration et de la production énergétique intracellulaire, est fortement impliquée dans l'amplification et dans l'initiation du signal apoptotique (voir plus bas). Pour cette raison, une grande variété de protéines résidentes de la mitochondrie sont essentielles pour déterminer le potentiel de survie d'une cellule recevant un signal apoptotique (Ferri and Kroemer, 2001).

Figure 1: Signalisation apoptotique

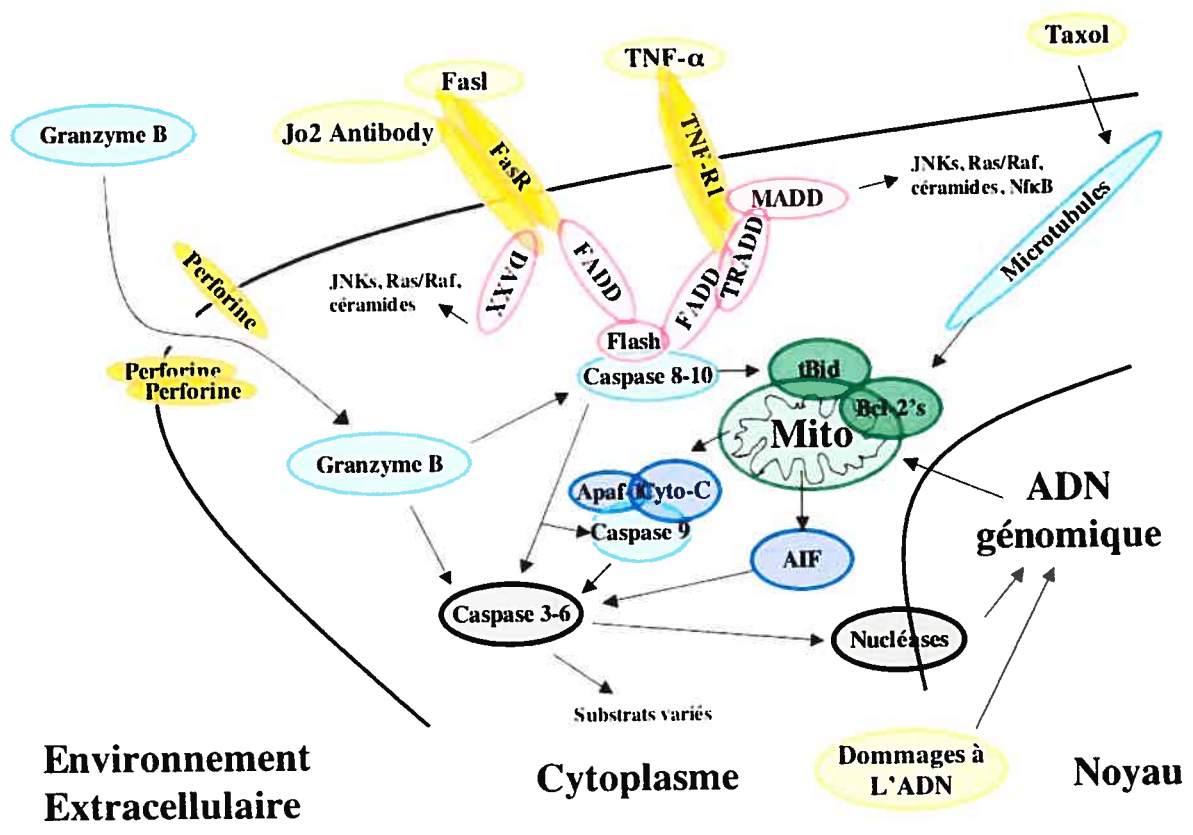


Figure 1: Schématisation simplifiée des voies de signalisation apoptotiques principales

Les récepteurs FAS (FasR) et TNF (TNF-R1) sont deux protéines transmembranaires faisant partie de la famille du NGFr (nerve growth factor receptor) et représentent en ce moment les modèles les plus détaillés de signalisation apoptotique (revue par (Nagata, 1997)). On connaît les événements majeurs de la cascade qui va mener le signal apoptotique de la membrane cellulaire jusqu'au noyau (Voir figure 1). L'oligomérisation de FasR ou de TNF-R1 par leur ligands respectifs va recruter et activer un complexe protéique nommé DISC (death inducing signalling complex) du côté cytoplasmique du récepteur au niveau de son death domain (DD). Différentes protéines composent le DISC qui comprend la molécule adaptatrice FADD dans le cas de FasR et FADD/TRADD dans le cas de TNF-R1. Ce complexe est aussi composé de plusieurs protéines qui vont agir en tant que co-activateurs ou co-inhibiteurs en fonction du contexte cellulaire. Ultiment, le DISC génère l'activation d'un de ses membres, la procaspase 8, aussi connue sous le nom de FLICE. Cette caspase 8 activée va directement cliver et activer plusieurs caspases incluant des caspases exécutrices telles que la caspase 3 (CPP-32, YAMA ou APOPAIN) qui semble être le médiateur majeur du reste du signal. Il y a probablement d'autres caspases ainsi que des protéases ayant une activité caspase-like qui sont activées. Il existe aussi d'autres voies de signalisation issues de FasR ou de TNF-R1 comme les céramides, JNKs, RAS et NF κ B, mais ce sont toutes des voies de signalisation plus lentes pour induire l'apoptose et moins bien décrites. Dépendamment du contexte cellulaire, l'importance de l'amplification mitochondriale du signal apoptotique émanant des récepteurs de mort cellulaire est variable. Par exemple, le clivage de Bid par caspase 8 au niveau du DISC va générer le médiateur tBid, qui va transloquer à la mitochondrie pour interagir avec les membres de la famille protéique des Bcl-2. L'altération par tBid de l'équilibre entre les activités pro- (Bax, Bak, Bad, Bik, etc.) et anti-apoptotique (Bcl-2, bcl-XL, etc.) des différents membres de cette famille permet de générer un signal apoptotique émanant directement de la mitochondrie et impliquant le relâchement du cytochrome C. Ce signal provoque l'activation de la procaspase 9 initiateur par le biais de Apaf-1 dans un complexe nommé l'apoptosome. La caspase 9 active ensuite les caspases exécutrices tel

que la caspase 3. Bien que la voie mitochondriale peut aider à amplifier un signal apoptotique provenant des récepteurs de mort cellulaire, cette voie de signalisation apoptotique est suffisante par elle-même pour initier l'apoptose en l'absence des récepteurs de mort cellulaire et ceci en réponse à des stimuli pro-apoptotiques endogènes à la cellule. Finalement, peu importe les voies exactes de signalisation impliquées, lorsque les caspases exécutrices comme la caspase 3 sont activées, on observe rapidement et irrémédiablement le clivage de plusieurs substrats cytoplasmiques et nucléaires ainsi que la dégradation nucléosomale de l'ADN génomique.

L'apoptose cause une mort cellulaire rapide et 'propre' et le processus est exploité par le volet cellulaire du système immunitaire pour éliminer de façon efficace les cellules malades ou infectées par des virus. L'apoptose est un processus régulé par des cascades de signalisations cellulaires complexes impliquant plusieurs organelles intracellulaires telles que la mitochondrie et le complexe de golgi (Ferri and Kroemer, 2001) et plusieurs gènes-clé de cette cascade sont maintenant considérés comme des oncogènes. Principalement parce que la surexpression de ces gènes permet de protéger efficacement une cellule contre l'apoptose (Johnstone et al., 2002). Dans une population de cellules prénéoplasiques ou tumorales cette activité peut clairement faire pencher la balance en faveur de l'augmentation du nombre de cellules en prévenant la mort cellulaire. En fait, parce que la plupart des cellules cancéreuses détruites lors des radio- ou des chimiothérapies meurent par apoptose, une résistance contre ce processus cellulaire peut aussi promouvoir la survie des cellules cancéreuses durant un traitement chez un patient (Fulda and Debatin, 2003; Hersey and Zhang, 2003; Kasibhatla and Tseng, 2003).

Très tôt lors de leur développement chez un individu sain, les cellules tumorales vont exposer certains antigènes anormaux et seront reconnues comme étant des corps

étrangers par le système immunitaire qui les éliminera directement (Appelbaum, 1992). Un bon exemple démontrant l'importance du système immunitaire pour combattre le cancer est celui des animaux ou individus en condition d'immunosuppression qui sont prédisposés à développer un cancer (Penn, 1986; Ryffel et al., 1992). Similairement, le déclin de l'efficacité du système immunitaire au cours du vieillissement contribue aussi fort probablement à l'augmentation des risques d'avoir le cancer (Ershler, 1993). Ainsi, chez un individu sain, les cellules précancéreuses activées sont probablement assez fréquentes, mais elles sont rapidement éliminées. Il est clairement démontré que les cellules tumorales sont majoritairement éliminées de l'organisme par le volet cellulaire du système immunitaire (Appelbaum, 1992). C'est-à-dire que des globules blancs comme les lymphocytes T ou les macrophages vont physiquement localiser une cellule tumorale pour ensuite l'éliminer. Cette élimination active implique que la cellule du système immunitaire va sécréter des cytokines pour sensibiliser les cellules cibles, induire un processus apoptotique classique incluant l'activation des récepteurs de mort cellulaire tel que FasR et TNF-R1 (Chinnaiyan and Dixit, 1997) ainsi qu'une activation directe de la chaîne de protéase des caspases par le biais de granzyme B (Lord et al., 2003). Les récepteurs comme FasR et TNF-R1 semblent être impliqués directement dans l'immunité cellulaire lors de la réponse immunitaire cellulaire. En effet, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés secrètent de l'INF- γ pour induire l'expression de FASr dans les cellules cibles. Le contact entre les lymphocytes T CD8⁺ qui expriment le ligand FAS (FasL) et les cellules cibles induit ensuite l'apoptose dans ces cellules. FasL fait donc partie d'un arsenal incluant aussi l'INF- γ , le TNF- α , les perforines et granzymes B ainsi que certaines interleukines (Abbas et al., 1994). Au niveau global, la protection contre l'apoptose induite par FasR ou par d'autres récepteurs de mort cellulaire pourrait donc être un avantage pour la cellule cancéreuse voulant éviter le système immunitaire. Lorsqu'une cellule tumorale acquiert une résistance à l'apoptose, elle peut donc non seulement faire pencher la balance en faveur de la croissance incontrôlée, mais elle peut aussi devenir plus résistante aux attaques du système immunitaire (French and Tschopp, 2002). Cette caractéristique à double tranchant est probablement très précoce

lors du développement d'une masse tumorale et est aussi très critique puisque le système immunitaire peut être extrêmement efficace lors de l'élimination des cellules tumorales.

1.4 L'environnement microtissulaire

La contribution de l'environnement microtissulaire entourant les cellules préneoplasiques ne peut pas être négligée et est aussi considérée comme un pré-requis essentiel à la progression cancéreuse. Premièrement, pour favoriser la croissance des cellules potentiellement activées, mais surtout, pour plus tard, permettre la croissance continue des tumeurs (exemple : angiogenèse). Un exemple bien caractérisé de contribution environnementale est celui des carcinomes causés par les coups de soleil ou rayon UV. Ces rayonnements vont causer des mutations persistantes dites 'activantes' dans des cellules épithéliales de la peau. En particulier, le gène suppresseur de tumeurs p53 est muté dans plus de 90% des carcinomes des cellules squameuses de la peau. Bien que maintenant susceptibles à devenir cancéreuses, ces cellules activées devront souvent attendre plusieurs années pour qu'un environnement favorable au cancer se développe (Brash, 1997). Chez un individu jeune, la matrice extracellulaire et le stroma qui entourent les cellules épithéliales activées sont stables et envoient des signaux qui gardent ces cellules dans un état normal malgré leur caractère préneoplasique. Dans le cas particulier des cancers causés par les coups de soleil, il est fort probable que le vieillissement cause une déstabilisation graduelle du tissu sain qui permettra ultimement à ces cellules activées de commencer à proliférer de façon non contrôlée. En fait, de façon plus générale, on pense que dans les tissus vieillissant la surexpression de plusieurs types de protéases et de métallo protéinases par les cellules stromales senescentes permet la digestion de la matrice extra-cellulaire ce qui pourrait ensuite promouvoir la croissance des cellules activées (Krtolica and Campisi, 2003). Cette prolifération clonale permettra ensuite à la nouvelle population de cellules tumorales d'acquérir des mutations supplémentaires. Tous ces événements provenant de l'extérieur des cellules tumorales s'entrecroisent continuellement avec la plasticité génétique

représentée par l'acquisition de mutations et les processus épigénétiques incluant l'acquisition de nouveaux profils d'expression génétique pour permettre aux cellules cancéreuses d'accroître le potentiel prolifératif et envahisseur de la néoplasie. Bien que l'accent soit ici porté sur l'initiation de la carcinogenèse, cette contribution potentielle de l'environnement est importante à tous les stades de la progression tumorale et en particulier lors des interactions entre la tumeur et son environnement tel que décrit plus bas pour l'angiogenèse.

Une étape des plus critiques pour le développement d'une tumeur solide consiste à acquérir la capacité d'attirer des vaisseaux sanguins pour alimenter les cellules en nutriments essentiels et pour évacuer les déchets du métabolisme cellulaire. Cette habilité se nomme capacité à induire l'angiogenèse. Lorsque la néoplasie atteint un diamètre de 1-2 mm, l'oxygène et les nutriments essentiels à la survie et à la croissance cellulaire ne peuvent plus diffuser vers l'intérieur. La néoplasie atteint donc un état d'équilibre où certaines cellules continuent à proliférer tandis que les cellules au centre vont mourir par hypoxie. Il n'y a plus de croissance de la néoplasie. À ce stade, il est essentiel d'induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et de capillaires qui vont irriguer la tumeur et permettre sa croissance continue (Carmeliet and Jain, 2000). En particulier, les cellules cancéreuses vont devoir sécréter des facteurs pro-angiogéniques qui vont favoriser et diriger la croissance et la migration des nouveaux vaisseaux sanguins. Un des facteurs les mieux caractérisé à ce niveau se nomme VEGF (vascular endothelial growth factor). La sécrétion de VEGF par les cellules cancéreuses permet l'activation des cellules endothéliales résidentes dans les vaisseaux sanguins voisins de la tumeur. La sécrétion de VEGF lui-même, ainsi que la sécrétion de plusieurs autres facteurs incluant des membres de la famille des FGF (fibroblast growth factors), stimule la croissance et la migration de ces vaisseaux sanguins locaux. De plus, les cellules tumorales vont aussi sécréter des facteurs tel que des protéases extracellulaires qui vont altérer le microenvironnement

tissulaire et favoriser directement la migration des nouveaux vaisseaux sanguins et ultimement l'irrigation sanguine de la masse tumorale (Hanahan and Weinberg, 2000). Les cellules tumorales doivent donc non seulement acquérir des capacités intrinsèques qui vont leur permettre de proliférer, mais elles doivent aussi interagir avec leur environnement microtissulaire pour favoriser la migration des vaisseaux sanguins.

Les cellules tumorales ayant acquis la capacité d'angiogenèse et d'évasion du système immunitaire se développent généralement comme un organe distinct. La masse tumorale possède comme les autres organes une capsule protectrice qui l'empêche de fusionner avec les tissus normaux environnants. La perte éventuelle de cette capsule permet la prolifération dans le stroma et éventuellement l'invasion directement à travers les capsules protectrices des organes environnants. Juste avant cette étape, les chances de succès sont assez élevées lorsqu'on intervient de façon chirurgicale, puisque retirer la tumeur encapsulée permet de ne laisser pratiquement aucune cellule tumorale. Par contre, un cancer agressif ayant envahi la capsule protectrice d'un autre organe peut difficilement être retiré à moins d'enlever aussi une bonne partie de cet organe. Les cancers ayant atteint ce stade n'ont pas un bon pronostic si le patient survit, puisqu'ils impliquent la perte de fonctionnalité au niveau d'un autre organe. Finalement, les cancers les plus agressifs développent des capacités métastatiques aux endroits distants dans l'organisme. Ceci représente l'acquisition d'une capacité des cellules tumorales à s'exciser de la masse tumorale pour entrer dans la circulation sanguine et lymphatique. Plus important encore, elles ont la capacité de se fixer *de novo* sur une membrane biologique quelconque dans un site distant et de former une nouvelle néoplasie qui va évoluer d'elle-même (Bogenrieder and Herlyn, 2003; McClatchey, 1999). Les cancers qui ont atteint ce stade sont extrêmement agressifs. Il est impossible de les extraire chirurgicalement parce qu'ils sont maintenant présents à plusieurs sites et ils sont souvent capables de développer rapidement des résistances aux divers traitements anti-tumoraux. Il est critique de réussir à prévenir le développement d'un cancer avant qu'il n'atteigne ce stade final de la maladie.

1.5 Le concept de carcinogenèse multiple étapes

Les caractéristiques décrites précédemment, sauf la contribution précoce du microenvironnement tissulaire, représentent des habilités essentiellement intrinsèques que les cellules activées doivent acquérir pour pouvoir former un cancer. L'acquisition séquentielle de toutes ces caractéristiques fait partie d'un processus de tumorigenèse dit de carcinogenèse à multiples étapes. Depuis plusieurs années la modélisation des cancers humains par des modèles animaux ou par de la culture cellulaire fait partie des pratiques courantes. Ces modèles permettent de définir dans des conditions plus simples et plus reproductibles ce qui pourrait arriver dans le cas du développement d'un cancer humain. Ils ont aussi apporté des détails sur la progression cancéreuse et défini ce concept "*in vitro*" de carcinogenèse multiples étapes. La synthèse de ces modèles nous apprend qu'une cellule normale doit subir un minimum de 4 à 7 altérations pour devenir une cellule cancéreuse (Balmain, 2002; Grant, 2001; Hahn and Weinberg, 2002; Henderson et al., 1991; Klein and Klein, 1985). Ces différentes altérations nécessaires pour que la cellule dite normale puisse devenir cancéreuse peuvent être résumées en deux étapes essentielles, mais entrelacées; l'immortalisation et la transformation. Bien que ces deux phénomènes aient été majoritairement étudiés dans des modèles de culture cellulaire, il y a de fortes évidences démontrant leur importance lors du cancer dans les modèles animaux et chez l'humain.

L'acquisition par les cellules préneoplasiques de presque toutes les caractéristiques décrites au chapitre précédent représente la transformation cellulaire. Ce processus de transformation inclut les capacités qui permettent aux cellules cancéreuses de croître dans un environnement tissulaire qui essaie de limiter activement leur croissance. On parle ici de perte de réponse aux signaux limitant la croissance et de l'acquisition d'un potentiel mitogénique élevé. Ces activités peuvent être acquises par l'expression d'un puissant

oncogène comme RAS. La transformation inclut aussi la capacité d'activer l'angiogénèse et d'envahir les tissus avoisinants pour permettre la croissance de la tumeur. Ultimement, la transformation cellulaire apporte une capacité métastatique aux cellules cancéreuses. Il existe plusieurs essais *in vitro* qui permettent de déterminer le statut de transformation d'une cellule. Mais tout d'abord, il faut comprendre le deuxième processus important de la carcinogénèse multiple étapes, l'immortalisation cellulaire.

L'immortalisation cellulaire représente l'acquisition d'une capacité de division illimitée pour la cellule. Une caractéristique importante pour la formation de masses tumorales majeures. Pour prévenir cette éventualité, les organismes complexes comme les mammifères, ont élaboré un mécanisme suppresseur de tumeurs, la sénescence, qui permet de limiter le potentiel de division cellulaire. Une cellule qui entre en sénescence va changer de morphologie, elle va persister à long terme, devenir beaucoup plus grosse, acquérir des ramifications et perdre de la mobilité. Elle va aussi devenir résistante à la mort cellulaire programmée et commencer à sécréter différents facteurs qui vont lentement désorganiser les tissus où elle se trouve (Krtolica and Campisi, 2003). L'activation de la sénescence implique l'activité des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pRb et a été proposée comme étant un mécanisme suppresseur de tumeurs. Ceci représente un avantage chez un individu jeune, puisqu'à un certain point, une masse de cellules prénéoplasiques initiées va devoir arrêter sa croissance et entrer en sénescence. Malheureusement, l'accumulation de ces cellules sénescents au cours de la vie est probablement responsable, tout au moins partiellement, des phénotypes délétères associés au vieillissement (Campisi, 1997; Sharpless, 2003). Ainsi, chaque division cellulaire est enregistrée par des mécanismes moléculaires complexes et lorsqu'une cellule atteint la limite de son potentiel de division, elle entre dans cet état d'arrêt de croissance permanent qui se nomme la sénescence (Sharpless, 2003). Le principal mécanisme limitant les cellules humaines à nombre limité de divisions implique l'extrémité des chromosomes, les télomères. Les télomères sont

composés de séquences répétitives d'ADN longues de plusieurs kilobases et flanquants chaque extrémités des chromosomes humains. Plusieurs composantes protéiques spécifiques se fixe à cette séquence d'ADN et la structure nucléo-protéique qui en résulte permet de stabiliser l'extrémité chromosomique qui serait autrement instable. Les télomères peuvent compter le nombre de divisions cellulaires parce qu'à chaque division ils vont s'éroder jusqu'à un certain point critique où l'extrémité chromosomique devient instable et où le signal de sénescence est activé. De façon exclusive dans certaines cellules souches humaines, ainsi que dans la majorité des cellules cancéreuses, l'activation de l'enzyme télomérase va permettre le maintien de la longueur des télomères et inactiver ce mécanisme de comptage des divisions cellulaires. La télomérase stabilise ou allonge les télomères en ajoutant perpétuellement des séquences d'ADN télomériques répétitives, et compense donc pour l'érosion normale des télomères après chaque division cellulaire (Hanahan and Weinberg, 2000). En contraste flagrant avec les cellules humaines, la télomérase est active dans la plupart des cellules de souris et celle-ci possèdent de très longs télomères. Parce que les cellules murines possèdent de longs télomères et une télomérase active, ces cellules n'utilisent pas l'horloge des télomères. Par contre, plusieurs mécanismes incluant le stress oxydatif peuvent induire la sénescence et ces horloges alternatives seraient principalement utilisés par les cellules de souris. Même si les cellules de souris ont un processus de sénescence lié au stress, celui-ci n'est pas parfait, et l'immortalisation spontanée de ces cellules est un événement relativement fréquent comparé à ce qui se produit dans les cellules humaines (Wright and Shay, 2000). L'immortalisation représente l'acquisition par les cellules cancéreuses de la capacité de division illimitée nécessaire à la formation de masses tumorales majeures. Bien que cette étape semble être extrêmement importante, certaines données récentes laissent croire qu'elle ne soit pas absolument essentielle au développement d'une tumeur si les cellules prénéoplasiques ont un potentiel de division très élevé (Seger et al., 2002). Le consensus reste quand même que la grande majorité des cellules cancéreuses doivent acquérir cette capacité de division illimitée et doivent donc subir l'immortalisation. Chez des cellules humaines normales, en culture et en absence

d'instabilité génomique accélérant les processus de plasticité génétique incluant l'activation de la télomérase, l'immortalisation spontanée d'une cellule n'a probablement jamais été observée (Wright and Shay, 2000). Il est donc absolument essentiel qu'une cellule acquiert une certaine instabilité génomique et, donc, des caractéristiques prénéoplasiques comme la perte de gènes suppresseurs de tumeurs pour que l'immortalisation des cellules humaines normales puisse avoir lieu. Parce qu'il est très difficile de déterminer si l'immortalisation ou la transformation doivent intervenir de façon séquentielle lors de la carcinogenèse multiples étapes chez l'humain, on peut considérer qu'ils se produisent de façon simultanée. Ainsi, on considère les deux phénomènes comme étant entrelacés puisqu'une cellule initiée peut acquérir quelques caractéristiques de la transformation pendant que son processus d'immortalisation se complète. Ce concept de carcinogenèse multiples étapes où la cellule doit acquérir séquentiellement de multiples caractéristiques pour atteindre un stade de cellule cancéreuse agressive s'applique clairement chez l'humain où le cancer du côlon et de la peau en sont des exemples parfaits (Bertagnolli et al., 1997; Friedman, 1985; Hemminki and Mutanen, 2001; Yuspa et al., 1996). Parce que les études *in vivo* sur des modèles humains sont extrêmement difficiles et coûteuses, monétairement et psychologiquement, il est essentiel de développer des modèles faciles d'accès en laboratoire.

Les modèles animaux, principalement des rongeurs, ont été extensivement utilisés pour démontrer la validité du concept de carcinogenèse multiples étapes (Hahn and Weinberg, 2002; Van Dyke and Jacks, 2002). Essentiellement, la surexpression d'une multitude d'oncogènes dans différents tissus chez des animaux transgéniques peut causer l'apparition de tumeurs. Parce que la latence, ou le temps d'apparition des tumeurs, peut varier considérablement selon les tissus et les oncogènes impliqués, on peut conclure que des événements supplémentaires à la lésion originale sont nécessaires au développement d'une tumeur. L'utilisation d'oncogènes conditionnels exprimés de façon transitoire dans

des souris transgéniques démontre clairement que la croissance tumorale précoce *in vivo* peut dépendre d'un seul oncogène et que l'inactivation de celui-ci va faire régresser cette tumeur. Par contre, si l'inactivation est temporellement retardée, la tumeur va acquérir des caractéristiques nouvelles qui lui permettront de croître même en absence de cet oncogène initialement vital (Ewald et al., 1996). Similairement, l'ablation génétique d'une multitude de suppresseurs de tumeurs démontre que la perte de ces gènes prédispose l'animal au développement du cancer. Souvent, la prédisposition sera tissus spécifiques, même si l'oncogène ou le suppresseur de tumeur est manipulé dans une grande partie ou la totalité des tissus de l'animal. Ceci suggère clairement que certaines étapes sont limitantes au développement du cancer incluant la contribution épigénétique de la future cellule cancéreuse ainsi que la contribution micro-environnementale (Adams and Cory, 1991).

Bien que les preuves ultimes de l'existence du principe de carcinogenèse multiples étapes se retrouvent dans des modèles animaux ou chez l'humain, la création de modèles de culture cellulaire a permis de disséquer efficacement le rôle moléculaire des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs lors des diverses étapes de la carcinogenèse (Hahn and Weinberg, 2002; Van Dyke and Jacks, 2002). C'est ici que l'on peut définir l'immortalisation et la transformation à un niveau moléculaire. Comme mentionnée précédemment, la mise en culture de cellules normales humaines mène invariablement à la sénescence. De façon générale, on considère une population de cellules comme étant immortelle lorsqu'elle peut être propagée indéfiniment dans des conditions normales de culture cellulaire. La situation est beaucoup plus variable avec les cellules de souris qui ne comptent pas les divisions cellulaires avec des mécanismes aussi stricts que les cellules humaines (voir précédemment). Bien que les cellules humaines n'émergent jamais spontanément de la sénescence, ceci représente un événement relativement fréquent chez les cellules de souris (Rubin, 2001a; Wright and Shay, 2000). Pour cette raison, les cellules humaines sont un outil extrêmement puissant pour déterminer les modifications génétiques

nécessaires à l'immortalisation. C'est pour cette même raison que les cellules de souris se prêtent très bien à l'étude de la transformation cellulaire puisqu'elles sont facilement disponibles dans un état immortalisé, mais non transformé. Voici donc les critères *in vitro* classiques qui permettent de déterminer si une population de cellules possède des caractéristiques associées à la transformation (revue par (Rubin, 2001a; Rubin, 2001b)). Le premier critère représente la capacité des cellules à répondre à un signal d'inhibition de contact. Lorsque les cellules sont cultivées sur une surface plane en deux dimensions telle qu'un pétris, elles vont croître jusqu'à se toucher et vont ensuite répondre à des signaux d'inhibition de croissance pour former un tapis cellulaire uniforme. Les cellules transformées vont continuer à croître et vont s'empiler les unes sur les autres pour éventuellement former des petites masses cellulaires que l'on nomme foyers. Les cellules normales nécessitent une matrice et/ou un attachement constant à une surface pour la survie et la croissance. Les cellules transformées vont être capables de croître en absence de contact avec toutes matrices et de former des colonies, en suspension dans de l'agar mou par exemple. Le critère le plus strict pour la transformation cellulaire *in vitro* est de tester la capacité des cellules à former une tumeur réelle lorsque injectées de façon sous-cutanée ou intrapéritonéale dans une souris athymique (souris nues). En résumé, les critères de carcinogénèse *in vitro* sont donc: l'immortalisation, la perte d'inhibition de contact, la formation de foyer, la croissance sans ancrage en agar mou et la formation de tumeurs en souris nues. En utilisant ces critères, il est donc possible de déterminer si l'ablation de certains suppresseurs de tumeurs ou la surexpression de certains oncogènes contribuent directement au processus de carcinogénèse.

Pour conclure, il faut se souvenir que la culture cellulaire *in vitro* reste une modélisation et que l'ordre chronologique ainsi que l'importance des événements identifiés ne sont pas nécessairement reflétés directement lors de la carcinogénèse *in vivo* chez l'humain. Il faut aussi voir ces modèles comme un outil que l'on peut utiliser pour altérer

l'activité des oncogènes-suppresseurs de tumeurs et pour essayer de rétablir un phénotype normal chez les cellules transformées. Finalement, ces cultures cellulaires sont aussi un terrain d'essai pour des thérapies potentielles contre le cancer.

1.6 Les virus et le cancer

Certains virus peuvent être considérés comme étant des substances carcinogènes biologiques puisqu'ils peuvent directement initier la carcinogénèse. La démonstration initiale d'un rôle pour les virus en tant qu'agents carcinogènes fut faite en 1951 chez la souris (zur Hausen, 2001). Entre 1951 et 1964, les rétrovirus, des virus contenant un génome à base d'ARN, furent associés à plusieurs cancers de type lymphoprolifératifs chez les rongeurs, les chats et les bovins. Dès 1953 le virus de polyome murin, un virus à ADN, est identifié comme agent responsable d'une grande variété de tumeurs chez les souris nouveau-nés (Gross, 1953). En 1964 on démontre que le virus de Epstein-Barr (EBV), un virus à base d'ADN, est responsable de plusieurs cancers chez l'humain incluant aujourd'hui les lymphomes de Burkitt's, les carcinomes nasopharyngaux, les lymphomes en condition d'immunosuppression, une portion des lymphomes à cellules T et près de 40% des cas de la maladie d'Hodgkin's (Epstein et al., 1964; zur Hausen, 2001). Bien que le virus carcinogène initialement découvert était à base d'ARN, on sait maintenant qu'à l'exception du rétrovirus T-lymphotrophique type I et du virus de l'hépatite C, tous les virus humains pouvant causer directement la carcinogénèse sont des virus à ADN (Vecchio, 1993; zur Hausen, 2001). Parmi ceux-ci on reconnaît le virus de l'hépatite B qui est responsable de certains cancers du foie (Beasley et al., 1981) et le virus humain de l'herpès type 8 qui est directement responsable des sarcomes de Kaposi et de certains lymphomes (Chang et al., 1994). D'autres virus comme les papillomavirus humains (HPV) qui font partie du groupe des papovaviridae sont aussi documentés de façon exhaustive comme étant responsables de cancers oraux, anogénitaux ainsi que de certains carcinomes squameux de la peau (zur Hausen, 2001). Tous types de cancers confondus, on évalue que les virus

incluants ceux qui ne sont pas encore identifiés sont responsables d'environ 15% des cas de cancer humain (zur Hausen, 2001).

1.7 La carcinogenèse virale

Les modes de carcinogenèse virale sont très variés, mais ils ont tous certains points communs essentiels comme la modulation des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs de la cellule hôte. En temps normal, un virus va infecter une cellule permissive à sa propre réplication, la forcer à entrer dans le cycle cellulaire et à entamer les processus de réplication de l'ADN, et finalement détourner la majorité du métabolisme cellulaire vers la production de nouveaux virions infectieux. Ces virions pourront soit: être relâchés dans l'environnement cellulaire en bourgeonnant par la membrane cellulaire, ou provoquer la lyse complète de la cellule. Ce cycle lytique viral provoque normalement la mort contrôlée de la cellule hôte puisque la cellule doit survivre assez longtemps pour permettre au virus de se reproduire. Parce que le virus force la cellule à entrer dans un état mitogénique, il y a danger que celle-ci continue à se diviser de façon non contrôlée si le cycle lytique ne se termine pas par la mort de cette cellule. C'est exactement ce qui peut se produire lors de la carcinogenèse virale. De façon générale, l'infection par un virus d'une cellule non-permissive, c'est-à-dire une cellule qui ne lui permet pas de compléter son cycle lytique, peut potentiellement contribuer aux caractéristiques néoplasiques à cette cellule. Lors d'infection abortive, il est maintenant établi chez l'homme et chez les autres vertébrés que plusieurs virus oncogéniques à ARN agissent en activant ou mutant certains oncogènes cellulaires inactifs. Par contre, les virus à ADN peuvent agir directement en forçant l'expression de leurs propres gènes dans la cellule hôte (Stehelin et al., 1976; Vecchio, 1993). Ces gènes vont non seulement inactiver directement certains gènes suppresseurs de tumeurs endogènes à la cellule hôte, mais aussi agir en tant qu'oncogènes. Les exemples les mieux connus sont les protéines E6 et E7 du EBV ainsi que les antigènes T des polyomavirus décrits en détail au prochain chapitre. Parce que les virus oncogéniques sont

des organismes avec un génome très restreint, parce qu'ils sont faciles à maintenir en culture sous des conditions de laboratoire et aussi parce qu'ils induisent des tumeurs de façon reproductible, ils ont été utilisés extensivement pour étudier la croissance cellulaire et la carcinogénèse. Notre laboratoire porte un intérêt particulier à l'utilisation de certains de ces virus oncogéniques pour disséquer la carcinogénèse multiple étapes.

1.8 Les Polyomavirus

Parmi le groupe des Papovaviridae, le sous-groupe des polyomavirus est présentement constitué d'une douzaine d'espèces différentes identifiées chez un nombre presque aussi grand de vertébrés. Le virus de polyome murin (Py), de singe rhésus (simian virus 40 (SV40)) ainsi que deux isolats humains, le virus Jamestown canyon (JC) et le virus BK (BK), font partie de ce sous-groupe (Pipas, 1992). Ce sont des petits virus à ADN à la capsidie icosaédrique non enveloppée et au génome très compact d'environ 5300 paires de bases. Tous les virus de ce sous-groupe ont une spécificité d'espèce restreinte probablement définie par leurs interactions spécifiques avec des récepteurs viraux et des co-facteurs cellulaires distincts chez les différents hôtes (Breau et al., 1992). Par contre, ils ont tous une architecture et des produits géniques extrêmement similaires. L'importance de la recherche sur les polyomavirus a pris de l'ampleur dans les années 1950-60 suivant deux événements consécutifs. Premièrement, l'identification du virus de polyome murin a rapidement révélée son fort potentiel carcinogénique chez la souris. Ce virus bien que faiblement oncogénique chez la souris adulte peut, comme son nom l'indique, littéralement induire une multitude de tumeurs chez les souriceaux nouveau-nés (Basak et al., 1992; Bolen et al., 1981; Gross, 1953; Pipas, 1985; Schneider et al., 1994). Peu après, l'intérêt scientifique et médical général a été fortement éveillé par la constatation que des virions vivants du virus SV40 étaient présents dans un vaccin contre la poliomyélite déjà injecté à plusieurs millions de personnes à travers le monde. Aujourd'hui, l'association du virus SV40 avec des tumeurs humaines est clairement démontrée. Par contre, il y a toujours un débat à savoir si

effectivement il y a une augmentation de l'incidence de certains cancers rares chez les humains porteurs de ce virus. Effectivement, le consensus penche encore en faveur d'un manque d'association causale entre la présence du virus et le développement de ces tumeurs (Butel, 2001; Gazdar et al., 2002; Klein et al., 2002). Les deux souches humaines de polyomavirus, les virus BK et JC, sont extrêmement similaires aux virus Py et SV40. Ces deux virus humains combinés ont une pénétrance d'environ 80% dans la population mondiale et ils établissent généralement des infections persistantes sans phénotypes majeurs chez les individus immunocompétents. Par contre, les deux virus peuvent induire des maladies sévères chez des individus immunosupprimés. Essentiellement, JC est associé à une maladie neurodégénérative nommée leuco-encéphalite multifocale progressive tandis que BK est associé à la cystite hémorragique (Imperiale, 2000). Ces deux virus peuvent aussi transformer les cellules en culture et sont oncogéniques chez les rongeurs (Imperiale, 2001). Récemment, il y a eu association entre certaines tumeurs positives pour SV40 et les virus BK et JC chez l'humain (Croul et al., 2003). Les événements ayant mené à leurs identifications, combiné avec la facilité du protocole de culture de ces virus en laboratoire leur a rapidement permis de devenir des systèmes modèles pour l'étude de plusieurs phénomènes de biologie, incluant entre autres la réplication de l'ADN et la carcinogénèse.

1.9 Les transcrits précoces ou antigènes T des Polyomavirus

La structure du génome des polyomavirus est sous-divisée en deux régions principales, la région précoce et la région tardive. Les produits géniques qui sont exprimés peu après l'infection virale proviennent du transcrit précoce alors que le second groupe de produits géniques impliqués dans l'encapsidation virale provient du transcrit tardif. Ce dernier est exprimé seulement après la réplication de l'ADN viral et génère par épissage alternatif les trois protéines qui composent la capsid virale, VP1, VP2 et VP3. Le transcrit précoce est exprimé tôt après l'infection virale et génère lui aussi par épissage alternatif plusieurs protéines régulatrices de la transcription et de la réplication de l'ADN viral. Ces

protéines vont stimuler les activités enzymatiques cellulaires requises pour la réplication de l'ADN et ainsi préparer la cellule à répliquer le génome viral (Schlegel and Benjamin, 1978). Pour favoriser la réplication de l'ADN ces protéines vont aussi stimuler une cellule quiescente à réentrer dans le cycle cellulaire (Acheson, 1981). Ces produits géniques précoces sont responsables de la carcinogenèse par les polyomavirus lors d'infections abortives ou lorsqu'ils sont exprimés seuls en l'absence du génome viral complet et seront traités plus en détail dans cette thèse.

Chez tous les polyomavirus, l'ARNm précoce est épissé de façon alternative pour générer trois ou quatre produits géniques différents selon les espèces. Ces protéines, nommées antigène-t (T-Ag), tiennent leurs noms de leur capacité d'agir comme antigènes pour stimuler le système immunitaire d'un animal hôte qui générera un anti-sérum spécifique (Smith et al., 1970). C'est cette même capacité qui a permis leur identification. Présentement une dizaine de souches différentes de polyomavirus infectant un nombre presque aussi variés d'hôtes ont été identifiés. Chez les souches virales infectant naturellement les primates; SV40, BK et JC, trois protéines seront respectivement produites; mini T (Tiny T Antigen tT-Ag), petit T (Small T Antigen ST-Ag) et grand T (Large T Antigen LT-Ag). Chez les autres membres de la famille incluant Py murin, quatre protéines seront produites; TT-Ag, ST-Ag, moyen T (Middle T Antigen MT-Ag) et LT-Ag. Tous les T-Ag partagent une homologie amino-terminale alors que l'extrémité carboxy-terminale diffère. Il y a actuellement très peu de détails, sinon aucun, sur les rôles potentiels de tT-Ag dans la biologie des polyomavirus. Le produit génique ST-Ag est localisé au cytoplasme des cellules infectées par le virus et peut altérer l'activité de certaines enzymes ainsi que la morphologie cellulaire (Campbell et al., 1995; Liang et al., 1984; Pallas et al., 1990). Bien que ST-Ag augmente l'efficacité de l'infection virale par environ deux logs (Chen et al., 1995) et puisse clairement contribuer au potentiel carcinogénique de ces virus dans certaines conditions, ce sont LT-Ag et MT-Ag qui sont absolument essentiels à ces

processus. Puisque les modèles décrits dans cette thèse sont exclusivement basés sur l'utilisation des LT-Ag il n'y aura pas plus de description exhaustive des autres antigènes. Il faut par contre noter que chez les polyomavirus où il est présent, MT-Ag est absolument essentiel au processus de transformation, et est considéré comme un oncogène puissant pouvant altérer les voies de signalisation intracellulaire émergeant des récepteurs à facteurs de croissance. Son expression seule est suffisante pour causer l'apparition de tumeurs dans différents modèles de souris transgéniques, et ce, dans plusieurs organes. Les études sur PyMT-Ag ont entre autres permis de mieux comprendre les processus de régulation de la croissance et du cycle cellulaire.

1.10 L'antigène grand-T

Les antigènes grand-T (LT-Ag) sont des protéines extrêmement multifonctionnelles. Chez tous les polyomavirus, ils sont les seules protéines virales essentielles et suffisantes à l'initiation et à la réplication du génome viral (Dailey and Basilico, 1985). Ils sont aussi connus pour interagir avec plusieurs protéines et moduler une grande variété de processus cellulaires. Comme la plupart des protéines virales, LT-Ag comprend plusieurs domaines différents qui remplissent une multitude de fonctions cellulaires. C'est un large polypeptide avoisinant 100-kDA qui est localisés principalement au noyau (Kalderon et al., 1984) et très minoritairement à la membrane cellulaire (Henning and Lange-Mutschler, 1983). C'est aussi une protéine qui peut être extensivement phosphorylée et cette phosphorylation contribue à la régulation de ses activités (Hassauer et al., 1986). Étant une protéine précoce, LT-Ag est capable de moduler temporellement l'expression génique virale en agissant respectivement comme activateur de transcription au niveau des promoteurs viraux tardifs et comme inhibiteur de sa propre expression et de celle des autres transcrits précoces (Dailey and Basilico, 1985; Farmerie and Folk, 1984; Kern et al., 1986). LT-Ag peut lier directement le génome viral et cette activité est essentielle à son rôle dans la réplication virale (Imperiale, 2001; Wobbe et al., 1987). Bien que LT-Ag semble aussi lier l'ADN de façon non spécifique (D'Alisa and Gershey, 1978), il n'y a toujours pas d'études concertées

démontrant que les LT-Ag peuvent se lier à des sites de l'ADN génomique de mammifères pour réguler directement le niveau de transcription d'un gène cellulaire. Par contre, LT-Ag modifie le niveau d'expression de plusieurs gènes cellulaires, probablement en interagissant avec des protéines endogènes de la cellule hôte comme le produit du gène du rétinoblastome pRb (DeCaprio et al., 1988; Mudrak et al., 1994) ou avec d'autres facteurs coactivateurs de la transcription comme p300 (Lill et al., 1997). Bien que les protéines des virus humains JCLT-Ag et BKLT-Ag aient été étudiées, une attention particulière a été portée à la recherche sur PyLT-Ag et SV40LT-Ag. PyLT-Ag et SV40LT-Ag sont extrêmement similaires, mais il existe quelques différences essentielles au niveau de leurs fonctions. Principalement, SV40LT-Ag lie les suppresseurs de tumeurs pRb et p53 et possède une activité immortalisante et transformante alors que PyLT-Ag est déficient pour la liaison de p53 et est reconnu comme un oncogène immortalisant (Manfredi and Prives, 1994) (Pilon et al., 1996). Pour mieux comprendre pourquoi notre laboratoire concentre son attention sur des modèles impliquant PyLT-Ag, il est essentiel de décrire de façon détaillée les similarités et différences entre PyLT-Ag et SV40LT-Ag.

PyLT-Ag et SV40LT-Ag partagent des acides aminés identiques ou homologues sur la majorité de leurs séquences (Pipas, 1992). Plusieurs domaines fonctionnels de ces protéines ont été identifiés, sont partagés par les deux protéines, et ont des fonctions biologiques très précises (voir domaines sur la figure 2). Ils permettent, entre autres, des interactions spécifiques protéine-protéines qui peuvent influencer certaines fonctions cellulaires. Voici une description plus exhaustive des divers domaines identifiés dans les LT-Ag en commençant par la région amino-terminale (figure 2). Cette région comprend les domaines CR1/DNAJ et CR2/pRB's et est aussi considérée comme une région de transactivation génique (DeCaprio et al., 1988; Mudrak et al., 1994).

Figure 2: Interactions protéines-protéines avec les LT-Ag

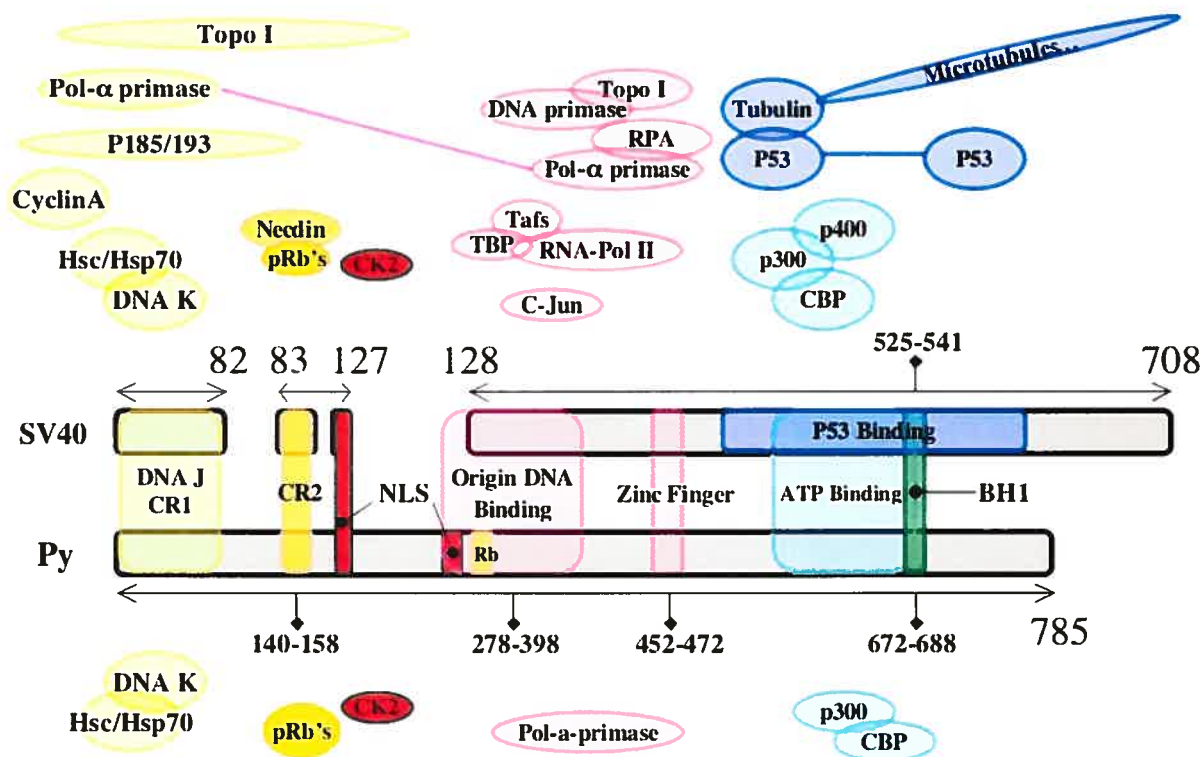


Figure 2: Schématisation des protéines interagissant avec SV40LT-Ag et PyLT-Ag.

Les codes de couleur permettent de relier ces diverses protéines avec leurs domaines spécifiques d'interaction. Lorsque différentes protéines se chevauchent, elles interagissent aussi entre elles et forme un complexe protéique pouvant inclure les LT-Ag. Plusieurs protéines supplémentaires absentes de cette figure ont été identifiées comme interagissant avec SV40LT-Ag, par contre, les domaines responsables de ces interactions ne sont pas encore connus: la protéine humaine ou de singe rhésus p33cdk2 ainsi que l'homologue chez la levure p34cdc28; La protéine humaine p63alpha, la lamine C, la nucléoline ainsi qu'IRS-1 et HSP90. Chez PyLT-Ag, une interaction avec le suppresseur de tumeur CUTL1 à été identifiée mais le domaine responsable de cette interaction est toujours inconnu.

Situé complètement en région amino-terminale de tous les LT-Ag se trouve le domaine CR1 ou DNAJ. Ce domaine est aussi le seul présent chez tous les autres T-Ag (Brodsky and Pipas, 1998) et possède des identités de séquences et des homologies fonctionnelles avec les chaperonnes de la famille DNAJ. C'est ce domaine qui est responsable de l'association entre les LT-Ag et la chaperonne cellulaire Hsc70/DNAK (Srinivasan et al., 1997). Cette association stimule l'activité des chaperonnes Hsc70 et Hsp70, ce qui influence des activités cellulaires incluant les repliements des protéines, la régulation de l'agrégation protéique et l'activité de plusieurs enzymes. La présence de SV40LT-Ag stimule aussi l'expression des chaperonnes Hsc70/Hsp70 ce qui peut amplifier leur niveau d'activité (Brodsky and Pipas, 1998). Parce que ces chaperonnes sont impliquées dans une multitude de mécanismes cellulaires incluant la résistance au stress et à l'apoptose, leur modulation par les T-Ag peut grandement affecter les phénotypes cellulaires. CR1 est de plus décrit chez LT-Ag comme pouvant lier deux protéines de poids moléculaire similaire, p185 et p193, qui sont possiblement la même protéine (Ali and DeCaprio, 2001; Kohrman and Imperiale, 1992; Tsai et al., 2000). La protéine p193 est décrite comme un membre pro-apoptotique de la famille des Bcl-2 et cette activité apoptotique est inhibée par la présence de SV40LT-Ag (Tsai et al., 2000). Le domaine DNAJ peut aussi lier la cyclinA et causer la transactivation probablement indirecte de son promoteur chez les cellules humaines et les cellules de singes (Adamczewski et al., 1993; Porras et al., 1996). Ce domaine est aussi responsable de la liaison avec p33cdk2 (Adamczewski et al., 1993) et communément avec deux domaines situés plus en position carboxy-terminale de LT-Ag de la liaison avec la topoisomérase I et la DNA polymérase-alpha (Dornreiter et al., 1990; Haluska et al., 1998; Roy et al., 2003; Simmons et al., 1996). Ces trois dernières liaisons pourraient potentiellement promouvoir l'entrée rapide en phase S et l'initiation de la réplication de l'ADN cellulaire et viral peu après le début de l'expression de LT-Ag. Plus important encore, l'activité du domaine DNAJ et sa liaison à

Hsc70 sont absolument essentielles pour l'inactivation des pRB's liée au domaine CR2 et possiblement pour l'inactivation de p53 par SV40LT-Ag (Brodsky and Pipas, 1998).

Tous les LT-Ag étudiés peuvent lier et inactiver les gènes suppresseurs de tumeurs de la famille du rétinoblastome (pRb's réfère aux trois membres de la famille soit p105 ou Rb ou Rb1, p107 ou Rb2 et p130 ou Rb3) (Dyson et al., 1990; Pilon et al., 1996). Cette liaison s'effectue au niveau du domaine de liaison aux pRb's, que l'ont nomme aussi CR2, et qui est situé juste après le domaine CR1 (figure 2). Les virus mutants qui expriment un LT-Ag défectif dans le domaine CR2 sont incapables de se répliquer et/ou d'immortaliser des cellules en culture mais peuvent toujours transformer les cellules préalablement immortalisées (Freund et al., 1992a; Larose et al., 1991). Ces résultats combinés avec d'autres analyses suggèrent fortement que le domaine de liaison à pRb est essentiel à l'immortalisation tandis que d'autres domaines de SV40LT-Ag décrits plus bas, où la présence de PyMT-Ag dans le cas de Py, sont nécessaires à la transformation (Freund et al., 1992b). Le consensus général établit que la liaison avec les membres pRb's libère les facteurs de transcription de la famille E2F (E2F's) qui vont promouvoir une entrée active dans le cycle cellulaire et la réplication de l'ADN (Hiebert et al., 1992). L'activation des E2F's transactive plusieurs gènes cellulaires incluant PCNA et la DNA polymérase-alpha qui vont promouvoir la synthèse de l'ADN et interagir avec les LT-Ag (voir plus bas). Cette inactivation des pRb's et le relâchement des facteurs E2F's représentent une activité critique pour le cycle lytique viral mais aussi des événements qui favorisent la carcinogénèse en l'absence d'un cycle lytique complet. En absence du domaine DNAJ, le domaine de liaison aux pRb's accomplit encore la liaison physique aux protéines pRb's, mais il n'y a pas de relâchement des facteurs E2F's et donc l'activité des pRb's n'est pas inhibée (Brodsky and Pipas, 1998). Le domaine CR2 permet aussi la liaison avec la protéine Necdin qui est considérée comme une homologue fonctionnelle potentielle des pRb's et qui est exprimée de façon spécifique dans le système nerveux. L'inactivation de certaines activités de Necdin par sa liaison avec SV40LT-Ag a été proposée (Taniura et al.,

1998). On peut voir sur la figure 2 que PyLT-Ag est le seul à posséder un domaine de liaison cryptique aux pRb's localisé dans la région de liaison à l'ADN de l'origine de réplication virale. De façon surprenante, bien que ce domaine ne soit pas complètement fonctionnel et ne puisse pas lier Rb par lui-même, il semble réguler négativement la capacité du domaine CR2 à lier Rb (Pilon et al., 1996).

Directement en position carboxy-terminale du domaine CR2 on retrouve le signal de localisation nucléaire (NLS) des LT-Ag (Kalderon et al., 1984). Tandis que la séquence NLS est unique chez SV40LT-Ag, elle est dédoublée chez PyLT-Ag. Entrelacé dans cette région se retrouve le site de liaison à la kinase cellulaire CKII (Gotz et al., 1995). Il est probable que la liaison directe entre les LT-Ag et CKII entraîne la phosphorylation des résidus sérines présents dans ce domaine (Barbosa et al., 1990). Bien que les LT-Ag possèdent plusieurs sites de phosphorylation pouvant réguler leurs activités, le domaine de liaison à la kinase CKII semble être important pour augmenter l'activité immortalisante (Pilon et al., 1996).

La région amino-terminale prend fin après le site de phosphorylation par CKII pour laisser place aux régions dites hélicase et ATPase qui recouvrent la majorité de l'extrémité carboxy-terminale des LT-Ag. Ces régions sont essentielles à l'interaction directe avec l'origine de réplication de l'ADN viral ainsi qu'à la réplication de ce dernier (Wobbe et al., 1987). Les LT-Ag forment normalement des hexamères lorsqu'ils sont associés à l'origine de réplication du génome viral et vont utiliser leur activité hélicase pour relaxer l'ADN, l'ouvrir et initier le processus de réplication en utilisant des mécanismes analogues aux protéines cellulaires de la famille Mcm (Li et al., 2003) (Waga and Stillman, 1994) (Mastrangelo et al., 1989). L'interaction directe ou indirecte avec plusieurs facteurs cellulaires incluant la topoisomérase I, PCNA, la polymérase-alpha, la réplication protéine A (RPA) et la DNA primase, est essentielle à la progression de ce processus (Dornreiter et al., 1992; Dornreiter et al., 1990; Gannon and Lane, 1987; Prelich et al., 1987). Certaines

activités de ce complexe multiprotéique, comme la fixation à l'origine de réplication virale et l'ouverture de l'ADN pour permettre la réplication, sont fortement stimulées par une interaction directe entre le facteur de transcription c-Jun et SV40LT-Ag (Ito et al., 1996). Cette région peut aussi agir comme un fort facteur de transcription (Ali and DeCaprio, 2001) sur les promoteurs du génome viral ainsi que sur des promoteurs de type pol I-II-III de mammifère. Elle peut aussi se lier à la machinerie cellulaire d'initiation de la transcription incluant la sous-unité 140-kDA de la polymérase à ARN II, TFIID, TBP (TATA-binding protein) et les complexes TafsI-II (TBP-associated factors) ainsi que TEF-1 et Sp1 (Damania and Alwine, 1996; Damania et al., 1998a; Damania et al., 1998b; Johnston et al., 1996; Zhai et al., 1997). Juste en position carboxy-terminale du domaine de liaison à l'origine de réplication virale se trouve le domaine doigt de zinc qui est absolument essentiel pour la formation des hexamères de LT-Ag essentiels à la réplication de l'ADN viral (Rose and Schaffhausen, 1995). Bien que ce domaine soit essentiel à la formation des hexamères de PyLT-Ag et SV40LT-Ag ainsi qu'à la capacité transformante de SV40LT-Ag, il ne semble pas affecter l'immortalisation des cellules de rongeurs (Pilon and Mes-Masson, 1996).

Au cœur de la région ATPase en position carboxy-terminale de SV40LT-Ag et de PyLT-Ag se trouvent les sites de liaison aux facteurs de co-activation transcriptionnelle p300, p400 et CBP (Avantaggiati et al., 1996; Eckner et al., 1996; Nemethova and Wintersberger, 1999) (Cho et al., 2001). Ce sont des facteurs qui sont considérés comme des suppresseurs de tumeurs et qui peuvent entre autres interagir avec et influencer l'activité de p53, mdm2 et Nf κ B p65 (Ali and DeCaprio, 2001). Grâce à leurs rôles de suppresseurs de tumeurs et parce que les gènes cibles de la famille p300/CBP sont importants pour la croissance cellulaire et la transformation, l'interaction entre les LT-Ag et cette famille de co-activateurs peut clairement influencer la carcinogénèse virale.

La région ATPase carboxy-terminale contient aussi le domaine bipartite responsable de la liaison et de l'inactivation du gène suppresseur de tumeur p53 (McCormick et al., 1981) (Ali and DeCaprio, 2001). Cette inactivation par interaction directe entre SV40LT-Ag et p53 introduit la différence la plus dramatique entre SV40LT-Ag et PyLT-Ag. En effet, malgré des efforts constants il est toujours impossible de démontrer une interaction similaire entre p53 et PyLT-Ag. Conséquemment, contrairement à SV40LT-Ag, la présence de PyLT-Ag ne cause aucune élévation des niveaux cellulaires de p53 et ne prévient pas la stabilisation de p53, ainsi que l'induction d'une réponse p53-dépendante suivant des dommages à l'ADN (Mor et al., 1997). Ce domaine de liaison avec p53 permet aussi la formation d'un tri-complexe entre SV40LT-Ag, p53 et la tubulin et l'association aux microtubules intracellulaires (Maxwell et al., 1991). Cette interaction pourrait être importante pour le transport intracellulaire des LT-Ag mais n'a jamais été testée chez PyLT-Ag. Dans certains modèles, il semble que PyLT-Ag est capable d'influencer des activités de p53 telles que l'inhibition de la croissance, mais cette influence est plutôt dépendante du domaine de liaison aux pRb's (Doherty and Freund, 1997). Dans ces cas particuliers, il faut noter que l'inactivation des pRb's et la modulation de l'activité des facteurs p300/CBP par PyLT-Ag vont influencer une partie de l'activité de p53 puisque ces derniers sont importants pour la régulation et l'exécution de certaines fonctions de p53 (Doherty and Freund, 1997). De plus, parce que l'interaction entre SV40LT-Ag et p53 stabilise ce dernier plutôt que de le dégrader complètement, il a été proposé que certaines activités de p53 étaient encore présentes (Kohli and Jorgensen, 1999). Toujours est-il qu'en inactivant spécifiquement p53, SV40LT-Ag influence une multitude de phénotypes cellulaires incluant la régulation du cycle cellulaire, la stabilité génomique et aussi l'apoptose p53-dépendante.

Il faut noter que PyLT-Ag et SV40LT-Ag sont aussi capables de protéger contre l'apoptose d'une façon p53-indépendante. D'ailleurs, une des premières activités qui a été attribuée à PyLT-Ag et SV40LT-Ag était de permettre aux cellules de mammifères de

survivre dans des conditions de faible sérum, et certaines observations plus récentes suggèrent que PyLT-Ag ou SV40LT-Ag sont suffisants pour protéger ces cellules de l'apoptose induite par un milieu faible en sérum (Zheng et al., 1994). Il est intéressant de noter que le dernier domaine carboxy-terminal de SV40LT-Ag, le domaine BH1, est une région d'homologie avec l'oncogène viral E1B19K. Chez E1B19K, ce domaine permet l'interaction directe avec plusieurs membres de la famille Bcl-2 et confère des propriétés anti-apoptotiques. Récemment, plusieurs auteurs ont démontré des rôles supplémentaires pour les LT-Ag dans certaines voies apoptotiques (Ces voies sont discutées plus en détail dans l'introduction du papier 1, chapitre 2 de cette thèse). Toutes ces activités anti-apoptotiques sont probablement reliées aux mécanismes que les virus ont développés pour retarder et manipuler le moment de la mort de la cellule hôte essentiellement pour leur permettre de compléter un cycle lytique complet (Teodoro and Branton, 1997).

Plusieurs protéines cellulaires supplémentaires ont été identifiées pour interagir avec SV40LT-Ag sans que le domaine précis responsable de l'interaction ait été identifié. Ces protéines comprennent plusieurs composantes du cytosquelette et de la matrice nucléaire comme la lamine C (Klawitz et al., 2001); la kinase humaine p34CDC2 et son homologue de levure p34CDC28, qui sont toutes deux importantes pour phosphoryler SV40LT-Ag lui-même et pour permettre la réplication de l'ADN viral (Nacht et al., 1995); la kinase p33cdk2 et la cyclin A qui régulent la phase S du cycle cellulaire et l'entrée en mitose (Johnston et al., 1996); un autre membre de la famille de p53 nommé p63 pouvant potentiellement influencer la sénescence (Djelloul et al., 2002); IRS-1 (insulin receptor substrate 1), un gène impliqué dans la cascade mitogénique émanant du récepteur IGF (Fei et al., 1995) et finalement, la chaperonne HSP90 qui est responsable au moins d'une partie de la maturation et de la stabilisation de SV40LT-Ag (Miyata and Yahara, 2000). Dans le cas de PyLT-Ag, une interaction avec le suppresseur de tumeurs CUTL1 a aussi été démontrée bien que le domaine de liaison ne soit pas encore identifié (Webster et al., 1998).

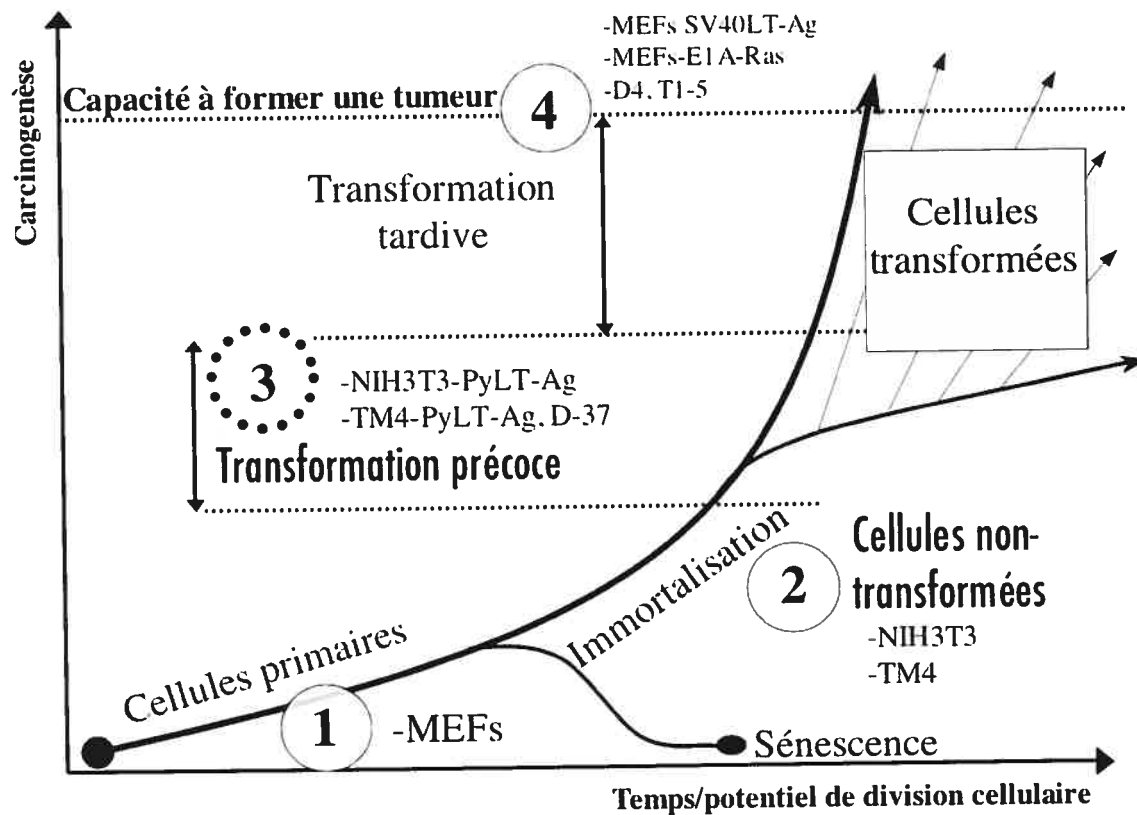
Étant donné la multitude des interactions identifiées entre les LT-Ag et des composantes du métabolisme cellulaire, il est difficile de déterminer avec précision toutes les fonctions de ces protéines qui participent au processus de carcinogénèse. L'identification d'activités cellulaires qui sont directement influencées par la présence des LT-Ag et qui pourraient influencer la carcinogénèse représente donc encore un défi majeur (Saenz-Robles et al., 2001). Ceci représente un des champs de recherche que nous poursuivons activement dans le laboratoire et constitue la majorité de la contribution scientifique de cette thèse.

1.11 Modéliser la carcinogénèse à multiples étapes : les oncogènes viraux

Comme décrit précédemment, il existe deux événements essentiels à la progression tumorale, l'immortalisation et la transformation. Chacun de ces deux événements globaux requiert plusieurs événements moléculaires spécifiques tels que l'activation ou l'inactivation de certains gènes. Dans notre laboratoire, nous portons un intérêt aux événements moléculaires impliqués dans la transformation cellulaire et nous disposons de plusieurs modèles basés sur la culture cellulaire et l'utilisation de souris transgéniques pour les identifier. Maintenant que les activités connues des LT-Ag sont décrites, j'aimerais les intégrer dans le concept de carcinogénèse multiples étapes pour expliquer l'intérêt de notre laboratoire à utiliser principalement PyLT-Ag lors de la génération de nos modèles.

La figure 3 représente une schématisation des différentes étapes *in vitro* nécessaires à une cellule normale pour pouvoir être considérée comme agressive et cancéreuse. L'étape 1 définit l'état des cellules normales lorsqu'elles sont établies en culture. Comme décrit précédemment, la majorité des cellules humaines ont un potentiel de division limité et vont entrer en sénescence d'une façon p53 et pRb dépendante. Le même phénomène se produit

Figure 3: Carcinogénèse multiples étapes *In Vitro*



avec les cellules de souris mais avec une finalité un peu moins restrictive. Des oncogènes viral comme E1A, PyLT-Ag ou SV40LT-Ag vont inactiver les pRb's et prolonger le nombre de divisions que ces cellules vont effectuer. Dans le cas des cellules de souris, qui sont déjà positives pour l'enzyme télomérase et possèdent de longs télomères, ceci sera suffisant pour générer l'immortalisation d'une portion accrue de la population cellulaire (étape 2 de la figure 3). Parce que ces cellules de souris exprimant PyLT-Ag ou E1A ne répondent pas aux critères de transformation *in vitro*, elles sont considérées comme étant exclusivement immortalisées (étape 2). Par contre, ces mêmes cellules de souris qui ont été immortalisées par SV40LT-Ag sont capables de former des tumeurs en souris nues et répondent donc au critère le plus strict de la transformation. SV40LT-Ag est considéré comme un oncogène immortalisant et transformant chez les cellules de rongeurs (voir la position des MEFs (fibroblastes embryonnaires primaires de souris) à l'étape 1 et des mêmes cellules MEFs-SV40LT-Ag à l'étape 4 de la figure 3). Pendant une certaine période de temps suivant l'acquisition de ce phénotype transformé, la perte d'expression de SV40LT-Ag sera suffisante pour renverser la transformation. Cette observation définit clairement que SV40LT-Ag est nécessaire et suffisant pour causer la transformation des cellules primaires de souris (revue par (Saenz-Robles et al., 2001)).

Similairement, les souris transgéniques exprimant de façon spécifique SV40LT-Ag dans certains tissus développent des tumeurs très rapidement. Parce que la latence est courte (de quelques semaines à quelques mois après la naissance) et parce que ces tumeurs sont absolument dépendantes de l'expression continue de SV40LT-Ag (Ewald et al., 1996), SV40LT représente un événement unique essentiel pour la formation de ces tumeurs. Par contre, dans le cas de souris transgéniques exprimant PyLT-Ag, la longue latence précédent le développement de tumeurs supporte l'hypothèse que PyLT-Ag agit en tant qu'agent immortalisant et suggère que des événements supplémentaires sont nécessaires pour la transformation complète des cellules (Lebel and Mes-Masson, 1994a; Lebel et al., 1995).

PyLT-Ag peut donc être utilisé dans des modèles de souris transgéniques pour essayer de comprendre quels sont ces événements supplémentaires nécessaires à la transformation.

1.12 Les objectifs : Identifier les événements associés à la transformation

Notre laboratoire a développé plusieurs modèles de souris transgéniques exprimant PyLT-Ag dans certains tissus spécifiques incluant les testicules et le cerveau. Je vous rappelle que contrairement à SV40LT-Ag, PyLT-Ag est une molécule qui possède en théorie la seule capacité d'immortaliser une cellule normale et que des événements carcinogéniques supplémentaires seront nécessaires à la formation d'une tumeur. En particulier, pour mon travail, j'ai utilisé les souris transgéniques exprimant PyLT-Ag sous le contrôle du promoteur de la kératine 19 (souris K19-LT) (Lebel et al., 1995), sous le contrôle du promoteur de la metallothionéine (souris Mt-LT) (Lebel and Mes-Masson, 1994a) et sous le contrôle du promoteur du mouse mammary tumor virus (souris MMTV-LT) (Webster et al., 1998). Les souris mâles MT-LT développent invariablement des adénomes testiculaires, un cancer des testicules, vers l'âge de 10 à 12 mois. Le même phénotype est reproduit chez les souris MMTV-LT avec toutefois une latence un peu plus courte, 6 à 9 mois. Ces lignées de souris transgéniques nous permettent d'étudier très précisément, et de façon reproductible, ce qui se passe au cours de la progression néoplasique de ces adénomes testiculaires. Le laboratoire a donc établi un système modèle de culture cellulaire basée sur les tissus provenant des souris MT-LT. Plus précisément, nous avons prélevé des lésions préneoplasiques au niveau du testicule, des masses de cellules non agressives, et les avons établies en culture cellulaire sous le nom de cellules D37. Nous avons similairement prélevé des adénomes testiculaires agressifs et établis des cultures cellulaires sous les noms de D4 et T1-5. Après caractérisation avec les critères classiques de la carcinogenèse multiples étapes *in vitro*, il appert que les cellules D37 sont des cellules Sertoli-Leydig immortelles et non transformées. Par contre, les cellules D4 et T1-5, bien qu'aussi d'origine Sertoli-Leydig, sont immortelles et transformées avec la capacité de former des tumeurs en souris nues (Lebel and Mes-Masson, 1994a). La

comparaison entre ces deux lignées cellulaires nous permet d'étudier les événements qui se sont produits entre des cellules immortalisées dérivées d'une lésion préneoplasique et des cellules complètement transformées d'une même origine (ceci correspond à la différence entre les étapes 3 et 4 de la figure 3). Une comparaison du patron d'expression des gènes par la technique de PCR différentiel lui a permis d'identifier trois gènes modulés spécifiquement et de façon reproductible dans la progression tumorale de ce modèle. Les deux premiers gènes ont une fonction encore inconnue et se comportent comme des oncogènes. Nous avons nommé ces deux gènes TDE1 et TDE2 pour "tumor differentially expressed" et comme attendu de la part d'oncogènes, ils sont surexprimés dans les adénomes testiculaires des souris transgéniques MT-LT (Lebel and Mes-Masson, 1994b). TDE1 est aussi fortement présent dans des tissus pulmonaires humains cancéreux ce qui est encourageant pour le définir en tant qu'oncogène (Bossolasco et al., 1999). Le troisième gène est le récepteur FAS et est déjà très bien connu pour son rôle dans l'apoptose (Lebel et al., 1996). Ce gène est éteint, inactivé, dans les tumeurs comparativement aux tissus normaux. Il est extrêmement intéressant d'avoir identifié ce gène puisqu'il est très intimement relié au bon fonctionnement du volet acquis du système immunitaire.

Dans notre modèle préalable, nous avons réalisé que les cellules D37, même si elles n'étaient pas transformées au sens strict du terme, étaient tout de même résistantes à l'apoptose induite par FasR si on les comparait à des cellules SeroLi-Leydig qui n'expriment pas PyLT-Ag. Cette caractéristique de résistance à l'apoptose induite par les récepteurs de mort cellulaire fait clairement partie des événements moléculaires pouvant faire pencher la balance en faveur de la croissance et pouvant permettre l'évasion du système immunitaire. Nous avons démontré que PyLT-Ag seul était suffisant pour apporter cette caractéristique aux cellules. Dans un premier temps, basé sur les observations précédentes faites au laboratoire, j'ai analysé les propriétés anti-apoptotiques de PyLT-Ag en relation avec les récepteurs de mort cellulaire (Chapitre 2, papier 1 (Rodier et al., 2000)). Cette étude représente un exemple d'analyse et de compréhension d'un phénotype identifié

en utilisant une comparaison différentielle basée sur un modèle complexe de souris transgéniques et de culture cellulaire.

PyLT-Ag est considéré comme un oncogène strictement immortalisant selon les critères *in vitro* et on peut présumer que cette caractéristique soit suffisante pour initier la tumorigenèse, avec une longue latence, dans les modèles de souris transgéniques. Par contre, il faut se souvenir que les cellules de souris possèdent déjà presque toutes les caractéristiques nécessaires à l'immortalisation, incluant de long télomères et l'activité de l'enzyme télomérase, et que la présence des LT-Ag ne fait seulement qu'augmenter les probabilités de cet événement *in vitro*. Puisque rien n'est connu au sujet de la mortalité des cellules de souris *in vivo* chez l'animal, il est difficile d'adresser à quelle point cette caractéristique *in vitro* contribue à la carcinogenèse *in vivo*. Dans le chapitre 3, nous tentons d'introduire une variable supplémentaire au concept de transformation. Parce que PyLT-Ag peut procurer une résistance à l'apoptose induite par FasR et parce que les cellules de souris sont déjà immortalisées dès la naissance, il est fort probable que le rôle de PyLT-Ag ne soit pas limité à l'immortalisation dans les modèles de souris transgéniques et qu'il puisse contribuer à certains événements de la transformation précoce. Les cellules initiées, mais non transformées, par ces événements médiés par PyLT-Ag auront ensuite un avantage pour évoluer vers un stade plus agressif de la transformation ce qui explique la longue latence dans les modèles de souris transgéniques exprimant PyLT-Ag. La résistance contre l'apoptose contribué par PyLT-Ag dans notre modèle est un exemple de ces caractéristiques de transformation précoce qui sont indépendantes de l'immortalisation. Selon cette hypothèse, la comparaison entre des cellules D-37 et les cellules D-4 identifie principalement des événements de la transformation tardive puisque les événements de la transformation précoce et de l'immortalisation ont eu lieu en présence de PyLT-Ag avant la formation de la néoplasie (comparaison entre les stades 3 et 4 de la figure 3).

En comparant des cellules de souris immortalisées spontanément avec les mêmes cellules exprimant PyLT-Ag, nous pouvons donc possiblement investiguer les événements secondaires associés à l'expression de PyLT-Ag qui sont indépendants de l'immortalisation, et pourraient contribuer à la transformation précoce d'une cellule. Dans le chapitre 3 de cette thèse est présentée la deuxième partie des résultats de mon travail. En utilisant plusieurs systèmes modèles différents nous avons tenté de disséquer les événements moléculaires associés à la transformation en présence de PyLT-Ag ou de SV40LT-Ag. Pour préparer le travail présenté au chapitre 3 de ma thèse j'ai participé à la mise au point des conditions pour l'utilisation d'une nouvelle technologie dans le laboratoire. Cette collaboration a mené à la publication d'un article scientifique qui ne fait pas partie intégrante de cette thèse mais qui définit l'expertise acquise par notre laboratoire dans l'utilisation des puces à ADN (Tonin et al., 2001) (Annexe I). Ceci nous conduit à la mise en place d'un système de comparaison différentielle génomique basé sur l'utilisation des micropuces à ADN Affymetrix. L'utilisation de cette technologie nous a permis d'élaborer un nouveau système modèle (Chapitre 3, papier 2, soumis à Journal of Virology). Nous avons généré un modèle de culture cellulaire où des fibroblastes de souris immortalisé spontanément sont comparés à leurs contreparties exprimant PyLT-Ag. Ceci dans le but d'identifier des événements qui sont indépendants de l'activité classique d'immortalisation cellulaire attribuée à PyLT-Ag et possiblement associés à la transformation.



Chapitre II : Article 1



CHAPITRE II

Article 1. Polyomavirus large T antigen protects mouse cells from Fas-, TNF- α and taxol-induced apoptosis.

Article publié dans la revue Oncogene 2000, vol 19/54, p:6261.

Contributions des auteurs:

Rodier F. (90%), Bertrand R., Bossolasco M. and Mes-Masson A.-M. 2000.

Rodier F. a réalisé toutes les expérimentations décrites ainsi que la version initiale du papier. Bertrand R. est un collaborateur important concernant le volet apoptotique de la publication. Sa contribution comprend un support technique et matériel lorsque nécessaire. Bossolasco M. est une étudiante du laboratoire de Mes-Masson A.-M. ayant fourni un support technique sur certaines expérimentations. Mes-Masson A.-M. est l'investigateur principal.

ABSTRACT

Polyomavirus large T antigen (PyLT-Ag), a nucleophosphoprotein essential for regulating viral gene expression, modulates the cell cycle by binding to the Rb tumor suppressor gene product. PyLT-Ag/Rb binding is essential for *in vitro* immortalization. However, the effect of PyLT-Ag on apoptosis has not been extensively studied. We have previously reported that FasR agonist antibodies (FasR(Ab)) treatment of Sertoli cells derived from transgenic mice expressing PyLT-Ag induces the growth arrest of these cells without concomitant apoptosis (Lebel, M., Bertrand, R., Mes-Masson, A.-M. *Oncogene* 12: 1127-1135, 1996). Here we show that stable expression of PyLT-Ag in murine Sertoli TM4 and hybridoma NSO cell lines confers protection from FasR(Ab)-induced apoptosis. The protection was maintained up to 48 h when cells were grown continuously in the presence of FasR(Ab). Removal of the death stimulus after 24 h exposure was sufficient to allow full recovery of the PyLT-Ag expressing cells. The protective effect conferred by PyLT-Ag was associated with a delay in the sequential activation of caspase-8 and -3 after FasR(Ab) treatment. PyLT-Ag co-precipitated following immunoprecipitation of caspase-8 or FADD, both components of the DISC. Based on these results we suggest that PyLT-Ag directly impedes the recruitment or activation of caspase-8 by the FasR. PyLT-Ag expression in TM4 cells was also associated with protection from TNF- α and taxol-induced apoptosis. In contrast, PyLT-Ag expression was not sufficient to confer protection from camptothecin-induced apoptosis. Taken together, these results indicate that PyLT-Ag can be a potent inhibitor of FasR(Ab)-, TNF- α and taxol-induced apoptosis.

INTRODUCTION

Polyomavirus (Py), a member of the papovaviruses, causes tumors in rodents, immortalizes primary cells and transforms established cells in culture. The proteins mediating these activities are encoded by the early Py transcription unit. The early region produces differentially spliced mRNAs (Soeda *et al.*, 1980) that encode small, middle and large T-antigen (LT-Ag), as well as the recently described tiny T-Ag (Riley *et al.*, 1997). When expressed in primary cultures, PyLT-Ag confers an unlimited growth potential to cells and is responsible for the decreased serum requirement of Py transformed cells (Rassoulzadegan *et al.*, 1982; Rassoulzadegan *et al.*, 1983). In addition, PyLT-Ag can cooperate with other oncogenes to confer a complete transformed phenotype (Rassoulzadegan *et al.*, 1982). PyLT-Ag binds to the Rb gene product *in vivo* through its CR2 domain (Khandjian & Tremblay, 1992; Resnick-Silverman *et al.*, 1991). Mutants that fail to bind Rb are inactive in immortalization assays (Larose *et al.*, 1991; Larose *et al.*, 1990; Pilon *et al.*, 1996). The amino-terminal CR1 domain contains a DNA J homology domain which can stimulate Hsp70 ATPase activity (Brodsky & Pipas, 1998; Kelley & Georgopoulos, 1997; Sheng *et al.*, 1997). While some observations have suggested a role of PyLT-Ag in modulating apoptosis, its exact role remains as yet unknown (Fimia *et al.*, 1998; Gottifredi *et al.*, 1999; Lebel *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1994).

Apoptosis or programmed cell death, is a conserved mechanism essential during embryogenesis and development, and maintains tissue homeostasis of the adult (Vaux & Korsmeyer, 1999). It is implicated in many diseases including cancer, auto-immune and neurodegenerative disorders (Mountz *et al.*, 1997; Thompson, 1995). Apoptosis is critical for cellular mediated immune response since cytolytic and natural killer T cells induce apoptosis via granzyme B release, TNF- α or FasL exposure (Chinnaiyan & Dixit, 1997; Rathmell & Thompson, 1999; Siegel & Fleisher, 1999). The receptors of FasL, CD95/Apo1/FasR, and TNF- α , TNF-R1, are part of a growing family called the cell death receptor family. Upon binding of their respective ligands, the oligomerization of the cell death receptors induces the formation of death-inducing signaling complexes (DISC). These DISC transmit the external apoptotic signals to the cytoplasm, mitochondria, and ultimately to the nuclei, leading to the characteristic DNA degradation associated with apoptosis. The FasR and TNF-R1 signal transduction cascades have been extensively

studied and reviewed recently (Baker & Reddy, 1998; Kidd, 1998; Nagata, 1997; Schmitt *et al.*, 1999; Wallach *et al.*, 1999).

As part of their lytic cycle, viruses have developed strategies and appropriate viral gene products to either induce, delay, or totally block apoptosis (reviewed in (Teodoro & Branton, 1997; Young *et al.*, 1997). As an example, the Cowpox virus CrmA protein can modify the host inflammatory response by inhibiting Ice/caspase-1 (Ray *et al.*, 1992; Yuan *et al.*, 1993). Caspase-1 inhibition reduces interleukin-1 β production allowing the infected cell to evade the immune system. CrmA can also block apoptosis mediated by the activation of cell death receptors by inhibiting Mch5/Flice/Mach/caspase-8, the first caspase of the cascade recruited and activated following FasR and TNF-R1 stimulation (Boldin *et al.*, 1996; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996; Tewari *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1997). The adenovirus E1B 19-kDa protein also indirectly inhibits caspase-8 by binding to Flash, a protein associated with the FasR DISC (Imai *et al.*, 1999). E1B 19-kDa is also thought to protect from apoptosis by acting as a functional homolog of Bcl-2, a cellular inhibitor of apoptosis (Boyd *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996; Chiou *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1998).

PyLT-Ag and the related SV40LT-Ag are multi-functional proteins that have been shown to modulate some instances of apoptosis. SV40LT-Ag is sufficient to protect CV-1 monkey cells against apoptosis induced by the over-expression of caspase-1 (Jung & Yuan, 1997). Independently, it was shown that full-length SV40LT-Ag can protect against apoptosis induced by an amino-terminal fragment of SV40LT-Ag (Conzen *et al.*, 1997). This anti-apoptotic function is p53-independent and localizes to a carboxy-terminal domain of the protein that contains a degenerate BH1 domain found in various Ced-9/Bcl-2 family members. While SV40LT-Ag appears to block apoptosis induced by growth factor withdrawal in a neural stem cell line (Slinsky *et al.*, 1999) it has been reported that SV40 and PyLT-Ag cause apoptosis in differentiating myoblasts (Endo & Nadal-Ginard, 1998; Fimia *et al.*, 1998; Gottifredi *et al.*, 1999). Using temperature-sensitive mutants, both SV40LT-Ag and PyLT-Ag has been shown to protect cells from serum starvation-induced apoptosis (Zheng *et al.*, 1994). Other *in vitro* and *in vivo* results also suggest that SV40LT-Ag is able to block FasR induced apoptosis (Gonin *et al.*, 1999; Rouquet *et al.*, 1995),

although the mechanism by which it does so is unclear. In addition, we have previously reported that the D-37-C1 Sertoli cell line derived from transgenic mice expressing PyLT-Ag are resistant to treatment with FasR agonist antibodies (FasR(Ab)) (Lebel *et al.*, 1996). These results have suggested that the inhibition of FasR(Ab)-induced apoptosis in these cells was attributable to PyLT-Ag expression. In this study, we investigated the effect of PyLT-Ag expression in two different murine cell lines sensitive to FasR(Ab) treatment, and observed that PyLT-Ag protected these cells from FasR(Ab)-induced apoptosis. Furthermore, the protective effect conferred by PyLT-Ag was not restricted to FasR(Ab) but also includes protection to TNF- α and taxol treatment.

RESULTS

Expression of PyLT-Ag in TM4 and NSO murine cell lines.

The TM4 Sertoli and the NSO hybridoma cell lines were transfected with the episomal PCEP4LT vector and stable populations were selected following hygromycinB selection. TM4 cells were also transfected with the PGKLT vector and G418 resistant clones were isolated (TM4-PGKLT1, 3, and 5). To assess the level of PyLT-Ag expression, mRNA and proteins were extracted from the parental cell lines and transfected clones or mixed populations. Level of PyLT-Ag expression was analyzed by Northern (Fig. 1a) and Western blot (Fig. 1b). Both TM4-PCEP4LT and NSO-PCEP4LT mixed populations expressed PyLT-Ag. The TM4-PGKLT clones expressed variable amounts of PyLT-Ag. By comparison with internal controls (β -actin in Fig. 1a and Hsp 60 in Fig. 1b) there appears to be a good correlation between PyLT-Ag mRNA and protein profiles in TM4-PGKLT1, 3, and 5 clones. In addition, there was no significant change in procaspase-8 proteins level associated with PyLT-Ag expression.

PyLT-Ag confers protection against FasR(Ab)-induced apoptosis

The TM4-PGKLT5 cell line, which showed strong PyLT-Ag expression, was used to test the effect of PyLT-Ag expression on apoptosis. Cells were treated with 150 U/ml of γ -INF for 16 h to induce FasR expression (Takahashi *et al.*, 1995) and subsequently 1 μ g/ml of FasR(Ab) was added at every 24 h interval (γ -INF/FasR(Ab)). Treatment with γ -INF for 16 h induced the expression of FasR in both TM4, TM4-PGKLT3 and TM4-PGKLT5 cells (Fig. 1c). A filter DNA elution assay was used to monitor and quantitate kinetics of DNA fragmentation in treated TM4 and TM4-PGKLT5 cells (Fig. 2a). The TM4-PGKLT5 cells were resistant to DNA fragmentation for at least 48 h. In contrast, the parental TM4 cells underwent apoptosis rapidly after FasR(Ab) treatment. After 48 h, the TM4-PGKLT5 treated cells demonstrated little detectable DNA fragmentation although they eventually reached the levels detected in the treated TM4 cells by the sixth day. However, if FasR(Ab) treatment was restricted to the first 24 h, DNA fragmentation was observed in TM4 cells

but not in TM4-PGKLT5 cells, up to 96 h post γ -IFN/FasR(Ab) treatment (data not shown).

Morphological examination of the TM4 and TM4-PGKLT5 cells by light microscopy indicated that when DNA fragmentation reached about 40%, cells began to round up, became refractile to light, and finally detached from the cell culture dish (Fig. 2b). These morphological changes are seen as early as 24 hours in some TM4 cells. At 72 h for TM4 cells and 96 h for TM4-PGKLT5 cells, aberrant morphologies are evident and few normal adherent TM4 cells were observed at 96 h.

To assess if the protective activity was specific to TM4-PGKLT5 cells, we analyzed the effect of γ -IFN/FasR(Ab) treatment in other TM4-PGKLT clones and in the TM4-PCEP4LT and NSO-PCEP4LT mixed cell populations. Decreased DNA fragmentation was observed in the TM4-PGKLT1 and 3 clones, and also in TM4-PCEP4LT cells (Fig. 2c). The lower levels of PyLT-Ag expression in these cells correlated with a more limited extent of protection following γ -IFN/FasR(Ab) treatment. The NSO-PCEP4LT cells were also more resistant to γ -IFN/FasR(Ab) treatment compared to the parental NSO cell line (Fig. 2c). Although both the parental NSO and NSO-PCEP4LT cells showed high background levels of DNA fragmentation, treatment increased the level of fragmented DNA up to 80% in NSO cells, while NSO-PCEP4LT cells maintained background levels of DNA fragmentation. These observations show that PyLT-Ag modulated FasR(Ab)-induced apoptosis in different cell types.

PyLT-Ag confers protection against TNF- α and taxol-induced apoptosis.

We investigated whether PyLT-Ag can interfere with other apoptotic stimuli in TM4-PGKLT5 cells. First, TNF- α was tested since oligomerization of TNF-R1 by TNF- α binding induces a DISC formation that also recruits and activates caspase-8. Treatment of TM4-PGKLT5 cells with TNF- α for 48 hours resulted in 35-40% DNA fragmentation while the TM4 cells showed 75-80% DNA fragmentation (Fig. 3b). These observations indicate that PyLT-Ag has only a partial protective effect against TNF- α -induced apoptosis. The response of TM4-PGKLT5 cells to taxol, a microtubule depolymerization inhibitor, and camptothecin, a DNA topoisomerase I inhibitor, was also examined. Taxol treatment induced 40% DNA fragmentation in TM4 cells 48 h post-treatment, while

camptothecin treatment triggered 80% DNA fragmentation (Fig. 3a, 3c). The TM4-PGKLT5 cells were almost completely protected from taxol-induced DNA fragmentation, while no protection was observed in cells treated with camptothecin. (Fig. 3a,, 3c). These results were confirmed in two other PyLT-Ag expressing TM4 clones (data not shown). These observations reveals that PyLT-Ag interfered with taxol- but not camptothecin-induced apoptosis.

Sequential caspase activation is delayed in PyLT-Ag expressing cells stimulated by FasR(Ab) or Taxol.

Activation of caspases are known to play a central role in apoptosis (Alnemri, 1997; Cryns & Yuan, 1998; Stennicke & Salvesen, 1998). FasR stimulation by agonist antibodies leads to the formation of a DISC that recruits and activates procaspase-8. Once activated, caspase-8 promotes activation of procaspase-3 in a mitochondria-independent or -dependent manner (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Scaffidi *et al.*, 1998). Thus, we analyzed the effect of PyLT-Ag expression on procaspase-8 and -3 activation in TM4, TM4-PGKLT3 and TM4-PGKLT5 cells after FasR(Ab) treatment. Caspase-8 and -3 activities were monitored from cellular extracts using as substrates, the fluorescent derivative peptides z-IETD-AMC and z-DEVD-AFC, respectively. Note that the background activities of caspase-8 and -3 were similar in TM4 and TM4-PGKLT cells suggesting that PyLT-Ag expression does not affect the basal level of these caspases. FasR(Ab)-stimulated TM4 cells reached a peak of caspase-8 activity 2 h after stimulation and remained high for the next 4 hours (Fig. 4a). Caspase-8 activity then diminished slowly until it reached the initial level of activity 12 h post-treatment. In treated TM4-PGKLT3 and 5 cells, caspase-8 was much less active and never attained the level seen in TM4 cells. These results clearly indicate that PyLT-Ag impedes the activation of procaspase-8 following FasR(Ab) stimulation. In TM4 cells, caspase-8 activation resulted in the rapid induction of caspase-3 activity beginning 6 h post-treatment (Fig. 4b). After reaching 10X background, the level of caspase-3 activity then increased slowly over times. In TM4-PGKLT3 and 5 cells, caspase-3 activation started slowly 12-18 h post-treatment and

eventually reached high level of activation (Fig. 4b). The slow activation of caspase-3 in the TM4-PGKLT3 and 5 cells after FasR(Ab) treatment, correlated with the slow activation of caspase-8 in these cells. Thus, lack of early caspase-3 activity seems to be a consequence of caspase-8 inactivation mediated by PyLT-Ag expression. Unlike to FasR stimulation, procaspase-8 was not fully activated in control cells and only slightly delayed in the TM4-PGKLT5 clone in the presence of taxol, with no significant difference in the TM4-PGKLT3 cells (Fig. 4c). In contrast, caspase-3 activation was delayed in PyLT-Ag expressing TM4-PGKLT cells treated with taxol (Fig. 4d).

PyLT-Ag interacts with components of the DISC

To explain the lack of caspase-8 activation in FasR stimulated PyLT-Ag expressing cells, we investigated whether PyLT-Ag could interact with different components of the DISC. Since it is known that FasR stimulation induces the formation of the DISC we extracted proteins both before and after a five minute stimulation of FasR in control and TM4-PGKLT5 cells. Following immunoprecipitations with anti-FADD or control anti-Hsp60 antibodies, proteins were electrophoresed, blotted and analyzed for the presence of co-immunoprecipitated PyLT-Ag. No PyLT-Ag was observed in TM4 controls (Fig. 5a, lanes 1-2) or immunoprecipitates using either pre-immune goat sera or anti-Hsp60 with TM4-PGKLT5 cells (Fig. 5a, lanes 3 and 4). PyLT-Ag was observed, however, in TM4-PGKLT5 cell extracts immunoprecipitated with antibodies against FADD (Fig. 5a, lane 5). The intensity of PyLT-Ag staining was greatly enhanced following the stimulation of FasR (Fig. 5a, lane 6). Similar results with caspase-8 were difficult to visualize in the TM4-PGKLT5 cells (data not shown) and subsequent experiments were performed in NIH3T3 clones expressing varying amounts of PyLT-Ag. In particular, NIH-LT23 cells expressed similar amounts of PyLT-Ag as the TM4-PGKLT5 cells (data not shown) while NIH-LT7 cells expressed significantly more PyLT-Ag (Fig. 5b, compare lanes 14 and 15). PyLT-Ag was observed in NIH-LT7 extracts following anti-caspase-8 and anti-FADD immunoprecipitations (Fig. 5b lanes 4 and 12) but not in the lower PyLT-Ag expressing NIH-LT23 cells (Fig. 5b, lanes 3 and 11). PyLT-Ag was not observed following immunoprecipitations with goat pre-immune serum or by an anti-Hsp60 antibody (data not shown).

DISCUSSION

In this study we present evidence that PyLT-Ag protects cells from apoptosis induced by stimulation of cell death receptors and taxol treatment. The analysis of caspase activation after FasR(Ab) stimulation in the TM4 and TM4-PGKLT5 cells, suggests that the protective effect of PyLT-Ag occurs primarily at or upstream of caspase-8, preventing its recruitment or activation in the FasR DISC. This is based on the observations that in the TM4-PGKLT5 cells, caspase-8 activation is delayed and reduced as compared to the TM4 cells. For FasR, stimulation by the agonist antibodies leads to the formation of a DISC that contains FADD/MORT-1 and FLASH that recruits caspase-8 or -10 (Baker & Reddy, 1998; Kidd, 1998; Nagata, 1997; Schmitt *et al.*, 1999; Wallach *et al.*, 1999). E1B 19-kDa binds to FLASH and interferes with caspase-8 activation (Imai *et al.*, 1999). Our results suggest a similar function for PyLT-Ag in preventing caspase-8 activation in FasR(Ab)-treated cells. To determine whether PyLT-Ag interacts with the DISC, we used a co-immunoprecipitation approach to detect whether PyLT-ag interacts either with FADD or caspase 8. Our results indicate that PyLT-Ag co-immunoprecipitates with FADD, and this interaction is strengthened following FAS receptor activation. This latter result suggests that PyLT-Ag might not directly interact with FADD/caspase-8 but rather with other components of the DISC, such as FLASH, which are recruited to the DISC complex following activation (Fig. 6). In our study, PyLT-Ag was less efficient in preventing TNF- α -induced apoptosis compared to FasR(Ab) although both receptors depend on caspase-8 activation to relay cell death signals within cells. However, for TNF-R1 the DISC contains the adapter molecule TRADD that recruits FADD and caspase-8, or alternatively TRADD recruits caspase-2 via a TRADD/RIP/CRADD/RAIDD complex (Baker & Reddy, 1998; Kidd, 1998; Nagata, 1997; Schmitt *et al.*, 1999; Wallach *et al.*, 1999). Our observations may imply that the ability of PyLT-Ag to prevent caspase-8 activation is diminished in the TNF-R1 DISC or that TNF-R1 uses apoptotic pathways bypassing the DISC (Wallach *et al.*, 1999).

Following caspase-8 activation in TM4 cells, caspase-3 was activated and DNA fragmentation occurred rapidly (6 hours later). In the TM4-PGKLT5 cells, the slow activation of caspase-8 delayed the subsequent activation of caspase-3. However, even after caspase-3 activation, DNA degradation did not occur rapidly (30 hours later). PyLT-Ag

expression seems to prolong the interval between caspase-3 activation and the occurrence of DNA fragmentation. This result suggests that PyLT-Ag may also act downstream of caspase-3 activation, delaying the activation or activity of other caspases involved in the structural disintegration of the nuclei (Earnshaw, 1995; Lazebnik *et al.*, 1995; Oberhammer *et al.*, 1994) or alternatively, of apoptotic nucleases such as CAD or AIF that are involved in the DNA fragmentation processes (Sakahira *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1999). Thus, PyLT-Ag might act at different levels of the apoptotic cascade depending on its cellular localization (Fig. 6). PyLT-Ag has previously been shown to indirectly activate the HSP70 promoter presumably by activating HSF1, a key regulator in stress responses (Kingston *et al.*, 1986). Indeed, several reports have indicated that stress proteins such as HSP70, can modulate apoptosis, including cell death receptor mediated apoptosis (Arrigo, 1998; Hohfeld, 1998; Jaattela *et al.*, 1998; Samali & Orrenius, 1998; Schett *et al.*, 1999; Vayssier & Polla, 1998). Following TNF-R1 stimulation, HSP70 has been reported to act downstream of caspase-3 activation but before the appearance of DNA degradation (Jaattela *et al.*, 1998) although recent results suggest that it can also act before the activation of caspase-3 (Beere *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Saleh *et al.*, 2000). This observation parallels the delayed appearance of DNA fragmentation after caspase-3 activation in our model. Moreover, PyLT-Ag not only appears to stimulate HSP70 expression indirectly, but it can directly bind and stimulate HSP70 enzymatic activity via its DNA J/CR1 homology domain located within its amino-terminal sequences (Kelley & Georgopoulos, 1997).

During continuous FasR(Ab) stimulation, PyLT-Ag can protect TM4-PGKLT5 cells from DNA degradation up to 48 h. Initiation of DNA fragmentation after 48 h demonstrated that, under constant stimulation, the protection provided by PyLT-Ag was only transient. Whether these lengthy *in vitro* stimuli are relevant to the *in vivo* situation is not clear. The *in vitro* use of peptide derivatives that inhibit caspase activities fails to protect cells completely when they are maintained in apoptotic stimulation (McCarthy *et al.*, 1997; Sane & Bertrand, 1999). In addition, delayed DNA degradation observed in some studies was due to a switch from apoptosis to necrosis (Hirsch *et al.*, 1997; Sane & Bertrand, 1999). It is unclear therefore, whether the delayed DNA degradation observed in TM4-PGKLT5 cells is related to a similar switch to necrosis.

Our results show that PyLT-Ag was able to protect cells from taxol- but not camptothecin-induced apoptosis. The apoptotic signalling pathways activated following taxol stimulation are still controversial, and while some reports suggest an important role for caspase-8 (Oyaizu *et al.*, 1999) other reports suggest that caspase-3 is the more important target for activation (Perkins *et al.*, 2000; Weigel *et al.*, 2000). In our experiments we can see a slight activation of caspase-8 in control and TM4-PGKLT3 cells which is mildly delayed in TM4-PGKLT5 cells and it is not clear whether caspase-8 is activated before or after caspase-3 activation. If caspase-8 activation is not essential for taxol induced apoptosis, it is possible that at least part of the protective activity of PyLT-Ag is directed towards the mitochondria since chemotherapeutic agents, including taxol and camptothecin, activate apoptosis in a mitochondria-dependent manner that can be inhibited by Bcl-2 and Bcl-xL (Decaudin *et al.*, 1998; Dole *et al.*, 1995; Ibrado *et al.*, 1996; Kharbanda *et al.*, 1997; Schmitt *et al.*, 1998; Simonian *et al.*, 1997). Expression level of anti-apoptotic members of the Ced-9/Bcl-2 family often determine drug sensitivity or resistance in tumors (Reed, 1997). The E1B 19-kDa protein which also acts as a functional homolog of Bcl-2, contains a degenerate BH1 domain that mediates interaction of E1B 19-kDa with the pro-apoptotic proteins Bax, Bak and Bnip3 (Boyd *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996; Han *et al.*, 1996; Subramanian *et al.*, 1995; Yasuda *et al.*, 1998). It has been postulated that SV40LT-Ag possesses a putative degenerate BH1 domain located in the amino-terminal portion of the protein (Conzen *et al.*, 1997). PyLT-Ag does possess this degenerate BH1 domain, however, as for SV40LT, the similarity with Bcl2 is relatively low and the sequence lacks the highly conserved GR tandem present in all family members including the evolutionarily distant *Caenorhabditis elegans*. Whether this BH1-like domain of PyLT-Ag is functional despite the lack of the glycine moiety known to be highly important for Bcl-2 and E1B 19-kD functions (Chen *et al.*, 1996; Yin *et al.*, 1994), is currently under investigation.

Viruses have evolved various biochemical functions that allow them not only to self-replicate, but also to induce cellular transformation. The ability of PyLT-Ag to protect cells from cell death receptor mediated apoptosis suggests that Py has developed strategies to confer immune privileges that allow the host cell to escape immune responses. Further

characterization of the mechanisms by which viral proteins like PyLT-Ag modulate apoptosis will help in understanding how tumor cells evade the immune system.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. The NSO cell line was obtained from Dr. B. Massie (Institut de Recherche en Biotechnologie, Canada) and is also available at the American Type Culture Collection (ATCC). The TM4 and NIH 3T3 cell lines were purchased from the ATCC. D4 cells, Sertoli cells derived from transgenic PyLT-Ag animals [Lebel, 1994 #91, were used as a positive control for PyLT-Ag expression in Fig. 2a. Both TM4 and NSO cell lines were chosen because of their sensitivity to FasR(Ab) and because the TM4 Sertoli line was of the same origin as the D37-C1/PyLT-Ag expressing cells used previously (Lebel *et al.*, 1996). All cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) supplemented with 9% fetal bovine serum, 50 µg/ml gentamycin, 2.5 µg/ml fungizone and 100 U/ml streptomycin/penicillin. All cell culture products were from Gibco-BRL Life Technology. Cells were allowed to grow at 37°C with the controlled addition of 5% CO₂ in the atmosphere.

Vectors and transfections. PCEP4LT was constructed by introducing the *XhoI-BamHI* fragment of PyLT-Ag cDNA (derived from the A2 strain of Py) into the pCEP4 polylinker (Invitrogen) and was used to transfect TM4 and NSO cells. The PGKLT plasmid was constructed by introducing the *BamHI-BamHI* fragment of PyLT-Ag cDNA into the PGK vector (a gift from Dr. M. McBurney, University of Ottawa, Canada) and was used to transfect TM4 and NIH3T3 cells. This vector is composed of the pUC19 backbone in which the mouse PGK5' and PGK3' regulatory regions have been inserted (McBurney *et al.*, 1991). The pSV2neo vector is a common G418 selection vector. All restriction and modification enzymes were purchased from Pharmacia Canada. For transfection, cells were washed twice with PBS, resuspended in 400 µl DMEM including 20 µg of plasmid DNA and electroporated at 250 volts and 960 µFD. Cells were left at room temperature for 10 min before being seeded in fresh media. Selection with either 0.5 mg/ml hygromycinB or G418 was applied after 48 h.

Northern Blots. RNA was extracted from 100 mm petri dishes confluent at 80% using Gibco TRIZOL™. Ten µg of total RNA from cells were electrophoresed on 1% (w/v)

agarose gel containing 2.2 M formaldehyde and 20 mM MOPS (3-[N-morpholine] propane sulfonic acid, pH 6.8). RNA was transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell) by capillary blotting with 10x SSC (1x SSC is 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0). The filters were baked at 80°C for 2 h and hybridized overnight at 60°C in 30% formamide, 0.35 M sodium phosphate, pH 7.2, 7% SDS, 1% bovine serum albumin and a random-primed [³²P] dCTP-labeled linearized plasmid containing the cloned fragment of interest. Filters were subsequently washed twice at 60°C with 0.15 M sodium phosphate, containing 1% SDS and exposed to Kodak XAR-5 film for two hours to five days at -70°C with an intensifying screen. To reprobe specific Northern blots, filters were treated at 80°C for one hour in 0.03 M sodium phosphate, 0.1% SDS. To insure that the probe had been stripped, membranes were exposed at -70°C with an intensifying screen overnight. Either the complete PyLT-Ag cDNA 2300 bp, or a 300 bp fragment of the FasR cDNA, or a 600 bp fragment of human β -actin cDNA were used as probes. Probes were prepared using the Pharmacia random primed labeling kit and subsequently purified by the Nucleotide Removal kit (Qiagen).

Western Blots. Cells from a 80% confluent 100 mm petri dish were scraped, washed twice in ice cold PBS and proteins extracted by resuspending the cells directly in 100 μ l of gel loading buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 10% glycerol). The mixture was briefly sonicated (30 sec) followed by centrifugation (10 min) in a tabletop centrifuge at 4°C to remove particulates. Samples (50 μ g) were loaded on a 10% Tris-glycine SDS-polyacrylamide gel and electrophoresed as described (Sambrook *et al.*, 1989). Proteins were electroblotted overnight onto a nitrocellulose membrane and probed for PyLT-Ag expression. We used a 1:300 dilution (in PBS, 5% milk) of a polyclonal antibody specific to Py-TAg's (BNR 2C1) which was produced by injection of PyB4a to form ascites in BN rats cells (Silver *et al.*, 1978). Commercially available antibodies were bought from SantaCruz and diluted appropriately (caspase-8 p20 (H-134) 1:250 and Hsp60 (N-20) 1:2000). Secondary biotinylated antibodies (BioCan Scientific) and tertiary streptavidin-horseradish peroxidase (Amersham) were used at dilutions of 1:500 and 1:1000, respectively. Blots were developed using enhanced chemiluminescence reagent (Boehringer-Mannheim).

Apoptosis induction. For FasR stimulation, a pre-treatment with 150 U/ml mouse γ -IFN (Boehringer Mannheim) for 16 h followed by addition of 1 μ g/ml FasR agonist antibodies

(FasR(Ab), clone Jo2 Pharmingen) was used. Timeline and other experiments calculate time zero from the point of FasR(Ab) addition. For TNF- α (Boehringer-Mannheim), we used concentrations ranging from 1,300 U/ml to 33,000 U/ml with or without γ -IFN pretreatment of 150 U/ml. Taxol and camptothecin were obtained from Sigma Chemicals Co. and treatments were performed as indicated.

DNA fragmentation assays. Cellular DNA was labeled for 48 h with ^{14}C -thymidine (20 nCi/ml) and then chased in isotope-free medium before treatment. DNA fragmentation was quantitated at various time points by DNA filter elution assays, in which cells are lysed directly onto a protein-adsorbent filter (Metricel membrane, 0.8- μm pore size, 25-mm diameter, Gelman Sciences Inc). The filter retains labeled high molecular weight DNA while allowing fragmented DNA in the cell lysate to pass through. First, cells were washed with PBS and the collected supernatant was labeled fraction 1. Cells lysis was done directly on the filter with LS-10 solution (0.2% sodium sarkosyl, 2 M NaCl, 0.04 M EDTA, pH 10.0) and lysates collected and labeled fraction 2. One subsequent filter wash was done with 0.02M EDTA, pH 10.0, to remove residual DNA fragments and was labeled fraction 3. The filter, containing only high molecular weight DNA was labeled fraction 4. All fractions were counted individually by liquid scintillation spectrometry for ^{14}C -thymidine radioactivity. Total cpm of fraction 1, 2 and 3 (fragmented DNA) divided by total cpm of fraction 1, 2, 3 and 4 (total DNA) X 100, gives a precise percentage of the amount of DNA fragmentation (Bertrand *et al.*, 1995).

Caspases activity monitoring. Caspases-8 and -3 activities were monitored using protein extracts obtained from treated and control cells. Proteins were extracted from one petri dish at 80% confluence. Cells were washed twice in ice cold PBS directly on the dish and were then scraped and harvested at 3000 rpm for 2 min. in an eppendorf centrifuge at 4°C. Surplus PBS was removed and cells were resuspended in 100 μl lysis buffer (100 mM Hepes pH 7.4, 20% glycerol, 5 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol and 0.1% NP-40) and left on ice with agitation for 30 min. The supernatants were collected and frozen at -80°C until used. For each determination, 100 μg of protein was diluted with lysis buffer and fluorescence was monitored continuously at 37°C in a dual luminescence fluorometer (LS 50B Perkin-Elmer) for 1 min. to establish a baseline. The specific derivative peptides z-DEVD-AFC (casp-3) and z-IETD-AMC (casp-8) obtained from Calbiochem were used as substrates at 200 μM final concentration. Fluorescence was monitored for 10 min. and

enzyme activities were determined as initial velocities in fluorescence units/mg/min. Data are expressed as activity relative to control untreated cells.

Immunoprecipitation. Immunoprecipitation reactions were performed following Santa Cruz Biotechnology protocols. Proteins were extracted in RIPA buffer (1 x PBS, 1% NP-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS) in the presence of COMPLETE™, (Boehringer Mannheim) protease inhibitor cocktail. Cells from three 100 mm tissue culture dishes (70% confluence) were rinsed in PBS, scraped and resuspended in 200ul extraction buffer and rocked for 2 hours at 4°C. The mixture was briefly sonicated (30 sec) followed by centrifugation (10 min) in a tabletop centrifuge at 4°C to remove particulates. Supernatants were pre-cleared with goat control IgGs. Samples were divided in three and incubated with primary antibodies (SantaCruz, caspase-8 p20 (H-134), FADD (M-19) and Hsp60 (N-20)) at a concentration of 10ug/ml overnight. Pellets of protein A/G PLUS-Agarose/primary antibodies/complex were washed 4 times with RIPA buffer before being analyzed as described above (Western blot analysis).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank L. Champoux for technical assistance. We thank Dr. L. Masson for critical reading of the manuscript and scientific discussions. This research was funded by a Medical Research Council of Canada grant to A.-M.M.-M. F.R. is the recipient of an Institut du cancer de Montreal Canderel scholarship; M.B. is the recipient of a studentship from the MRC; A.-M.M.-M. is the recipient of a Fonds de la recherche en santé au Québec (FRSQ) Chercheur National fellowship; R.B. is the recipient of an FRSQ Chercheur Junior II fellowship.

REFERENCES

- Alnemri, E.S. (1997). *J. Cell Biochem.*, **64**, 33-42.
- Arrigo, A.P. (1998). *Biol. Chem.*, **379**, 19-26.
- Baker, S.J. & Reddy, E.P. (1998). *Oncogene*, **17**, 3261-70.
- Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M. & Green, D.R. (2000). *Nat Cell Biol*, **2**, 469-475.
- Bertrand, R., Kohn, K.W., Solary, E. & Pommier, Y. (1995). *Drug Develop. Res.*, **34**, 138-144.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. & Wallach, D. (1996). *Cell*, **85**, 803-15.
- Boyd, J.M., Malstrom, S., Subramanian, T., Venkatesh, L.K., Schaeper, U., Elangovan, B., D'Sa-Eipper, C. & Chinnadurai, G. (1994). *Cell*, **79**, 341-51.
- Brodsky, J.L. & Pipas, J.M. (1998). *J. Virol.*, **72**, 5329-34.
- Chen, G., Branton, P.E., Yang, E., Korsmeyer, S.J. & Shore, G.C. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 24221-5.
- Chinnaiyan, A.M. & Dixit, V.M. (1997). *Semin. Immunol.*, **9**, 69-76.
- Chiou, S.K., Tseng, C.C., Rao, L. & White, E. (1994). *J. Virol.*, **68**, 6553-66.
- Conzen, S.D., Snay, C.A. & Cole, C.N. (1997). *J. Virol.*, **71**, 4536-43.
- Cryns, V. & Yuan, J.Y. (1998). *Genes Dev.*, **12**, 1551-1570.
- Decaudin, D., Marzo, I., Brenner, C. & Kroemer, G. (1998). *Intl. J. Oncol.*, **12**, 141-152.
- Dole, M.G., Jasty, R., Cooper, M.J., Thompson, C.B., Nunez, G. & Castle, V.P. (1995). *Cancer Res.*, **55**, 2576-2582.
- Earnshaw, W.C. (1995). *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 337-343.
- Endo, T. & Nadal-Ginard, B. (1998). *J. Cell Sci.*, **111**, 1081-93.
- Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G. & Alnemri, E.S. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7464-7469.
- Fimia, G.M., Gottifredi, V., Bellei, B., Ricciardi, M.R., Tafuri, A., Amati, P. & Maione, R. (1998). *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1449-63.
- Gonin, S., Diaz-Latoud, C., Richard, M.J., Ursini, M.V., Imbo, A., Manero, F. & Arrigo, A.P. (1999). *Oncogene*, **18**, 8011-23.
- Gottifredi, V., Peschiaroli, A., Fimia, G.M. & Maione, R. (1999). *J. Cell Sci.*, **112**, 2397-407.

- Han, J., Sabbatini, P. & White, E. (1996). *Mol. Cell Biol.*, **16**, 5857-5864.
- Han, J., Wallen, H.D., Nunez, G. & White, E. (1998). *Mol. Cell Biol.*, **18**, 6052-62.
- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S.A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M. & Kroemer, G. (1997). *Oncogene*, **15**, 1573-81.
- Hohfeld, J. (1998). *Biol. Chem.*, **379**, 269-74.
- Ibrado, A.M., Huang, Y., Fang, G.F. & Bhalla, K. (1996). *Cell Growth Diff.*, **7**, 1087-1094.
- Imai, Y., Kimura, T., Murakami, A., Yajima, N., Sakamaki, K. & Yonehara, S. (1999). *Nature*, **398**, 777-85.
- Jaattela, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T. & Egeblad, M. (1998). *Embo J.*, **17**, 6124-34.
- Jung, Y.K. & Yuan, J. (1997). *Oncogene*, **14**, 1207-14.
- Kelley, W.L. & Georgopoulos, C. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3679-84.
- Khandjian, E.W. & Tremblay, S. (1992). *Oncogene*, **7**, 909-917.
- Kharbanda, S., Pandey, P., Schofield, L., Israels, S., Roncinske, R., Yoshida, K., Bharti, A., Yuan, Z.M., Saxena, S., Weichselbaum, R., Nalin, C. & Kufe, D. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6939-6942.
- Kidd, V.J. (1998). *Annu. Rev. Physiol.*, **60**, 533-73.
- Kingston, R.E., Cowie, A., Morimoto, R.I. & Gwinn, K.A. (1986). *Mol. Cell Biol.*, **6**, 3180-90.
- Larose, A., Dyson, N., Sullivan, M., Harlow, E. & Bastin, M. (1991). *J. Virol.*, **65**, 2308-2313.
- Larose, A., St-Onge, L. & Bastin, M. (1990). *Virology*, **176**, 98-105.
- Lazebnik, Y.A., Takahashi, A., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H. & Earnshaw, W.C. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9042-9046.
- Lebel, M., Bertrand, R. & Mes-Masson, A.M. (1996). *Oncogene*, **12**, 1127-35.
- Li, C.Y., Lee, J.S., Ko, Y.G., Kim, J.I. & Seo, J.S. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 25665-71.
- Li, H.L., Zhu, H., Xu, C.J. & Yuan, J.Y. (1998). *Cell*, **94**, 491-501.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X.D. (1998). *Cell*, **94**, 481-490.
- McBurney, M.W., Sutherland, L.C., Adra, C.N., Leclair, B., Rudnicki, M.A. & Jardine, K. (1991). *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5755-61.
- McCarthy, N.J., Whyte, M.K., Gilbert, C.S. & Evan, G.I. (1997). *J. Cell Biol.*, **136**, 215-27.
- Mountz, J.D., Wu, J., Zhou, T. & Hsu, H.C. (1997). *Immunol. Rev.*, **160**, 19-30.

- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. & Dixit, V.M. (1996). *Cell*, **85**, 817-27.
- Nagata, S. (1997). *Cell*, **88**, 355-365.
- Oberhammer, F.A., Hochegger, K., Froschl, G., Tiefenbacher, R. & Pavelka, M. (1994). *J. Cell Biol.*, **126**, 827-37.
- Oyaizu, H., Adachi, Y., Taketani, S., Tokunaga, R., Fukuhara, S. & Ikehara, S. (1999). *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, **2**, 36-41.
- Perkins, C.L., Fang, G., Kim, C.N. & Bhalla, K.N. (2000). *Cancer Res.*, **60**, 1645-53.
- Pilon, A.A., Desjardins, P., Hassell, J.A. & Mes-Masson, A.M. (1996). *J. Virol.*, **70**, 4457-65.
- Rassoulzadegan, M., Cowie, A., Carr, A., Glaichenhaus, N., Kamen, R. & Cuzin, F. (1982). *Nature*, **300**, 713-718.
- Rassoulzadegan, M., Naghashfar, Z., Cowie, A., Carr, A., Grisoni, M., Kamen, R. & Cuzin, F. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4354-4358.
- Rathmell, J.C. & Thompson, C.B. (1999). *Annu. Rev. Immunol.*, **17**, 781-828.
- Ray, C.A., Black, R.A., Kronheim, S.R., Greenstreet, T.A., Sleath, P.R., Salvesen, G.S. & Pickup, D.J. (1992). *Cell*, **69**, 597-604.
- Reed, J.C. (1997). *Semin. Hematol.*, **34**, 9-19.
- Resnick-Silverman, L., Pang, Z., Li, G., Jha, K.K. & Ozer, H.L. (1991). *J. Virol.*, **65**, 2845-2852.
- Riley, M.I., Yoo, W., Mda, N.Y. & Folk, W.R. (1997). *J. Virol.*, **71**, 6068-74.
- Rouquet, N., Allemand, I., Molina, T., Bennoun, M., Briand, P. & Joulin, V. (1995). *Oncogene*, **11**, 1061-7.
- Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. (1998). *Nature*, **391**, 96-9.
- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D. & Alnemri, E.S. (2000). *Nat Cell Biol*, **2**, 476-483.
- Samali, A. & Orrenius, S. (1998). *Cell Stress Chaperones*, **3**, 228-36.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sane, A.T. & Bertrand, R. (1999). *Cancer Res.*, **59**, 3565-9.

- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1998). *Embo J.*, **17**, 1675-87.
- Schett, G., Steiner, C.W., Groger, M., Winkler, S., Graninger, W., Smolen, J., Xu, Q. & Steiner, G. (1999). *Faseb J.*, **13**, 833-42.
- Schmitt, E., Cimoli, G., Steyaert, A. & Bertrand, R. (1998). *Exp. Cell Res.*, **240**, 107-121.
- Schmitt, E., Sane, A.T. & Bertrand, R. (1999). *Drug Resist Updates*, **2**, 21-29.
- Sheng, Q., Denis, D., Ratnofsky, M., Roberts, T.M., DeCaprio, J.A. & Schaffhausen, B. (1997). *J. Virol.*, **71**, 9410-6.
- Siegel, R.M. & Fleisher, T.A. (1999). *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 729-38.
- Silver, J., Schaffhausen, B. & Benjamin, T. (1978). *Cell*, **15**, 485-96.
- Simonian, P.L., Grillot, D.A.M. & Nunez, G. (1997). *Blood*, **90**, 1208-1216.
- Slinskey, A., Barnes, D. & Pipas, J.M. (1999). *J. Virol.*, **73**, 6791-9.
- Soeda, E., Arrand, J.R., Smolar, N., Walsh, J.E. & Griffin, B.E. (1980). *Nature*, **283**, 445-53.
- Stennicke, H.R. & Salvesen, G.S. (1998). *Biochim. Biophys. Acta*, **1387**, 17-31.
- Subramanian, T., Tarodi, B. & Chinnadurai, G. (1995). *Cell Growth Diff.*, **6**, 131-7.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. & Kroemer, G. (1999). *Nature*, **397**, 441-446.
- Takahashi, H., Kobayashi, H., Hashimoto, Y., Matsuo, S. & Iizuka, H. (1995). *J. Invest. Dermatol.*, **105**, 810-5.
- Teodoro, J.G. & Branton, P.E. (1997). *J. Virol.*, **71**, 1739-1746.
- Tewari, M., Telford, W.G., Miller, R.A. & Dixit, V.M. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 22705-22708.
- Thompson, C.B. (1995). *Science*, **267**, 1456-62.
- Vaux, D.L. & Korsmeyer, S.J. (1999). *Cell*, **96**, 245-254.
- Vayssier, M. & Polla, B.S. (1998). *Cell Stress Chaperones*, **3**, 221-7.
- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V. & Boldin, M.P. (1999). *Annu. Rev. Immunol.*, **17**, 331-367.
- Weigel, T.L., Lotze, M.T., Kim, P.K., Amoscato, A.A., Luketich, J.D. & Odoux, C. (2000). *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **119**, 795-803.

- Yasuda, M., Theodorakis, P., Subramanian, T. & Chinnadurai, G. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 12415-12421.
- Yin, X.M., Oltval, Z.N. & Korsmeyer, S.J. (1994). *Nature*, **369**, 321-323.
- Young, L.S., Dawson, C.W. & Eliopoulos, A.G. (1997). *Brit. Med. Bull.*, **53**, 509-21.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. & Horvitz, R. (1993). *Cell*, **75**, 641-652.
- Zheng, D.Q., Vayssiere, J.L., Petit, P.X., LeCoeur, H., Spatz, A., Mignotte, B. & Feunteun, J. (1994). *Oncogene*, **9**, 3345-51.
- Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V.M. & Salvesen, G.S. (1997). *J. Biol. Chem.*, **272**, 7797-800.

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Expression of PyLT-Ag and FasR in transfected TM4 and NSO cells by Northern and Western blot analysis. (A) PyLT-Ag expression in the parental and transfected TM4 and NSO cells evaluated by Northern blot analysis using full length PyLT-Ag cDNA and partial β -actin cDNA as probes. Ten μ g of total RNA was applied to each lane and the blot was hybridized separately for each probe. The D-37 line is a positive control for PyLT-Ag expression. (B) PyLT-Ag expression in TM4 and NSO cells evaluated by Western blot analysis using polyclonal antibody against Py-TAGs. Equivalent amounts of protein was loaded in each lane. Enhanced chemiluminescence reaction was used for detection. The same membrane was subsequently reanalyzed for pro-Caspase-8 and Hsp60 expression. (C) Expression of FasR and β -actin mRNAs in TM4, TM4-PGKLT3 and TM4-PGKLT5 cells before and after γ -INF treatment. The top panel represents a 48 h exposure of the FasR probed membrane. The bottom panel represents a 4 h exposure of the same membrane probed with β -actin. Cells were maintained with or without γ -INF for 16 h before total RNA was harvested from an 80% confluent 100 mm cell culture dish (* represents treated cells). Note the approximate 4 to 5-fold induction of FasR in TM4, TM4-PGKLT3 and TM4-PGKLT5 cells.

Figure 2

The effect of PyLT-Ag expression on DNA fragmentation induced by FasR(Ab) stimulation. (A) Kinetics of DNA fragmentation induced by FasR(Ab) in TM4 and TM4-PGKLT5 cells. At the indicated times (x axis, hour), DNA fragmentation was determined by DNA filter elution assays. Results are expressed as a percentage of DNA fragmentation. Points represent the means \pm SD of at least 3 experiments. Symbols: open circles, TM4; closed circles, TM4-PGKLT5. (B) Optical microscope analysis of TM4 and TM4-PGKLT5 cells undergoing FasR(Ab) treatment. Cells were analyzed at a 100x magnification. Cells

undergoing apoptosis round up and detach from the dish or break down releasing small fragment. (C) FasR(Ab) stimulation in a series of TM4-PGKLT clones and TM4/NSO-PCEP4LT mixed cell populations expressing PyLT-Ag. DNA fragmentation was scored 48 h after γ -IFN/FasR(Ab) treatment by DNA filter elution assays. Bars represent the means \pm SD of at least 3 experiments. Symbols: open bars, untreated cells; closed bars, FasR(Ab)-treated cells.

Figure 3

The effect of PyLT-Ag expression on DNA fragmentation induced by TNF- α , taxol and camptothecin. Cells were treated for 48 h with 0.05, 0.2 or 0.5 μ M taxol (Panel A), 6,700 U/ml TNF- α (Panel B), or 10 μ g/ml camptothecin (Panel C) prior to DNA fragmentation assays. Error bars represent the means \pm SD of 3 experiments. Symbols: open bars or circles, TM4; open squares, TM4-PGKLT3; closed bars or circles TM4-PGKLT5. Note that similar results were obtained with concentrations ranging from 1,300 to 33,000 U/ml TNF- α , or from 1 to 100 μ g/ml camptothecin.

Figure 4

Sequential caspase activation in TM4 and TM4-PGKLT5 cells stimulated by FasR(Ab) or Taxol. Kinetics of caspase-8 (Panel A-C) and caspase-3 (Panel B-D) activities were determined using peptide derivatives as substrates at the indicated times (x axis, hour) after γ -INF/FasR(Ab) (Panel A-B) or Taxol 5mM (Panel C-D) treatment. Results are expressed as fold induction relative to control. Points represent the means \pm SD of 3 to 6 experiments (except the points without error bars were the experiments were conducted only twice). Symbols: open circles, TM4; open squares, TM4-PGKLT3; closed circles TM4-PGKLT5.

Figure 5

PyLT-Ag interact with FADD / Caspase-8 and this interaction is enhanced by FasR stimulation. (A) Western blotting of immunoprecipitated protein extracts from TM4 and TM4-PGKLT5 cells. Primary antibodies used for immunoprecipitation were anti-FADD, anti-HSP60 and goat pre-immune serum. TM4-PGKLT5/INF- γ FAS represents TM4-PGKLT5 cells treated for 16 hours with γ -interferon and stimulated for 5 minutes with the agonist anti-FasR(ab) before protein extraction. Immunodetection was performed with rat polyclonal antibodies against Py-TAgs (mm1a) and revealed with Enhanced chemiluminescence reaction (ECL). (B) Immunoprecipitation of fresh protein extracts from NIH3T3 and NIH3T3-LT cells. Lane 13-15 represents crude protein extracts before the immunoprecipitation reaction (50ug of protein/well). Anti-FADD (line 1-4), Anti-PyLT-Ag (line 5-8), Anti-CASP8 (line 9-12) were used as primary antibody to immunoprecipitate the complexes. Half of the reaction products were loaded on SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose. Immunodetection was realized with the same rat polyclonal antibodies against Py-TAgs (mm1a) as in (A). RIPA refers to extraction buffer only.

Figure 6**Model of PyLT-Ag anti-apoptotic activity**

Schematic representation of the potential subcellular localisation where PyLT-Ag might exert its anti-apoptotic effect against FasR apoptotic stimulation.

Figure 1

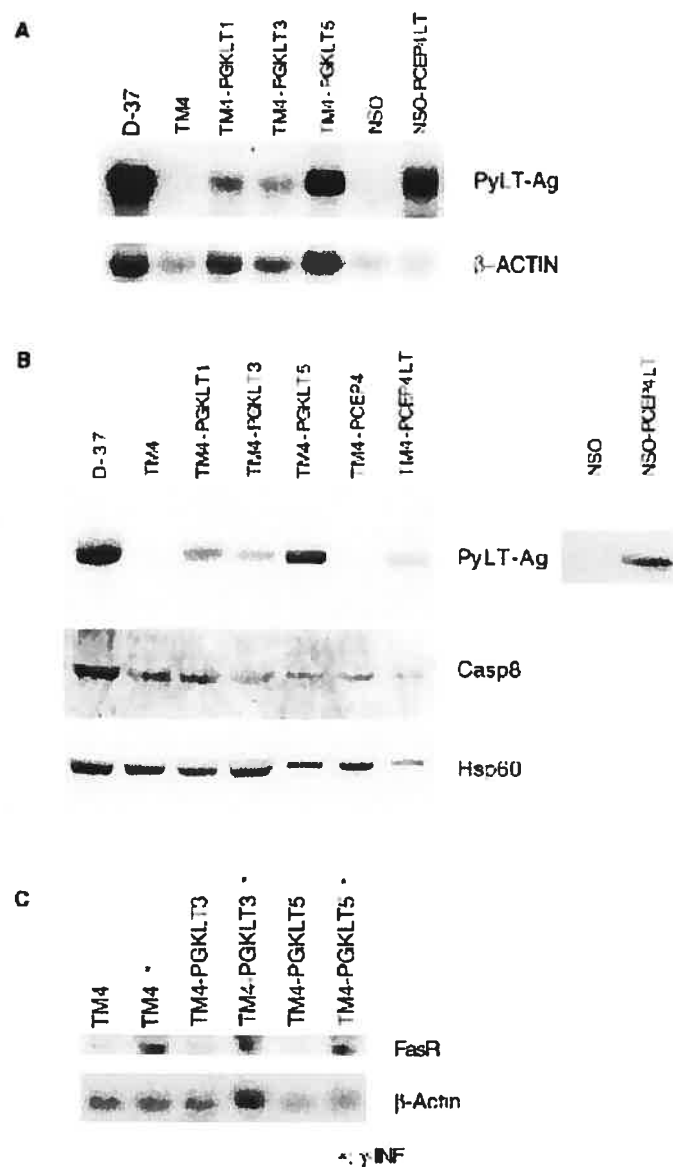


Figure 2

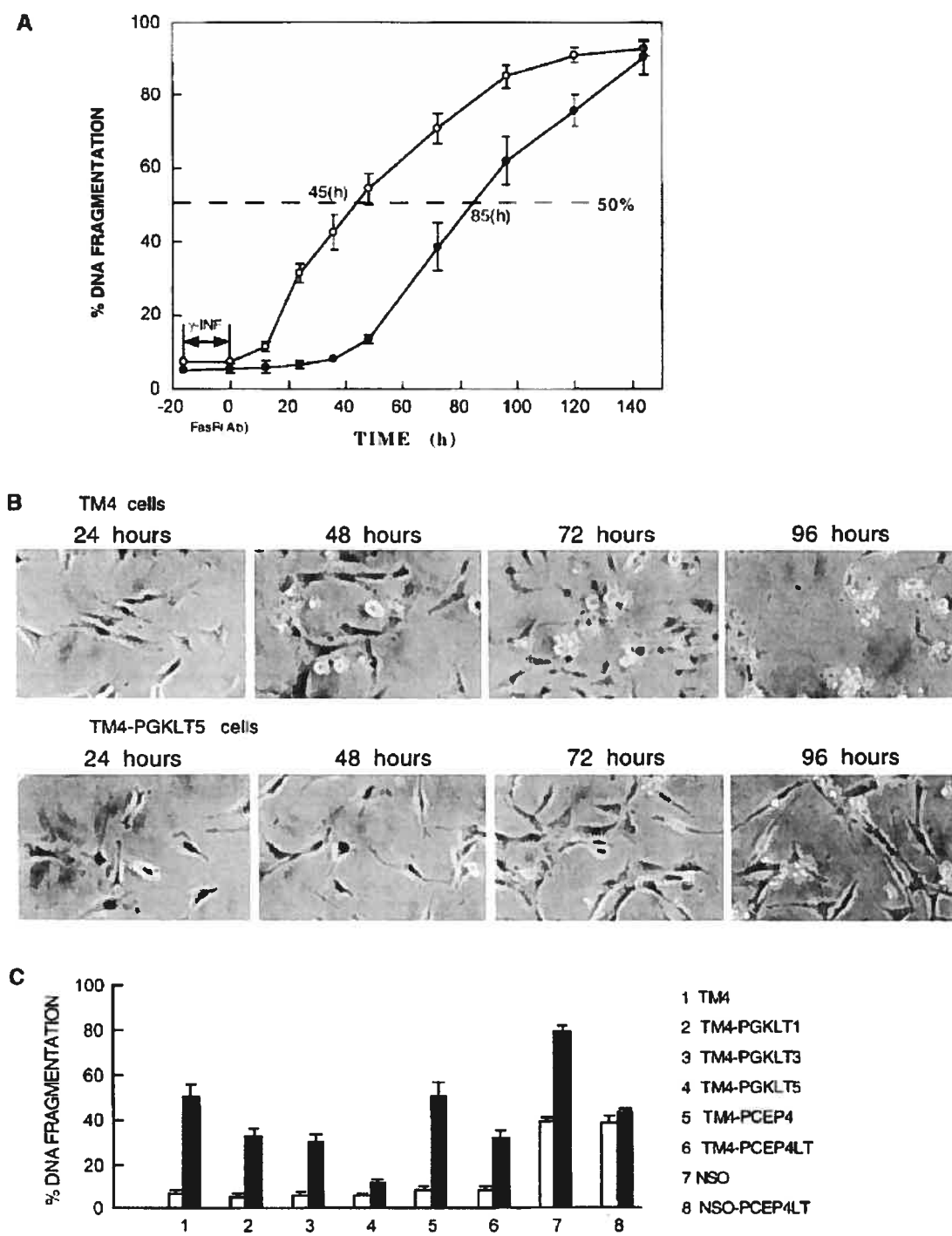
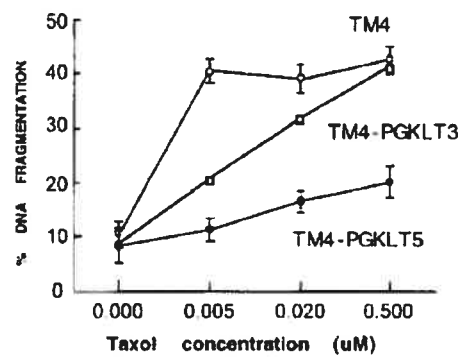
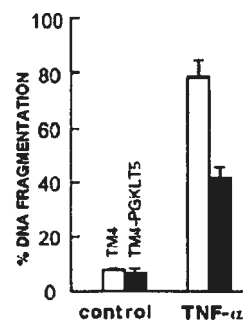


Figure 3

A Taxol

B TNF- α 

C Camptothecin

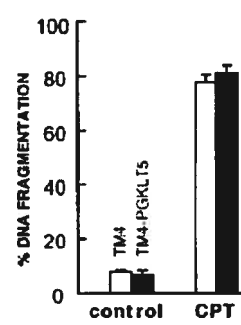
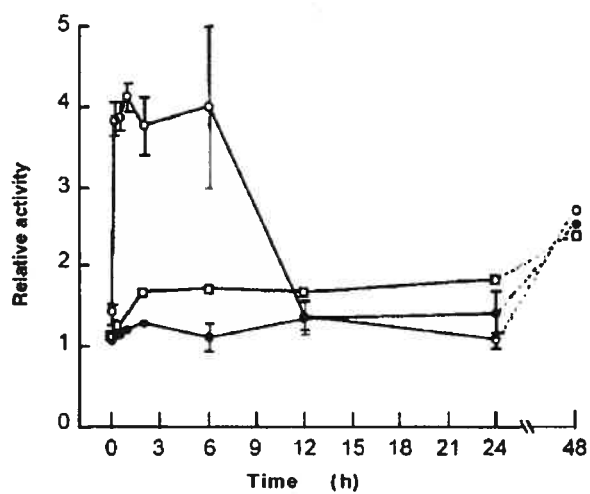
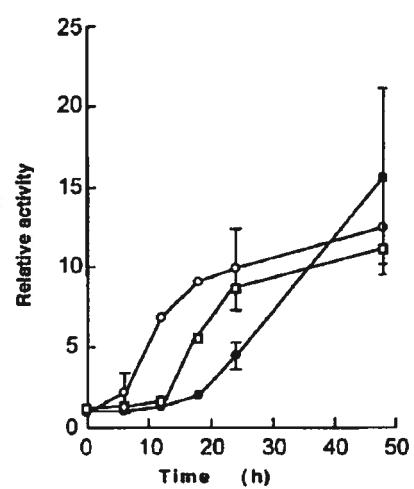


Figure 4

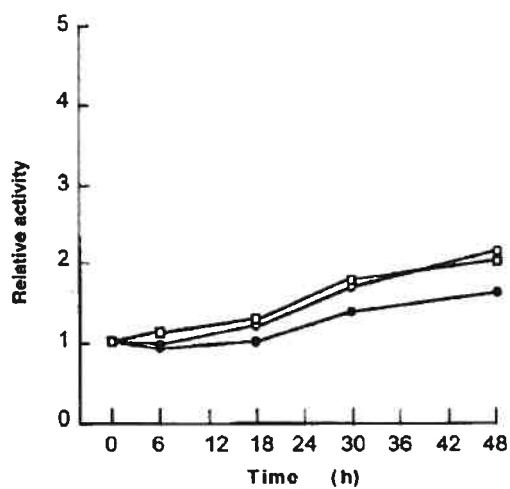
A Caspase-8 FAS



B Caspase-3 FAS



C Caspase-8 TAXOL



D Caspase-3 TAXOL

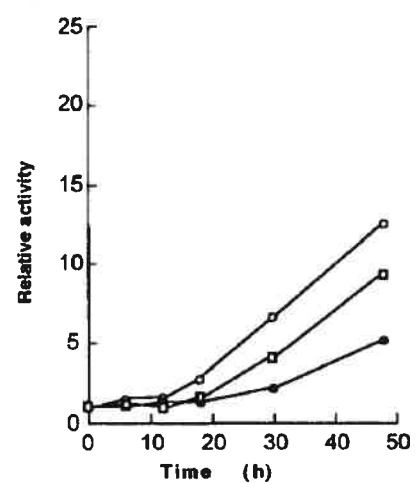


Figure 5

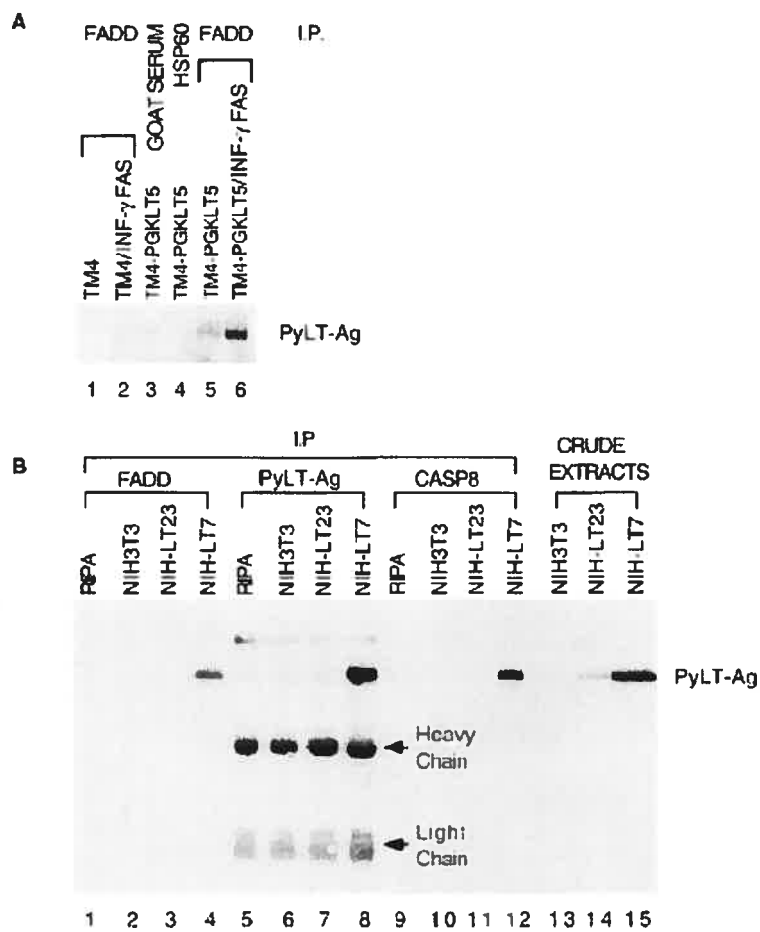
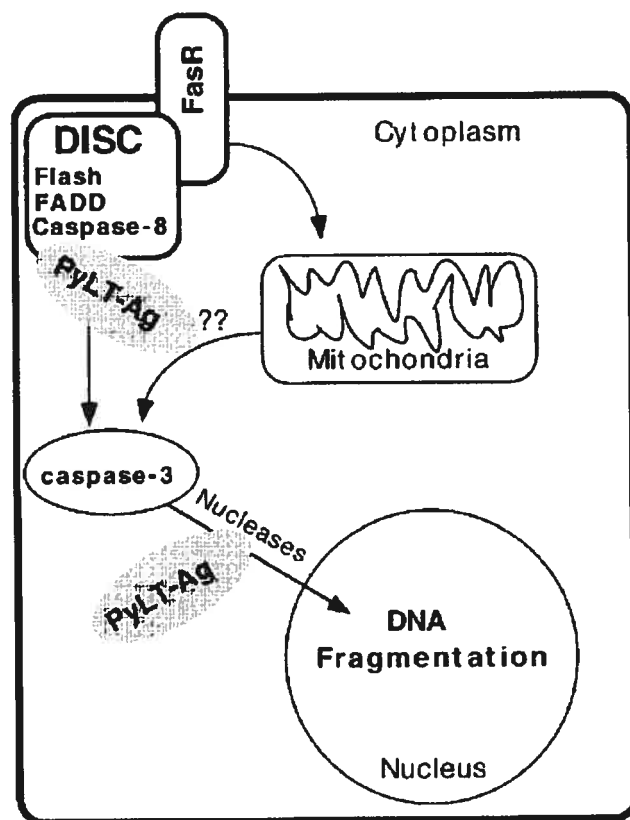


Figure 6





Chapitre III : Article 2



CHAPITRE III

Article 2. Large T-antigen gene expression analysis reveals cytoskeletal effects and identifies modulated targets in transgenic mice

Article soumis dans la revue Journal of Virology 2004.

Contributions des auteurs:

Rodier F. (85%), Lafontaine J., Veillette F. and Mes-Masson A.-M. 2004.

Rodier F. a réalisé ou supervisé toutes les expérimentations décrites ainsi que la version initiale du papier. Lafontaine J. est une étudiante du laboratoire de Mes-Masson A.-M. ayant fourni un support technique pour l'immunofluorescence et les immunoprécipitations de necdin. Veillette F. est un étudiant du laboratoire de Mes-Masson A.-M. ayant fourni un support technique pour les analyses par buvardage de Western des tissus de souris transgéniques. Mes-Masson A.-M. est l'investigateur principal.

Title Page**Large T-antigen gene expression analysis reveals cytoskeletal effects and identifies modulated targets in transgenic mice**

Francis Rodier¹, Julie Lafontaine¹, François Veillette¹ and Anne-Marie Mes-Masson^{1,2}

¹Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and Institut du cancer de Montréal, 1560, rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1,

²Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

Running title: Transcriptome modulation by large T-antigens

Corresponding author: Anne-Marie Mes-Masson
CR-CHUM/Institut du cancer de Montréal, Y-4606
1560, rue Sherbrooke Est
Montréal, Québec
Canada H2L 4M1
Tel: (514) 890-8000 ext. 25496
Fax: (514) 412-7703



Abstract

In vitro, cellular immortalization and transformation define a model for multistep carcinogenesis and current ongoing challenges include the identification of specific molecular events associated with steps along this oncogenic pathway. Based on the expression of Polyomavirus Large-T antigen (PyLT-Ag), we coupled cell culture and genomic approaches to target post-immortalization events associated with transformation. Within groups of genes that were consistently up or down regulated in the presence of PyLT-Ag, alterations in the expression of α -sm-actin and several actin-regulating genes correlated with loss of cellular actin cytoskeleton integrity and resulted in cytoskeleton reorganization. Additionally, expression profiles influenced by PyLT-Ag were compared to re-analyzed/published datasets for cell culture and mouse models expressing PyLT-Ag, SV40LT-Ag or E1A and revealed multiple overlapping candidates including Necdin, Hip1r, Hells, Peg3 and members of gene families such as Idb, myb and mcm. In particular, we noted that Necdin is up regulated in transgenic mouse brain and prostate tissues expressing LT-Ags. Essentially, a cell culture model can be used to identify events associated with multistep cancer progression in various animal tissues and cross comparisons between these models allowed us to make several interesting observations related to the hierarchy of events in multistep carcinogenesis.

Keywords: Actin cytoskeleton/Large T-antigens/transcriptome/transformation/transgenic mice

Introduction

Carcinogenesis is a multistep process defined by the loss of cell cycle checkpoints, uncontrolled cell growth and neoplastic progression leading to invasive tumors and metastasis. Cancer cell progression models dictate that normal cells undergo a variety of genetic/epigenetic alterations that can be summarized *in vitro* by two major phenotypic changes. Normal cells need to overcome their limited division potential resulting in immortalization. Interlaced with this process, additional events contribute to transformation and move cells toward the complete neoplastic phenotype [1]. In humans, examples such as lung and colon cancer show clear multistep sequences where distinct events can be discriminated along the cancer pathological progression. Genetically altered mice, along with human and mouse cell culture models, have been extensively used to support the multistep progression model [2,3]. One current challenge in cancer research is the identification of specific molecular events associated with different time points of the multistep progression pathways [4].

Recently, cultured primary human fibroblasts were used to identify at least four events essential to drive normal diploid human cell immortalization and transformation [5]. Over-expression of the catalytic subunit of telomerase restored telomere stability and favored unlimited division potential while Ras conferred an advanced transformed phenotype in the context of p53 and pRb's inactivation by simian virus 40 (SV40) Large T-antigen (LT-Ag). Several examples have now been described where normal human epithelial or fibroblast cell transformation can be obtained with the sequential expression of a series of oncogenes, often including SV40LT-Ag or E1A [6,7]. Several E1A domains conserved in SV40LT-Ag, including CR1/CR2 domains and the p300/400-binding pocket are absolutely required for this transformation process [8]. However, the characterization of

all viral oncogene domains involved in this transformation remains incomplete suggesting that additional activities contribute to the transformation process.

Polyomavirus (Py), an oncogenic member of the papovaviruses, causes tumors in rodents and transform primary cells in culture [9]. Among the four described early viral gene products (tiny, small, middle and large T antigen), PyLT-Ag is responsible for inappropriate cell cycle promotion and immortalization of mouse primary cells in culture [10]. This ability is mediated principally through binding and inactivation of the Rb family gene products (pRb's) by conserved CR1 and CR2 amino-terminal domains. Mutants that fail to bind Rb are inactive in immortalization assays [11,12]. The LT-Ag of SV40, a closely related papovavirus, shares extensive homology with PyLT-Ag although critical differences exist. As an example, while both proteins can bind p300 and inactivate the pRb's family of tumor suppressors, only SV40LT-Ag can bind and inactivate P53 [13]. Functionally, SV40LT-Ag is a dual oncogene able to immortalize and transform primary rodent cells as a single event while PyLT-Ag is limited to immortalization *in vitro* [14]. Thus their differences render these T-Ags of use in order to study different aspects of oncogenesis.

PyLT-Ag can drive tumor formation when expressed under various promoters in transgenic mouse models although the frequency and latency suggests a requirement for secondary events [4,15,16]. In addition to its immortalizing activity, PyLT-Ag has been shown to confer apoptotic resistance to low serum and protects cells against Fas and TNF- α induced apoptosis [17]. The ability to evade apoptotic signals can potentially promote growth and allow cells to evade cellular mediated immunity, important events of multistep carcinogenesis [2]. It is also noteworthy that all E1A domains known to be essential to human cell transformation are not only conserved in SV40LT-Ag but can also be found in PyLT-Ag [8]. Based on these observations, we hypothesized that, in addition to its immortalizing activity, PyLT-Ag also modulates functions important in early mouse cell transformation. Here we present new approaches where events associated with PyLT-Ag can be revealed by expressing PyLT-Ag in NIH3T3 mouse fibroblast [18]. As events

associated with the immortalization process have already occurred in the recipient cells lines in the absence of PyLT-Ag, this analysis allows us to focus on additional activities associated with this oncogene. Further comparisons to related models also permit the dissection of multi-step carcinogenesis and point to genes correlated with early transformation.

Materials and methods

Cell culture

TM4 and NIH3T3 cell lines were purchased from ATCC. All cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 50- μ g/ml gentamycin, 2.5 μ g/ml fungizone and 100 U/ml streptomycin/penicillin. Cells were grown at 37°C with 5% CO₂ and kept at low-density conditions to prevent culture induced transformation [18,19]. All cell culture products were from Gibco-BRL Life Technology.

Vectors and transfections

The PGKLTneo plasmid was constructed by introducing the Neomycin resistance from the pSV2neo vector into PGKLT [17] and was used to transfect NIH3T3 cells. The TM4-PGKLT5 clone was described previously [17]. The PGKLTGFPneo vector was generated by cloning eGFP from Clontech eGFP-N1 vector in frame with PyLT-Ag into PGKLTneo. A small C-terminal deletion of PyLT-Ag was introduced encompassing amino acids 685-785. All restriction and modification enzymes were purchased from Pharmacia Canada. All stable clones were selected with 0.5 mg/ml G418 applied 48 h post-transfection.

Protein/RNA extractions

RNA was extracted directly from 80% confluent 100mm petri dishes or from complete mouse organs preserved in RNAlater (AMBION) and crushed to a powder in liquid nitrogen. Total RNA was extracted with TRIzol™ reagent (Gibco/BRL, Life

Technologies Inc.). RNA used in microarray experiments were further purified with QUIAGEN Rneasy columns. Proteins were extracted from 80% confluent 100 mm plates or from flash frozen organs crushed to powder in liquid nitrogen. Total proteins were extracted directly in gel loading buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 10% glycerol).

Microarray analysis

Biotinylated hybridization target was prepared from total RNA as described (Tamayo et al, 99). Affymetrix arrays Mu74a were used in experiment 1 to hybridize cRNA from NIH3T3 and clones NIHLT11, NIHLT47, NIHLT40, NIHLT50 while arrays Mu74a2 were used in experiment 2 to hybridize NIHcM, TM4 and clones NIHLTGFPa, NIHLT7, NIHLT12, NIHLT33, NIHLT46, NIHLT32 and TM4-PGKLT. Gene expression levels were calculated for each EST from the scanned image by the Affymetrix GeneChip software algorithm. After normalization to the total average intensity, all probe sets whose expression levels were below 50 were raised to 50. The ~25% of probes on the Mu74a arrays corresponding to Affymetrix synthesis errors were removed from both experiments for subsequent analysis. Datasets were individually compared to NIH3T3 to generate fold change and further ordered using Microsoft Excel spreadsheets or GENESPRING™. A similar analysis was conducted for experiment 2 clones that were compared to NIHcM. (for microarray data, see supplementary material). MEFs-SV40LT-Ag data was acquired online [20]. Using individual microarrays average expression levels all 8 selected samples were normalized to a similar average before re-analysis. Experiments between different microarrays, cell types or tissue backgrounds, were compared on the basis of Unigene cluster references. For every candidate in a gene list, GenBank accession numbers representing an individual probe set on the arrays were converted to Unigene cluster number to generate a new list. Lists from different groups were then compared against each other regardless of directionality of fold changes.

Candidate validation

Northern blot analysis has been described [17]. Probes were generated from RIKEN full-length cDNA. A subset of Northern blots were hybridized and revealed using Dig-labeled 1kb RNA probes according to the manufacturer's instruction (ROCHE Diagnostics). Proteins were analyzed by Western blot as described [17]. For immunofluorescence cells were grown on coverslips and fixed for 2 minutes in 1:1 methanol/acetone. Slides were rinsed with PBS and blocked for 30 minutes with 3%BSA in PBS. Cells were then incubated with primary and secondary antibodies for 30 minutes each and washed 3 times in PBS. The polyclonal antibody specific to PyT-Ag's (Mm1a) was produced by injection of PyB4a to form ascites in BN rat's cells [21]. Commercially available antibodies were bought from; NeoMarkers for Pan-actin (ATCN05) and Caspase 3 (CPP32), Abcam for β -actin (ab6276-100) and Gapd (ab9485-100), Sigma for α -sm-actin (AQ547), Santa Cruz for Hsp90 (H-114), Pdgfr- α (C-20), Id1 (C-20), SlpI (V-17), Hsp60 (N-20), Ikb- α (C-21) and Bad- α (C-7) and Transduction laboratories for Hip1R (H35920).

Results

Gene statement mapping of PyLT-Ag expressing mouse fibroblast

NIH3T3 mouse fibroblasts were transfected with a PyLT-Ag non-episomal expression plasmid and selected clones were assessed for stable PyLT-Ag expression at mRNA and protein levels (Figure 1, 5A). Selected clones were used for microarray analysis including the parental NIH3T3, an untransfected sub-clone (NIHm), transfected clones that do not express detectable amounts of PyLT-Ag (NIHLT-12, NIHLT-7), and clones expressing variable amounts of PyLT-Ag (NIHLT-11, NIHLT-47, NIHLT-40, NIHLT-50, NIHLT46, NIHLT32, NIHLT33), as well as a clone expressing a fusion PyLT-Ag with carboxy-terminal sequences for eGFP (NIHGFPLTA). Additional analyses included TM4 sertoli cells and TM4PGKLT-5, a previously described PyLT-Ag expressing TM4 clone

[17]. We conducted two series of Affymetrix Mu19KA microarrays and the data generated was validated by Northern blot analysis with a selected number of genes. Expression levels on Northern blots were compared to corresponding microarray expression values represented by a bar graph. Gene expression variations observed on Northern blots with full length cDNA probes were highly similar to the data generated by Affymetrix oligonucleotide microarray for all probes and clones tested (Figure 1). Some full-length cDNA probes generated more than one band by Northern blots although at least one band closely followed the expected microarray pattern (see α -sm-actin and Necdin). Gapd, Dohx as well as Rsp2 showed little variation across all clones and were used as loading controls.

Datasets were used to select candidates based on up- or down-regulation across all clones expressing PyLT-Ag. When the cut-off for variation was set to greater than 1.3 fold, we generated 161 candidates while a more stringent cut-off of 1.5 fold variation generated a total of 59 candidates consistently modulated by the presence of PyLT-Ag (Figure 3). To refine candidate selection we imposed a further selection criteria on the 161 genes selected in the primary analysis based on the observation that genes displaying co-transcriptional regulation often interact by functional relationships [22]. Levels of PyLT-Ag were correlated to the amplitude of fold-change expression (either up- or down-regulation) to identify 54 candidate genes whose expression varied proportionally to PyLT-Ag (group A genes in Figure 3). As an example, note the correlation between variation in Necdin gene expression and PyLT-Ag. Combined with the overlapping 1.5 fold change gene list for PyLT-Ag these genes represent the 83 strong candidate displayed in Figure 3.

Validation of selected candidate genes on an extended NIH3T3 clone set

In order to further validate microarray data we analyzed Necdin and Transgelin for their expression on an extended set of six NIH3T3 sub-clones and nine PyLT-Ag expressing NIH3T3 stable clones (Figure 2A). This set of clones was independent from those used in the described microarray analysis. By Northern blot analysis we obtained either a perfect (Necdin) or highly similar (Transgelin) correlation to predicted patterns

observed by microarray. Similarly, our microarray results showed that a PyLT-Ag eGFP fusion protein (clone NIHgfpLTA), which includes a small C-terminal deletion of PyLT-Ag, modulated ~ 60% of wild-type (WT) PyLT-Ag targets including most group A genes (data not shown, see Figure 1 and 5A for mRNA and protein expression). Since this clone was not included for the selection of candidate genes it also represents an independent confirmation of the microarray candidate selection analysis.

Comparison of PyLT-Ag and SV40LT-Ag modulated expression profile

As PyLT-Ag and SV40LT-Ag are highly homologous structurally and functionally, we compared the datasets generated with PyLT-Ag in NIH3T3 mouse fibroblasts to publicly available datasets that we re-analyzed in the context of SV40LT-Ag expression [23]. The datasets of interest for our purposes involved (p53^{-/-}) MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts) and SV40LT-Ag expressing MEFs, both of which harbored Cre-lox sites placed to inactivate Dnmt1. In contrast to the published analysis of these datasets, which focused on genes differentially regulated following the loss of Dnmt1, we compared four clones of MEFs (p53^{-/-}) with four clones of SV40 LT-Ag expressing MEFs to generate a list of genes that are modulated by the expression of SV40 LT-Ag. Datasets following Cre-lox inactivation of Dnmt1 were not considered. Candidate genes were selected based on up- or down-regulation by at least 1.5 fold in a minimum of three out of four clones within a group. This analysis yielded 192 candidate genes, 86 were down regulated while 106 were up regulated by the presence of SV40LT-Ag. Candidates generated by this analysis were compared with the PyLT-Ag primary analysis of 161 candidates. As shown in Figure 4, 18 genes were similarly modulated between both model systems.

Expression of PyLT-Ag leads to up regulated Necdin mRNA in transgenic mouse brain

To address if cell culture models can recapitulate events occurring in transgenic mice expressing PyLT-Ag, we screened tissues of these mice for the expression of the candidate Necdin. FVB K1-19 PyLT-Ag young adult male mouse were sacrificed between 6-9 months of age. As described previously, tumor free organs expressing PyLT-Ag were significantly larger than their WT counterparts, most notably stomach and heart [15]. RNA was analyzed by Northern blot and Necdin mRNA was not detected in any organs but brain where it was significantly up regulated in transgenic mice (Figure 2B). While one cytoplasmic β -actin isoform was down regulated in skeletal muscle, the gene was used as a loading control for intra-organ comparisons because its expression was stable in other organs tested. Equal loading was also judged by ethidium bromide staining of the gel prior to RNA transfer. All tested transgenic tissues used in this experiment expressed some level of Py-LT-Ag as judged by RNA expression [15].

Comparison between Mefs-SV40LT-Ag candidates and an SV40LT-Ag expressing mouse prostate tumor progression model

To address the value of cell culture identified candidates on a larger scale we compared MEFs SV40LT-Ag candidates we identified with candidates from a mouse prostate tumor progression model. In this model selected candidates were determined from a comparative analysis of WT age matched non-transgenic mice versus various stages of prostate cancer from prostate specific SV40LT-Ag transgenic mice [24]. We have compared the list of 122 genes modulated in mouse prostate cancer with our own list of 192 genes modulated by SV40LT-Ag in cultured MEFs. Not taking into account the directionality of gene regulation (up or down), 34 genes were identified as being modulated in both systems (Figure 4). Interestingly, six of these genes were modulated in the PyLT-

Ag cell culture context while *Necdin* was also modulated in PyLT-Ag transgenic mouse brain (Figure 4 and 2B).

Correlations between protein and mRNA modulations in cell culture and transgenic mice

To address the functional relevance of group A candidates we correlated alterations in mRNA expression levels for a subset of candidates with their corresponding cellular protein levels. Cell culture protein extracts were probed by Western blot and protein expression was compared to the relevant Affymetrix microarray data mRNA expression value (Figure 5A). In general, greater than two fold variations in mRNA levels as judged by microarray data were reflected in protein levels observed by Western blot analysis (see *Hip1r*, β -actin, *Pdgfr- α* , α -sm-actin, *Id-1*, and *Slpi*) while changes below two fold were not easily confirmed at the protein level (see *caspase-3*). For other candidates like *E2F5* no differences at the protein level were identified while the mRNA was consistently modulated (data not shown). *Hsp60*, *bax- α* and ponceaux staining were used as loading controls.

To further address potential functional activities of cell culture candidates in animal models, we conducted Western blot analysis of group A genes in LT-Ag expressing tissues from K1-19-PyLT-Ag mice. Because expression levels varied greatly between tissues, only intra-tissue comparisons were made. While some genes were not differentially modulated in mouse tissues (See *Gapd* and *Hsp60* in Figure 5B) we found that *Hip1r* was expressed and regulated differentially in many organs screened. As observed in cultured fibroblasts *Hip1r* was up regulated in heart, but strongly down regulated in kidney, lung and spleen of transgenic mice. *Pdgfr- α* was down regulated in kidney, correlating with its modulation in cell culture but an inverse up-regulation was observed in spleen. β -actin, although identified as up regulated in cell culture, displayed down-regulation in mouse kidney. α -sm-actin which is down regulated in cell culture is also down in kidney, lung and spleen but it is up regulated in colon. While all transgenic tissues used in this experiment expressed

some level of PyLT-Ag as judged by RNA expression [15], the viral protein was only strongly detected by Western blot in stomach and heart which were hyperplastic (Figure 5B).

The actin cytoskeleton is compromised in PyLT-Ag expressing fibroblasts

We noted that a number of the candidate genes identified in our screen were related to cytoskeletal structures. In particular, we have highlighted within group A five candidates strongly down regulated by PyLT-Ag in fibroblasts which are involved in the regulation of the actin cytoskeleton; a poorly characterized cysteine rich protein, Eplin, Transgelin, Destrin and α -sm-actin (Figure 3). Based on the microarray identified actin-related candidates, we tested whether PyLT-Ag expression alone was sufficient to disrupt actin ultra-structure. Actin cytoskeletons were revealed by immunohistochemistry in fixed NIH3T3, NIHLT and NIHLTGFP cells. Immortal non-transformed NIH3T3 cells possessed a well-organized actin cytoskeleton (Figure 6A-C). Interestingly, pan-actin as well as β -actin antibodies revealed disrupted cytoskeleton in the presence of PyLT-Ag or PyLT-AgGFP (Figure 6F, G, K, L). In these cells, organized cytoplasmic actin filaments disappeared and were replaced by punctate structures. As described previously for transformed cells, the immunofluorescence signal re-localized to perinuclear and cell membrane structures. As expected from the dramatic down-regulation in microarray data, most individual cells in a population expressing PyLT-Ag had little or no detectable α -sm-actin protein expression (Figure 6D, I and N). The few residual cells expressing α -sm-actin were large flat cells (Figure 6I). Interestingly some cells that retained α -sm-actin expression also had organized α -sm-actin stress fibers (Figure 6H and M). While it is unclear if PyLT-Ag was expressed in all NIHLT46 expressing cells, the PyLT-AgGFP fusion protein allowed us to confirm that this fusion protein is expressed in all NIHgfpLTA cells whereas α -sm-actin expression levels were variable from cell to cell and displaying an overall decrease in expression corroborating microarray data (Figure 1, 6D and N). HSP90

was used as a ubiquitous control (6E, J and O). Overall, α -sm-actin expression was lost and the actin cytoskeletal structure was clearly perturbed by the presence of PyLT-Ag.

Discussion

Candidate genes regulated by PyLT-Ag were identified in a mouse fibroblast cell culture model. As NIH3T3 mouse fibroblasts spontaneously immortalized prior to stable PyLT-Ag expression our analysis focused on post-immortalization associated events. Considering that PyLT-Ag has related anti-apoptotic activities [17], that it disrupts cytoskeletal architecture, that it maintains strong homologies in essential domains to the transforming oncogenes SV40LT-Ag and E1A [8], and that its expression in transgenic mice leads to tumor developments [15,16], it appears likely that PyLT-Ag affects post-immortalization events and may provide clues to the early steps of transformation (Figure 7 steps 2-3). Since our model targeted post-immortalization events it is interesting to note that several candidate genes identified here are associated with genes previously reported in cells fully transformed by polyomaviruses including Transgelin, DNA/RNA binding proteins, glycoproteins, and nucleotide metabolism regulators (Figure 3 and 4). This overview of candidate genes identifies interesting pathways and corroborates the existing literature validating the results obtained in this PyLT-Ag study.

Identification of functional activities associated with PyLT-Ag

One way to identify closely interacting proteins (physical or functional associations) is to monitor their mRNA expression levels since they are often co-regulated [22]. Group A genes (Figure 3) therefore represents the best candidates for functional associations since this group most closely correlates with PyLT-Ag expression at the transcriptional level. One promising candidate is Necdin, whose gene product has Rb-like growth modulatory activities and has been shown to interact with p53 and mdm2 and viral oncogenes such as

SV40LT-Ag and E1A [25]. It has been hypothesized that Necdin leads to cell growth arrest when over-expressed in neurons and fibroblasts and that viral oncogenes counteract this activity [26]. In particular, growth inhibitory effects of Necdin were described in a model system using NIH3T3 cells [27]. We demonstrate that PyLT-Ag expression in NIH3T3 cells results in increased Necdin transcripts from a previously undetectable level (Figure 1, 2A and 3) without altering growth characteristics. While over-expression of GFP- or Flag-tagged Necdin into NIH3T3 cells resulted in massive cell death similar transfections in NIH3T3 clones expressing PyLT-Ag showed limited death suggesting that PyLT-Ag has a protective effect against Necdin over-expression. NecdinGFP was localized in punctate nuclear structures while PyLT-AgGFP was diffusely dispersed throughout the nuclei and was excluded from similar structures (Figure 6P and Q). Necdin is up regulated in transgenic mouse brain expressing PyLT-Ag and in prostate and prostate tumors expressing SV40LT-Ag (Figure 2B, 4) suggesting that this is a more general phenomenon worthy of further investigation.

One of several features in cells transformed by complete polyomaviruses is the reorganization and disruption of the cellular actin cytoskeleton which changes from a highly organized and microtubule based sub-cellular structure to a more disorganized and cell membrane/perinuclear morphology [28-30]. This event characterizes transformed cells but no molecular basis for this phenotype has been identified. In this study we have highlighted a subgroup of actin regulatory genes, including Destrin, Transgelin and Eplin, which are clearly down regulated by the presence of PyLT-Ag in NIH3T3 fibroblast. Interestingly, we demonstrate that several actin cytoskeleton compartments are destabilized (pan-actin and β -actin) or completely disappear (α -sm-actin) in the presence of PyLT-Ag. These results are significant since cytoskeletal disruptions and down-regulation of Transgelin were not known to be associated with the exclusive expression of PyLT-Ag. Moreover, it was unclear at which time in the carcinogenesis process this particular virus driven event occurs since earlier comparisons were conducted between primary cells and virally transformed cells [29]. Modulations of α -sm-actin proteins by PyLT-Ag in

transgenic mice harboring no tumors point towards a similar regulation in a tissue context (Figure 5B). A subset of genes responsible for actin cytoskeleton integrity including various α -actin isoforms and Transgelin are also down regulated in SV40LT-Ag and E1A expressing MEFs (Figure 6) suggesting a conserved mechanism in viral transformation. Within this actin regulating gene group both α -SM-actin and Transgelin have highly similar regulation patterns and are down regulated in fibroblast by all oncogenes analyzed in this study. Both genes have been shown to be potential senescence/myofibroblast markers associated with a non-replicative terminal differentiation cellular state [31,32]. Finite replicative lifespan of cells, termed senescence, has been proposed as a protective mechanism against loss of cell division checkpoints that could contribute to cancer [33]. Therefore, down-regulation of this gene group by viral oncogenes may contribute to the maintenance of a proliferative state necessary for viral replication and/or cancer. The ability to disrupt cytoskeleton is not unique to LT-Ag since SV40 small T antigen (SV40ST-Ag) is sufficient to disorganize actin cytoskeleton in cultured kidney epithelial cells [34]. In addition, Py middle T antigen (PyMT-Ag) can affect the cytoskeleton of cultured fibroblasts [35], although this activity has been assumed to be associated with disruption in src signaling [36]. However, since common N-terminal sequences of T-Ags maintains a DNAJ domain it is possible that this domain mediates cytoskeleton disruption in all T-Ags. We observed that the small C-terminal deletion in the PyLT-Ag/eGFP fusion protein did not abrogate PyLT-Ag's ability to disrupt cellular cytoskeleton consistent with an N-terminal localization for this functional activity. Understanding of the molecular mechanisms behind this activity may identify important events associated with early transformation during carcinogenesis.

Intersect comparisons between multiple model systems point to common candidates

To strengthen the importance of candidates identified in a PyLT-Ag context, we extended the analysis to the highly homologous SV40LT-Ag and to the Adenoviral E1A

oncogene that shares functional domains with PyLT-Ag. We retrieved candidate gene lists from analyses using PyLT-Ag, SV40LT-Ag or E1A and generated from different model systems or analyses platforms. For comparison purposes, candidate genes GenBank accession numbers were converted to corresponding Unigene cluster numbers. Candidate consistently modulated in two or more model systems were identified and recorded in Figure 4. Although several models using SV40LT-Ag as a tool have been described, few of them were designed to identify specific gene modulation events associated with the presence of SV40LT-Ag. We therefore re-analyzed experimental data to identify events associated with the presence of SV40LT-Ag in MEFs deficient for p53 (see Figure 4 and [20]). Under these conditions SV40LT-Ag functions are not influenced by its ability to bind and inactivate p53, making this analysis perhaps more comparable to analyses with PyLT-Ag, since the latter does not bind p53. Cross-comparisons to a model using E1A-Ras transformed MEFs also identified similarly modulated genes including Dnmt1, Idb1, Rgs16, Igf2, Talgn, Peg3, Hells, Mcmd and Acta2 (Figure 4).

Comparisons of mRNA and proteins between wt FVB and transgenic FVB K1-19 PyLT-Ag organs confirmed differential expression of several candidates. Included in this group were Pdgfr- α , α -sm-actin, Hip1r, β -actin and Necdin. Interestingly, modulations appeared to be organ specific and the direction of gene expression regulation (i.e. up- or down-) could be reversed in different organs and thus subsequent analysis did not take into account the directionality of expression regulation. To address if candidates identified in MEFs expressing SV40LT-Ag were also modulated *in vivo*, we compared these candidates to those identified in transgenic mice expressing SV40LT-Ag in prostate tissues. As tumor progression in this transgenic model system is associated with a gradual increase of SV40LT-Ag expression in prostate tissues, it is probable that some of the identified candidates correspond to genes modulated by SV40LT-Ag expression alone. Interestingly 34 out of 122 prostate-SV40LT-Ag candidates were modulated in SV40LT-Ag expressing MEFs (Figure 4). Within this group several DNA maintenance and nucleotide metabolism regulating genes were identified consistent with previously described SV40LT-Ag

activities. Moreover, DNA primase- α subunit which was previously shown to interact with SV40LT-Ag [37] was co-regulated along with SV40LT-Ag in both systems. This observation also strengthens the notion that physically interacting proteins are often co-regulated transcriptionally and suggest the evaluation of group A candidates in this light.

Differential expression in the context of multistep carcinogenesis

Immortalization and transformation are an interlaced sequence of events allowing a normal primary cell in culture to acquire an oncogenic phenotype. Here we consider that PyLT-Ag contributed to post immortalizing events and have identified modulated and functional candidate genes associated with early transformation (Figure 7 step 2 and 3). In contrast, candidate genes identified in the MEFs-SV40LT-Ag and MEFs-E1ARas analyses relates to both immortalization and transformation since they were derived from comparisons between primary cultures and transformed cells (Figure 7 step 1 to 4). Identification of intersecting and non-intersecting gene groups from this study allows us to define specific events associated with multistep carcinogenesis in varied models. Genes and genes families described earlier and modulated by PyLT-Ag may point to consistently conserved early transformation events in one or all of the other model systems (Figure 4 and 7 step 3). Nine genes are of particular interest as they lie at the intersection between PyLT-Ag, SV40LT-Ag and E1ARas activities in mouse fibroblast; *Dnmt1*, *Idb1*, *Rgs16*, *Igf2*, *Mcmd*, *Hells*, *Peg3*, *Acta2* and *Tagln* (Figure 4). Group A cytoskeleton associated genes *Acta2* (α -SM-actin) and *Tagln* (Transgelin) suggest an association of cytoskeleton reorganization with early transformation for all three oncogenes. In support of this general notion, yeast two-hybrid experiments have shown that SV40LT-Ag interacts with several other components of the cytoskeleton including Gelsolin and Lamins and point to a more general reorganization of cytoskeletal architecture in cellular transformation[38]. When extending this analysis to transgenic mice we highlight a consistent *in vitro* and *in vivo* implication of five gene families; mini chromosome maintenance (MCM), inhibitor of

DNA binding/differentiation (IDB), myb (MYB), High mobility group (HMGA, HMGB) and varied α -actin isoforms/actin regulating genes. The analysis also revealed several individual genes modulated throughout model systems, more specifically Necdin is modulated in SV40LT-Ag and PyLT-Ag mice and in the PyLT-Ag NIH3T3 cell culture model while Hells, Mcmd and Peg3 are modulated in all model systems analyzed including mouse prostate tissues (see Figure 2B and 4). Hells is a member of the SNF2 family of chromatin remodeling ATPases (SWI/SNF2), it is expressed in proliferating tissues, including peripheral lymphocytes, and mutations are potentially linked to cancer. Peg3 is a paternally imprinted zinc finger protein that potentially intervenes in p53/Bax-regulated apoptosis and Peg3/Pw1 is also known as a regulator of TNF and NF- κ -B apoptotic responses [39,40]. Since PyLT-Ag, SV40LT-Ag and E1A have been linked to apoptotic regulation, it is possible that Peg3 expression plays a role in this regulation. While several MCM family members are modulated in different model systems, we did observe consistent implication of the Mcmd gene across all tested systems. MCM family members are crucial to the initiation of DNA replication and the completion of cell division. Similarly, LT-Ags are essential factors for viral DNA replication and bind the viral origin of replication to initiate DNA replication. Interestingly it has been recently proposed that MCM proteins are functionally similar to LT-Ag's with respect to eukaryotic DNA replication initiation in mammalian chromosomes [41]. Why and how LT-Ags induces the expression of cellular proteins with similar functional activities during replication remains to be determined. Recent evidence suggests that Rb itself may directly modulate the expression of several MCM family members [42-44]. It is therefore possible that PyLT-Ag, SV40LT-Ag and E1A all modulate MCMs through Rb inactivation. As PyLT-Ag, SV40LT-Ag and E1A have several common functional domains, it is not surprising that shared candidates can be identified within the different model systems. We propose that commonly modulated gene groups like MCM family members identified in this study are potentially regulated through conserved domains between PyLT-Ag, SV40LT-Ag and E1A

including the p300 binding pocket, the DNA-J motif, and the CR1/CR2 Rb binding domains. It is likely that most of these domains play a role in viral carcinogenesis.

Conclusion

Based on multiple model systems, we demonstrate consistent and permanent alterations in gene expression profiles associated with PyLT-Ag and other viral oncogenes. We used a cell culture model coupled to a genomic approach to identify differentially expressed genes and for selected candidates demonstrate their potential functional relevance *in vitro* and in the context of animal tissues. By comparing several cell culture and animal models it is possible to associate potential candidate genes with specific steps of the multistep carcinogenesis process. While the temporal order of events may not be crucial, especially since immortalization and transformation are *in vitro* concepts, the pathways or genes themselves may point to important parameters in oncogenesis and some of the candidate genes identified may be readily applicable and play a role in human cancer. As an example, some of the genes regulating cytoskeletal architecture identified here have already been shown to be associated with human cancers. Transgelin is down regulated in virally transformed human cells and in human breast, colon and lung cancers [45,46]. A proteome analysis of serum also revealed that Transgelin antigenicity was modulated in renal and kidney cancers [47]. Among the other candidates, Destrin is down regulated while Stahmin is up regulated in some human lung cancers [46] and loss of Eplin is associated with human cell transformation [48]. Strong evidence associates actin regulation and human cells transformation, although whether this plays a causal role, or is simply an associated event, remains to be determined. It is likely that other candidate genes identified in this study may be related to human cancer progression. Further challenges include investigating the functional significance of the identified candidates during multistep carcinogenesis.

Acknowledgements

We thank Louise Champoux and Manon Deladurantaye for technical assistance, Laurent Lessard for stimulating discussions, Luke Masson for critical reading of the manuscript, the Montreal Genome Center and the Thomas Hudson laboratory assistance in conducting microarray experiments, and RIKEN for making their cDNA clones available. This research was funded by a Canadian Institute of Health Research (CIHR) grant to A.-M.M.-M. J.L., F.V. and F.R. are recipient of an Institut du cancer de Montreal Canderele scholarship and F.R. is also recipient of a Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) excellence scholarship; A.-M.M.-M. is the recipient of a Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) Chercheur National fellowship.

References

1. Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. (2002) Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**, 331-41.
2. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
3. Ghebranious, N. and Donehower, L.A. (1998) Mouse models in tumor suppression. *Oncogene*, **17**, 3385-400.
4. Van Dyke, T. and Jacks, T. (2002) Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell*, **108**, 135-44.
5. Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W. and Weinberg, R.A. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, **400**, 464-8.
6. Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. (2002) Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*, **347**, 1593-603.
7. O'Hare, M.J., Bond, J., Clarke, C., Takeuchi, Y., Atherton, A.J., Berry, C., Moody, J., Silver, A.R., Davies, D.C., Alsop, A.E., Neville, A.M. and Jat, P.S. (2001)

- Conditional immortalization of freshly isolated human mammary fibroblasts and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 646-51.
8. Seger, Y.R., Garcia-Cao, M., Piccinin, S., Cunsolo, C.L., Doglioni, C., Blasco, M.A., Hannon, G.J. and Maestro, R. (2002) Transformation of normal human cells in the absence of telomerase activation. *Cancer Cell*, **2**, 401-13.
 9. Benjamin, T.L. (2001) Polyoma virus: old findings and new challenges. *Virology*, **289**, 167-73.
 10. Rassoulzadegan, M., Cowie, A., Carr, A., Glaichenhaus, N., Kamen, R. and Cuzin, F. (1982) The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature*, **300**, 713-8.
 11. Larose, A., Dyson, N., Sullivan, M., Harlow, E. and Bastin, M. (1991) Polyomavirus large T mutants affected in retinoblastoma protein binding are defective in immortalization. *J Virol*, **65**, 2308-13.
 12. Pilon, A.A., Desjardins, P., Hassell, J.A. and Mes-Masson, A.M. (1996) Functional implications of mutations within polyomavirus large T antigen Rb-binding domain: effects on pRb and p107 binding in vitro and immortalization activity in vivo. *J Virol*, **70**, 4457-65.
 13. Wang, E.H., Friedman, P.N. and Prives, C. (1989) The murine p53 protein blocks replication of SV40 DNA in vitro by inhibiting the initiation functions of SV40 large T antigen. *Cell*, **57**, 379-92.
 14. Dilworth, S.M. (1990) Cell alterations induced by the large T-antigens of SV40 and polyoma virus. *Semin Cancer Biol*, **1**, 407-14.
 15. Lebel, M., Webster, M., Muller, W.J., Royal, A., Gauthier, J. and Mes-Masson, A.M. (1995) Transgenic mice bearing the polyomavirus large T antigen directed by 2.1 kb of the keratin 19 promoter develop bronchiolar papillary tumors with progression to lung adenocarcinomas. *Cell Growth Differ*, **6**, 1591-600.
 16. Lebel, M. and Mes-Masson, A.M. (1994) Establishment and characterization of testicular cell lines from MT-PVLT-10 transgenic mice. *Exp Cell Res*, **213**, 12-9.

17. Rodier, F., Bertrand, R., Bossolasco, M. and Mes-Masson, A.M. (2000) Polyomavirus large T-antigen protects mouse cells from Fas-, TNF-alpha- and taxol-induced apoptosis. *Oncogene*, **19**, 6261-70.
18. Rubin, H. and Xu, K. (1989) Evidence for the progressive and adaptive nature of spontaneous transformation in the NIH 3T3 cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 1860-4.
19. Rubin, H. (2001) Selected cell and selective microenvironment in neoplastic development. *Cancer Res*, **61**, 799-807.
20. Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E. and Jaenisch, R. (2001) Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet*, **27**, 31-9.
21. Silver, J., Schaffhausen, B. and Benjamin, T. (1978) Tumor antigens induced by nontransforming mutants of polyoma virus. *Cell*, **15**, 485-96.
22. Ge, H., Liu, Z., Church, G.M. and Vidal, M. (2001) Correlation between transcriptome and interactome mapping data from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Genet*, **29**, 482-6.
23. Vasseur, S., Malicet, C., Calvo, E.L., Labrie, C., Berthezene, P., Dagorn, J.C. and Iovanna, J.L. (2003) Gene expression profiling by DNA microarray analysis in mouse embryonic fibroblasts transformed by rasV12 mutated protein and the E1A oncogene. *Mol Cancer*, **2**, 19.
24. Hu, Y., Ippolito, J.E., Garabedian, E.M., Humphrey, P.A. and Gordon, J.I. (2002) Molecular characterization of a metastatic neuroendocrine cell cancer arising in the prostates of transgenic mice. *J Biol Chem*, **277**, 44462-74.
25. Taniura, H., Matsumoto, K. and Yoshikawa, K. (1999) Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor necdin with p53. *J Biol Chem*, **274**, 16242-8.

26. Taniura, H., Taniguchi, N., Hara, M. and Yoshikawa, K. (1998) Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1. *J Biol Chem*, **273**, 720-8.
27. Hayashi, Y., Matsuyama, K., Takagi, K., Sugiura, H. and Yoshikawa, K. (1995) Arrest of cell growth by necdin, a nuclear protein expressed in postmitotic neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, **213**, 317-24.
28. McNutt, N.S., Culp, L.A. and Black, P.H. (1973) Contact-inhibited revertant cell lines isolated from SV 40-transformed cells. IV. Microfilament distribution and cell shape in untransformed, transformed, and revertant Balb-c 3T3 cells. *J Cell Biol*, **56**, 412-28.
29. Shapland, C., Lowings, P. and Lawson, D. (1988) Identification of new actin-associated polypeptides that are modified by viral transformation and changes in cell shape. *J Cell Biol*, **107**, 153-61.
30. Koffer, A., Daridan, M. and Clarke, G.D. (1985) Regulation of the microfilament system in normal and polyoma virus transformed cultured (BHK) cells. *Tissue Cell*, **17**, 147-59.
31. Thweatt, R., Lumpkin, C.K., Jr. and Goldstein, S. (1992) A novel gene encoding a smooth muscle protein is overexpressed in senescent human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **187**, 1-7.
32. Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. and Brown, R.A. (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 349-63.
33. Campisi, J. (2003) Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer*, **3**, 339-49.
34. Nunbhakdi-Craig, V., Craig, L., Machleidt, T. and Sontag, E. (2003) Simian virus 40 small tumor antigen induces deregulation of the actin cytoskeleton and tight junctions in kidney epithelial cells. *J Virol*, **77**, 2807-18.
35. da Costa, S.R., Wang, Y., Vilalta, P.M., Schonthal, A.H. and Hamm-Alvarez, S.F. (2000) Changes in cytoskeletal organization in polyoma middle T antigen-

- transformed fibroblasts: involvement of protein phosphatase 2A and src tyrosine kinases. *Cell Motil Cytoskeleton*, **47**, 253-68.
36. Dilworth, S.M. (2002) Polyoma virus middle T antigen and its role in identifying cancer-related molecules. *Nat Rev Cancer*, **2**, 951-6.
 37. Dornreiter, I., Erdile, L.F., Gilbert, I.U., von Winkler, D., Kelly, T.J. and Fanning, E. (1992) Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *Embo J*, **11**, 769-76.
 38. Klawitz, I., Preuss, U. and Scheidtmann, K.H. (2001) Interaction of SV40 large T antigen with components of the nucleo/cytoskeleton. *Int J Oncol*, **19**, 1325-32.
 39. Relaix, F., Wei, X.J., Wu, X. and Sassoon, D.A. (1998) Peg3/Pw1 is an imprinted gene involved in the TNF-NFkappaB signal transduction pathway. *Nat Genet*, **18**, 287-91.
 40. Johnson, M.D., Wu, X., Aithmitti, N. and Morrison, R.S. (2002) Peg3/Pw1 is a mediator between p53 and Bax in DNA damage-induced neuronal death. *J Biol Chem*, **277**, 23000-7.
 41. Li, D., Zhao, R., Lilyestrom, W., Gai, D., Zhang, R., DeCaprio, J.A., Fanning, E., Jochimiak, A., Szakonyi, G. and Chen, X.S. (2003) Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature*, **423**, 512-8.
 42. Black, E.P., Huang, E., Dressman, H., Rempel, R., Laakso, N., Asa, S.L., Ishida, S., West, M. and Nevins, J.R. (2003) Distinct gene expression phenotypes of cells lacking Rb and Rb family members. *Cancer Res*, **63**, 3716-23.
 43. Vernell, R., Helin, K. and Muller, H. (2003) Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway. *J Biol Chem*.
 44. Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M. and Nevins, J.R. (2001) Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol*, **21**, 4684-99.

45. Shields, J.M., Rogers-Graham, K. and Der, C.J. (2002) Loss of transgelin in breast and colon tumors and in RIE-1 cells by Ras deregulation of gene expression through Raf-independent pathways. *J Biol Chem*, **277**, 9790-9.
46. Chang, J.W., Jeon, H.B., Lee, J.H., Yoo, J.S., Chun, J.S., Kim, J.H. and Yoo, Y.J. (2001) Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**, 507-12.
47. Klade, C.S., Voss, T., Krystek, E., Ahorn, H., Zatloukal, K., Pummer, K. and Adolf, G.R. (2001) Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics*, **1**, 890-8.
48. Maul, R.S., Song, Y., Amann, K.J., Gerbin, S.C., Pollard, T.D. and Chang, D.D. (2003) EPLIN regulates actin dynamics by cross-linking and stabilizing filaments. *J Cell Biol*, **160**, 399-407.

Figures legends

Fig. 1. Analysis of mRNA expression levels and validation of Affymetrix microarray data for selected genes in NIH3T3 and TM4 clones. Northern blotting (using full-length cDNA probes) was used to qualitatively validate selected Affymetrix microarray quantitative patterns. Northern blots are compared to a bar graph scale representing normalized data expression levels for the corresponding gene probe on the Affymetrix microarray. Stars represent the transcript corroborating microarray data when more than one band was detected by autoradiography for a single probe. Note no detectable PyLT-Ag in clone NIHLT33, although transcripts can be seen on longer exposures (data not shown). There is no microarray data for the PyLT-Ag transcript. PyLT-Ag expression was verified on the total RNA used for microarray analysis. Northern blots shown are representative of 2 or 3 experiments.

Fig. 2. Validation of microarray identified candidate genes by Northern blot analysis on an independent extended clone set and in PyLT-Ag transgenic animal. (A) Northern blot

analysis of selected candidates identified in the microarray screen on an extended cell culture clone set. Lane 1 to 6 represent individual NIH3T3 sub-clones. Lane 7 to 15 represents individual NIH3T3 clones transfected and selected to express PyLT-Ag. Clones were independent from those used in the microarray analysis. Full-length cDNA probe were used and exposure times were adjusted. DOHX and GAPD were used as loading controls. **(B)** Northern blot analysis (using short DIG-labelled RNA probes) of selected candidates identified in the microarray screen on various tissues from 9 month old male WT FVB and transgenic FVB K1-19 PyLT-Ag mice. Row indicates K1-19LT transgenic status. Kidney, spleen and stomach were also tested and while Necdin was not expressed β -actin levels were stable (not shown). Northern blots shown are representative of 2 experiments.

Fig. 3. Candidate genes and group A genes modulated by PyLT-Ag in mouse NIH3T3 fibroblast. Partial listing of candidate genes including GenBank number, common name, Unigene identifier, fold change, short descriptor and inclusion within Group A. Inset shows Genespring software representation of expression of Group A candidates with emphasis on Necdin expression. PyLT-Ag mRNA expression levels by Northern blot analysis are presented to permit correlations (see **Figure 1**). Only group A genes modulated at least 1.3x fold change are included.

Fig. 4. Venn diagram representing candidate intersect comparisons between different model systems. Model systems include those described here as well as data re-analyzed from other sources (* [24], ** [20], *** [23]). Numbers represent total intersecting genes identified in the comparisons while the colors provide references to the corresponding detailed gene list. Listing of candidate genes include GenBank number, common name, Unigene identifier, short descriptor and the model systems under comparison. Additional color (pink associated with the Unigene identifier) indicates intersect candidates that were also

modulated in the MEFs-E1ARas context. The dark green association with the common name is to highlight Peg3 that is modulated in several systems.

Fig. 5. Western blot analysis of protein expression for selected genes in cell culture and in tissues from PyLT-Ag transgenic animal. **(A)** Protein expression levels in cell culture corroborate microarray data. Western blots are compared to a bar graph scale representing normalized data expression levels for the corresponding gene probe on the Affymetrix microarray. Exposure times for Western blots were variable. The PyLT-Ag row represents the expression levels of PyLT-Ag protein in all clones (note that like mRNA in Figure 1, PyLT-Ag protein in clone NIHLT33 is only detected on long exposures). There is no microarray data for the PyLT-Ag transcript. **(B)** Candidate genes identified in the cell culture microarray screen can also be modulated in PyLT-Ag transgenic mouse tissues at the protein level. Western blot analysis of various tissues from 9-month-old male WT FVB and transgenic FVB K1-19 PyLT-Ag mice. The row K1-19LT refers to transgenic status. Gapd and Ponceaux staining served as internal controls (Gapd expression levels were stable throughout but a small up-regulation observed in lungs). Arrows identify up (\uparrow) and down (\downarrow) regulated transcripts for a given organ. Exposure times were adjusted for signal strength. Western blots shown are representative of 2 or more experiments.

Fig. 6. Candidate genes modulated by PyLT-Ag at the transcriptional level can also have functional significance at the protein level. **(A-O)** Immunofluorescence staining reveals different sub-compartments of the actin cytoskeleton in control NIH3T3, a clone expressing full-length PyLT-Ag (NIHLT46) and a PyLT-AgGFP fusion protein expressing clone (NIHLTGFP). Fold magnification is indicated. Staining was performed with antibodies against pan-actin, β -actin, α -sm-actin or GFP. HSP90 was used as a ubiquitously expressed control. Cells in higher magnification fields were representative of cell population. Panels P-Q display GFP fluorescence from living cells in NIH3T3 controls transfected with the

empty vector (eGFPN1), GFP associated with a NecdinGFP fusion protein in cells expressing PyLT-Ag (NIHLT46) or show the constitutive GFP fluorescence associated with the GFPLT-Ag construct (NIHgfpLTA).

FIGURES

Figure 1

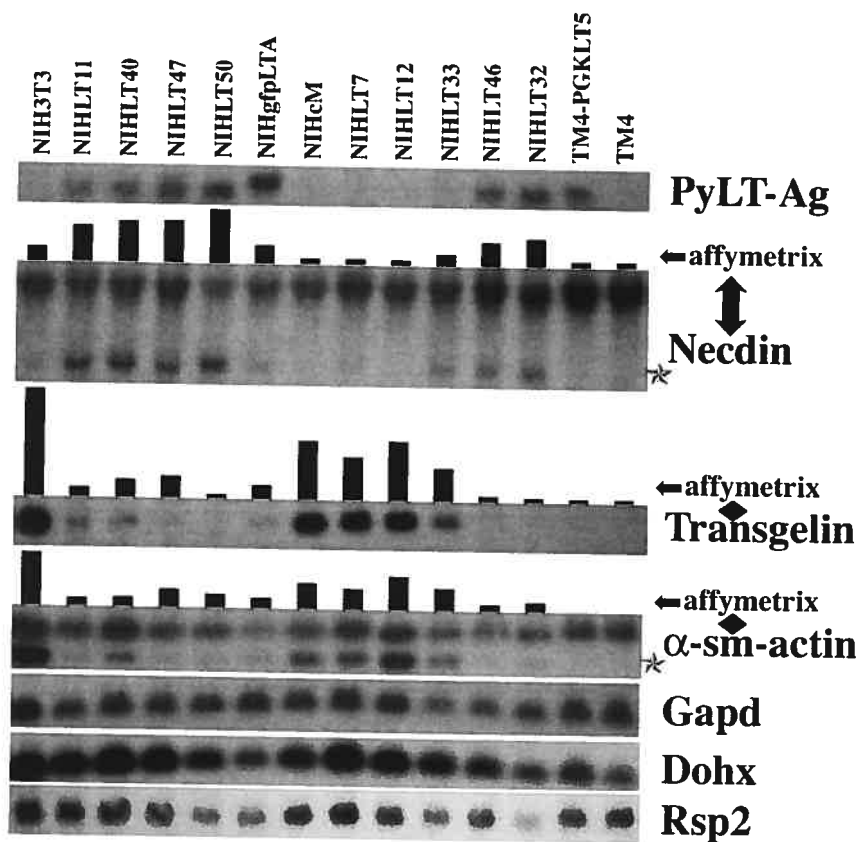


Figure 2

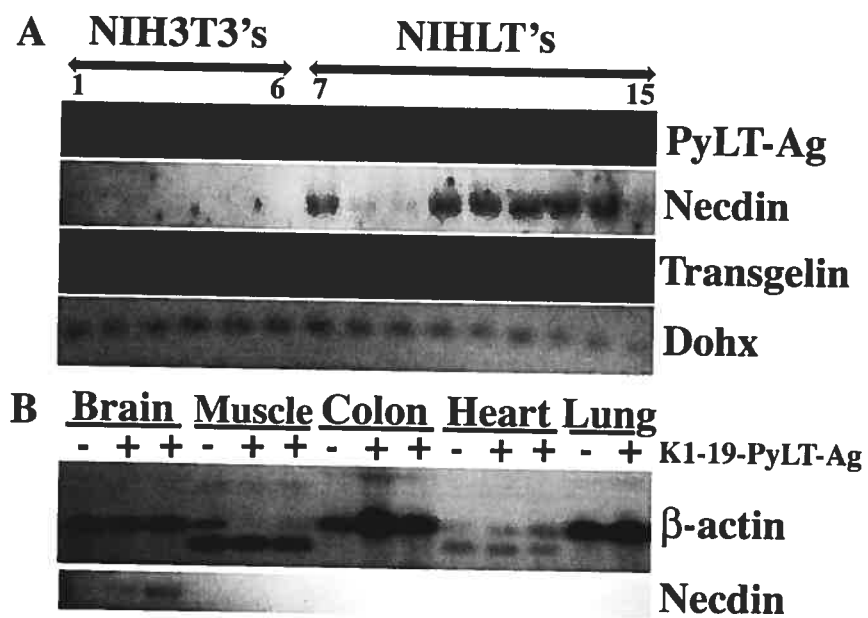


Figure 3

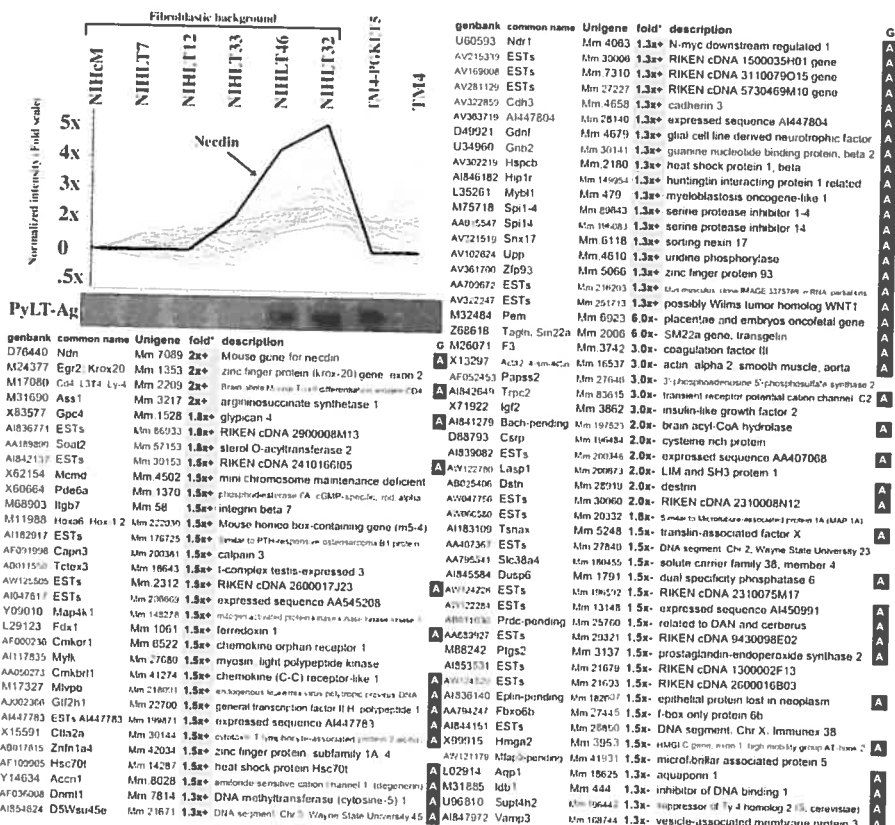
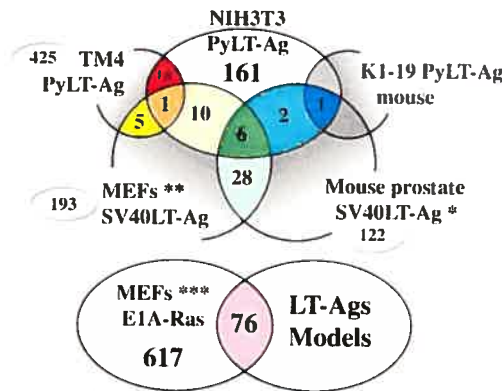


Figure 4



genbank	common name	Unigene	description	
M13170	Gpc4	Mm 1528	glypican 4	
M13171	ESTs	Mm 30153	RIKEN cDNA 2410166105 gene	
M13172	ESTs	Mm 21876	RIKEN cDNA 5730488L07 gene	
M13173	ESTs	Mm 24053	osprex1d sequence AA986766	
M13174	F3	Mm 3742	coagulation factor III	
M13175	Bach-pending	Mm 197523	brain acyl-CoA hydrolase	
M13176	Carp	Mm 196484	cytisine rich protein	
M13177	Tanax	Mm 5248	transin associated factor X	
M13178	DZWau23e	Mm 27840	Chr 2, Wayne State University 23	
M13179	Sic3a4	Mm 180455	solute carrier family 38 member 4	
M13180	Dusp6	Mm 1701	dual specificity phosphatase 6	
M13181	ESTs	Mm 196592	RIKEN cDNA 2310075M17 gene	
M13182	Rsu1	Mm 905	Ras suppressor protein 1	
M13183	Tie1	Mm 12823	transducin-like enhancer of split 1	
M13184	ESTs	Mm 14189	osprex2 sequence A1841487	
M13185	ESTs	Mm 1985	RIKEN cDNA 1500011L16 gene	
M13186	Mbc2	Mm 29010	membrane bound C2 domain containing protein GLUT4	
M13187	Ltp1	Mm 19307	latent transforming growth factor beta binding protein 1	
M13188	TM4PyLT	MEFsSV40LT	NIH3T3PyLT (1)	
M13189	Cd4	Lyt-4	Mm 2209	Mouse T-cell differentiation antigen CD4
M13190	TM4PyLT	MEFsSV40LT (5)		
M60523	Idb3	Mm 110	inhibitor of DNA binding 3	
M55316	Nfyb	Mm 200683	Nuclear transcription factor-Y beta	
X70472	Mybl2	Mm 4594	Myeloblastosis oncogene-like 2	
M83601	Ptx3	Mm 4663	Pentaxin related gene	
U32107	Col7a1	Mm 6290	Collagen, type VII, alpha 1	
M13191	NIH3T3PyLT	MEFsSV40LT (10)		
U60881	Ant5	Mm 2816	arginine ADP-ribosyltransferase 5	
AF036008	Dnmt1	Mm 7814	DNA (cytosine-5)-methyltransferase	
D26107	Pvs	Mm 4341	pokoovirus sensitivity	
M73748	Gp38	Mm 2976	glycoprotein 38	
M31885	Idb1	Mm 444	inhibitor of DNA binding 1	
U54828	Rgs16	Mm 181709	regulator of G-protein signaling 16	
AV349152	Rgs16	Mm 181709	regulator of G-protein signaling 16	
X71922	Igf2	Mm 3862	insulin-like growth factor 2	
Z68618	Tagln: Sm22a	Mm 2006	SH22 gene transgen	
X13297	Acta2	Mm 16537	actin, alpha 2, smooth muscle, parva ****	
M13192	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13193	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13194	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13195	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13196	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13197	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13198	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13199	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13200	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13201	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13202	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13203	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13204	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13205	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13206	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13207	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13208	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13209	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13210	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13211	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13212	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13213	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13214	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13215	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13216	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13217	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13218	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13219	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13220	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13221	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13222	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13223	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13224	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13225	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13226	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13227	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13228	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13229	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13230	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13231	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13232	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13233	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13234	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13235	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13236	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13237	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13238	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13239	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13240	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13241	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13242	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13243	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13244	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13245	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13246	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13247	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13248	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13249	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13250	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13251	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13252	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13253	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13254	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13255	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13256	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13257	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13258	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13259	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13260	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13261	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13262	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13263	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13264	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13265	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13266	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13267	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13268	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13269	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13270	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13271	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13272	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13273	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13274	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13275	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13276	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13277	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13278	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13279	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13280	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13281	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13282	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13283	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13284	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13285	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13286	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13287	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13288	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13289	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13290	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13291	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13292	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13293	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13294	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13295	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13296	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13297	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13298	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13299	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13300	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13301	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13302	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13303	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13304	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13305	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13306	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13307	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13308	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13309	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13310	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13311	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13312	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13313	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13314	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13315	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13316	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13317	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13318	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13319	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13320	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13321	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13322	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13323	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13324	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13325	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13326	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13327	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13328	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13329	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13330	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13331	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13332	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13333	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13334	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13335	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13336	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13337	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13338	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13339	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13340	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13341	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13342	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13343	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13344	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13345	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13346	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13347	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13348	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13349	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13350	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13351	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13352	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13353	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13354	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13355	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13356	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13357	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13358	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13359	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13360	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13361	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13362	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13363	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13364	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13365	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13366	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13367	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13368	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13369	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13370	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13371	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13372	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13373	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13374	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13375	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13376	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13377	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13378	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13379	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13380	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13381	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13382	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13383	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13384	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13385	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13386	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13387	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13388	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13389	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		
M13390	MEFsSV40LT	ProstateSV40LT (28)		

Figure 5

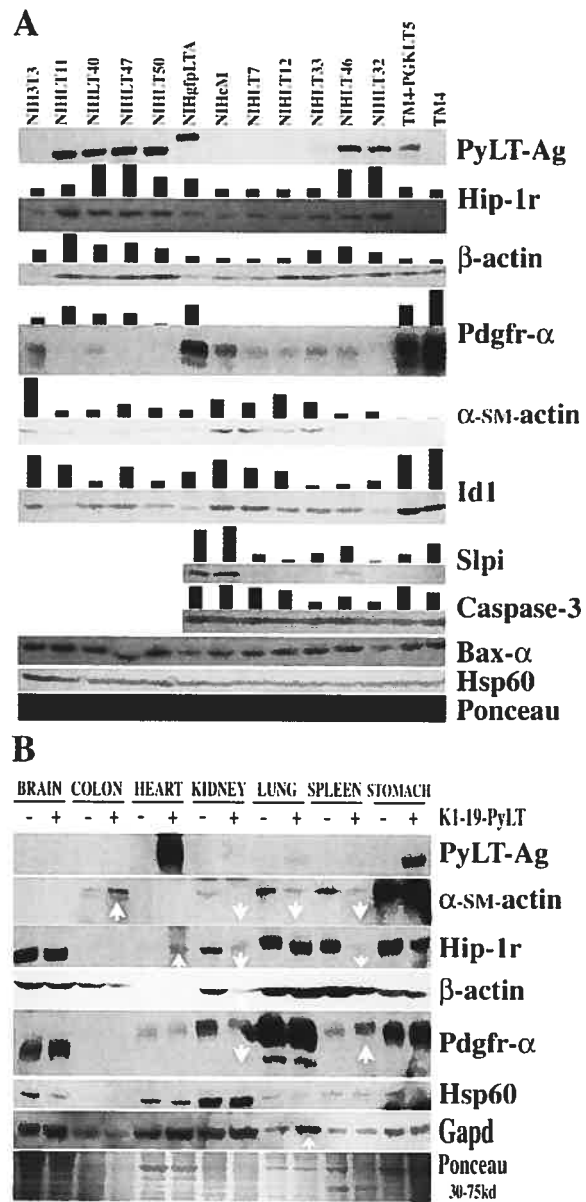
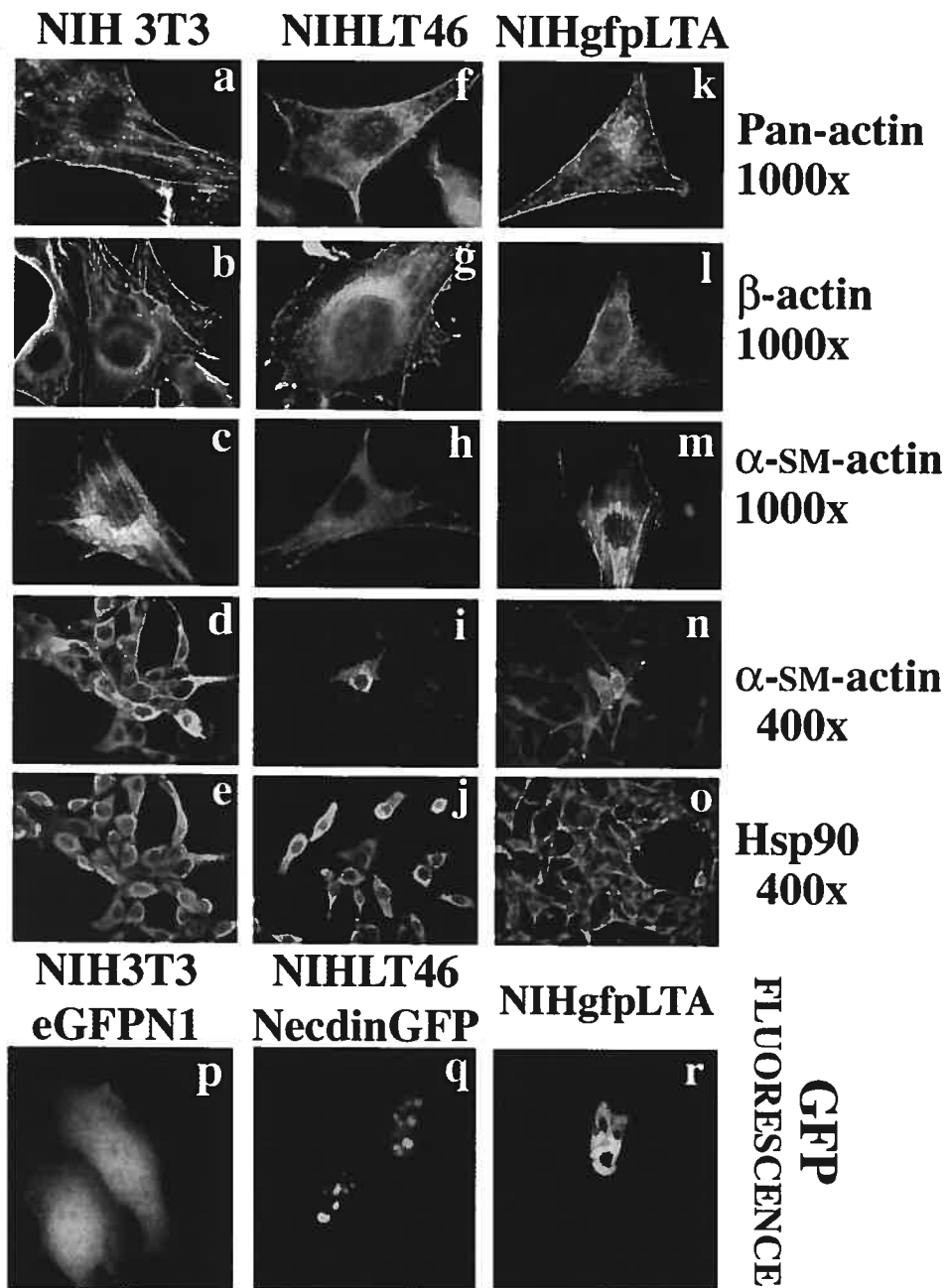


Figure 6



Discussion

Notre laboratoire a utilisé extensivement les modèles animaux et de culture cellulaire pour disséquer les événements associés à la progression carcinogénique multiples étapes. Tels que décrits dans l'introduction, ces modèles *in vitro* tentent de définir avec précision des événements génétiques ou épigénétiques qui peuvent être associés à la carcinogénèse multiples étapes (section 1.5). Dans le laboratoire, nous avons précédemment démontré que bien que PyLT-Ag soit suffisant pour immortaliser les cellules de rongeurs, des événements secondaires supplémentaires étaient nécessaires à la transformation cellulaire et à la formation de tumeurs. En particulier, ces modèles ont permis l'identification d'événements associés à la transformation cellulaire agressive. Ces événements incluent la perte d'expression de FasR et le gain de l'expression de TDE1 et TDE2 lors de la progression des adénomes testiculaires chez les souris transgéniques MT-LT et MMTV-LT (Lebel and Mes-Masson, 1994b) (Lebel et al., 1996). Basé sur ces observations, mon travail représente un approfondissement des connaissances au niveau de la synergie qui existe entre l'activité des récepteurs de mort cellulaire et la présence de PyLT-Ag. Plus précisément, ce travail permet de définir que la simple présence de PyLT-Ag est suffisante pour altérer la signalisation émanant de FasR/TNF-R1 et de façon plus générale certaines voies de signalisation apoptotiques (chapitre II et section 4.1). Cette série d'observations nous a permis de générer une nouvelle hypothèse concernant le rôle de PyLT-Ag dans la carcinogénèse multiples étapes. Nous proposons que même si PyLT-Ag fut préalablement décrit comme étant un oncogène strictement immortalisant il peut aussi contribuer de façon précoce au processus de transformation cellulaire. Telle que décrite au chapitre III et à la section 4.3 cette hypothèse peut devenir un outil pour l'identification de nouveaux événements associés à la transformation précoce lors de la carcinogénèse multiples étapes.

4.1 Validation de la synergie entre FasR et PyLT-Ag

L'intérêt que nous portons au récepteur FAS (FasR) est apparu quand nous avons observé qu'il était exprimé de façon différentielle durant la progression néoplasique des adénomes testiculaires issus des cellules Sertoli/Leydig chez des souris transgéniques exprimant PyLT-Ag. En effet, FasR est exprimé dans les tissus testiculaires normaux des souris transgéniques MT-LT, mais n'est plus exprimé dans les tumeurs. Ces souris transgéniques expriment PyLT-Ag dans les tissus testiculaires sous le promoteur de la métallothionéine et les mâles développent des adénomes testiculaires vers l'âge de 12 mois. Des lignées cellulaires, population mixte Sertoli-Leydig, ont été dérivées des testicules de ces souris et elles expriment PyLT-Ag. La lignée D-4 provient de tissus adénomateux tandis que la lignée D-37 provient de tissus hypertrophiques normaux préneoplasiques. Bien que les cellules D-37 soient immortalisées, elles se comportent *in vitro* comme des cellules normales et ne forment pas de tumeurs lorsque réinjectées de façon sous-cutanée chez la souris nue. Au contraire, les cellules D-4 se conforment à tous les critères de la transformation *in vitro* incluant la formation de tumeurs lorsque réinjectées chez la souris nue. Les cellules T1-5 sont encore plus agressives puisque dérivées des D-4 mais ré-établies en culture après un passage *in vivo* chez la souris en tant que tumeurs sous-cutanées. Dans ce modèle linéaire d'agressivité cellulaire (voir figure 3, chapitre I), les cellules D-37 expriment FasR alors que chez les D-4 il est pratiquement absent. En accord avec la perte d'expression de FasR associée à l'agressivité tumorale dans ce modèle, l'expression de FasR est indétectable chez les cellules T1-5. Puisque la stimulation de FasR génère normalement un signal apoptotique et la mort cellulaire, il est intrigant de remarquer que les cellules préneoplasiques D-37, encore positives pour FasR, sont résistantes à l'apoptose induite par celui-ci. Cette observation suggère que la présence de PyLT-Ag dans les cellules D-37 pourrait potentiellement expliquer leur résistance à la stimulation de FasR.

4.1.1 PyLT-Ag protège temporairement de l'apoptose induite par FasR

Ceci représente l'état des connaissances lors mon arrivée au laboratoire et nous a permis d'émettre l'hypothèse que l'expression de PyLT-Ag était suffisante pour conférer une protection contre l'apoptose. Si cette hypothèse est vraie, il suffirait d'exprimer PyLT-Ag dans des lignées cellulaires qui sont préalablement sensibles à l'apoptose induite par FasR pour ainsi les rendre résistantes à cette apoptose. Dans ce système de culture cellulaire, nous utilisons l'INF- γ en tant qu'agent sensibilisant qui précède la stimulation de FasR ou de TNF-R1. L'INF- γ induit l'expression des récepteurs de mort cellulaire ainsi que l'expression de certains médiateurs intracellulaires du signal apoptotique comme les caspases (Li et al., 2002; Ruiz-Ruiz et al., 2000). Parce que les cellules D-37 représentent une population cellulaire mixte de type SeroLi-Leydig, j'ai choisi une lignée cellulaire normale de type similaire, les cellules de Sertoli TM4, qui sont dérivées de testicules murins normaux et sont immortalisées spontanément en absence d'oncogènes viraux. La seconde lignée cellulaire, les cellules NSO, sont des hybridomes murins normaux immortalisés spontanément et extrêmement sensibles à la stimulation par FasR. Tels que décrits au chapitre II, ces deux types cellulaires deviennent résistants à l'apoptose induite par un anticorps anti-Fas stimulant FasR lorsqu'ils expriment PyLT-Ag. Ils peuvent aussi résister, à un moindre niveau, à l'apoptose induite par TNF-R1. Finalement, bien que les cellules TM4 exprimant PyLT-Ag deviennent résistantes à l'apoptose induite par le taxol, un agent altérant la structure des microtubules cellulaires, elles ne sont pas résistantes à certains types de dommages à l'ADN. Ceci suggère que PyLT-Ag peut agir sur certaines voies de signalisation apoptotiques, mais ne peut pas protéger la cellule contre tous les types d'agression. L'observation d'un arrêt de croissance dans les cellules D-37 et TM4-PGKLT5 résistantes à l'apoptose par FASr ainsi que la détection de l'ARN messager de FasR nous permet de savoir que le FasR est toujours présent et que la protection ne se médie pas au niveau de la perte d'expression du récepteur. Cette observation suggère aussi que la protection offerte par PyLT-Ag n'empêche pas certains événements de signalisation émanant du FasR mais empêche les événements irréversibles de l'apoptose. Il est évident

que des événements cytoplasmiques doivent avoir lieu puisque le stimulus apoptotique est quand même capable d'induire un arrêt de croissance. En fait, si la stimulation du FasR est maintenue en permanence chez les cellules TM4-PGKLT5, le signal apoptotique sera éventuellement suffisant pour tuer les cellules. PyLT-Ag peut donc offrir une protection temporaire contre la stimulation de FasR, un avantage sélectif, mais pas final lors de la progression carcinogénique. Cette observation pourrait expliquer la perte de FasR dans les cellules D-4 et T1-5 malgré la présence de PyLT-Ag. Avec les connaissances actuelles sur les voies de signalisation apoptotiques émanant de FasR et TNF-R1 il n'est pas surprenant de constater que PyLT-Ag confère seulement une protection partielle contre l'apoptose.

4.1.2 Le concept des régulateurs apoptotiques

Les mécanismes moléculaires participant à la cascade apoptotique sont de mieux en mieux connus, en particulier la cascade de signalisation émanant des récepteurs de morts cellulaires. Bien qu'une multitude d'effecteurs apoptotiques soient connus et souvent précisément localisés à l'intérieur de ces voies de signalisation, chacun d'entre eux existe en équilibre avec des inhibiteurs et des coactivateurs spécifiques. Ainsi, le contexte cellulaire va déterminer si un stimulus apoptotique particulier sera suffisant pour induire l'apoptose ou pourra induire une réponse différente telle qu'un arrêt de croissance, voire rien du tout. La plupart des théories actuelles sur l'apoptose convergent vers l'existence d'un ou de plusieurs mécanismes de balance intracellulaire qui décident à quel moment la cellule doit commencer à mourir. Un de ces mécanismes individuels pourrait être une seule protéine, un complexe protéique, ou une multitude d'éléments différents que l'on pourrait nommer régulateur apoptotique (RA). Un exemple de RA a été décrit dans l'introduction sous le nom d'apoptosome, le complexe intégrateur de signaux apoptotiques émanant de la mitochondrie et composé du cytochrome C, de la caspase 9 et d'apaf-1 (section 1.6). Pour bien comprendre ce concept de balance il faut comprendre que la cellule est soumise en tout temps, et ce simultanément, à de multiples signaux en faveur de la mort cellulaire contrebalancés par d'autres signaux en faveur de la survie. Lorsque la balance des signaux

penche en faveur de la mort, comme dans le cas de l'apoptose induite par FASr dans les TM4, le RA décide que la cellule doit mourir. Par contre, si les signaux apoptotiques ne sont pas assez forts pour faire pencher la balance en leur faveur, le RA ne sera pas activé et la cellule ne mourra pas. Il est fort probable qu'il existe plus d'un RA dans chaque cellule, chacun plus spécifique à un type de signaux apoptotiques. Par exemple, le RA mitochondrial est intégré par l'apoptosome, il pourrait y en avoir un autre pour les récepteurs NGF-like (possiblement le DISC), un pour les céramides, un pour les JNKs, etc. Dans ce contexte, la présence de PyLT-Ag peut inhiber l'apoptose en agissant avant ou après l'activation d'un ou de plusieurs RA différents. Nous avons identifié deux stades de la signalisation apoptotique où PyLT-Ag peut influencer le destin de la cellule, deux RA potentiels où PyLT-Ag aurait une activité dans le contexte de l'apoptose induite par FasR dans les cellules TM4.

4.1.3 PyLT-Ag bloque un signal au niveau du DISC

Si PyLT-Ag agit de façon très précoce dans la cascade apoptotique, il doit, soit inhiber les signaux en faveur de la mort comme le fait Crma avec les caspases au niveau du DISC (Zhou and Salvesen, 2000), ou soit promouvoir des signaux en faveur de la survie. Cette première possibilité fut facile à tester puisque la stimulation de FasR entraîne immédiatement son oligomérisation, la formation du DISC et l'activation de caspase 8. Analyser les niveaux de caspase 8 activée après la stimulation de FasR permet de savoir la qualité de la signalisation apoptotique qui émane du récepteur lui-même et du complexe du DISC. Nous avons démontré que dans le contexte de l'apoptose induite par l'anticorps anti-Fas dans les cellules TM4, PyLT-Ag prévient l'activation de la caspase initiateur caspase 8. Parce que PyLT-Ag interagit *in vivo* avec le complexe du DISC il est possible que cette inhibition se produise directement au niveau du récepteur (voir figure 4). Bien que PyLT-Ag soit considéré comme une protéine nucléaire environ 5% de la protéine totale est cytoplasmique ou membranaire. En support de cause, nous avons aussi observé que la protéine de fusion PyLT-Ag-GFP bien qu'essentiellement nucléaire était aussi

partiellement localisée au cytoplasme. Ces 5 % de PyLT-Ag cytoplasmique/membranaire pourraient facilement être suffisants pour expliquer l'interaction directe avec le complexe du DISC. Donc, PyLT-Ag peut perturber le signal apoptotique le plus direct émanant du FasR, l'activation de la caspase 8 initiatrice.

4.1.4 PyLT-Ag retarde la dégradation de l'ADN génomique

Il est aussi possible que PyLT-Ag peut agir en aval d'un RA dans la cascade apoptotique. L'activation des caspases effectrices comme la caspase 3 est un des événements les plus critiques de la signalisation apoptotique. C'est aussi un événement qui est considéré comme étant irréversible puisque même si l'utilisation d'inhibiteurs chimiques de l'activité des caspases peut retarder la mort cellulaire, on ne peut pas la prévenir indéfiniment. De façon intéressante, la présence de PyLT-Ag dans les cellules TM4 permet de retarder la dégradation de l'ADN génomique en présence de caspase 3 activée (voir figure 4). Dans ce contexte, il est possible que PyLT-Ag puisse médier son effet protecteur dans le noyau où il est principalement localisé. Ainsi, la signalisation cytoplasmique, incluant les kinases et protéases, est activée normalement, mais le signal est bloqué au niveau du noyau et l'ADN est temporairement protégé de la dégradation. Ceci peut représenter un phénomène spécifique à la biologie virale qui peut donner un avantage à double tranchant au virus durant le cycle lytique. Principalement, cette activité particulière de PyLT-Ag permet de retarder un stade final de l'apoptose mais pas de prévenir la finalité du processus. Retarder la dégradation de l'ADN au niveau cellulaire est une activité qui peut permettre la réplication efficace du génome viral malgré les stress proapoptotiques infligés à la cellule hôte. De plus, permettre à l'apoptose de procéder normalement après un certain délai peut ultimement permettre au virus de se propager efficacement. Non seulement l'apoptose permet de finaliser le cycle lytique par la mort de la cellule hôte, mais parce que les fragments de cellules apoptotiques sont ingérés directement par les cellules avoisinantes le virus peut voyager sans être exposé au milieu extracellulaire. Ce milieu extracellulaire est

potentiellement dangereux pour les virions à cause des anticorps et des cellules du système immunitaire. Cette particularité pourrait aussi participer à l'habileté des polyomavirus à établir des infections persistantes chez leurs hôtes normaux.

4.1.5 Rôle de PyLT-Ag au niveau des interactions directes protéines-protéines

Dans notre étude PyLT-Ag protège plus efficacement contre l'apoptose induite par FasR comparée à celle induite par TNF-R1. Si PyLT-Ag inhibe certains RA comme le DISC il doit interagir directement avec un élément important de ce RA ou favoriser un autre élément inhibiteur. Dans notre étude, il semble que PyLT-Ag puisse se lier directement avec le DISC (voir figure 4). Dans tous les cas, PyLT-Ag peut se retrouver à un endroit qui inhibe la majorité des signaux de FasR mais pas tous les signaux de TNF-R1. La divergence de certaines voies de signalisation entre les deux récepteurs peut expliquer les 30 % d'apoptose différentielle observée. Il se peut aussi que PyLT-Ag se retrouve en position d'inhiber les mêmes signaux de FasR ou de TNF-R1 mais que le signal émanant de TNF-R1 soit plus fort. Cette augmentation des signaux en faveur de la mort pourrait par exemple être due à une plus grande présence de récepteurs TNF-R1 fonctionnels à la surface de la cellule. Dans la plupart des hypothèses discutées préalablement l'augmentation du niveau d'expression de PyLT-Ag pourrait théoriquement augmenter le niveau de protection contre l'apoptose. Ainsi, il est aussi possible que PyLT-Ag exerce son effet anti-apoptotique en corrélation avec son niveau d'expression. Par exemple, on peut penser que PyLT-Ag va avoir une action en inhibant par interaction directe des molécules effectrices du signal proapoptotique. Si ce nombre de molécules dépasse le nombre de molécules de PyLT-Ag, on observera une augmentation du taux d'apoptose. C'est-à-dire que PyLT-Ag serait capable de bloquer l'apoptose tant et aussi longtemps que la force du stimulus apoptotique ne dépasse pas sa capacité d'inhibition. L'observation que les cellules TM4-PGKLT-3 qui expriment un niveau plus bas de PyLT-Ag que les TM4-PGKLT-5

Figure 4: Signalisation apoptotique et rôles de PyLT-Ag

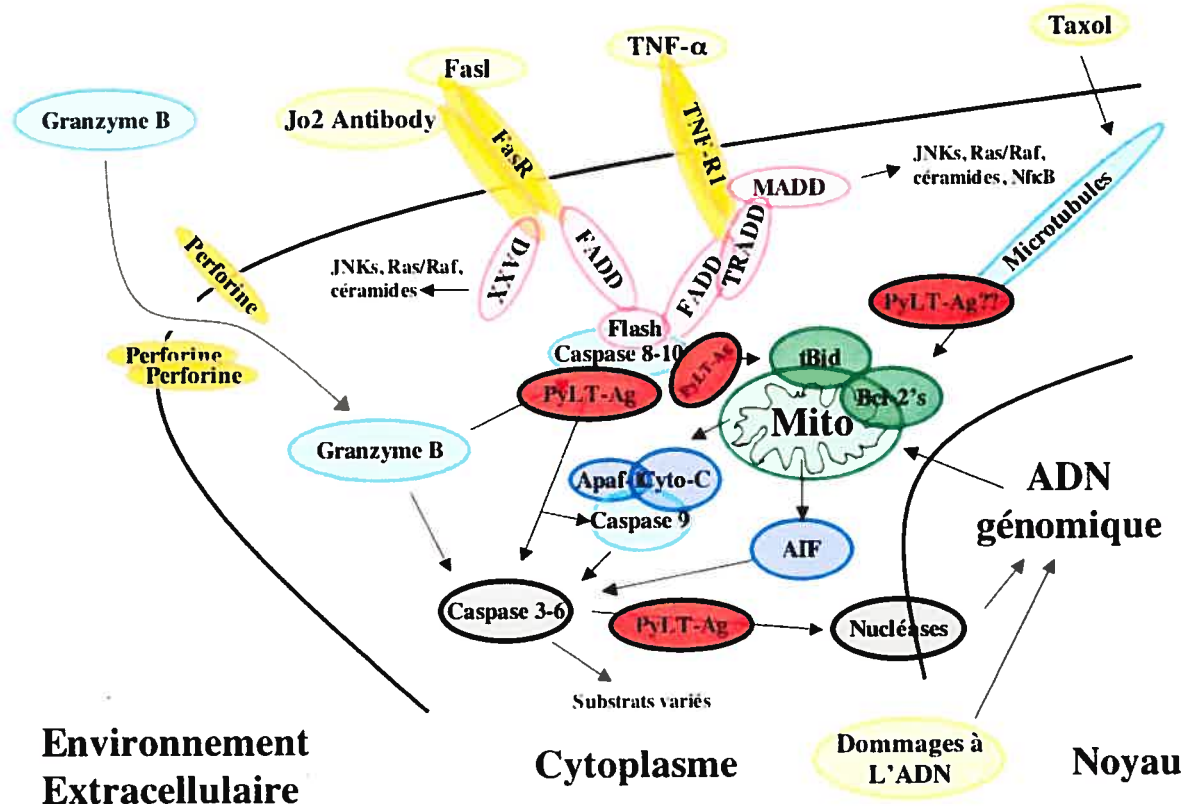


Figure 4: Schématisation simplifiée des voies de signalisation apoptotiques principales et localisation potentielle des activités de PyLT-Ag

soient moins résistantes à l'apoptose induite par plusieurs stimuli supporte cette hypothèse. Dans le cas de FasR, on pourrait dire qu'un certain niveau de PyLT-Ag est éventuellement suffisant pour contrebalancer tous les signaux émanant du DISC. Par contre, dans le cas de TNF-R1, il semblerait que la force des signaux en faveur de la mort cellulaire dépasse la capacité d'inhibition de PyLT-Ag, tout au moins pour les niveaux que nous avons atteints dans le clone TM4-PGKLT-5.

Au niveau des interactions directes entre PyLT-Ag et des protéines importantes pour la signalisation apoptotique il est intéressant de constater que SV40LT-Ag et E1B19K (Conzen et al., 1997) possèdent un domaine BH1 dégénéré et que ce domaine BH1 est conservé chez PyLT-Ag. Chez E1B19K, ce domaine est essentiel pour la liaison à plusieurs membres de la famille des régulateurs apoptotiques Bcl-2 et altère la balance apoptotique en faveur de la survie (Han et al., 1998) (Boyd et al., 1994) (Subramanian et al., 1995) (Smith, 1995). Il est clair que dans la multitude de protéines interagissant directement avec PyLT-Ag il y a plusieurs candidats potentiels pouvant altérer la balance apoptotique (incluant particulièrement les chaperonnes cellulaires et les membres de la famille pRb's). Finalement, et alternativement, il est fort probable que PyLT-Ag peut altérer le niveau d'expression de plusieurs gènes cellulaires qui ont une influence sur cette balance apoptotique entre la mort et la survie (voir section 4.3). On peut facilement imaginer les avantages et même la nécessité d'une stratégie virale pouvant indirectement promouvoir les signaux en faveur de la survie et diminuer les signaux en faveur de la mort cellulaire.

PyLT-Ag est une nucléophosphoprotéine classée comme un oncogène immortalisant mais non-transformant. Bien que les effets précis des LT-Ag sur la régulation de l'apoptose soient plutôt mal connus, les résultats de mes travaux démontrent que PyLT-Ag agit en tant que protecteur contre l'apoptose induite par les voies de FasR et de TNF-R1. Le principe des protéines virales inhibant l'apoptose n'est pas nouveau et il existe déjà plusieurs exemples bien documentés. On sait qu'E1B19K, Crma, p35 et d'autres

inhibent l'apoptose de façon très efficace (Zhou and Salvesen, 2000) (Degenhardt et al., 2000). Crma interagit avec les cystéines protéases (ICE-like) et est un inhibiteur de cette voie de signalisation apoptotique. Plus précisément, Crma peut inhiber caspase 8 et donc, dans le cas de FASr, l'inhibition a lieu au niveau de la membrane cellulaire ou caspase 8 est liée à FADD ce qui empêche le signal apoptotique d'atteindre le cytoplasme. Crma est donc un inhibiteur de l'apoptose induite par FasR au même titre que PyLT-Ag. Dans le contexte des cellules TM4, PyLT-Ag offre une protection temporaire totale contre l'apoptose induite par FasR et une protection partielle contre l'apoptose induite par TNF-R1. Ces deux voies d'induction apoptotiques conjointement avec les perforines/granzymes sont reconnues pour être très importantes, sinon essentielles, à la médiation de la réponse immunitaire par le volet cellulaire. Ce qui entraînent un questionnement sur le rôle dont cette activité anti-apoptotique de PyLT-Ag peut jouer dans la progression carcinogénique.

4.1.6 PyLT-Ag apoptose et carcinogénèse

En résumé, nous avons identifié un gène qui est modulé de façon négative au cours du développement des adénomes testiculaires chez des souris transgéniques exprimant PyLT-Ag. Ce gène, FasR, est important pour la signalisation apoptotique en général et pour la réponse cellulaire au système immunitaire. Il fut surprenant de constater que dans ce modèle les cellules préneoplasiques D37 Sertoli-Leydig exprimant encore FasR étaient pourtant résistantes à l'apoptose induite par FasR et répondaient plutôt par un arrêt de croissance. D'après mon travail, suivant la démonstration que PyLT-Ag peut protéger de l'apoptose induite par FasR, nous pouvons concilier ces résultats. Il semblerait que PyLT-Ag peut protéger de façon transitoire contre l'apoptose induite par FasR. Dans le cas des adénomes testiculaires chez les souris transgéniques MT-PyLT-Ag et MMTV-PyLT-Ag cette expression de PyLT-Ag peut donc donner un avantage pour la progression cancéreuse des cellules préneoplasiques vers un état complètement transformé. Par contre, parce que la résistance n'est pas complète, il est quand même nécessaire pour ces cellules de perdre complètement l'expression du récepteur pour ainsi devenir insensibles aux stimuli

apoptotiques convoyés par FasR. Particulièrement dans un environnement microtissulaire comme le testicule où le FasR est exprimé de façon constitutive. Ceci représente potentiellement une activité de transformation précoce associée à l'expression de PyLT-Ag et cette activité est indépendante du concept d'immortalisation cellulaire normalement associée à PyLT-Ag. Dans un contexte relié à l'apoptose non seulement PyLT-Ag peut altérer la signalisation émanant des récepteurs de croissance, mais il peut aussi ralentir la finalité du processus de mort cellulaire en altérant des étapes tardives de l'apoptose qui se produisent après l'activation des caspases exécutrices telles que caspase 3. PyLT-Ag peut donc immortaliser, mais il peut aussi faire pencher la balance en faveur de la croissance carcinogénique en protégeant contre l'apoptose et en participant à l'évasion contre le système immunitaire. Clairement des activités similaires à celles que nous venons d'identifier avec FasR, indépendantes de l'immortalisation cellulaire, peuvent représenter des événements très intéressants dans l'étude de la carcinogenèse puisqu'ils sont modulés bien avant que la cellule ne devienne complètement transformée et acquière les caractéristiques agressives d'un cancer *in vivo*. Ils sont d'autant plus intéressants que ceci représente un stade du développement néoplasique où il serait plus facile d'intervenir pour pouvoir sauver des vies humaines. Dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons développé un modèle qui permet d'identifier d'autres activités similaires qui pourraient être associées à la transformation précoce par PyLT-Ag.

4.2 La réalisation d'une publication sur le cancer de l'ovaire pour raffiner l'utilisation de la technologie Affymetrix appliquée à des phénotypes complexes

Bien que le projet décrit ici soit connexe à mon projet principal, c'est l'acquisition de cette expertise qui m'a permis d'appliquer avec succès une approche génomique au problème de PyLT-Ag énoncé plus haut. Plus spécifiquement cette section décrit le développement dans notre laboratoire d'une expertise en génomique basée sur la technologie des micropuces à ADN de la compagnie Affymetrix. Cette technologie permet

l'analyse de phénotypes complexes tel que le cancer. Parce que la mise au point des conditions à utiliser pour avoir du succès dans ce domaine n'est pas si triviale, ce travail a mené à une collaboration et à la publication d'un article scientifique dans la revue *Oncogene* (Tonin et al., 2001). Je suis troisième auteur sur cette publication (Annexe I).

Les micropuces à ADN, plus communément appelé "DNAchip" ou "microarray", sont de nouveaux outils qui permettent de relever très rapidement la différence entre les gènes actifs ou inactifs, leur expression différentielle. Le concept à la base de ces micropuces est relativement simple à partir du moment où la séquence des cibles, que ce soit des ARN messagers ou des séquences génomiques (ADN), est connue. Sur une seule puce on peut déposer plusieurs dizaines de milliers de sondes qui représentent chacune une seule séquence amplifiée, ou un seul gène. En fait, si on dispose d'un nombre suffisant de sondes on peut analyser les différences au niveau d'un génome complet. Il existe déjà des micropuces qui permettent de visualiser simultanément le niveau d'expression de la totalité des gènes de la levure ou du nématode dont les génomes complets sont séquencés. Chez l'humain et la souris, les micropuces les plus récentes permettent de visualiser les niveaux d'expression de plus de 40 000 ARN messagers différents. La plupart du temps, la cible est l'ARN messager. Bien que celui-ci ne soit pas l'effecteur final des gènes puisqu'il code lui-même pour une protéine, son abondance indique bien souvent la présence de la protéine qui lui est associée. Les ARN messagers sont relativement faciles à extraire et à purifier que ce soit à partir de cellules en culture ou d'échantillons de tissus. Une copie conforme marquée *in vitro* de tous les ARN messagers d'un échantillon est synthétisée pour réaliser l'analyse d'expression par micropuce. Ces copies viennent se coller sur leurs séquences homologues présentes sur la micropuce. Grâce au marquage par une molécule fluorescente, une scanographie de la micropuce permettra de digitaliser et de quantifier par ordinateur le patron d'intensité de toutes les sondes, représentant chacune le niveau d'expression d'un ARNm. La connaissance du patron d'expression de milliers d'ARNm présents dans un type

de cellules ou de tissus nous permet ainsi de connaître leur identité moléculaire et de les différencier clairement des autres types. Dans le cas de certaines maladies comme le cancer, la signature moléculaire des tumeurs peut devenir très complexe et la capacité à les différencier les unes des autres peut impliquer des centaines de gènes. En résumé, avec les micropuces à ADN, nous disposons d'un d'outil qui peut nous permettre d'établir une signature moléculaire de plus de 40 000 ARN messagers en moins de quelques jours. Il suffit de disposer de quelques échantillons bien choisis pour pouvoir relever les différences importantes entre chacun d'entre eux. Une option intéressante consiste à identifier les signatures moléculaires qui caractérisent le cancer et c'est exactement ce que nous avons appliqué au cancer de l'ovaire. Une approche possible dans l'étude du cancer est de comprendre les événements génétiques qui sont impliqués dans la progression de la maladie. En effet, les cellules normales de l'ovaire vont subir successivement des modifications dans la régulation de l'activité de certains gènes pour progresser tranquillement vers une tumeur bénigne, maligne puis invasive. L'intérêt principal de notre travail est d'identifier les différents événements génétiques qui conduisent à la progression de la maladie. Pour réaliser ce travail il est nécessaire d'avoir accès à une banque très élaborée de tissus normaux et cancéreux provenant de plusieurs centaines de patients. La stratégie est de comparer les signatures moléculaires associées avec chacun des différents grades de tumeurs pour identifier des gènes qui sont différentiellement exprimés. La connaissance de ces gènes nous permet par la suite de mieux comprendre la biologie du cancer et les facteurs qui sont importants pour son apparition et sa progression

Ce projet consistait à utiliser une approche génomique pour caractériser en détail quatre lignées cellulaires de cancer de l'ovaire immortalisées spontanément dans le laboratoire (TOV-21G, TOV-81D, TOV112D et OV-90). Le laboratoire porte un grand intérêt à l'étude du cancer de l'ovaire en collaboration avec le Docteur Diane Provencher. Le cancer de l'ovaire est la cinquième cause de décès relié au cancer chez la femme. Le

cancer de l'ovaire épithélial est la plus commune manifestation de cette maladie (Auersperg et al., 2001). Les lignées que nous avons étudiées sont particulièrement intéressantes parce qu'elles semblent préserver les caractéristiques du cancer épithélial de l'ovaire original (Lounis et al., 1994; Provencher et al., 2000). Bien que cet événement d'immortalisation spontanée des cellules cancéreuses de l'ovaire soit fréquent comparé à ce qui se produit avec des cellules normales, il est quand même assez rare pour donner une grande valeur à ces quatre lignées cellulaires. À ce jour ces lignées sont les seules qui se soient établies de façon permanente, immortelles, dans notre laboratoire suivant la mise en culture de plus de 1500 échantillons de tumeurs humaines. Nous avons donc utilisé la technologie des micropuces à ADN Affymetrix pour générer un profil transcriptionnel de ces quatre lignées cellulaires. Dans cette étude, aux fins de comparaison, nous avons aussi inclus un échantillon d'une culture cellulaire de cellules normales épithéliales ovariennes non immortalisées (NOV-31) ainsi qu'un échantillon de tissus cancéreux frais (TOV-578G). La comparaison des profils d'expression révèle que le patron d'expression de la lignée normale NOV-31 est celui qui est le plus différent de tous les autres échantillons. Un résultat prévisible puisque c'était la seule lignée normale, mais tout de même intéressant puisqu'il validait notre approche. Similairement, l'échantillon TOV-81D est celui qui se rapproche le plus de NOV-31 et c'est aussi le cancer le moins agressif et les cellules cancéreuses les plus 'normales' de notre échantillonnage. De façon intéressante les quatre échantillons supplémentaires sont tous divergents par rapport à NOV-31 et TOV-81D, mais sont aussi divergents entre eux attestant la variabilité génétique des cancers agressifs à un stade avancé. En conclusion bien que ce nombre restreint d'échantillons fût suffisant pour séparer des différences majeures, les cellules plus ou moins normales des cellules très agressives, un nombre plus grand d'échantillons est nécessaire pour sous-diviser des phénotypes complexes parmi les cellules cancéreuses plus agressives.

Dans cette étude, nous avons aussi extensivement validé les données brutes issues des micropuces Affymetrix et confirmé la sensibilité ainsi que la fiabilité de cette technologie. Ceci représente d'ailleurs ma plus grande contribution au niveau de la publication de notre article dans la revue *Oncogene*. Bien que cette étude ne présente que six échantillons, j'ai aussi aidé à la génération de plusieurs centaines de profils transcriptionnels associés aux cancers de l'ovaire. Voici les leçons que nous avons tirées de ce projet et que j'ai appliquées lors de la réalisation de mon nouveau modèle avec PyLT-Ag. Premièrement, il faut réaliser que la technologie Affymetrix est tellement sensible que les éléments importants au succès de l'expérimentation se retrouvent à tous les niveaux du design expérimental. Il est critique de réduire au maximum les variables environnementales qui peuvent influencer les bruits de fond sur les micropuces, puisque ces variations peuvent facilement devenir plus importantes que les événements biologiques subtils que nous tentons d'identifier. Selon notre expérience, voici les éléments les plus importants pour assurer la qualité d'un groupe de données sur les micropuces à ADN Affymetrix. Au niveau le plus basal de notre ressource primaire, les cellules cultivées, les bonnes pratiques de culture cellulaire incluent l'utilisation d'un approvisionnement non variable en FBS, la culture dans un seul incubateur, et la synchronisation des cellules à un niveau de confluence identique dans tous les cas. Nous avons choisi 70-80 % de confluence, un état où la grande majorité des cellules de la population sont en croissance exponentielle. Il est aussi important d'effectuer la préparation des échantillons simultanément à toutes les étapes. Ceci prévient des variations expérimentales telles que les temps d'incubation ou des variations de température. Il faut effectuer la préparation des échantillons, incluant les extractions d'ARN, la préparation des sondes et l'hybridation de façon consistante. Ceci inclut aussi l'utilisation de micropuces Affymetrix qui sont issues d'une même séquence de fabrication (Batch) puisque des variations peuvent exister entre ces séquences. Finalement, et peut-être la constatation la plus importante pour valider notre approche de culture cellulaire, les variations génétiques et environnementales génèrent des variations majeures dans les profils d'expression géniques et l'utilisation de tissus ou de cellules non

isogéniques introduit un facteur majeur de variabilité non contrôlée. Autrement dit, les variations expérimentales intéressantes peuvent être cachées par des variations biologiques non spécifiques mais plus importantes. Pour cette raison en particulier, je pense que l'utilisation de modèles de culture cellulaire permet de réduire le nombre d'échantillons et d'augmenter la fiabilité des gènes candidats identifiés. Ayant appliqué toutes ces précautions à la génération des profils transcriptionnels associés à l'expression de PyLT-Ag dans les cellules de souris, nous sommes confiants dans la qualité des données que nous avons générées.

4.3 Événements précoces de la carcinogenèse multiples étapes associé à l'expression de PyLT-Ag

Dans le modèle développé au laboratoire, les cellules D37, même si elles ne sont pas transformées, sont tout de même résistantes à l'apoptose induite par FasR et cette protection est probablement due à la présence de PyLT-Ag. Clairement la présence de PyLT-Ag dans les cellules Sertoli normales TM4 est suffisante pour conférer une protection contre l'apoptose. Cette caractéristique fait partie des événements moléculaires essentiels pouvant faire pencher la balance en faveur de la croissance cancéreuse et pouvant permettre l'évasion du système immunitaire. Toutefois, PyLT-Ag est considéré comme un oncogène strictement immortalisant selon les critères *in vitro* et on présume que cette caractéristique est suffisante pour initier la tumorigenèse, avec une longue latence, dans les modèles de souris transgéniques. Il est intéressant de noter que le statut des cellules de souris *in vivo* en rapport avec l'immortalisation cellulaire n'est pas clair. En effet, ces cellules ont de longs télomères et sont positives pour l'expression de la télomérase ce qui suggère que l'immortalisation cellulaire n'est peut-être pas aussi essentielle que chez les cellules humaines. Dans ces conditions, il est possible que PyLT-Ag contribue à la carcinogenèse multiples étapes d'une façon plus subtile. PyLT-Ag immortalise les cellules de rongeurs, mais ne les transforme pas tandis que SV40LT-Ag immortalise et transforme ces mêmes

cellules simultanément en un seul événement. Puisque PyLT-Ag et SV40LT-Ag partagent la majorité de leurs activités fonctionnelles, il est possible que certains événements précoces de la transformation ne puissent pas être identifiés avec les critères traditionnels de transformation *in vitro*. Plus précisément, parce que PyLT-Ag peut procurer une résistance à l'apoptose et en particulier à l'apoptose induite par les récepteurs de mort cellulaire, parce que tous les domaines essentiels à la transformation des cellules humaines par l'oncogène viral E1A sont conservés dans PyLT-Ag et SV40LT-Ag et parce que l'expression de PyLT-Ag génère des tumeurs dans les modèles de souris transgéniques, nous proposons que le rôle de PyLT-Ag ne soit pas limité à l'immortalisation et qu'il puisse contribuer à certains événements de la transformation précoce. Ces événements seraient indépendants mais possiblement associés à sa capacité à augmenter l'immortalisation. Les cellules initiées par ces événements ne seront pas complètement transformées, mais auront ensuite un avantage pour évoluer vers un stade plus agressif de la transformation ce qui explique la longue latence dans les modèles de souris transgéniques exprimant PyLT-Ag. En identifiant des événements liés à PyLT-Ag tôt durant la transformation, nous pouvons possiblement identifier des événements précoces dans certains cancers humains, potentiellement ceux qui sont associés à la carcinogenèse virale chez l'homme.

4.3.1 Mise au point d'un nouveau modèle pour identifier des événements indépendants de l'immortalisation et associés à PyLT-Ag

Selon notre nouvelle hypothèse, la comparaison entre des cellules D-37 et les cellules D-4, identifie principalement des événements de la transformation tardive puisque les événements de la transformation précoce ont eu lieu en présence de PyLT-Ag avant la formation de la néoplasie (comparaison entre les stades 3 et 4 de la figure 3). Sous un autre angle, en comparant des cellules de souris normales et immortalisées spontanément avec les mêmes cellules exprimant PyLT-Ag, nous pouvons investiguer des événements secondaires indépendants de l'immortalisation, associés à l'expression de PyLT-Ag et qui pourraient

contribuer à la transformation d'une cellule (comparaison entre les stades 2 et 3 de la figure 3). Pour adresser cette question, nous avons généré un modèle de culture cellulaire où des fibroblastes de souris NIH3T3 immortalisés spontanément sont comparés à leurs contreparties exprimant PyLT-Ag. La comparaison se fait en utilisant des outils génomiques qui permettent de générer un profil d'expression génique associé aux échantillons. Ceci dans le but d'identifier des événements de modulations transcriptionnelles qui sont indépendants de l'activité classique d'immortalisation cellulaire attribuée à PyLT-Ag.

4.3.2 Identification des gènes modulés par PyLT-Ag dans des fibroblastes murin immortalisés spontanément

En comparant les populations cellulaires de fibroblastes murins NIH3T3 parentaux avec des clones de NIH3T3 exprimant divers niveaux de PyLT-Ag de façon stable nous avons identifié des gènes candidats modulés par PyLT-Ag à un niveau transcriptionnel. Ce modèle nous permet d'identifier les événements modulés par PyLT-Ag qui sont indépendants du processus d'immortalisation puisque ces événements sont intervenus préalablement en absence de PyLT-Ag lors de l'immortalisation spontanée des cellules NIH3T3. Bien que nous ayons aussi utilisé les cellules TM4 lors de cette étude, les cellules NIH3T3 représentent un meilleur modèle puisqu'elles ont été extensivement décrites comme étant des cellules non transformées (Rubin, 2001c). Ceci n'est pas le cas avec les cellules TM4. Pour cette raison, les cellules NIH3T3 sont utilisées pour la majorité de cette étude.

Le chapitre III décrit en détail les procédures que nous avons utilisées pour transformer les données brutes de cette analyse en liste de gènes candidats actuellement modulés par la présence de PyLT-Ag dans les cellules NIH3T3. Tel que décrit à la section

4.2, notre laboratoire possède une certaine expertise dans l'utilisation de la technologie Affymetrix et nous pouvons générer des données relativement fiables. Nous avons tout de même procédé à une validation exhaustive des données Affymetrix par des méthodes plus traditionnelles. Ces validations se retrouvent aussi dans le chapitre III. De façon générale, la validité de nos données brutes générées par le système Affymetrix ainsi que celles de plusieurs de nos meilleurs gènes candidats a été démontrée clairement. Entre autres, les candidats Necdin et Transgelin ont été confirmés sur un groupe de 15 clones de cellules NIH3T3 complètement indépendants des clones originaux utilisés lors de notre analyse primaire. Nous avons validé les données brutes du système Affymetrix en utilisant une analyse par buvardage de Northern et des sondes de cDNA pleine longueur pour chacun des candidats sélectionnés. Il est intéressant de noter que ceci nous a permis de détecter plusieurs isoformes pour certains de ces gènes. De façon surprenante lorsque plus d'un isoforme était présent pour un gène donné, un seul de ces isoformes était modulé de façon spécifique correspondant à nos données brutes (voir Necdin et α -sm-actin, figure 1, chapitre III). Ceci nous indique que la technologie Affymetrix détecte de façon préférentielle un seul des isoformes associés à ces gènes. L'identification de cet isoforme important lorsqu'il y en avait plus d'un, dépasse malheureusement l'envergure de ce travail. Il faut noter que l'une des méthodes de validation que nous avons utilisée impliquait la technologie des micropuces Affymetrix. Cette validation nous démontre aussi que la protéine de fusion PyLT-Ag-GFP est au moins partiellement fonctionnelle. L'ARN du clone NIH3T3-GFPLTA exprimant cette fusion de façon stable a été analysé simultanément avec les autres clones sur la plateforme Affymetrix. Parce que nous n'étions pas certains de la fonctionnalité de cette protéine de fusion, ce clone n'a pas été inclus dans le processus de sélection des candidats et représente donc un clone indépendant de l'analyse principale. Parce que plus de 60 % des gènes modulés dans l'analyse principale le sont aussi dans le clone NIH3T3-GFPLTA, ceci confirme la validité de nos candidats mais démontre aussi que cette protéine de fusion est au moins partiellement fonctionnelle.

À cause de la magnitude des nombres impliqués, la plupart des analyses basées sur la technologie des micropuces peuvent générer des quantités très élevées de gènes candidats. En fait, plus de candidats que la majorité des laboratoires sont capables d'investiguer par la suite. Malgré la stringence des critères que nous avons utilisés, cette étude ne fait pas exception à la règle puisque nous avons généré une liste de 161 gènes candidats qui sont modulés par la simple présence de PyLT-Ag dans les cellules NIH3T3. Pour prioriser l'importance des gènes candidats à investiguer plus à fond nous avons choisi deux stratégies différentes. Premièrement, une analyse croisée avec d'autres plateformes expérimentales pour identifier des candidats redondants (Sections 4.3.3 et 4.3.4). Deuxièmement, l'identification des gènes parmi cette liste originale de 161 qui sont modulés de façon parallèle au niveau d'expression de PyLT-Ag. Autrement dit, l'identification de nos candidats qui vont varier en corrélation directe avec le niveau de PyLT-Ag exprimé dans chaque clone individuel de notre étude (4 clones parentaux et 7 clones exprimant des niveaux variables de PyLT-Ag). Cette sélection est basée sur le concept selon lequel les protéines qui interagissent directement ensemble ou qui travaillent dans une même voie métabolique vont être modulées simultanément au niveau transcriptionnel (Ge et al., 2001) (Walhout et al., 2002). Cette sélection a permis de rationaliser notre processus de sélection des candidats à étudier plus à fond et à mettre à l'avant-plan, entre autres, les candidats Necdin, Transgelin et α -sm-actin décrits plus en détail à la section 4.3.5.

Bien que cette étude identifie plusieurs candidats intéressants incluant des partenaires ou des cibles fonctionnels de PyLT-Ag nous n'avons malheureusement pas identifié de gènes qui peuvent être directement impliqués dans le processus d'apoptose (par exemple, des caspases, membres de la famille Bcl-2, récepteurs de mort cellulaire ou tout autre protéine directement impliquée dans les voies de signalisation apoptotiques classiques). Ceci fut une surprise et une déception étant donné les résultats que nous avons

générés précédemment concernant PyLT-Ag et l'apoptose en général. Les raisons de ce manque de présence de gènes reliés à l'apoptose pourraient s'expliquer en partie si ces gènes ne sont pas exprimés à des niveaux assez élevés pour être facilement détectés par les micropuces Affymetrix ou même tout simplement parce que les gènes modulés par PyLT-Ag sont peut-être absents de la micropuce. Il est aussi possible que l'activité de ces gènes soient régulés à un niveau post-transcriptionnel. Finalement, puisque PyLT-Ag interagit directement avec des protéines impliquées dans le processus apoptotique il n'est peut-être pas vraiment nécessaire de causer des modulations au niveau transcriptionnel.

4.3.3 Comparaison de profils d'expression associés à PyLT-Ag et SV40LT-Ag

Parce que PyLT-Ag et SV40LT-Ag sont tellement similaires au niveau fonctionnel, il devenait intéressant de comparer les gènes candidats identifiés dans notre étude avec ceux potentiellement identifiés dans un contexte impliquant SV40TL-Ag. Cette comparaison pouvait nous permettre d'identifier des événements fortement conservés entre les deux souches virales et donc relativement importants. Puisque nous ne possédions pas de données brutes concernant SV40LT-Ag dans le laboratoire, j'ai été chanceux de pouvoir récupérer les données brutes d'une expérience utilisant la technologie Affymetrix réalisée par un autre laboratoire. Dans leur modèle, ce laboratoire utilise les cellules embryonnaires de souris pour étudier les effets de la méthylation sur les profils d'expression globale cellulaires dans un contexte p53 déficient (Jackson-Grusby et al., 2001). Ils ont mis au point un système basé sur une ablation inductible de la méthylase cellulaire Dnmt1 en utilisant le système Cre-Lox. Dans ce modèle, ils peuvent comparer des cellules parentales portant le gène Dnmt1 fonctionnel flanqué par des sites Lox avec les mêmes cellules infectées par un virus exprimant la recombinaise Cre pour causer l'inactivation de Dnmt1. Dans ce système modèle, les auteurs analysent la perte d'expression de Dnmt1 combinée avec la surexpression de la recombinaise Cre. Ceci parce que les cellules parentales utilisées pour l'analyse sont aussi infectées par un virus ne produisant pas la recombinaise

Cre. Ce système a été développé simultanément dans deux systèmes considérés comme étant p53 déficient. Des fibroblastes murins embryonnaires (Mefs) déficients pour le suppresseur de tumeur p53 et des Mefs sauvages exprimant SV40LT-Ag. Bien que SV40LT-Ag inactive p53, il accomplit aussi une multitude d'autres fonctions ce qui en fait un choix douteux dans ce modèle. Les auteurs ont donc généré deux groupes de données (groupe 1 : Mefs/p53- et Mefs/p53-/Dnmt1-) (groupe 2 : Mefs/SV40LT-Ag et Mefs/SV40LT-Ag/Dnmt1-) où chaque sous-groupe est composé de quatre échantillons indépendants (16 échantillons au total).

Puisque nous sommes intéressés exclusivement dans les événements associés à l'expression de SV40LT-Ag, j'ai récupéré les données brutes des quatre échantillons des sous-groupes Mefs/p53- et Mefs/SV40LT-Ag. Puisqu'ils ont été générés sur la même plateforme Affymetrix que celle que nous avons utilisée j'ai re-normalisé les données selon nos critères et comparé ces deux groupes. La comparaison finale relève donc les différences entre des Mefs négatives pour p53 et des Mefs exprimant SV40LT-Ag. Les gènes candidats générés par cette analyse ont été confrontés à ceux qui sont générés par notre analyse impliquant PyLT-Ag. Les résultats de cette comparaison sont rapportés dans le chapitre III, figure 4.

4.3.4 Comparaison des profils d'expression associés aux oncogènes viraux entre des plateformes expérimentales différentes

Parce que mon analyse comparée entre les modèles NIH3T3-PyLT-Ag et Mefs-SV40LT-Ag avait très bien fonctionné, j'ai décidé d'appliquer cette stratégie à plus d'un système modèle. La rationnelle derrière cette analyse étant que les candidats qui vont être conservés entre des plateformes expérimentales et fonctionnelles très différentes vont être probablement très importants au niveau de la biologie de ces modèles. Ceci permet, encore une fois de réduire le nombre de gènes candidats intéressants à tester par des méthodes plus

traditionnelles. Par exemple, cette analyse m'a permis de ressortir une trentaine de gènes intéressants parmi une liste étendue de 700 candidats originaux dans l'étude des Mefs-E1A-Ras (Vasseur et al., 2003). Cette analyse comparée révèle aussi l'incroyable capacité de ces profils d'expression à aller chercher des familles de gènes ou des gènes individuels qui sont connus pour interagir directement avec les LT-Ag ou qui ont été extensivement décrits comme participants à des phénotypes biologiques modulés par ceux-ci. Ces observations nous donnent beaucoup de confiance quant à la valeur des autres gènes avec des fonctions encore inconnues qui font partie de ces groupes et vont nous permettre de cibler certains candidats pour des études futures. Voici donc une description des différents modèles que j'ai utilisés pour mes comparaisons.

Le modèle des Mefs exprimant SV40LT-Ag a été décrit à la section précédente. Dans ce modèle, les auteurs comparent des Mefs immortalisés spontanément et déficients en p53 avec des Mefs transformés et immortalisés par SV40LT-Ag (quelque part entre l'étape 2-3 comparée avec l'étape 4 de la figure 3, chapitre I). Nous avons aussi utilisé trois autres modèles pour valider ou comparer les candidats générés par notre étude avec PyLT-Ag. Dans le premier modèle, une analyse sur une plateforme Affymetrix compare des Mefs avec des Mefs exprimant les oncogènes E1A-Ras (Vasseur et al., 2003). Dans cette étude, les auteurs comparent donc des cellules primaires avec des cellules complètement transformées (étape 1 comparée à l'étape 4 de la figure 3, chapitre I). Dans un second modèle, une analyse sur une plateforme Affymetrix compare des échantillons de tissus prostatiques à divers stades de la progression cancéreuse dans un modèle de souris transgéniques exprimant SV40LT-Ag spécifiquement dans la prostate (Hu et al., 2002). Parce que le niveau d'expression de SV40LT-Ag devient de plus en plus fort au cours de la progression cancéreuse dans ce modèle, il est fort probable que cette analyse met en évidence des gènes modulés par SV40LT-Ag. Finalement, nous avons utilisé un modèle de souris transgéniques exprimant PyLT-Ag sous le contrôle de la kératine 19 (Lebel et al.,

1995). Dans ce modèle, nous avons comparé des organes normaux, sans masses tumorales, mais exprimant PyLT-Ag avec leurs contreparties prélevées sur des souris sauvages. Nous avons utilisé des méthodes plus traditionnelles pour adresser les variations au niveau de l'expression des gènes incluant les analyses de buvardage de Western et de Northern. Ici, la comparaison nous permet de confirmer la modulation de certains de nos gènes candidats dans un contexte prénéoplasique associé à l'expression de PyLT-Ag (comparaison entre les étapes 1 et 3 de la figure 3, chapitre I, mais au niveau de tissus). La compilation de ces comparaisons est rapportée dans la figure 4, chapitre III.

En fait, étant donné la grande variabilité biologique, mais surtout expérimentale des systèmes modèles que j'ai comparés, il est assez surprenant d'avoir réussi à identifier autant de candidats communs. Ceci soulève la possibilité que ces oncogènes viraux modulent de façon reproductible des nombres relativement restreints de gènes cellulaires et qu'il est probablement possible de les identifier avec précision. L'identification de ces gènes pourrait nous aider à comprendre dans les moindres détails les événements qui sont nécessaires à la progression carcinogénique multiples étapes; du moins dans ces modèles. La stratification du statut des différentes comparaisons parmi une échelle de carcinogenèse multiples étapes nous permet aussi de cibler des étapes très spécifiques de cette progression (voir les différentes étapes de la figure 3, chapitre I). Armé de notre hypothèse sur la contribution de PyLT-Ag à la transformation précoce ainsi que de la connaissance spécifique des activités immortalisantes et transformantes des divers oncogènes que nous avons étudiés, nous pouvons déterminer les événements conservés qui se chevauchent entre ces analyses et qui peuvent représenter des candidats particulièrement intéressants pour notre concept de transformation précoce. Les plus intéressants de ces candidats sont décrits à la section 4.3.5.

À propos des comparaisons de cette étude, il faut noter qu'étant donné que SV40LT-Ag et E1A sont respectivement des oncogènes de virus simiens et humains, il est fort probable que ceci affecte le patron d'expression qu'ils sont capables de générer dans des cellules murines. Puisque PyLT-Ag est un oncogène originaire d'un virus murin, il est probable que son profil d'expression dans les systèmes modèles que j'ai utilisés est celui qui se rapproche le plus de la réalité. Ceci peut aussi expliquer pourquoi l'étude E1A-Ras et l'analyse que j'ai faite pour SV40LT-Ag étaient plus similaires entre elles qu'elles le sont avec mon analyse pour PyLT-Ag. Les deux analyses E1A-Ras et SV40LT-Ag ont aussi été réalisées dans le même type de cellules, les Mefs. Finalement, il faut noter que l'analyse comparée qui relève le plus de similarité concerne les deux modèles SV40LT-Ag, ou plus de 30 % des candidats chez la souris transgénique SV40LT-Ag se retrouvent dans les Mefs-SV40LT-Ag. Résultats surprenants puisque l'une des études utilise des tissus mixtes de prostates alors que la seconde utilise des fibroblastes embryonnaires en culture cellulaire. Cette constatation valide une fois de plus l'utilisation de modèles de culture cellulaire pour identifier des événements qui peuvent se produire *in vivo*.

4.3.5 Les familles de gènes modulées par les LT-Ag

Notre étude a identifié une multitude de gènes candidats incluant plusieurs familles de gènes impliqués dans des processus métaboliques cellulaires variés. Il est intéressant de constater que cette étude s'est validée d'elle-même puisque nous avons identifié plusieurs candidats qui étaient déjà connus pour être modulés par les LT-Ag ou qui pouvaient facilement être prédits comme étant modulés. Ces candidats sont mentionnés de façon détaillée dans le chapitre III. J'aimerais quand même attirer l'attention sur quelques candidats particulièrement intéressants qui ont été modulés dans plus d'une plateforme d'analyse.

4.3.5.1 Necdin

Les gènes du groupe A (chapitre III figure 3) représente les gènes candidats qui sont fortement modulés par PyLT-Ag de façon reproductible ainsi que ceux qui sont modulés de façon proportionnelle au niveau d'expression de PyLT-Ag. Necdin, qui est notre gène candidat principal du groupe A, est aussi celui qui a fait le mieux dans la validation indépendante sur un groupe de 15 clones supplémentaires de cellules NIH3T3. Dans cette validation, nous avons observé une corrélation de 100 % entre l'expression de PyLT-Ag et la modulation de Necdin. Validant de plus l'approche que nous avons utilisée pour forcer l'identification de gènes avec une valeur fonctionnelle, il appert que Necdin possède déjà une histoire en association avec les LT-Ag. Necdin est décrit comme étant un marqueur de différenciation terminale neuronale et aussi comme un gène fonctionnellement similaire à ceux de la famille pRb's (Taniura et al., 1998). Le produit protéique de ce gène peut interagir avec p53, E2F, E1A et surtout, SV40LT-Ag. Cette dernière interaction a été démontrée dans les cellules de singe COS-7 en surexprimant la protéine Necdin sauvage pleine longueur. Les cellules COS-7 expriment déjà de forts niveaux de SV40LT-Ag. Cette interaction a aussi été démontrée par double hybride de levure (Taniura et al., 1998). Au chapitre III j'ai démontré que Necdin est modulé positivement par l'expression des LT-Ag dans le cerveau des souris transgéniques K19-LT, dans la prostate des souris transgéniques SV40LT-Ag et dans les cellules fibroblastes de souris NIH3T3. Il est intéressant de constater que l'activité de suppression de croissance de Necdin fut identifiée dans les cellules NIH3T3. Dans cette étude, une surexpression de Necdin cause l'arrêt de croissance des NIH3T3 (Hayashi et al., 1995). Bien que nous observions la surexpression de Necdin dans plusieurs des modèles que nous avons étudiés, elle ne corrèle jamais avec un arrêt de croissance, au mieux avec un effet complètement contraire. Il est donc possible que la présence des LT-Ag puisse non seulement causer la surexpression de Necdin mais aussi son inactivation. Effectivement, il est difficile d'envisager pour quelle raison PyLT-Ag induirait directement l'expression de Necdin puisque ce gène est un suppresseur de la croissance cellulaire. Dans ces conditions, est-il possible que Necdin puisse être régulé positivement

dans un mécanisme de bouclage (feedback loop) en réponse à la présence de PyLT-Ag? Puisque l'on pense que Necdin a des fonctions biologiques similaires à celles des pRb's et agit en tant que suppresseur de croissance, il est possible que son niveau d'expression soit augmenté pour supprimer la croissance en réponse à une entrée non désirable ou forcée dans le cycle cellulaire. La présence de PyLT-Ag place certainement la cellule hôte dans cette situation.

Pour adresser ces questions intéressantes, nous avons construit des protéines de fusion GFP-Necdin et Flag-Necdin. Ces protéines de fusion contiennent une petite délétion en amino-terminal, mais la même délétion n'a causé aucun effet détectable dans les études précédentes incluant l'interaction avec SV40LT-Ag. En accord avec l'observation publiée, la surexpression de GFP-Necdin ou de Flag-Necdin cause un phénotype immédiat dans les cellules NIH3T3 et TM4. Par contre, bien que nous ayons observé un arrêt de croissance évident nous observons plutôt une mort cellulaire massive puisque la fluorescence est perdue dans les cellules qui adhèrent au pétris et est remplacée par une augmentation des cellules flottantes fluorescentes. La perte totale de la fluorescence dans les cellules transfectées avec GFP-Necdin se produit en 72 heures, tandis que les cellules-contrôles transfectées par GFP seule étaient encore bien fluorescentes 7 jours plus tard. Il fut intéressant de constater que les clones NIHLT46, NIHLT50 et TM4-PGKLT5 transfectés avec GFP-Necdin et exprimant tous PyLT-Ag ont démontré une perte beaucoup plus graduelle de la fluorescence avec quelques cellules encore fluorescentes 7 jours après la transfection. Cette observation démontre clairement que la présence de PyLT-Ag dans les cellules NIH3T3 et TM4 est suffisante pour protéger ces cellules contre la mort cellulaire induite par la surexpression de Necdin. Malheureusement, nous n'avons pas été capables de reproduire l'interaction entre Necdin et SV40LT-Ag observée précédemment dans les cellules de singes COS-7 en utilisant la construction GFP-Necdin. Similairement, bien que nous ayons été capables de détecter une très faible interaction entre GFP-Necdin et PyLT-

Ag dans les cellules TM4 et NIH3T3, nous n'avons pas pu reproduire cette interaction avec la construction Flag-Necdin. Finalement, la localisation intracellulaire de GFP-Necdin bien que nucléaire se retrouve dans des petites structures ponctuelles qui sont exclues de la distribution de GFP-PyLT-Ag (probablement les nucléoles). En résumé, nous détectons facilement une synergie fonctionnelle entre PyLT-Ag et Necdin puisque PyLT-Ag protège contre l'arrêt de croissance et l'apoptose induite par Necdin, mais nous ne détectons pas d'interaction directe sinon une interaction très faible entre Necdin et PyLT-Ag. Puisque Necdin semble avoir des fonctions biologiques intéressantes et est modulée par les LT-Ag dans plusieurs contextes différents incluant des tissus normaux et des modèles de carcinogénèse *in vivo* nous allons poursuivre l'étude de ce gène candidat.

4.3.5.2 Le cytosquelette d'actine

Parmi les meilleurs gènes candidats du groupe A qui sont modulés négativement par PyLT-Ag se retrouvent quatre gènes reliés à la régulation du cytosquelette d'actine : Transgeline, α -sm-actin, Destrin et Eplin. Particulièrement, α -sm-actin qui est l'actine impliquée dans la formation des fibres d'actine de stress et Transgeline est un gène essentiel pour la régulation de la polymérisation de ces fibres d'actine de stress, mais aussi de l'actine en général.

Comme dans le cas de Necdin l'identification de Transgeline permet une validation de nos gènes candidats dans un modèle complètement indépendant et déjà publié. Dans ce modèle, les auteurs utilisent un mutant thermosensible de SV40LT-Ag (Tsa) pour identifier des événements associés à la sénescence cellulaire (Gonos et al., 1998). En effet, l'inactivation de Tsa dans des cellules des fibroblastes de rat l'exprimant depuis plusieurs générations génère un phénotype similaire au phénotype de sénescence, un arrêt de croissance permanent et irréversible. Les auteurs utilisent donc ce modèle pour comparer

les cellules non sénescents exprimant encore Tsa et les cellules sénescents ayant perdu l'expression de Tsa. Dans ce modèle, il est facile d'envisager que l'inactivation subite de SV40LT-Ag génère une activité massive de p53 et des pRb's qui peuvent immédiatement engager la voie de la sénescence cellulaire. Par contre, puisque les cellules de ce modèle perdent l'expression de SV40LT-Ag il est fort probable que des événements associés directement à la présence de SV40LT-Ag sont détectés. Effectivement, après une étude d'étalage différentiel de produits de PCR similaires à celle utilisée pour identifier FasR et les TDE, le candidat le plus intéressant identifié se nomme SM22a, plus tard renommé Transgelin. Il semble donc que la présence des LT-Ag régule négativement Transgelin et que cette présence soutenue soit absolument essentielle pour maintenir de bas niveaux de Transgelin.

Notre deuxième meilleur candidat dans ce groupe relié au cytosquelette d'actine, α -sm-actin, suit de façon extrêmement précise les patrons d'expression de Transgelin. Ceci suggère que les deux gènes soient toujours régulés simultanément dans le modèle cellulaire des NIH3T3 que nous avons utilisé. Il est intéressant de noter ici la synergie fonctionnelle entre ces deux gènes. Alors qu' α -sm-actin représente les blocs de construction des fibres de stress, ces fibres sont assemblées par l'activité de Transgelin. Ceci représente un excellent exemple du concept que nous avons utilisé précédemment qui stipule que les produits géniques interagissant directement ensemble ou travaillant à l'intérieur d'une même voie métabolique sont souvent co-régulés au niveau transcriptionnel. Parce qu'aucun anticorps n'était commercialement disponible contre Transgelin mais que des excellents anticorps contre α -sm-actin et les autres isoformes de l'actine étaient disponibles, nous avons décidé d'investiguer en détail la régulation du cytosquelette d'actine dans les cellules NIH3T3 en présence et en absence de PyLT-Ag. En résumé, la présence de PyLT-Ag dans les cellules NIH3T3 cause une perte d'expression d' α -sm-actin et de Transgelin. Bien que nous ne détectons pas de diminution de l'actine en général avec un anticorps qui détecte

tous les isoformes de cette protéine, il est clair que la structure des filaments du cytosquelette est perturbée. Possiblement, par la perte de Transgeline qui est un élément impliqué dans la polymérisation de toutes les fibres d'actine. Il est intéressant de constater que l'actine bêta cytoplasmique semble être augmentée par la présence de PyLT-Ag. La régulation de α -sm-actin par PyLT-Ag semble donc être une régulation qui est très spécifique à cet isoforme. À ce sujet, il est intéressant de constater que parmi les populations de cellules NIH3T3 exprimant PyLT-Ag il y a toujours quelques cellules isolées qui sont positives pour α -sm-actin. Cette sous-population est phénotypiquement distincte puisqu'elle possède de belles fibres de stress, un cytoplasme ainsi qu'un noyau d'une grande surface (plus de deux fois les autres cellules) et elle ne semble pas se diviser. En fait, malgré plusieurs essais, il fut impossible d'isoler un clone pur de cette sous-population cellulaire. Avec un peu de recul, il est fort probable que ces cellules représentent en fait des cellules parmi la population qui ont perdu l'expression de PyLT-Ag. La perte de PyLT-Ag similairement à la perte de SV40LT-Ag dans le modèle décrit précédemment pourrait diriger la cellule vers la sénescence et réactiver l'expression de la Transgeline et de l' α -sm-actine. Ceci représente une réponse spécifique à la perte d'expression des LT-Ag et pourrait faire partie d'un phénotype associé à la sénescence cellulaire.

Telle que décrite dans le chapitre III, cette fonction spécifique de PyLT-Ag dans la régulation du cytosquelette cellulaire peut avoir un rôle important à jouer au cours de la transformation cellulaire. La littérature regorge d'exemple démontrant que la structure du cytosquelette est altérée dans les cellules cancéreuses. Il est aussi clair que la transformation cellulaire par les virus de la famille de polyome cause une perturbation du cytosquelette (Koffer et al., 1985) (Koffer and Edgar, 1989). Notre étude représente la première démonstration que cette activité peut être associée directement avec PyLT-Ag, mais pas de façon exclusive, puisque d'autres ont démontré une association entre cette activité et PyMT-Ag ou SV40ST-Ag (da Costa et al., 2000; Nunbhakdi-Craig et al., 2003). Ceci soulève la possibilité que le domaine CR1 amino-Terminal soit impliqué dans la

régulation du cytosquelette puisqu'il est le seul domaine fonctionnel conservé entre les trois protéines. Voici d'ailleurs une observation intéressante concernant la régulation transcriptionnelle de α -sm-actin par les T-Ag. Puisque PyLT-Ag régule l'expression de α -sm-actin et Transgelin de façon tellement similaire il est possible qu'un groupe de gènes associés aux muscles lisses en général soient aussi modulés négativement par les autres T-Ag. Supportant cette hypothèse, il est impossible d'exprimer PyMT-Ag sous le contrôle d'un promoteur de α -sm-actin chez des souris transgéniques (Moghal et al., 1995). Se pourrait-il que seulement les cellules de muscle lisse n'exprimant pas de T-Ag puissent survivre *in vivo*? Notre étude est aussi la première à identifier les isoformes spécifiques de l'actine qui sont modulés ainsi que les gènes fonctionnels comme Transgelin qui peuvent médier la perte des structures. Bien que nous soulevions le lien entre cette perturbation du cytosquelette et le développement du cancer, il faut se souvenir qu'originellement cette fonction est probablement associée avec tous les T-Ag parce que la perturbation du cytosquelette cellulaire est connue pour être impliquée lors de l'infection virale (Gilbert et al., 2003).

4.3.6 La dichotomie entre les modèles de souris et le cancer humain

Jusqu'ici nous avons identifié plusieurs gènes candidats ou même des phénotypes cellulaires complexes potentiellement associés à la transformation précoce dans un modèle de culture cellulaire murine. Malheureusement, certaines différences essentielles existent entre les cellules de rongeurs et les cellules humaines et ces différences peuvent prévenir la corrélation directe entre les observations réalisées sur des cellules murines et ce qui se produit dans des cellules humaines. En théorie, une meilleure compréhension des différences entre les cellules humaines et les cellules de rongeurs peut nous permettre d'évaluer à quel point les gènes identifiés comme candidats dans des modèles murins peuvent être applicables chez l'homme. Ici, j'essaie de résumer ces différences pour nous permettre de mieux replacer nos découvertes dans un contexte humain.

Les fibroblastes de souris possèdent de longs télomères et expriment la télomérase de façon constitutive tandis que les cellules humaines n'expriment pas la télomérase et possèdent des télomères beaucoup plus courts. Cette différence essentielle établit que les cellules humaines peuvent entrer en sénescence répllicative lorsque les télomères deviennent trop courts alors que ceci ne se produit jamais chez les cellules de souris. De façon surprenante, les cellules de souris en culture sénescent beaucoup plus rapidement que les cellules humaines et ce dans des conditions similaires (Wright and Shay, 2000). C'est cette durée de vie très longue de certaines cellules humaines qui a été exploitée pour démontrer qu'il est possible de transformer ces cellules et de leur faire former des tumeurs en souris nues en absence d'immortalisation. Si les cellules humaines transformées issues de ces tumeurs en souris nues sont re-cultivées, elles s'immortaliseront en activant la télomérase ou certains mécanismes alternatifs de maintenance des télomères (Seger et al., 2002). Ceci démontre clairement que les processus d'immortalisation et de transformation sont entrelacés et peuvent se produire simultanément mais qu'ils sont aussi individuellement indépendants. C'est une observation critique qui permet aussi de séparer les deux phénomènes quant à leur importance pour la formation d'une tumeur.

Bien que l'expression de la télomérase soit suffisante pour immortaliser les cellules humaines, il est aussi nécessaire de les cultiver dans des conditions appropriées. Cette particularité se nomme en anglais le "culture shock", et signifie que n'importe quelle cellule humaine s'immortalisera en présence de télomérase et des bonnes conditions de culture (Sherr and DePinho, 2000). Par contre, si les conditions de culture ne sont pas optimales il est possible que le "culture shock" induise la sénescence même en présence de télomérase. Cette règle s'applique directement aux cellules murines, mais puisqu'elles expriment déjà la télomérase, un simple ajustement aux bonnes conditions de culture cellulaire est suffisant pour générer l'immortalisation. Il faut noter que les cellules murines sont beaucoup plus sensibles au "culture shock" si on les compare aux cellules humaines et

cela explique pourquoi elles sénescent rapidement en culture primaire. Cette différence s'explique par la sensibilité accrue des cellules murines au stress oxydatif causé par l'oxygène. Si les cellules murines sont cultivées dans des conditions d'oxygène qui sont plus près des niveaux physiologiques rencontrés *in vivo*, 3 % au lieu de 20 % dans des incubateurs conventionnels, elles seront immortelles et ne sénescent jamais (Parrinello et al., 2003). Pour diverses raisons, il semble que les cellules humaines sont beaucoup plus résistantes que les cellules murines au stress oxydatif, ce qui leur permet de survivre plus facilement à des concentrations de 20 % en oxygène. Ceci nous permet de comprendre que l'immortalisation spontanée chez les cellules de souris est un phénomène complètement différent de ce qui doit se produire chez des cellules humaines. Alors que les fibroblastes de souris doivent simplement surmonter leur sensibilité au stress oxydatif, les cellules humaines doivent réactiver un mécanisme complexe de maintenance des télomères. Il est probable que l'immortalisation spontanée des cellules de souris se produit à une fréquence plus élevée que celle des cellules humaines, qui ne se produit presque jamais, parce que l'acquisition d'une résistance au stress oxydatif est un événement moins stringente que l'acquisition d'un mécanisme pour élonger les télomères. Dans ce contexte, il est probable que les oncogènes murins immortalisant comme E1A, PyLT-Ag et SV40LT-Ag favorisent une résistance au stress oxydatif et protègent contre le "culture shock" pour permettre une immortalisation rapide des cellules murines. Par exemple, PyLT-Ag peut permettre la survie des cellules de rongeurs en condition de faible sérum ainsi qu'une protection anti-apoptotique. Ces deux activités combinées avec l'inactivation des pRb's peuvent clairement favoriser l'acquisition d'un rythme de croissance accéléré et la résistance au stress oxydatif. Ceci serait suffisant pour expliquer l'augmentation du taux d'immortalisation spontanée observée avec tous ces oncogènes viraux. Bien que ces oncogènes puissent aussi conférer une résistance au stress chez les cellules humaines, ces dernières nécessitent quand même l'activation supplémentaire d'un mécanisme de maintenance des télomères pour pouvoir surmonter la sénescence. Parce que l'immortalisation des cellules humaines implique seulement l'expression de la télomérase et n'est tout simplement pas nécessaire à la

transformation, il devient intéressant d'identifier les événements minimaux favorisant la transformation d'une cellule humaine. Il appert que plusieurs groupes ont récemment tenté de déterminer ces événements de façon grossière en utilisant principalement des oncogènes viraux. Dans le premier de ces modèles, l'expression de SV40LT-Ag, de SV40ST-Ag et de l'oncogène Ras fut suffisante pour causer la transformation (Hahn and Weinberg, 2002). Parce que SV40LT-Ag inactive aussi p53 il est probable que cet événement était important dans ce modèle. Effectivement, dans une étude indépendante, une dissection plus fine révèle que les trois oncogènes essentiels à la transformation humaine furent l'oncogène viral E1A, le gène mdm2 qui inactive p53 et l'oncogène Ras (Seger et al., 2002). Ainsi, on peut résumer les activités nécessaires à transformer une cellule humaine à l'inactivation du suppresseur de tumeur p53, à l'expression de l'oncogène cellulaire Ras qui confère des caractéristiques agressives à la cellule et finalement à l'expression de l'oncogène viral E1A. L'expression de E1A confère l'inactivation des pRb's mais aussi plusieurs autres activités pour la plupart inconnues. Parce que tous les domaines de E1A connus pour être essentiel à la transformation humaine, incluant le domaine d'inactivation des pRb's, sont absolument conservés chez PyLT-Ag, il est possible que PyLT-Ag puisse remplacer fonctionnellement E1A dans ce modèle. Ceci suggère que l'identification d'événements associés à PyLT-Ag et indépendants de l'immortalisation dans un modèle murin peuvent être directement corrélés à des événements importants pour le cancer chez l'humain.

4.3.7 Plusieurs candidats identifiés dans notre étude sont associés à des cancers humains

Puisque nous pensons que les événements que nous pouvons identifier dans un modèle de culture cellulaire peuvent nous permettre d'identifier de nouveaux gènes reliés au développement du cancer et que de façon plus précise ceux-ci pourraient représenter des événements précoces de la transformation, qu'en est-il de nos meilleurs candidats? Peuvent-ils être associés à des cancers humains? La réponse est simple, oui. Tel que discuté

dans la conclusion du chapitre III, nos candidats associés à la régulation du cytosquelette d'actine tels que Transgelin, Eplin et Destrin ont tous été associés avec divers cancers humains. Si notre modèle est valide, ces gènes pourraient potentiellement être considérés comme des marqueurs précoces de la transformation cellulaire et du cancer. Il est intéressant de noter ici le cas d'un candidat qui est modulé dans tous les systèmes modèles étudiés sauf notre modèle avec PyLT-Ag. Stathmin est un gène qui est lui aussi associé à la régulation du cytosquelette et qui est associé avec des cancers humains (Mistry and Atweh, 2002). C'est aussi un gène qui est déjà connu pour être augmenté au cours de l'immortalisation cellulaire (Mistry and Atweh, 1999). Les modèles que nous avons étudiés dans le contexte de SV40LT-Ag et E1A ont tous comparé des cellules normales non immortalisées avec leurs contreparties immortalisées et transformées. Ceci explique l'identification de Stathmin dans tous ces modèles. Puisque les cellules NIH3T3 étaient préalablement immortalisées, nous n'avons pas détecté d'événements associés à l'immortalisation en induisant l'expression de PyLT-Ag. En fait, les NIH3T3 expriment déjà des niveaux de Stathmin comparables à ceux très élevés induits par SV40LT-Ag et E1A-Ras dans les deux autres modèles de culture cellulaire avec les Mefs primaires. Cette observation, même si elle ne peut valider à elle seule notre modèle de segmentation de la carcinogenèse multiple étapes, supporte fortement l'association entre les événements que nous avons identifiés et la transformation précoce plutôt qu'avec l'immortalisation.

4.3.8.1 Perspectives reliées à l'apoptose

Localisation du/des domaines anti-apoptotiques de PyLT-Ag

PyLT-Ag étant une protéine virale polyvalente, elle possède plusieurs domaines fonctionnels. La localisation du ou des domaines fonctionnels impliqués dans l'activité anti-apoptotique va donc nous permettre de mieux caractériser cette nouvelle fonction. Nous

possédons présentement une banque de mutants de PyLT-Ag que j'ai déjà exprimés de façon stable dans les cellules TM4 et NIH3T3 pour déterminer les domaines importants pour la protection anti-apoptotique. En effet, la lignée cellulaire qui exprimera un mutant de PyLT-Ag ne la protégeant plus de l'apoptose nous signalera une portion de la protéine importante pour cette protection. Notre banque de mutants comprend des fusions avec le rapporteur eGFP, des délétions amino-terminale et carboxy-terminale, des délétions internes ainsi que plusieurs mutations ponctuelles dans des régions clés de la protéine comme le domaine de liaison à pRb ou le domaine de localisation nucléaire (Pilon et al., 1996). Malgré son importance, nous ne pensons pas que le domaine de liaison à pRb soit impliqué dans la protection anti-apoptotique. pRb en lui-même est un inhibiteur général de l'apoptose grâce à sa fonction de lier E2F1 et de freiner le cycle cellulaire en G1. L'activité immortalisante de PyLT-Ag est reliée à cette capacité de lier pRb et de relâcher E2F1 pour permettre à la cellule de rester dans le cycle cellulaire actif. Parce qu'une activité soutenue de E2F1 induit l'apoptose (Ginsberg, 2002; Knezevic and Brash, 2004), la capacité de lier pRb de PyLT-Ag favorise en quelque sorte l'apoptose et résulte en une activité théorique contraire à ce que nous cherchons à observer. Il serait intéressant de voir si dans les mutants qui ne lient plus pRb nous allons quand même observer une protection contre l'apoptose mais un arrêt du cycle cellulaire dans une autre phase que S puisque pRb sera libre. Si, toutefois, il s'avérait que le domaine de liaison à pRb est important, nous disposons de plusieurs mutants nous permettant d'adresser clairement cette question incluant des mutants qui ne lient plus pRb, qui le lient à des niveaux très variables et aussi des mutants qui lient pRb mais ne font pas relâcher E2F1.

L'utilisation du double hybride est aussi une option intéressante pour déterminer quelles protéines interagissent avec le/les domaines actifs de PyLT-Ag dans la protection contre l'apoptose. Plusieurs groupes ont déjà fait des essais extensifs de co-

immunoprécipitation avec PyLT-Ag, mais aucun ne semble avoir cherché à identifier des protéines inconnues par deux hybrides. Le but visé des différents essais était plutôt de confirmer des interactions avec des protéines déjà connues, telles que : pRb, p53 et les différentes cyclines. Un problème rencontré ici est que PyLT-Ag étant une protéine virale polyvalente, il semble interagir avec une multitude de facteurs cellulaires qui compliquent l'interprétation des résultats. Pour réduire le nombre de candidats nous pourrions donc faire un double hybride avec la protéine sauvage, mais aussi avec la portion minimale de la protéine nécessaire pour médier l'effet anti-apoptotique, que nous aurons préalablement identifié avec les mutants.

Modèle de souris transgéniques MMTV-PyLT/lpr-/-

Parce que nous proposons que la perte d'expression de FasR est un événement qui contribue tardivement à la progression cancéreuse dans les adénomes testiculaires des souris MMTV-LT, un croisement direct entre ces souris et des souris déficientes pour l'activité de FasR devrait augmenter l'incidence ou la rapidité d'apparition de ces cancers. Nous avons déjà entrepris dans le laboratoire les croisements rétrogrades nécessaires pour transférer la mutation homozygote lpr inactivante de FasR dans la souche murine appropriée. Parce que nous utilisons la souche de souris FVB pour nos études, il est nécessaire de faire 7 à 8 croisements rétrogrades pour obtenir un maximum de 1 % de contamination génomique provenant de la souche originale de souris pour la mutation lpr, les C57/BL6. Quand ces croisements seront complétés, un croisement entre les souris FVB-Lpr et les souris FVB-MMTV-LT devrait nous permettre d'adresser la question de la synergie entre FasR et PyLT-Ag lors de la progression néoplasique.

4.3.8.2 Perspectives reliées aux candidats associés à la transformation précoce par PyLT-Ag

En utilisant les mêmes mutants que ceux décrits dans les perspectives pour les domaines reliés à la protection apoptotique il est possible de déterminer quels domaines fonctionnels de PyLT-Ag sont responsables de la modulation transcriptionnelle des différents candidats identifiés. Particulièrement pour cette étude, l'utilisation des candidats reliés à la modulation du cytosquelette cellulaire devrait permettre une progression rapide. Principalement parce que nous possédons de bonnes sondes pour analyser l'ARN qui est fortement exprimé, parce que nous possédons des anticorps contre plusieurs de ces protéines et surtout, parce que le phénotype est très facile à observer en culture cellulaire. Bien que les études avec Necdin soient plus difficiles à réaliser parce que l'anticorps n'est pas disponible et que les niveaux d'ARN messagers sont relativement bas, les réponses que nous pouvons trouver seront particulièrement informatives. Entre autres, cette étude nous permettra de déterminer si le domaine de liaison au pRb's, qui doit aussi possiblement lier et inactiver Necdin, est responsable de sa surexpression en présence de PyLT-Ag. Un résultat positif, démontrant que ce domaine est responsable de l'inactivation et de la surexpression, serait très favorable à l'hypothèse d'une boucle de réponse cellulaire à la présence de PyLT-Ag.

Principalement dans cette étude nous avons proposé que le rôle de PyLT-Ag ne soit pas limité à l'immortalisation dans les modèles de souris transgéniques et qu'il puisse contribuer certains événements de la transformation précoce. Ces événements seraient indépendants, mais possiblement associés à sa capacité d'augmenter l'immortalisation. Il serait essentiel de tester cette possibilité en générant des souris transgéniques exprimant des mutants de PyLT-Ag déficients pour l'immortalisation *in vitro*. Si PyLT-Ag contribue des événements indépendants de l'immortalisation, ces souris transgéniques devraient développer des tumeurs en absence de l'activité immortalisante de PyLT-Ag. Dans ce

contexte, comme mentionné lors de ma discussion sur la modulation du cytosquelette d'actine, il est possible que le site de liaison aux pRb's contribue en fait beaucoup plus que la simple immortalisation cellulaire et soit important pour nos événements de transformation précoce. Les souris transgéniques avec ces mutants de PyLT-Ag restent quand même la meilleure façon de tester cette hypothèse.

Il est clair que l'étape finale de la validation du travail présenté dans cette thèse reste la confirmation que certains des gènes identifiés dans cette étude sont modulés durant la progression tumorale humaine. Puisque plusieurs des gènes candidats identifiés dans cette étude sont déjà fortement associés ou directement impliqués dans la progression tumorale humaine, il y a lieu de penser que les candidats inconnus peuvent avoir un rôle intéressant à jouer et ceci potentiellement de façon assez précoce lors de la maladie humaine. Nous devons donc comparer les gènes candidats de notre groupe de données avec plusieurs modèles de progression cancéreuse humaine. Transformant cette approche en quelque chose de plus qu'une validation, il devient intéressant de porter un intérêt particulier pour les gènes avec des fonctions encore inconnues. Ces gènes ne peuvent présentement pas être facilement identifiés directement dans les modèles humains puisqu'ils sont cachés parmi les centaines de candidats identifiés par ces études génomiques et que l'intérêt est porté en premier sur les gènes déjà annotés.

Conclusion

Nous avons présenté divers modèles où il est possible d'identifier des événements qui sont associés aux étapes spécifiques de la carcinogenèse. La dissection de la carcinogenèse multiples étapes que nous avons effectuée nous permet d'associer des événements de transformation précoce indépendants de l'immortalisation avec l'expression de PyLT-Ag. Lors de la carcinogenèse, il est difficile de déterminer lequel des deux phénotypes, l'immortalisation ou la transformation, vient en premier. Il est fort probable qu'ils sont complètement entrelacés et malgré tout, nos modèles utilisent une approche innovatrice pour les étudier séparément. Notre système modèle ainsi que les comparaisons inter modèles nous donnent cette habileté de corrélérer certains événements moléculaires avec des étapes spécifiques de la carcinogenèse. Parce que les différences majeures entre les cellules humaines et les cellules murines sont maintenant mieux comprises, il devient plus facile d'extrapoler les résultats obtenus dans ces systèmes modèles murins vers les cancers humains.

Bien que l'utilisation d'oncogènes viraux pour les modèles de carcinogenèse est devenue traditionnelle, il ne faut pas perdre de vue que PyLT-Ag est une protéine virale et que toutes ses fonctions spécifiques doivent ultimement avantager le virus d'une façon ou d'une autre. En effet, PyLT-Ag n'a certainement pas évolué pour être un oncogène parfait. Si on replace PyLT-Ag dans un contexte d'infection virale, on peut facilement comprendre les avantages que procure la modulation du cytosquelette cellulaire ou une protection contre l'apoptose. De même, PyLT-Ag en tant qu'oncogène viral, procure des avantages certains aux cellules prénéoplasiques. Essentiellement, les propriétés d'immortalisation de PyLT-Ag permettent à la cellule de rester dans le cycle cellulaire et de proliférer. Simultanément, on peut imaginer que la protection contre l'apoptose permet à cette cellule de survivre aux stimuli apoptotiques provenant des cellules environnantes et du système immunitaire. Contrairement à la protection contre l'apoptose, plus de travail sera nécessaire pour

associer des fonctions directes dans la carcinogenèse aux autres événements que nous avons identifiés comme la modulation du cytosquelette cellulaire ou de Necdin.

Pour terminer, j'aimerais mentionner un lien important entre l'utilisation des oncogènes viraux pour modéliser la carcinogenèse multiples étapes et le cancer humain. Tel que mentionné dans mon introduction, il est probable que près de 15% des cancers humains sont causés par les virus. Parmi ceux-ci, les virus JC et BK peuvent causer le cancer chez des individus immunosupprimés, alors que les évidences s'accumulent pour accuser SV40 dans certains cancers humains. La niche naturelle de ces virus chez l'humain n'est pas clairement définie. Bien que le consensus admette qu'on les retrouve dans les cellules épithéliales des reins chez les individus jeunes et en santé, les évidences s'accumulent et démontrent leur présence dans divers tissus incluant plusieurs tissus de types neuronaux. Il est intéressant de noter que la majorité des cellules qui peuvent être infectés par JC sont d'origine neuronale. En particulier, quelques tumeurs associées à BK ainsi que presque toutes les tumeurs associées à SV40 et JC sont d'origine neuronale (Imperiale, 2001) (Tognon et al., 2003) (Khalili et al., 2003) (Carbone et al., 2003) (Vilchez and Butel, 2003) (Barbanti-Brodano et al., 2004). Si les cellules neuronales peuvent agir comme une niche spécifique pour les infections non pathologiques persistantes des polyomavirus humains, il est possible d'envisager que les LT-Ag en général puissent moduler spécifiquement des facteurs neurologiques tels que Necdin. Pour supporter cette possibilité, il faut noter que dans tous les modèles que j'ai étudiés basés sur PyLT-Ag et SV40LT-Ag, particulièrement dans le modèle de souris transgénique SV40LT-Ag, il y a une surreprésentation de gènes candidats à caractère neuronal. Ces observations soulèvent la possibilité que les virus de la famille de Polyome aient développé une habileté à moduler les gènes de type neuronaux, et que ces types cellulaires sont particulièrement sensibles chez l'humain pour ces virus. Cette possibilité est d'autant plus intéressante qu'en absence de nécessité absolue du processus d'immortalisation pour la formation de tumeurs avec des cellules humaines, il est possible

que BKLT-Ag, JCLT-Ag ou SV40LT-Ag puissent contribuer un avantage à la progression néoplasique humaine en modulant les gènes candidats que nous avons identifiés dans notre étude. Ainsi, le type d'événements de modulation génique que nous avons identifiés, qui ne sont pas nécessairement des événements suffisants à la transformation cellulaire complète, pourrait conférer des avantages prolifératifs significatifs à ces cellules et permettre la tumorigenèse après une longue latence. Plus spécifiquement, il serait intéressant de tester cette hypothèse et d'étudier le statut de Necdin et des autres candidats que nous avons identifié dans les tumeurs humaines positives pour les LT-Ag de BK, JC ou SV40.

Bibliographie des chapitres I, IV et VI (introduction, discussion et conclusion)

Abbas, A.A., Lichtman A., et Pober J. (1994) Cellular and molecular immunology 2nd edition. Library of congress cataloging -in -pulation Data 1994

Acheson, N. H. (1981). Efficiency of processing of viral RNA during the early and late phases of productive infection by polyoma virus. J Virol 37, 628-635.

Adamczewski, J. P., Gannon, J. V., and Hunt, T. (1993). Simian virus 40 large T antigen associates with cyclin A and p33cdk2. J Virol 67, 6551-6557.

Adams, J. M., and Cory, S. (1991). Transgenic models of tumor development. Science 254, 1161-1167.

Ali, S. H., and DeCaprio, J. A. (2001). Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. Semin Cancer Biol 11, 15-23.

Appelbaum, J. W. (1992). The role of the immune system in the pathogenesis of cancer. Semin Oncol Nurs 8, 51-62.

Auersperg, N., Wong, A. S., Choi, K. C., Kang, S. K., and Leung, P. C. (2001). Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. Endocr Rev 22, 255-288.

Avantaggiati, M. L., Carbone, M., Graessmann, A., Nakatani, Y., Howard, B., and Levine, A. S. (1996). The SV40 large T antigen and adenovirus E1a oncoproteins interact with distinct isoforms of the transcriptional co-activator, p300. Embo J 15, 2236-2248.

Balducci, L., and Beghe, C. (2001). Cancer and age in the USA. *Crit Rev Oncol Hematol* 37, 137-145.

Balmain, A. (2002). Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models. *Cell* 108, 145-152.

Barbanti-Brodano, G., Sabbioni, S., Martini, F., Negrini, M., Corallini, A., and Tognon, M. (2004). Simian virus 40 infection in humans and association with human diseases: results and hypotheses. *Virology* 318, 1-9.

Barbosa, M. S., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J. T., Lowy, D. R., and Vousden, K. H. (1990). The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *Embo J* 9, 153-160.

Basak, S., Turner, H., and Compans, R. W. (1992). Expression of SV40 receptors on apical surfaces of polarized epithelial cells. *Virology* 190, 393-402.

Beasley, R. P., Hwang, L. Y., Lin, C. C., and Chien, C. S. (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 2, 1129-1133.

Bertagnolli, M. M., McDougall, C. J., and Newmark, H. L. (1997). Colon cancer prevention: intervening in a multistage process. *Proc Soc Exp Biol Med* 216, 266-274.

Bogenrieder, T., and Herlyn, M. (2003). Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 22, 6524-6536.

Bolen, J. B., Anders, D. G., Trempey, J., and Consigli, R. A. (1981). Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species. *J Virol* 37, 80-91.

Bossolasco, M., Lebel, M., Lemieux, N., and Mes-Masson, A. M. (1999). The human TDE gene homologue: localization to 20q13.1-13.3 and variable expression in human tumor cell lines and tissue. *Mol Carcinog* 26, 189-200.

Boyd, J. M., Malstrom, S., Subramanian, T., Venkatesh, L. K., Schaeper, U., Elangovan, B., D'Sa-Eipper, C., and Chinnadurai, G. (1994). Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell* 79, 341-351.

Brash, D. E. (1997). Sunlight and the onset of skin cancer. *Trends Genet* 13, 410-414.

Breau, W. C., Atwood, W. J., and Norkin, L. C. (1992). Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40 receptor. *J Virol* 66, 2037-2045.

Brodsky, J. L., and Pipas, J. M. (1998). Polyomavirus T antigens: molecular chaperones for multiprotein complexes. *J Virol* 72, 5329-5334.

Butel, J. S. (2001). Increasing evidence for involvement of SV40 in human cancer. *Dis Markers* 17, 167-172.

Campbell, K. S., Auger, K. R., Hemmings, B. A., Roberts, T. M., and Pallas, D. C. (1995). Identification of regions in polyomavirus middle T and small t antigens important for association with protein phosphatase 2A. *J Virol* 69, 3721-3728.

Campisi, J. (1997). Aging and cancer: the double-edged sword of replicative senescence. *J Am Geriatr Soc* 45, 482-488.

Campisi, J. (2003). Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer* 3, 339-349.

Carbone, M., Pass, H. I., Miele, L., and Bocchetta, M. (2003). New developments about the association of SV40 with human mesothelioma. *Oncogene* 22, 5173-5180.

Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.

Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M. S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D. M., and Moore, P. S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266, 1865-1869.

Chen, M. C., Redenius, D., Osati-Ashtiani, F., and Fluck, M. M. (1995). Enhancer-mediated role for polyomavirus middle T/small T in DNA replication. *J Virol* 69, 326-333.

Chinnaiyan, A. M., and Dixit, V. M. (1997). Portrait of an executioner: the molecular mechanism of FAS/APO-1-induced apoptosis. *Semin Immunol* 9, 69-76.

Cho, S., Tian, Y., and Benjamin, T. L. (2001). Binding of p300/CBP co-activators by polyoma large T antigen. *J Biol Chem* 276, 33533-33539.

Conzen, S. D., Snay, C. A., and Cole, C. N. (1997). Identification of a novel antiapoptotic functional domain in simian virus 40 large T antigen. *J Virol* 71, 4536-4543.

Croul, S., Otte, J., and Khalili, K. (2003). Brain tumors and polyomaviruses. *J Neurovirol* *9*, 173-182.

D'Alisa, R. M., and Gershey, E. L. (1978). Simian virus 40 T antigen binds to host cell chromosomes. *Nature* *274*, 164-166.

da Costa, S. R., Wang, Y., Vilalta, P. M., Schonthal, A. H., and Hamm-Alvarez, S. F. (2000). Changes in cytoskeletal organization in polyoma middle T antigen-transformed fibroblasts: involvement of protein phosphatase 2A and src tyrosine kinases. *Cell Motil Cytoskeleton* *47*, 253-268.

Dailey, L., and Basilico, C. (1985). Sequences in the polyomavirus DNA regulatory region involved in viral DNA replication and early gene expression. *J Virol* *54*, 739-749.

Damania, B., and Alwine, J. C. (1996). TAF-like function of SV40 large T antigen. *Genes Dev* *10*, 1369-1381.

Damania, B., Lieberman, P., and Alwine, J. C. (1998a). Simian virus 40 large T antigen stabilizes the TATA-binding protein-TFIIA complex on the TATA element. *Mol Cell Biol* *18*, 3926-3935.

Damania, B., Mital, R., and Alwine, J. C. (1998b). Simian virus 40 large T antigen interacts with human TFIIB-related factor and small nuclear RNA-activating protein complex for transcriptional activation of TATA-containing polymerase III promoters. *Mol Cell Biol* *18*, 1331-1338.

DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J. Y., Huang, C. M., Lee, W. H., Marsilio, E., Paucha, E., and Livingston, D. M. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* *54*, 275-283.

Degenhardt, K., Perez, D., and White, E. (2000). Pathways used by adenovirus E1B 19K to inhibit apoptosis. *Symp Soc Exp Biol* *52*, 241-251.

Djelloul, S., Tarunina, M., Barnouin, K., Mackay, A., and Jat, P. S. (2002). Differential protein expression, DNA binding and interaction with SV40 large tumour antigen implicate the p63-family of proteins in replicative senescence. *Oncogene* *21*, 981-989.

Doherty, J., and Freund, R. (1997). Polyomavirus large T antigen overcomes p53 dependent growth arrest. *Oncogene* *14*, 1923-1931.

Dornreiter, I., Erdile, L. F., Gilbert, I. U., von Winkler, D., Kelly, T. J., and Fanning, E. (1992). Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *Embo J* *11*, 769-776.

Dornreiter, I., Hoss, A., Arthur, A. K., and Fanning, E. (1990). SV40 T antigen binds directly to the large subunit of purified DNA polymerase alpha. *Embo J* *9*, 3329-3336.

Dyson, N., Bernards, R., Friend, S. H., Gooding, L. R., Hassell, J. A., Major, E. O., Pipas, J. M., Vandyke, T., and Harlow, E. (1990). Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J Virol* *64*, 1353-1356.

Eckner, R., Ludlow, J. W., Lill, N. L., Oldread, E., Arany, Z., Modjtahedi, N., DeCaprio, J. A., Livingston, D. M., and Morgan, J. A. (1996). Association of p300 and CBP with simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol* 16, 3454-3464.

Epstein, M. A., Achong, B. G., and Barr, Y. M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 15, 702-703.

Ershler, W. B. (1993). The influence of an aging immune system on cancer incidence and progression. *J Gerontol* 48, B3-7.

Ewald, D., Li, M., Efrat, S., Auer, G., Wall, R. J., Furth, P. A., and Hennighausen, L. (1996). Time-sensitive reversal of hyperplasia in transgenic mice expressing SV40 T antigen. *Science* 273, 1384-1386.

Farmerie, W. G., and Folk, W. R. (1984). Regulation of polyomavirus transcription by large tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6919-6923.

Fei, Z. L., D'Ambrosio, C., Li, S., Surmacz, E., and Baserga, R. (1995). Association of insulin receptor substrate 1 with simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol* 15, 4232-4239.

Ferri, K. F., and Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3, E255-263.

Franceschi, S., and La Vecchia, C. (2001). Cancer epidemiology in the elderly. *Crit Rev Oncol Hematol* 39, 219-226.

French, L. E., and Tschopp, J. (2002). Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape. *Semin Cancer Biol* 12, 51-55.

Freund, R., Bronson, R. T., and Benjamin, T. L. (1992a). Separation of immortalization from tumor induction with polyoma large T mutants that fail to bind the retinoblastoma gene product. *Oncogene* 7, 1979-1987.

Freund, R., Sotnikov, A., Bronson, R. T., and Benjamin, T. L. (1992b). Polyoma virus middle T is essential for virus replication and persistence as well as for tumor induction in mice. *Virology* 191, 716-723.

Friedman, E. A. (1985). A multistage model for human colon carcinoma development integrating cell culture studies with pathology. *Cancer Invest* 3, 453-461.

Fulda, S., and Debatin, K. M. (2003). Death receptor signaling in cancer therapy. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 3, 253-262.

Furberg, A. H., and Ambrosone, C. B. (2001). Molecular epidemiology, biomarkers and cancer prevention. *Trends Mol Med* 7, 517-521.

Gannon, J. V., and Lane, D. P. (1987). p53 and DNA polymerase alpha compete for binding to SV40 T antigen. *Nature* 329, 456-458.

Gazdar, A. F., Butel, J. S., and Carbone, M. (2002). SV40 and human tumours: myth, association or causality? *Nat Rev Cancer* 2, 957-964.

Ge, H., Liu, Z., Church, G. M., and Vidal, M. (2001). Correlation between transcriptome and interactome mapping data from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Genet* 29, 482-486.

Gilbert, J. M., Goldberg, I. G., and Benjamin, T. L. (2003). Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *J Virol* 77, 2615-2622.

Ginsberg, D. (2002). E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Lett* 529, 122-125.

Gonos, E. S., Derventzi, A., Kveiborg, M., Agiostratidou, G., Kassem, M., Clark, B. F., Jat, P. S., and Rattan, S. I. (1998). Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Exp Cell Res* 240, 66-74.

Gotz, C., Koenig, M. G., Issinger, O. G., and Montenarh, M. (1995). A casein-kinase-2-related protein kinase is tightly associated with the large T antigen of simian virus 40. *Eur J Biochem* 233, 327-334.

Grant, S. G. (2001). Molecular epidemiology of human cancer: biomarkers of genotoxic exposure and susceptibility. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20, 245-261.

Gross, L. (1953). A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 83, 414-421.

Guilford, P. (2000). The inherited susceptibility to cancer. *Cell Mol Life Sci* 57, 589-603.

Hahn, W. C., and Weinberg, R. A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 331-341.

Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elia, A., de la Pompa, J. L., Kagi, D., Khoo, W., *et al.* (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94, 339-352.

Haluska, P., Jr., Saleem, A., Edwards, T. K., and Rubin, E. H. (1998). Interaction between the N-terminus of human topoisomerase I and SV40 large T antigen. *Nucleic Acids Res* 26, 1841-1847.

Han, J., Wallen, H. D., Nunez, G., and White, E. (1998). E1B 19,000-molecular-weight protein interacts with and inhibits CED-4-dependent, FLICE-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 18, 6052-6062.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hassauer, M., Scheidtmann, K. H., and Walter, G. (1986). Mapping of phosphorylation sites in polyomavirus large T antigen. *J Virol* 58, 805-816.

Hayashi, Y., Matsuyama, K., Takagi, K., Sugiura, H., and Yoshikawa, K. (1995). Arrest of cell growth by necdin, a nuclear protein expressed in postmitotic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 213, 317-324.

Hemminki, K., and Mutanen, P. (2001). Genetic epidemiology of multistage carcinogenesis. *Mutat Res* 473, 11-21.

Henderson, B. E., Ross, R. K., and Pike, M. C. (1991). Toward the primary prevention of cancer. *Science* 254, 1131-1138.

Henning, R., and Lange-Mutschler, J. (1983). Tightly associated lipids may anchor SV40 large T antigen in plasma membrane. *Nature* 305, 736-738.

Hersey, P., and Zhang, X. D. (2003). Overcoming resistance of cancer cells to apoptosis. *J Cell Physiol* 196, 9-18.

Hickman, E. S., Moroni, M. C., and Helin, K. (2002). The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 12, 60-66.

Hiebert, S. W., Chellappan, S. P., Horowitz, J. M., and Nevins, J. R. (1992). The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev* 6, 177-185.

Honarpour, N., Du, C., Richardson, J. A., Hammer, R. E., Wang, X., and Herz, J. (2000). Adult Apaf-1-deficient mice exhibit male infertility. *Dev Biol* 218, 248-258.

Hu, Y., Ippolito, J. E., Garabedian, E. M., Humphrey, P. A., and Gordon, J. I. (2002). Molecular characterization of a metastatic neuroendocrine cell cancer arising in the prostates of transgenic mice. *J Biol Chem* 277, 44462-44474.

Imperiale, M. J. (2000). The human polyomaviruses, BKV and JCV: molecular pathogenesis of acute disease and potential role in cancer. *Virology* 267, 1-7.

Imperiale, M. J. (2001). Oncogenic transformation by the human polyomaviruses. *Oncogene* 20, 7917-7923.

Ito, K., Asano, M., Hughes, P., Kohzaki, H., Masutani, C., Hanaoka, F., Kerppola, T., Curran, T., Murakami, Y., and Ito, Y. (1996). c-Jun stimulates origin-dependent DNA unwinding by polyomavirus large T antigen. *Embo J* 15, 5636-5646.

Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E., and Jaenisch, R. (2001). Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet* 27, 31-39.

Johnston, S. D., Yu, X. M., and Mertz, J. E. (1996). The major transcriptional transactivation domain of simian virus 40 large T antigen associates nonconcurrently with multiple components of the transcriptional preinitiation complex. *J Virol* 70, 1191-1202.

Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108, 153-164.

Kaina, B. (2003). DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem Pharmacol* 66, 1547-1554.

Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F., and Smith, A. E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311, 33-38.

Kasibhatla, S., and Tseng, B. (2003). Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol Cancer Ther* 2, 573-580.

Kern, F. G., Pellegrini, S., Cowie, A., and Basilio, C. (1986). Regulation of polyomavirus late promoter activity by viral early proteins. *J Virol* 60, 275-285.

Khalili, K., Del Valle, L., Otte, J., Weaver, M., and Gordon, J. (2003). Human neurotropic polyomavirus, JCV, and its role in carcinogenesis. *Oncogene* 22, 5181-5191.

Klawitz, I., Preuss, U., and Scheidtmann, K. H. (2001). Interaction of SV40 large T antigen with components of the nucleo/cytoskeleton. *Int J Oncol* 19, 1325-1332.

Klein, G., and Klein, E. (1985). Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. *Nature* 315, 190-195.

Klein, G., Powers, A., and Croce, C. (2002). Association of SV40 with human tumors. *Oncogene* 21, 1141-1149.

Knezevic, D., and Brash, D. E. (2004). Role of E2F1 in Apoptosis: A Case Study in Feedback Loops. *Cell Cycle* 3.

Koffer, A., Daridan, M., and Clarke, G. D. (1985). Regulation of the microfilament system in normal and polyoma virus transformed cultured (BHK) cells. *Tissue Cell* 17, 147-159.

Koffer, A., and Edgar, A. (1989). Enhanced number of actin binding sites on plasma membranes of polyoma virus-transformed fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 982, 295-299.

Kohli, M., and Jorgensen, T. J. (1999). The influence of SV40 immortalization of human fibroblasts on p53-dependent radiation responses. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 168-176.

Kohrman, D. C., and Imperiale, M. J. (1992). Simian virus 40 large T antigen stably complexes with a 185-kilodalton host protein. *J Virol* 66, 1752-1760.

Krtolica, A., and Campisi, J. (2003). Integrating epithelial cancer, aging stroma and cellular senescence. *Adv Gerontol* 11, 109-116.

Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S., Rakic, P., and Flavell, R. A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325-337.

La Vecchia, C., Levi, F., and Franceschi, S. (2000). Epidemiology of cancer with a focus on Europe. *J Epidemiol Biostat* 5, 31-47.

Larose, A., Dyson, N., Sullivan, M., Harlow, E., and Bastin, M. (1991). Polyomavirus large T mutants affected in retinoblastoma protein binding are defective in immortalization. *J Virol* 65, 2308-2313.

Lebel, M., Bertrand, R., and Mes-Masson, A. M. (1996). Decreased Fas antigen receptor expression in testicular tumor cell lines derived from polyomavirus large T-antigen transgenic mice. *Oncogene* 12, 1127-1135.

Lebel, M., and Mes-Masson, A. M. (1994a). Establishment and characterization of testicular cell lines from MT-PVLT-10 transgenic mice. *Exp Cell Res* 213, 12-19.

Lebel, M., and Mes-Masson, A. M. (1994b). Sequence analysis of a novel cDNA which is overexpressed in testicular tumors from polyomavirus large T-antigen transgenic mice. *DNA Seq* 5, 31-39.

Lebel, M., Webster, M., Muller, W. J., Royal, A., Gauthier, J., and Mes-Masson, A. M. (1995). Transgenic mice bearing the polyomavirus large T antigen directed by 2.1 kb of the keratin 19 promoter develop bronchiolar papillary tumors with progression to lung adenocarcinomas. *Cell Growth Differ* 6, 1591-1600.

Leist, M., and Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598.

Li, D., Zhao, R., Lilyestrom, W., Gai, D., Zhang, R., DeCaprio, J. A., Fanning, E., Jochimiak, A., Szakonyi, G., and Chen, X. S. (2003). Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature* 423, 512-518.

Li, J. H., Kluger, M. S., Madge, L. A., Zheng, L., Bothwell, A. L., and Pober, J. S. (2002). Interferon-gamma augments CD95(APO-1/Fas) and pro-caspase-8 expression and sensitizes human vascular endothelial cells to CD95-mediated apoptosis. *Am J Pathol* 161, 1485-1495.

Liang, T. J., Carmichael, G. G., and Benjamin, T. L. (1984). A polyoma mutant that encodes small T antigen but not middle T antigen demonstrates uncoupling of cell surface and cytoskeletal changes associated with cell transformation. *Mol Cell Biol* 4, 2774-2783.

Lill, N. L., Tevethia, M. J., Eckner, R., Livingston, D. M., and Modjtahedi, N. (1997). p300 family members associate with the carboxyl terminus of simian virus 40 large tumor antigen. *J Virol* 71, 129-137.

Lord, S. J., Rajotte, R. V., Korbitt, G. S., and Bleackley, R. C. (2003). Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev* 193, 31-38.

Lounis, H., Provencher, D., Godbout, C., Fink, D., Milot, M. J., and Mes-Masson, A. M. (1994). Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies. *Exp Cell Res* 215, 303-309.

Macaluso, M., Paggi, M. G., and Giordano, A. (2003). Genetic and epigenetic alterations as hallmarks of the intricate road to cancer. *Oncogene* 22, 6472-6478.

Manfredi, J. J., and Prives, C. (1994). The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta* 1198, 65-83.

Mastrangelo, I. A., Hough, P. V., Wall, J. S., Dodson, M., Dean, F. B., and Hurwitz, J. (1989). ATP-dependent assembly of double hexamers of SV40 T antigen at the viral origin of DNA replication. *Nature* 338, 658-662.

Maxwell, S. A., Ames, S. K., Sawai, E. T., Decker, G. L., Cook, R. G., and Butel, J. S. (1991). Simian virus 40 large T antigen and p53 are microtubule-associated proteins in transformed cells. *Cell Growth Differ* 2, 115-127.

McClatchey, A. I. (1999). Modeling metastasis in the mouse. *Oncogene* 18, 5334-5339.

McCormick, F., Clark, R., Harlow, E., and Tjian, R. (1981). SV40 T antigen binds specifically to a cellular 53 K protein in vitro. *Nature* 292, 63-65.

Mistry, S. J., and Atweh, G. F. (1999). Stathmin expression in immortalized and oncogene transformed cells. *Anticancer Res* 19, 573-577.

Mistry, S. J., and Atweh, G. F. (2002). Role of stathmin in the regulation of the mitotic spindle: potential applications in cancer therapy. *Mt Sinai J Med* 69, 299-304.

Miyata, Y., and Yahara, I. (2000). p53-independent association between SV40 large T antigen and the major cytosolic heat shock protein, HSP90. *Oncogene* 19, 1477-1484.

Moghal, N., Bonyadi, S., Hassell, J. A., Alpert, L., and Chalifour, L. E. (1995). A transgenic mouse line harboring a smooth muscle alpha-actin promoter polyomavirus middle T antigen transgene develops an epithelial hyperplasia in the rectum and distal stomach. *Lab Invest* 72, 291-299.

Mor, O., Read, M., and Fried, M. (1997). p53 in polyoma virus transformed REF52 cells. *Oncogene* 15, 3113-3119.

Mountz, J. D., Wu, J., Zhou, T., and Hsu, H. C. (1997). Cell death and longevity: implications of Fas-mediated apoptosis in T-cell senescence. *Immunol Rev* 160, 19-30.

Mudrak, I., Ogris, E., Rotheneder, H., and Wintersberger, E. (1994). Coordinated trans activation of DNA synthesis- and precursor-producing enzymes by polyomavirus large T antigen through interaction with the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 14, 1886-1892.

Nacht, M., Reed, S. I., and Alwine, J. C. (1995). Simian virus 40 large T antigen affects the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle and interacts with p34CDC28. *J Virol* 69, 756-763.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.

Nemethova, M., and Wintersberger, E. (1999). Polyomavirus large T antigen binds the transcriptional coactivator protein p300. *J Virol* 73, 1734-1739.

Nunbhakdi-Craig, V., Craig, L., Machleidt, T., and Sontag, E. (2003). Simian virus 40 small tumor antigen induces deregulation of the actin cytoskeleton and tight junctions in kidney epithelial cells. *J Virol* 77, 2807-2818.

Oren, M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10, 431-442.

Ozoren, N., and El-Deiry, W. S. (2003). Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Semin Cancer Biol* 13, 135-147.

Pallas, D. C., Shahrik, L. K., Martin, B. L., Jaspers, S., Miller, T. B., Brautigan, D. L., and Roberts, T. M. (1990). Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* 60, 167-176.

Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5, 741-747.

Penn, I. (1986). Cancer is a complication of severe immunosuppression. *Surg Gynecol Obstet* 162, 603-610.

Pilon, A. A., Desjardins, P., Hassell, J. A., and Mes-Masson, A. M. (1996). Functional implications of mutations within polyomavirus large T antigen Rb-binding domain: effects on pRb and p107 binding in vitro and immortalization activity in vivo. *J Virol* 70, 4457-4465.

Pilon, A. A., and Mes-Masson, A. M. (1996). Polyomavirus large T antigen zinc finger is not required for efficient cellular immortalization of primary rat embryo fibroblasts. *Virus Res* 46, 171-175.

Pipas, J. M. (1985). Mutations near the carboxyl terminus of the simian virus 40 large tumor antigen alter viral host range. *J Virol* 54, 569-575.

Pipas, J. M. (1992). Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. *J Virol* 66, 3979-3985.

Porras, A., Bennett, J., Howe, A., Tokos, K., Bouck, N., Henglein, B., Sathyamangalam, S., Thimmapaya, B., and Rundell, K. (1996). A novel simian virus 40 early-region domain mediates transactivation of the cyclin A promoter by small-t antigen and is required for transformation in small-t antigen-dependent assays. *J Virol* 70, 6902-6908.

Prelich, G., Kostura, M., Marshak, D. R., Mathews, M. B., and Stillman, B. (1987). The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro. *Nature* 326, 471-475.

Pronk, G. J., and Bos, J. L. (1994). The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochim Biophys Acta 1198*, 131-147.

Provencher, D. M., Lounis, H., Champoux, L., Tetrault, M., Manderson, E. N., Wang, J. C., Eydoux, P., Savoie, R., Tonin, P. N., and Mes-Masson, A. M. (2000). Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim 36*, 357-361.

Pulford, D. J., Falls, J. G., Killian, J. K., and Jirtle, R. L. (1999). Polymorphisms, genomic imprinting and cancer susceptibility. *Mutat Res 436*, 59-67.

Rodier, F., Bertrand, R., Bossolasco, M., and Mes-Masson, A. M. (2000). Polyomavirus large T-antigen protects mouse cells from Fas-, TNF-alpha- and taxol-induced apoptosis. *Oncogene 19*, 6261-6270.

Rose, P. E., and Schaffhausen, B. S. (1995). Zinc-binding and protein-protein interactions mediated by the polyomavirus large T antigen zinc finger. *J Virol 69*, 2842-2849.

Roy, R., Trowbridge, P., Yang, Z., Champoux, J. J., and Simmons, D. T. (2003). The cap region of topoisomerase I binds to sites near both ends of simian virus 40 T antigen. *J Virol 77*, 9809-9816.

Rubin, H. (2001a). Multistage carcinogenesis in cell culture. *Dev Biol (Basel) 106*, 61-66; discussion 67, 143-160.

Rubin, H. (2001b). The role of selection in progressive neoplastic transformation. *Adv Cancer Res 83*, 159-207.

Rubin, H. (2001c). Selected cell and selective microenvironment in neoplastic development. *Cancer Res* 61, 799-807.

Ruiz-Ruiz, C., Munoz-Pinedo, C., and Lopez-Rivas, A. (2000). Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program. *Cancer Res* 60, 5673-5680.

Ryffel, B., Mihatsch, M. J., and Fisher, G. L. (1992). Immunosuppression and cancer: the ciclosporin case. *Drug Chem Toxicol* 15, 95-115.

Saenz-Robles, M. T., Sullivan, C. S., and Pipas, J. M. (2001). Transforming functions of Simian Virus 40. *Oncogene* 20, 7899-7907.

Sage, J., Mulligan, G. J., Attardi, L. D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E., and Jacks, T. (2000). Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev* 14, 3037-3050.

Schlegel, R., and Benjamin, T. L. (1978). Cellular alterations dependent upon the polyoma virus Hr-t function: separation of mitogenic from transforming capacities. *Cell* 14, 587-599.

Schmitz, I., Kirchhoff, S., and Krammer, P. H. (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 1123-1136.

Schneider, C., Weissbart, K., Guarino, L. A., Dornreiter, I., and Fanning, E. (1994). Species-specific functional interactions of DNA polymerase alpha-primase with simian virus 40 (SV40) T antigen require SV40 origin DNA. *Mol Cell Biol* 14, 3176-3185.

Seger, Y. R., Garcia-Cao, M., Piccinin, S., Cunsolo, C. L., Doglioni, C., Blasco, M. A., Hannon, G. J., and Maestro, R. (2002). Transformation of normal human cells in the absence of telomerase activation. *Cancer Cell* 2, 401-413.

Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.

Sharpless, N. E. (2003). The persistence of senescence. *Sci Aging Knowledge Environ* 2003, PE24.

Sherr, C. J., and DePinho, R. A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102, 407-410.

Sherr, C. J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103-112.

Shields, P. G., and Harris, C. C. (2000). Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. *J Clin Oncol* 18, 2309-2315.

Simmons, D. T., Melendy, T., Usher, D., and Stillman, B. (1996). Simian virus 40 large T antigen binds to topoisomerase I. *Virology* 222, 365-374.

Sinha, R., and Caporaso, N. (1999). Diet, genetic susceptibility and human cancer etiology. *J Nutr* 129, 556S-559S.

Smith, C. A. (1995). A novel viral homologue of Bcl-2 and Ced-9. *Trends Cell Biol* 5, 344.

Smith, R. W., Morganroth, J., and Mora, P. T. (1970). SV40 virus-induced tumour specific transplantation antigen in cultured mouse cells. *Nature* 227, 141-145.

Solomon, E., Borrow, J., and Goddard, A. D. (1991). Chromosome aberrations and cancer. *Science* 254, 1153-1160.

Srinivasan, A., McClellan, A. J., Vartikar, J., Marks, I., Cantalupo, P., Li, Y., Whyte, P., Rundell, K., Brodsky, J. L., and Pipas, J. M. (1997). The amino-terminal transforming region of simian virus 40 large T and small t antigens functions as a J domain. *Mol Cell Biol* 17, 4761-4773.

Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., and Vogt, P. K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260, 170-173.

Subramanian, T., Boyd, J. M., and Chinnadurai, G. (1995). Functional substitution identifies a cell survival promoting domain common to adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins. *Oncogene* 11, 2403-2409.

Taniura, H., Taniguchi, N., Hara, M., and Yoshikawa, K. (1998). Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1. *J Biol Chem* 273, 720-728.

Teodoro, J. G., and Branton, P. E. (1997). Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* 71, 1739-1746.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Tognon, M., Corallini, A., Martini, F., Negrini, M., and Barbanti-Brodano, G. (2003). Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene* 22, 5192-5200.

Tonin, P. N., Hudson, T. J., Rodier, F., Bossolasco, M., Lee, P. D., Novak, J., Manderson, E. N., Provencher, D., and Mes-Masson, A. M. (2001). Microarray analysis of gene expression mirrors the biology of an ovarian cancer model. *Oncogene* 20, 6617-6626.

Tsai, S. C., Pasumarthi, K. B., Pajak, L., Franklin, M., Patton, B., Wang, H., Henzel, W. J., Stults, J. T., and Field, L. J. (2000). Simian virus 40 large T antigen binds a novel Bcl-2 homology domain 3-containing proapoptosis protein in the cytoplasm. *J Biol Chem* 275, 3239-3246.

Van Dyke, T., and Jacks, T. (2002). Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell* 108, 135-144.

Varley, J. M. (2003). Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 21, 313-320.

Vasseur, S., Malicet, C., Calvo, E. L., Labrie, C., Berthezene, P., Dagorn, J. C., and Iovanna, J. L. (2003). Gene expression profiling by DNA microarray analysis in mouse embryonic fibroblasts transformed by rasV12 mutated protein and the E1A oncogene. *Mol Cancer* 2, 19.

Vaux, D. L., and Korsmeyer, S. J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.

Vecchio, G. (1993). Oncogenes of DNA and RNA tumor viruses and the origin of cellular oncogenes. *Hist Philos Life Sci* 15, 59-74.

Vilchez, R. A., and Butel, J. S. (2003). SV40 in human brain cancers and non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 22, 5164-5172.

Waga, S., and Stillman, B. (1994). Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature* 369, 207-212.

Walhout, A. J., Reboul, J., Shtanko, O., Bertin, N., Vaglio, P., Ge, H., Lee, H., Doucette-Stamm, L., Gunsalus, K. C., Schetter, A. J., *et al.* (2002). Integrating interactome, phenome, and transcriptome mapping data for the *C. elegans* germline. *Curr Biol* 12, 1952-1958.

Webster, M. A., Martin-Soudant, N., Nepveu, A., Cardiff, R. D., and Muller, W. J. (1998). The induction of uterine leiomyomas and mammary tumors in transgenic mice expressing polyomavirus (PyV) large T (LT) antigen is associated with the ability of PyV LT antigen to form specific complexes with retinoblastoma and CUTL1 family members. *Oncogene* 16, 1963-1972.

Weir, H. K., Thun, M. J., Hankey, B. F., Ries, L. A., Howe, H. L., Wingo, P. A., Jemal, A., Ward, E., Anderson, R. N., and Edwards, B. K. (2003). Annual report to the

nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J Natl Cancer Inst* 95, 1276-1299.

Wobbe, C. R., Dean, F. B., Murakami, Y., Borowiec, J. A., Bullock, P., and Hurwitz, J. (1987). In vitro replication of DNA containing either the SV40 or the polyoma origin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 317, 439-453.

Wright, W. E., and Shay, J. W. (2000). Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med* 6, 849-851.

Yuspa, S. H., Dlugosz, A. A., Denning, M. F., and Glick, A. B. (1996). Multistage carcinogenesis in the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1, 147-150.

Zhai, W., Tuan, J. A., and Comai, L. (1997). SV40 large T antigen binds to the TBP-TAF(I) complex SL1 and coactivates ribosomal RNA transcription. *Genes Dev* 11, 1605-1617.

Zheng, D. Q., Vayssiere, J. L., Petit, P. X., LeCoeur, H., Spatz, A., Mignotte, B., and Feunteun, J. (1994). Apoptosis is antagonized by large T antigens in the pathway to immortalization by polyomaviruses. *Oncogene* 9, 3345-3351.

Zhou, Q., and Salvesen, G. S. (2000). Viral caspase inhibitors CrmA and p35. *Methods Enzymol* 322, 143-154.

zur Hausen, H. (2001). Oncogenic DNA viruses. *Oncogene* 20, 7820-7823.

ANNEXE I

Article 3. Microarray analysis of gene expression mirrors the biology of an ovarian cancer model

Article publié dans la revue Oncogene 2001, vol 20, p:6617.

Contributions des auteurs:

Tonin P., Hudson T., **Rodier F.** (15-20%), Bossolasco M., Lee P., Novak J., Manderson E., Golub T., Provencher D. and Mes-Masson A.-M. 2001. Microarray analysis of gene expression mirrors the biology of an ovarian cancer model. *Oncogene* (2001) vol. 20, 6617-26.

Avec Bossolasco M., j'étais responsable pour le travail de biologie moléculaire incluant les analyses de PCR, de buvardage Northern, la confirmation des candidats de micropuces et la densitométrie. De plus, j'ai participé à la revue de littérature concernant les gènes candidats choisis. J'ai travaillé avec Tonin P., Hudson T. et Mes-Masson M. pour générer la version finale du texte et des figures.

Microarray analysis of gene expression mirrors the biology of an ovarian cancer model.

Tonin, Patricia N.^{1,2,3}, Hudson, Thomas J.^{1,2,4,5}, Rodier, Francis⁶, Bossolasco, Michela⁶, Lee, Peter^{2,4}, Novak, Jaroslav⁴, Manderson, Emily N.², Provencher, Diane^{6,7}, and Mes-Masson, Anne-Marie^{6,8*}.

¹Department of Medicine, ²Department of Human Genetics, McGill University; ³Montreal General Hospital Research Institute, Montreal Quebec, Canada; ⁴Montreal Genome Center, McGill University Health Center, Montreal, Canada; ⁵Whitehead Institute for Biomedical Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA., USA; ⁶Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (Hôpital Notre-Dame) and Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada, ⁷Département d'obstétrique-gynécologie, ⁸Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada;

* corresponding author: Anne-Marie Mes-Masson
Centre de recherche CHUM/ICM
1560, rue Sherbrooke est,
Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1

tel: (514) 281-6000 ext 5496

FAX: (514) 896-4805

ABSTRACT

We have previously described an ovarian cancer model based on four independent spontaneously transformed cell lines (TOV-21G, OV-90, TOV-81D, and TOV-112D) that retain characteristics of the original epithelial ovarian cancers (EOC) from which they were derived. Here we report the characterization of this model system using high-density DNA microarrays in order to assess gene expression. Expression profiles were generated from total RNAs extracted from the four EOC cell lines, a primary culture of the ovarian surface epithelial cells of a normal ovary (NOV-31), and a fresh EOC sample (TOV-578G). A comparison of expression profiles revealed patterns of expression that distinguish NOV-31 from that of all tumor derived samples. The expression pattern of TOV-81D, an EOC cell line that was derived from a patient with indolent disease, most closely resembles NOV31 while profiles of samples derived from patients with more aggressive disease (TOV-21G, OV-90, TOV-112D and TOV-578G) showed more divergent patterns of expression. In addition, the expression profiles of the samples derived from tumors of the same histopathology (TOV-112D and TOV-578G) most closely resembled one another, despite the fact the comparison was made between a cell line and a primary tumor sample. The microarray analysis (<http://genome.mcgill.ca>) results confirm the usefulness of ovarian cancer model based on the characterization of these EOC cell lines.

Ovarian cancer is the fourth leading cause of cancer related deaths in women following breast, lung, and colon cancer. The most common form of cancer of the ovary is epithelial ovarian cancer (EOC). One approach to understanding the genetic and epigenetic events that contribute to EOC is to identify genes that are differentially expressed during neoplastic progression. The rationale in this strategy is that these differentially expressed genes may themselves be directly involved in transformation, or alternatively the promoter of these genes respond to transcription factors whose modulation is important during tumorigenesis. This approach has been recently revolutionized by the development of high throughput methodologies that permit the quantification of expression of large sets of transcripts simultaneously. Using technologies such as microarray analysis it has been possible identify signature patterns of expression in tumor samples that correlate with the biology of the system under study ¹⁻³. A major question facing ovarian cancer biologist is whether the data from microarray technologies accurately reflects the underlying biology of EOC. Here we report that the pattern of gene expression identified by microarray analysis mirrors the biology of the ovarian model system tested.

The model system is based on the use of primary cultures of normal ovarian surface epithelial cells ⁴, ovarian cancer cell lines ^{5,6} and fresh biopsied EOC samples (Table 1). The primary culture from normal surface ovarian epithelium (NOV-31) was derived as described previously ⁶. Four long-term cell lines were derived from ovarian malignant tumors (TOV-21G, TOV-81D and TOV-112D) and from an ovarian malignant ascites (OV-90) from chemotherapy naïve patients. These cell lines were characterized by

morphological, immunohistochemical, cytogenetic and molecular analysis ⁵. They harbor mutations in genes that have been implicated in ovarian cancer such as *TP53*, *CDNK2A*, *TGF- β -RII*, *BRCA2*. Notably, these cell lines display growth characteristics *in vitro* that mimic their clinical behavior, rendering them valuable tools for both *in vitro* and *in vivo* studies. RNA from a solid tumor tissue (TOV-578G) was also included in the analysis for comparison.

Expression profiles were generated using the Hs6000 gene chip with total RNA from NOV-31, TOV-21G, TOV-81D, OV-90, TOV-112D and TOV-578G (Table 1). Two strategies were pursued to validate data sets. The first strategy was based upon a comparison of expression profiles of different ESTs that were mapped to the same cluster (Figure 1a). The Hsu6000 microarray contained different EST representations of osteonectin (*SPARC*) and apolipoprotein E (*APOE*). As illustrated by these examples (Figure 1a), while there may be differences in the absolute numerical value assigned to the gene expression (maximum variance observed is 2- to 3- fold), the expression profiles of the six samples are comparable for each EST representation of the same gene. Exceptions to pattern conservation were seen in genes like the death-associated protein kinase 1 (*DAPK1*) where the numerical values of expression are below 100 (Figure 1a). It has been shown that the reproducibility of expression quantitation is more variable at these values (J. Novak, personal communication). The second strategy was based on a comparison of expression profiles with Northern blot analysis. Figure 1b provides examples of Northern blots and numerical microarray data for corresponding ESTs. Expression profiles for genes

showing greater than 3-fold differences generally displayed good concordance between the microarray data and Northern analysis (see for example *MYC* and *HSPD1*). When less than 3-fold variations between samples was observed, patterns tended to be similar but not identical (see for example *KIAA0064* and *PGAM1*). In these experiments, data interpretation was more questionable at microarray levels of less than 100, as patterns and fold-comparisons were more variable (see for example *TP53*).

Large scale data analysis was performed with a dataset containing values of at least one P (ie. present) call and an expression value of > 100 . In addition, in order not to overestimate the differences between expression profiles, the expression data less than 100 were re-assigned a value of 100. Using these stringent criteria, 1815 ESTs (from an original 6,416) were selected for analysis. A minimum of a 3-fold difference in expression values using the modified dataset was deemed significant.

We calculated the number of 3-, 5- and 10-fold differences in all possible two-way comparisons between samples. Individual two-way comparisons of NOV-31 to each individual ovarian tumor sample indicate that TOV-81D most closely resembles NOV-31 (Figure 2a). These results are consistent with our previous study of the EOC cell lines that showed that TOV-81D, derived from a patient with indolent disease, displayed characteristics consistent with the least aggressive form of the disease ⁵. As a group, samples derived from tumors associated with aggressive disease (TOV-21G, OV-90, TOV-112D and TOV-578G) are significantly more different from NOV-31 than TOV-81D (Figure 2a). Two-way comparisons of each sample to TOV-112D indicate the strongest

similarity of over expression profiles between that of TOV-112D and TOV-578G (Figure 2b). This observation may reflect the similar endometrioid histology of these two samples, and occurs despite the fact that TOV-578G is derived from a tumor biopsy that is likely contaminated with different cell types. This cell contamination was clearly exemplified by the significant expression of hemoglobin in TOV-578G (with values >500 for both γ - and β -hemaglobin) as compared with little or no signal (values <60) in all samples representing the EOC cell lines.

Simultaneous 6-way comparisons of each sample to NOV-31 revealed patterns of expression distinguishing normal from tumor derived material. The number of times the expression level exceeded that of NOV-31 for a given EST is indicated in Figure 2C. In this analysis, it is apparent that the majority of ESTs varied in expression only in one sample ($n=280$, 3--fold) while that of individual ESTs varied less frequently over two ($n=85$, 3-fold), three ($n=48$, 3-fold), four ($n=23$, 3-fold) and all five tumor samples ($n=1$, 3-fold). In contrast, ESTs that were under-expressed as compared to NOV-31 showed a different pattern of down-regulation (Figure 2D), in that a large number of ESTs varied simultaneously in at least three tumor samples. While relatively few ESTs showed down-regulation in all five samples ($n=9$, 3-fold) several ESTs varied in four ($n=32$, 3-fold), three ($n=24$, 3-fold), two ($n=20$, 3-fold) and one ($n=32$, 3-fold) tumor sample. Many of the ESTs that varied in four samples did not vary in TOV-81D as compared to NOV-31 (23 of 32 ESTs at 3-fold), again pointing to similarities between the expression profiles of NOV-31 and TOV-81D. In addition, it was noted that ESTs were more frequently over-expressed

(n=437, \geq 3-fold) than under-expressed (n=117, \geq 3-fold) in the tumor samples when compared to NOV-31 levels of expression.

We have begun to analyze the expression values of ESTs that have been chromosome mapped in anticipation of identifying patterns of gene expression that can be related to chromosome gains or losses which occur frequently in ovarian cancer ⁷. We compared the expression levels of ESTs in the NOV-31 and the EOC samples where chromosomal assignment is known. The chromosome mapping information was retrieved for the 1,815 ESTs. There were 1226 of these ESTs that were assigned to unique chromosomes based on Gene Map 98 as described in UniGene-Homo sapiens (Table 2). Only unambiguously mapped ESTs where one chromosome location was reported are indicated. The uneven distribution of ESTs per chromosome is a reflection of the differences in the number of expressed sequences (genes) on specific chromosomes which implies that some chromosomes are gene rich such as chromosome 19 ^{8,9}. For the ESTs with unique chromosome map locations, comparisons were made between the expression levels in the NOV-31 and each EOC cell sample (Table 2). The expression profiles for the vast majority of ESTs (>80%) did not differ greater than 3-fold in comparison to the NOV-31. The ESTs that displayed greater than 3-fold differences in expression levels were grouped according to those displaying increased or decreased levels of expression in comparison to NOV-31. The patterns of expression exhibited by the chromosome mapped ESTs are consistent with overall expression pattern observed by the alternative analysis of the ESTs dataset as described above. There were no obvious expression patterns associated

with particular chromosomes. This may be a reflection of the lack of sufficient coverage of ESTs per chromosome and this limitation will become less important with the development of higher density microarrays covering a greater portion of the genome.

Among the expression profiles of tumor derived cell lines, the tumor cell line with the least aggressive phenotype, TOV-81D, displayed the fewest differences over all chromosomes in comparison to that of NOV-31 (Table 2). We have investigated if the trend towards the similarity in expression profiles between NOV-31 and TOV-81D extends to the ESTs that map to individual chromosomes. Figure 3 features an analysis of the expression profile of ESTs that map to chromosome 6. This chromosome is featured because it has been implicated in ovarian tumorigenesis. There were 61 ESTs that mapped to chromosome 6. Three ESTs were removed from this analysis because the EST was no longer listed in UniGene database (in two cases) or because of ambiguous mapping information (in one case) as of March, 2000. The remaining ESTs were mapped according to cytogenetic position and genetic map co-ordinates (GeneMap 98) as described in UniGene. The 57 ESTs represent 49 clusters or genes. Comparisons of expression values of each tumor sample with that of NOV-31 revealed profiles consistent with the other modes of analysis described above. For example, TOV-81D displayed the fewest differences in expression profiles in comparison to NOV-31 in that only one EST, namely L12350, representing the gene for thrombospondin 2 (*THBS2*), is differentially expressed greater than 3-fold in TOV-81D in comparison to NOV-31.

Greater than 3-fold differences in the expression profiles was variable with samples representative of the most aggressive tumorigenic phenotype. However, there were two ESTs, R46753 and X78947, which displayed a similar differential pattern of expression in comparison to NOV-31 and TOV-81D. These ESTs represent connective tissue growth factor (*CTGF*) and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (*CDKN1A*). The D13315 EST also displayed an interesting expression pattern based on the increased expression in ovarian tumor samples derived from solid tumors (TOV-21G, TOV-112D and TOV-578) versus the expression profile in the tumor sample derived from an ovarian ascites, OV-90. The patterns displayed by these ESTs would suggest a role in tumors of advanced grade/stage or a role related to the pathology of ascites formation and thus warrant further investigation in a larger series of samples.

To further validate the model system and the strategy used to characterize it, we compared the expression pattern of genes previously described in ovarian cancer¹⁰⁻²⁰ with the expression values generated by microarray analysis. Some of the examples in Table 3 illustrate the concordance in microarray analysis with previous published reports based on Northern blot analysis and immunohistochemistry. In particular, both *CDKN1A*¹⁰ and *SPARC*¹⁹ have been shown to be down-regulated in aggressive ovarian cancer and this mirrors the situation revealed by microarray expression analysis in our model. Once again, for these particular ESTs the pattern of expression of NOV-31 and TOV-81D are highly similar, and contrast sharply with the aggressive EOC samples. OV-90 has been classified an ovarian adenocarcinoma as it maintains insufficient differentiated features to allow a

more precise classification by cell type. Over-expression of *TFF1* has previously been correlated with the mucinous subtype of EOC ¹⁴, and it will be interesting to determine if the expression patterns of genes like *TFF1* will allow us to eventually better classify ovarian adenocarcinomas.

In the study of complex diseases such as cancer, the development of good model systems is of primordial importance. In the cell model system we have developed, our results demonstrate a concordance between biological parameters and microarray expression results. Expression analysis reveals the highest similarity between a primary culture derived from the normal ovarian surface epithelium (NOV-31) and a cell line (TOV-81D) derived from a patient with indolent disease (> nine years survival despite stage 3C, grade 2 disease at initial surgery). In addition, different cell lines were less similar to each other than two RNA samples derived from material of the same endometrioid histopathology (TOV-112D and TOV-578G) despite the fact that a cell line was compared to a fresh biopsied tumor sample. The concordance in the TOV-112D and TOV-578G expression patterns also suggest that cell lines reflect some of the underlying biological alterations seen in the primary tumor. The advent of new high-throughput technologies combined with the sequencing of the human genome has revolutionized our approach to studying complex diseases such as cancer. Results presented here and made available to ovarian cancer researchers (<http://genome.mcgill.ca>) provide an important framework for analyzing both ovarian cancer and the *in vitro* model systems used to study this deadly disease.

METHODS

Cell culture and clinical material.

A primary cell culture from a normal ovarian surface epithelium (NOV-31) was established as described ⁶. EOC cell lines were maintained in OSE media consisting of 50:50 medium 199:105 (Sigma) ⁴ supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 2.5 ug/ml fungizone and 50 ug/ml gentamicin. Biopsy material from an ovarian tumor (TOV-578G) was collected following surgery performed at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (Hôpital Notre-Dame) following appropriate consent. Disease was assigned a grade and stage according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) criteria.

RNA extraction:

Total RNA was extracted with TRIzol™ reagent (Gibco/BRL, Life Technologies Inc., Grand Island, NY). RNA was either extracted directly from a tumor biopsy (TOV-578G) or from cells grown to 80% confluency in 100 mm petri dishes.

Northern Blots.

Twenty µg of total RNA were electrophoresed on 1% (w/v) agarose gel containing 2.2 M formaldehyde and 20 mM MOPS (3-[N-morpholine] propane sulfonic acid, pH 6.8). RNA was transferred to nylon membranes (GeneScreen Plus™, NEN products) by capillary blotting in 10x SSC (1x SSC is 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0). RNA was U.V. cross-linked and hybridized overnight at 60°C in 30% formamide, 0.35 M

sodium phosphate, pH 7.2, 7% SDS, 1% bovine serum albumin and an aliquot of the [³²P] dCTP-labeled probe. Membranes were subsequently washed twice at 60°C with 0.15 M sodium phosphate, containing 1% SDS, and exposed to Kodak XAR-5 film for two to five days, at -70°C, with an intensifying screen. Membranes were treated at 80°C for one hour in 0.03 M sodium phosphate and 0.1% SDS, and exposed at -70°C with an intensifying screen overnight to insure that the probe had been removed prior to rehybridization. Probes were prepared from agarose gel purified DNA fragments using a random primed labeling kit (Pharmacia) and subsequently purified by the Nucleotide Removal kit (Qiagen). Probes were cloned and sequenced verified prior to use.

Microarray analysis

Biotinylated hybridization target was prepared from total RNA as described (Tamayo et al, 99). A complete protocol is available at <http://www.genome.wi.mit.edu/MPR>. In summary, 20 ug of total RNA was reverse-transcribed to double-stranded cDNA using oligo-dT primer containing T7 RNA polymerase binding site. This cDNA was then in-vitro transcribed to cRNA using biotinylated dUTP and dCTP. The resulting cRNA “target” represents a labeled 50-100 fold linear amplification of the cDNA sample. To reduce secondary structure, the target was fragmented in 40 mM Tris acetate, 100 mM potassium acetate, and 30 mM MgCl₂ (pH 8.1) at 95°C.

Hybridizations were performed with 15 ug of target on Affymetrix Hsu6000 oligonucleotide microarrays containing probe sets for 6,416 human genes (5,223 known

genes and 1,193 ESTs). Following washing and staining, microarrays were scanned using a Hewlett Packard GeneArray scanner. Gene expression levels are calculated for each EST from the scanned image by Affymetrix GeneChip software giving a single average difference ratio across 20 probe pairs as well as a reliability score (Ambiguous (A), Present (P), or Marginal (M) based on the variability of hybridization with each probe set).

Retrieval of information for ESTs

Information for each EST was obtained from UniGene-Homo sapiens designation (Unigene-Homo sapiens, 1999. National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.gov/UniGene>) using a query that was designed to retrieve corresponding UniGene name (cluster) for each GenBank accession number that corresponded to the ESTs represented on the GeneChip Hsu6000. Then, additional information was retrieved for each cluster consisting of the gene symbol, the description of each gene, and the location on Gene Map 98. Retrieval from UniGene was performed in November, 1999. Additional information for selected genes was retrieved from GeneCards encyclopedia ²¹.

ACKNOWLEDGMENTS:

We gratefully acknowledge the assistance of Todd Golub for microarray analysis. We thank L. Champoux and F. Dion for technical assistance. We are grateful to Dr. P. Drouin, P. Gauthier and J. Dubuc-Lissoir for clinical samples, Dr. R. Vauclair for pathology and N. Belanger for clerical assistance with pathology reports. This research was supported by

grants from the *Medical Research Council of Canada (MRC)* (to A.-M.M.-M. P.N.T., T.J.H. and D.P), the Canadian Genetic Diseases Network, Federal Networks of Centres of Excellence Program (to TJH), and a research contract from Bristol-Myers Squibb, Millennium Pharmaceuticals Inc. and Affymetrix (TJH). M.B. is the recipient of a studentship from the *MRC*; E.N.M. is the recipient of a studentship from the *Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada*; P.N.T. is scholar of the *MRC* and the *Cancer Research Society, Inc*; TJH is a recipient of a Clinician Scientist Award from the *MRC*; D.P. is a recipient of a Chercheur-Cliniciens Senior from the *Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ)*.; and A.-M.M.-M. is a recipient of a Chercheur National fellowship from the *FRSQ*.

REFERENCES:

1. Golub, T.R. *et al.* Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**, 531-537 (1999).
2. St Croix, B. *et al.* Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* **289**, 1197-1202 (2000).
3. Alizadeh, A.A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503-511 (2000).
4. Kruk, P.A., Maines-Bandiera, S.L. & Auersperg, N. A simplified method to culture human ovarian surface epithelium. *Lab. Invest.* **63**, 132-136 (1990).
5. Provencher, D.M. *et al.* Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **36**, 357-361 (2000).
6. Lounis, H. *et al.* Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies. *Exp. Cell Res.* **215**, 303-309 (1994).
7. Mitelman, F., Mertens, F. & Johansson, B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* **15**, 417-474 (1997).
8. Hudson, T.J. *et al.* An STS-based map of the human genome. *Science* **270**, 1945-1954 (1995).
9. Saccone, S., De Sario, A., Della Valle, G. & Bernardi, G. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4913-4917 (1992).
10. Anttila, M.A. *et al.* p21/WAF1 expression as related to p53, cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* **79**, 1870-1878 (1999).
11. Barboule, N., Baldin, V., S, J.O., Vidal, S. & Valette, A. Increased level of p21 in human ovarian tumors is associated with increased expression of cdk2, cyclin A and PCNA. *Int J Cancer* **76**, 891-896 (1998).
12. Tanner, B. *et al.* C-myc mRNA expression in epithelial ovarian carcinomas in relation to estrogen receptor status, metastatic spread, survival time, FIGO stage, and histologic grade and type. *Int J Gynecol Pathol* **17**, 66-74 (1998).
13. Neyns, B. *et al.* Expression of the jun family of genes in human ovarian cancer and normal ovarian surface epithelium. *Oncogene* **12**, 1247-1257 (1996).
14. Wysocki, S.J. *et al.* Detection of pS2 messenger RNA in gynecological cancers. *Cancer Res* **50**, 1800-1802 (1990).
15. Asschert, J.G., Vellenga, E., Hollema, H., van der Zee, A.G. & de Vries, E.G. Expression of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), interleukin-6, (IL-6), interleukin-1 beta (IL-1 beta), interleukin-11 (IL-11) and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in p53-characterised human ovarian carcinomas. *Eur J Cancer* **33**, 2246-2251 (1997).
16. Huleihel, M. *et al.* Distinct patterns of expression of interleukin-1 alpha and beta by normal and cancerous human ovarian tissues. *Eur Cytokine Netw* **8**, 179-187 (1997).
17. Courjal, F. *et al.* Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers: evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors. *Int J Cancer* **69**, 247-253 (1996).

18. Chambers, S.K., Ivins, C.M. & Carcangiu, M.L. Plasminogen activator inhibitor-1 is an independent poor prognostic factor for survival in advanced stage epithelial ovarian cancer patients. *Int J Cancer* **79**, 449-454 (1998).
19. Mok, S.C., Chan, W.Y., Wong, K.K., Muto, M.G. & Berkowitz, R.S. SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells. *Oncogene* **12**, 1895-1901 (1996).
20. Brown, T.J. *et al.* Activation of SPARC expression in reactive stroma associated with human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **75**, 25-33 (1999).
21. Rebhan, M., Chalifa-Caspi, V., Prilusky, J. & Lancet, D. GeneCards: encyclopedia for genes, proteins and diseases. Weizman Insitute of Science, Bioinformatics Unit and Genome Center (Rehovot, Isreal). *World Wide Web URL: <http://bioinfo.weizmann.ac.jl/cards>* (1997).

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Validation of the microarray datasets. **a**, Comparative analysis of expression profiles from different ESTs that were mapped to the same cluster. Expression values from the microarray analysis were plotted. The UniGene cluster and GenBank accession number are indicated. Note that the numerical values may vary in the same cluster for different ESTs but the overall pattern between the samples is conserved except where the numerical values are below 100. **b**, Comparative analysis of expression profiles between microarray and Northern blot analysis. Northern blots were normalized to a *GAPDH* probe hybridized on the same membrane. Numerical data from the microarray readings were plotted. Black and grey columns in the *TP53* and *PGAM1* microarray data panels represent different ESTs.

Figure 2

Analysis of microarray data. **a**, Individual two-way comparisons of each ovarian tumor sample to NOV-31. Note that TOV-81D shows the fewest deviations as compared to NOV-31. **b**, Individual two-way comparisons of each ovarian sample to TOV-112D. TOV-578G is the sample showing the fewest differences as compared to TOV-112D. **c**, Six way comparison of all over-expressed ESTs in the five tumor samples compared to NOV-31. Three-, 5-, and 10-fold differences in expression are indicated. The number of ESTs over-

expressed is plotted against the number of tumor samples in which any given ESTs is over-expressed as compared to NOV-31. **d**, Six way comparisons of all under-expressed ESTs in the five tumor samples compared to NOV-31. Three-, 5-, and 10-fold differences in expression are indicated. The number of ESTs under-expressed is plotted against the number of tumor samples in which any given ESTs is under-expressed as compared to NOV-31.

Figure 3

Expression profile of ESTs assigned to chromosome 6 for the five EOC cell lines and tumor tissue samples. The different ESTs were mapped according to cytogenetic position and genetic map coordinates.

Figure 1A

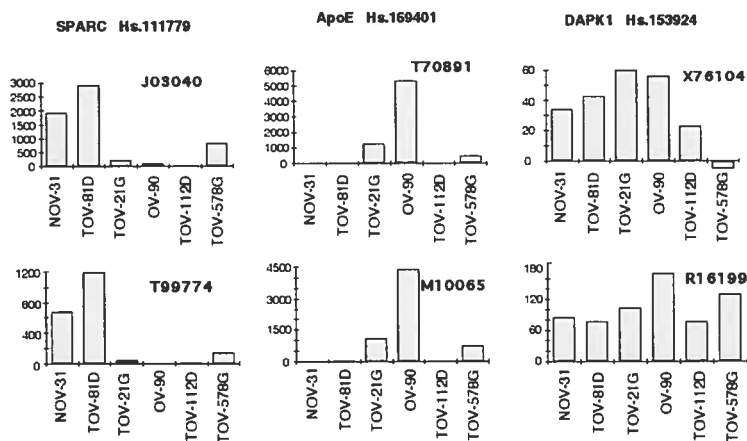
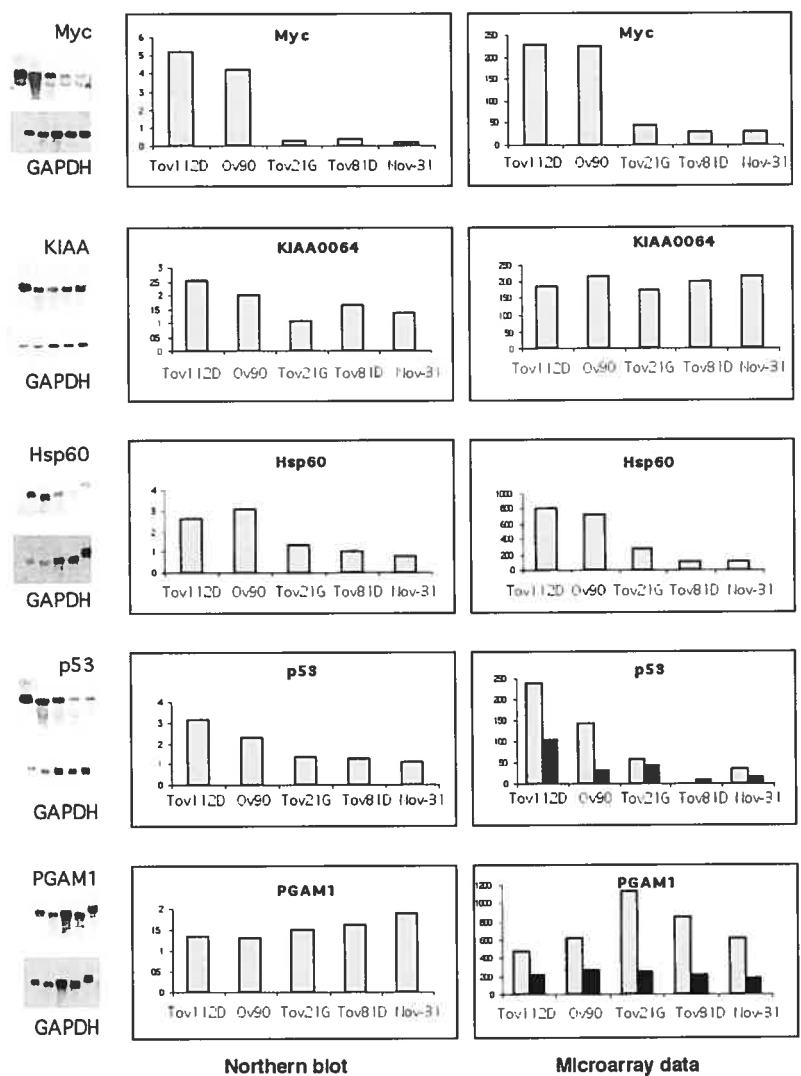


Figure 1B

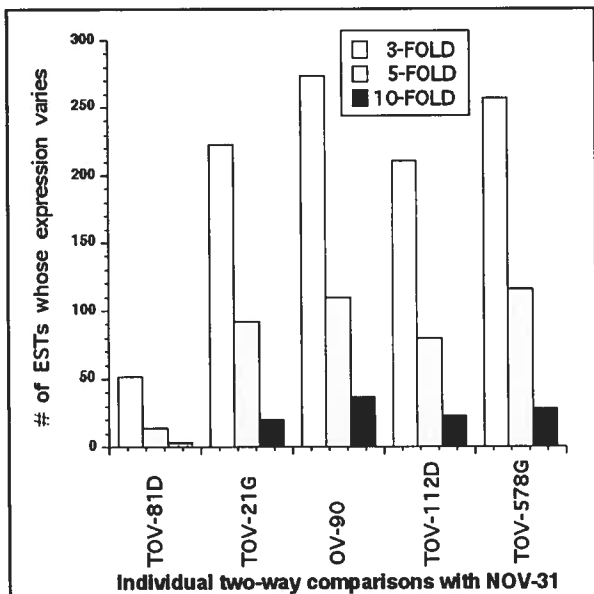


Northern blot

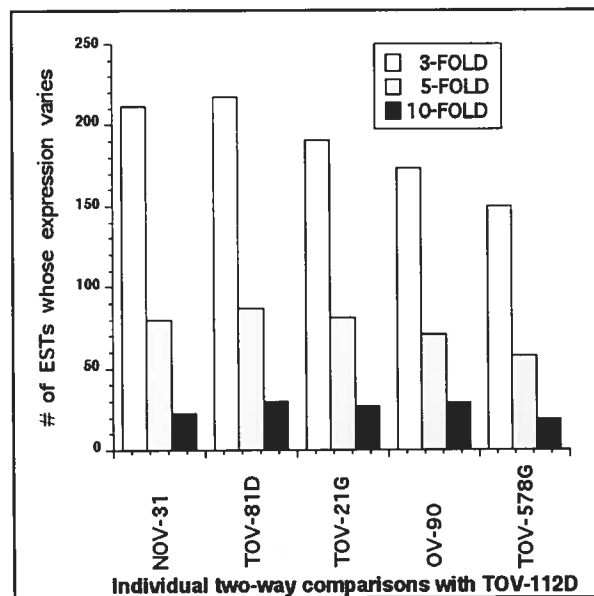
Microarray data

Figure 2

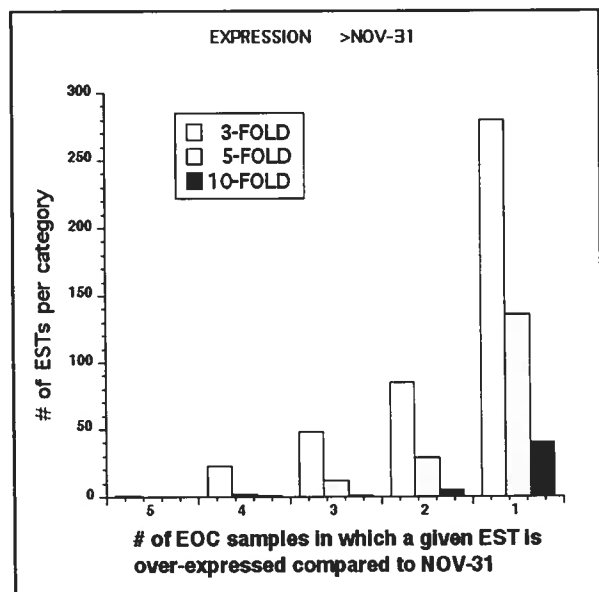
2A



2B



2C



2D

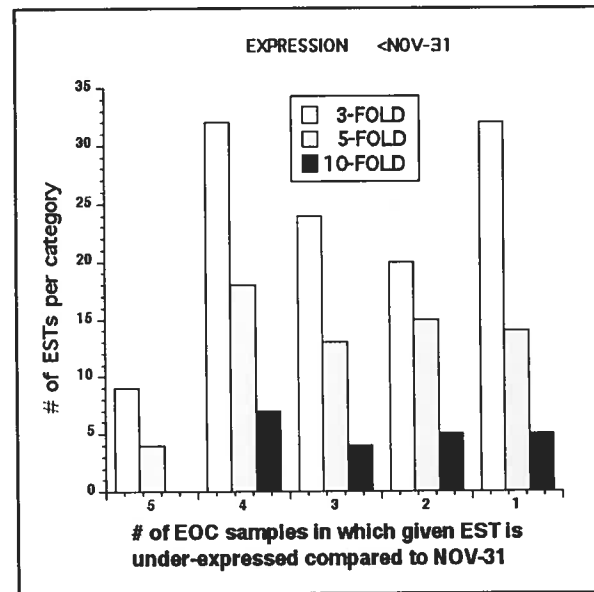


Figure 3

Cytogenetic position	Genetic marker	Gene symbol	UniGene designation	GenBank accession	TOY-81D	TOY-21G	OY-99	TOY-112D	TOY-578
p-1el		PI6	Hs.41072	T50500					
6p25	D6S1640	BPIIL	Hs.184552	XR1372					
6p23		DEK	Hs.110713	X64229					
6p22.3	D6S422	SOX4	Hs.83484	X70683					
6p22		E2F3	Hs.1185	D38550					
6p22.2-p21.3	D6S1665	PRL	Hs.1905	H51034					
	D6S1558	PPP2R5D	Hs.118244	R42798					
		H2BFR	Hs.134551	X00088					
		TBB1	Hs.179661	H15542					
		TBB1	Hs.179661	T65580					
		TBB1	Hs.179661	T56604					
6p21		SNRPC	Hs.1063	H82746					
		COX6A1	Hs.180714	H48072					
		K1A0082	Hs.154045	D43949					
6p21.3-p21.1		GLI1	Hs.75207	D13315					
		HLA-DR a	Hs.7687	V00523					
		HLA-F	Hs.110309	T54650					
6p21.3		ZNF173	Hs.1287	U09825					
		BF	Hs.69771	T67422					
		CLIC1	Hs.74276	T56690					
6p21.3		HLA-G	Hs.73885	M32800					
6p21.3		HLA-DRB1	Hs.180255	T62633					
6p21.3		HLA-DRB1	Hs.180255	X00700					
6p21.3		HLA-A	Hs.181244	M27539					
6p21.3		HLA-A	Hs.181244	T63499					
6p21.3		HLA-B	Hs.77961	M11799					
6p21.3		HLA-DMB	Hs.1162	R71401					
6p21.3		HLA-DMB	Hs.1162	U15085					
6p21.2	D6S1616	CDKN1A	Hs.179665	R46753					
		SRF	Hs.155321	R85482					
6p21		CCND3	Hs.83173	H89477					
6p21		CCND3	Hs.83173	M92287					
6p21		SRF	Hs.155321	J03161					
6p21		VEGF	Hs.73793	H11084					
		PTK7	Hs.90572	U33635					
		RHAG	Hs.169536	T48950					
	D6S427	GLI1	Hs.151393	M90656					
		MCM3	Hs.179565	X62153					
		K1A0057	Hs.153954	D31762					
		GSTA2	Hs.89552	T68706					
		GSTA4	Hs.169907	H09781					
		BPAG1	Hs.620	M63618					
	D6S430								
	D6S1596								
	D6S445	TRIP7	Hs.77558	L40357					
		ME1	Hs.14732	R60023					
		ST4	Hs.82128	Z29083					
		NT5	Hs.153952	X55740					
	D6S1644								
	D6S434	FYN	Hs.169370	H91826					
		FYN	Hs.169370	M14676					
	D6S266	MACS	Hs.75607	D10522					
		MACS	Hs.75607	R81330					
		PLN	Hs.85050	M63603					
	D6S304	HSE2	Hs.158195	M65217					
	D6S407								
	D6S457								
6p21.1		CTGF	Hs.75511	X78947					
6p22-q23	D6S472	MYB	Hs.1334	M13665					
		TNFAIP3	Hs.211600	T61446					
	D6S453								
	D6S311	AKAP12	Hs.788	M96322					
	D6S422								
	D6S261								
6q27		THBS2	Hs.108623	L12350					
q-ter									




 Greater than 3-fold differences where expression of tumour sample >NOV31
 Greater than 3-fold differences where expression of NOV31 > tumour sample
 Less than 3-fold differences in expression between NOV31 and the tumour sample

Table 1 Source of EOC specific RNA

Table 1 Source of EOC specific RNA					
	<i>Type of sample</i>	<i>Histology</i>	<i>Grade</i>	<i>Stage</i>	<i>Survival</i>
NOV-31	Primary culture	Normal ovarian surface epithelium			
TOV-21G	Cell line (solid tumor)	Clear cell carcinoma	3	III	N.D. (patient died of post-operative complications)
TOV-81D	Cell line (solid tumor)	Papillary serous adenocarcinoma	1-2	IIIC	10 years recurrent disease at 5, 7 and 9 years
OV-90	Cell line (ovarian ascites)	Adenocarcinoma	3	IIIC	18 months with disease
TOV-112D	Cell line (solid tumor)	Endometrioid carcinoma	3	IIIC	3 months with disease
TOV-578G	Solid tumor tissue	Endometrioid carcinoma	3	IIIC	5 months with disease

Tumors are staged and graded according to the FIGO classification

Table 2 Expression pattern of chromosome assigned genes/ESTs

Chromosome no.	No. of ESTs	Less than 3-fold differences in expression in comparison to NOV31					Greater than 3-fold differences in expression in comparison to NOV31									
							Tumour samples > NOV31					NOV31 > Tumour samples				
		TOV-81D	TOV-21G	OV-90	TOV-112D	TOV-578G	TOV-81D	TOV-21G	OV-90	TOV-112D	TOV-578G	TOV-81D	TOV-21G	OV-90	TOV-112D	TOV-578G
1	129	125	110	105	113	110	2	13	18	11	12	2	6	6	5	7
2	68	64	62	55	60	53	2	3	10	3	10	2	3	3	5	5
3	64	64	60	62	63	62	0	3	2	0	2	0	1	0	1	0
4	45	44	38	35	38	40	0	4	9	6	3	1	3	1	1	2
5	42	41	36	33	34	35	1	2	5	3	2	0	4	4	5	5
6	61	60	50	50	52	55	1	8	6	3	4	0	3	5	6	2
7	55	52	47	42	49	49	2	3	8	1	1	1	5	5	5	5
8	44	43	41	39	41	37	1	1	4	2	5	0	2	1	1	2
9	40	39	33	30	31	32	1	5	8	8	6	0	2	2	1	2
10	55	53	47	48	51	50	2	6	6	3	1	0	2	2	1	4
11	71	68	65	63	66	63	2	4	5	1	4	1	2	3	4	4
12	81	78	76	69	69	71	2	3	10	8	8	1	2	2	4	2
13	14	14	10	12	12	13	0	3	0	0	0	0	1	2	2	1
14	42	42	36	32	34	31	0	3	8	6	8	0	3	2	2	3
15	53	33	30	35	29	34	2	5	1	4	2	2	2	1	4	1
16	37	37	32	28	35	33	0	4	8	0	3	0	1	1	2	1
17	82	81	71	75	76	75	0	6	5	5	6	1	5	2	1	1
18	9	8	9	9	9	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
19	106	104	91	91	99	92	2	11	13	4	11	0	4	2	3	3
20	31	31	27	26	24	24	0	4	5	7	7	0	0	0	0	0
21	16	15	15	13	15	13	1	1	2	0	2	0	0	1	1	1
22	31	31	29	25	29	29	0	0	4	0	0	0	2	2	2	2
X	50	50	43	46	45	41	0	5	3	4	8	0	2	1	1	1
Total (%)	1226	1177 96	1058 86.3	1023 83.4	1074 87.6	1049 85.6	22 1.8	97 7.9	140 11.4	79 6.4	105 8.6	11 0.9	55 4.5	48 3.9	57 4.6	56 4.6

Table 3 Correlation of microarray expression results of selected genes/ESTs with published observations in EOC based on Northern blot analysis and immunohistochemistry

UniGene	Symbol	Description	Accession	NOV-31	TOV-81D	TOV-112D	TOV-778G	OV-90	TOV-21G	Previously reported expression in ovarian cancer
Hs.179665	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	R46753 U03106	300 (P) 94 (P)	411 (P) 95 (P)	-24 (A) -1 (A)	-15 (A) 1 (A)	11 (A) 30 (A)	-42 (A) 54 (A)	Low expression (protein) associated with high grade and stage disease (Anttila et al., 1999), in cultured cells reversed (protein) has been observed (Barboulet et al., 1992)
Hs.79070	MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	H24033	29 (P)	28 (P)	224 (P)	106 (P)	227 (P)	44 (P)	Over-expression (mRNA) seen in EOC (Tanmer et al., 1995)
Hs.2780	JUNB	Jun B proto-oncogene	X51346	169 (P)	219 (P)	304 (P)	423 (P)	108 (P)	200 (P)	Suppressed in EOC as compared to NOSE in situ and in vitro (Northern and immunohistochemistry) (Neyras et al., 1996)
Hs.1406	TFF1	trefoil factor 1	X00474	23 (A)	20 (A)	-9 (A)	86 (A)	5082 (P)	55 (A)	Suggest overexpression associated with mucous sub-type (Wyszocki et al., 1992)
Hs.126256	IL1B	interleukin 1, beta	X04500	3091 (P)	357 (P)	110 (P)	32 (A)	84 (M)	-113 (A)	Expression not detectable (mRNA) (Aitchison et al., 1997). Increased expression in EOC vs. NOSE (immunohistochemistry) (Haleibel et al., 1997)
Hs.75586	CCND1	cyclin D2	D13639 H11125	52 (P) 37 (P)	27 (P) 14 (A)	264 (P) 203 (P)	363 (P) 121 (P)	7 (A) 7 (A)	171 (P) 16 (A)	No increased expression (Northern blot analysis) (Counaj et al., 1996)
Hs.83173	CCND3	cyclin D3	M92287 H89477	33 (P) 69 (A)	53 (P) 80 (A)	37 (M) 79 (A)	95 (P) 89 (A)	193 (P) 171 (P)	347 (P) -173 (A)	No increased expression (Northern blot analysis) (Counaj et al., 1996)
Hs.82085	PAI1	plasminogen activator inhibitor, type 1	M14083	2434 (P)	3503 (P)	-12 (A)	69 (P)	158 (P)	6 (A)	Increased expression (immunohistochemistry) associated with high stage (Chamber et al., 1995)
Hs.195188	GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	T55131 M33197	2595 (P) 2087 (P)	3984 (P) 2226 (P)	2623 (P) 2066 (P)	4250 (P) 1278 (P)	3151 (P) 830 (P)	3971 (P) 2660 (P)	Has been used as mRNA control.
Hs.111779	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	J03040 T54767 T99774 T48035	1929 (P) 865 (P) 679 (P) 141 (P)	2905 (P) 1262 (P) 1190 (P) 55 (P)	39 (P) -16 (A) 15 (A) -33 (A)	822 (P) 114 (P) 139 (P) 13 (A)	113 (P) 8 (A) 1 (A) -9 (A)	229 (P) 7 (A) -40 (A) 23 (A)	Down-regulated in EOC vs. NOSE (Mak et al., 1996). Up-regulated in reactive stroma associated with EOC (Brown et al., 1999)

