

UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN
INSTITUT LUDWIG POUR LA RECHERCHE SUR LE CANCER
Unité de Bruxelles

**UN RETROVIRUS ENDOGENE DEFECTIF CODE
UN ANTIGENE RECONNU PAR DES
LYMPHOCYTES T CYTOLYTIQUES SUR UNE
LEUCEMIE MURINE SPONTANEE**

Figures des résultats : 2-21 à 2-29

Vinciane de Brouhoven de Bergeyck

Promoteur: Pr. T. Boon
Co-Promoteur: Pr. C. Remacle

**Dissertation présentée à la
Faculté des Sciences de l'Université catholique de Louvain
en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences**

1994

CIBLES :

CLONES CTL :

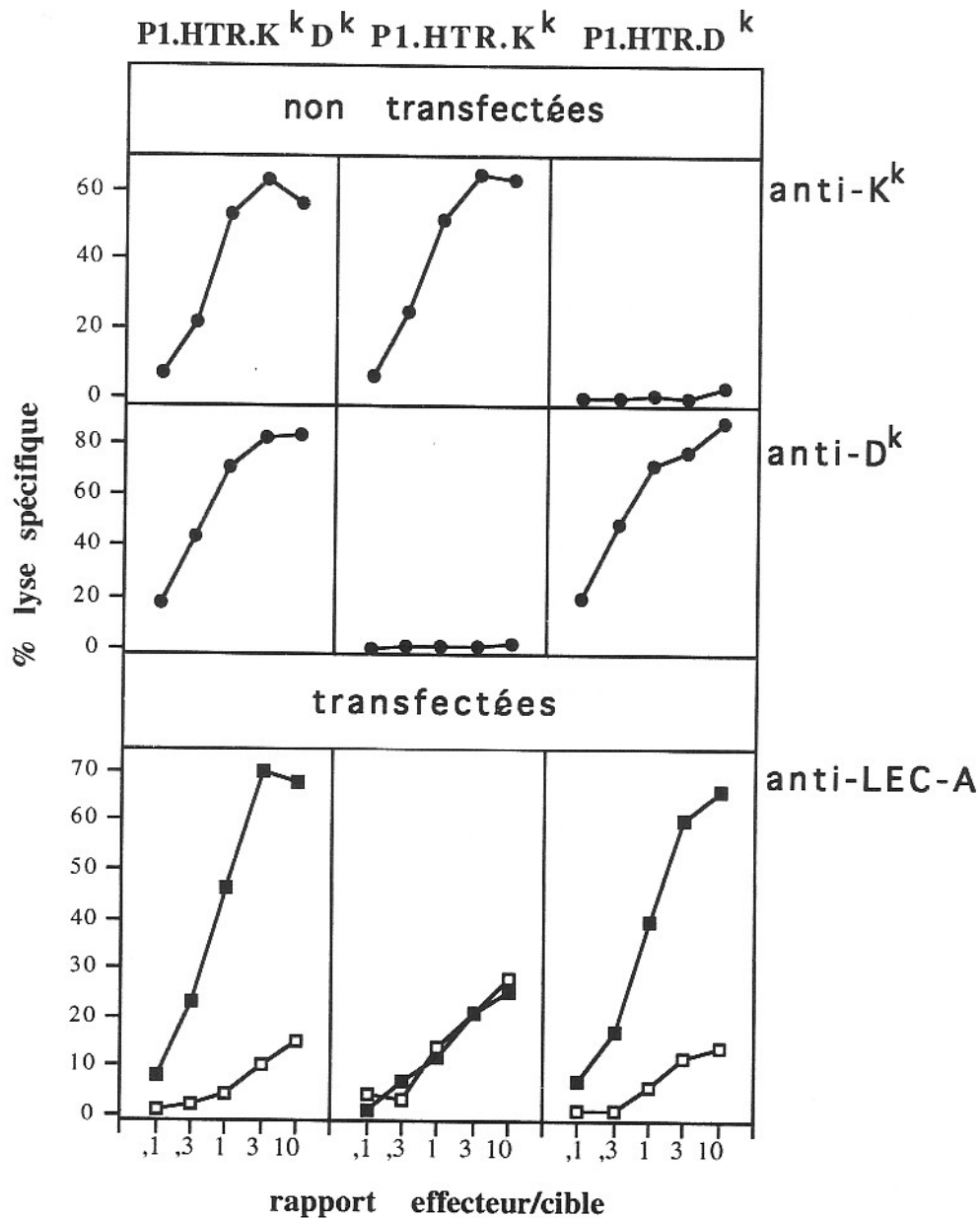


Figure II. 21: L'antigène LEC-A est restreint par la molécule H-2 D^k.

Les cellules P1.HTR exprimant soit les molécules K^k et D^k, soit la molécule K^k, soit la molécule D^k ont été transfectées soit avec le cosmide P5.C3 et le cosmide pHMR272 (■), soit uniquement avec le cosmide pHMR272 (□). Les transfectants résistants à l'hygromycine B ont été incubés pendant 3 jours dans un milieu contenant 25% de surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires. Leur lyse par les CTL-LEC1:5 a été mesurée après un test de relargage de chrome-51 de 4 heures.

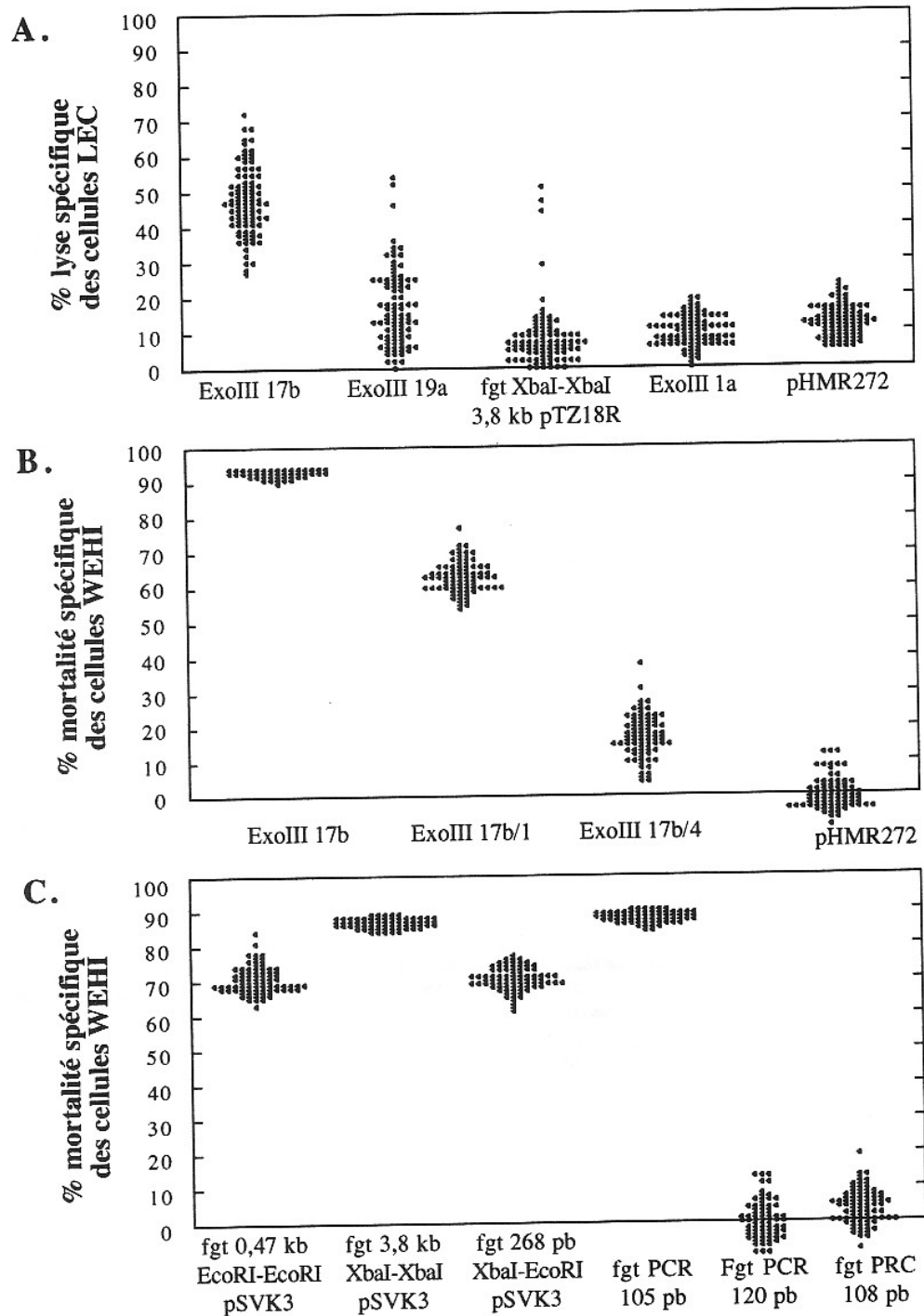
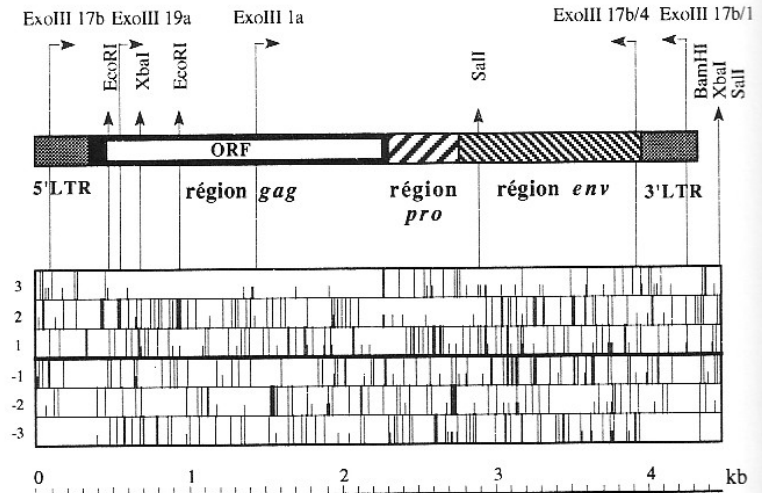


Figure II.22: Obtention d'un fragment de 105 pb codant l'antigène LEC-A.

- A.** Résultats des tests de stimulation effectués sur des groupes de 20 transfectants obtenus en cotransfectant le cosmide pHMR272 et des parties de l'élément LEC-A IAP clonées dans le plasmide pTZ18R.
- B.** Résultat des tests TNF effectués sur des groupes de 2.000 transfectants obtenus en cotransfectant le cosmide pHMR272 et des parties de l'élément LEC-A IAP clonées dans le plasmide pTZ18R.
- C.** Résultat des tests TNF effectués sur des groupes de 2.000 transfectants obtenus en cotransfectant le cosmide pHMR272 et des parties de l'élément LEC-A IAP clonées dans pSVK3 ou pSVK6.4.

A.



B.

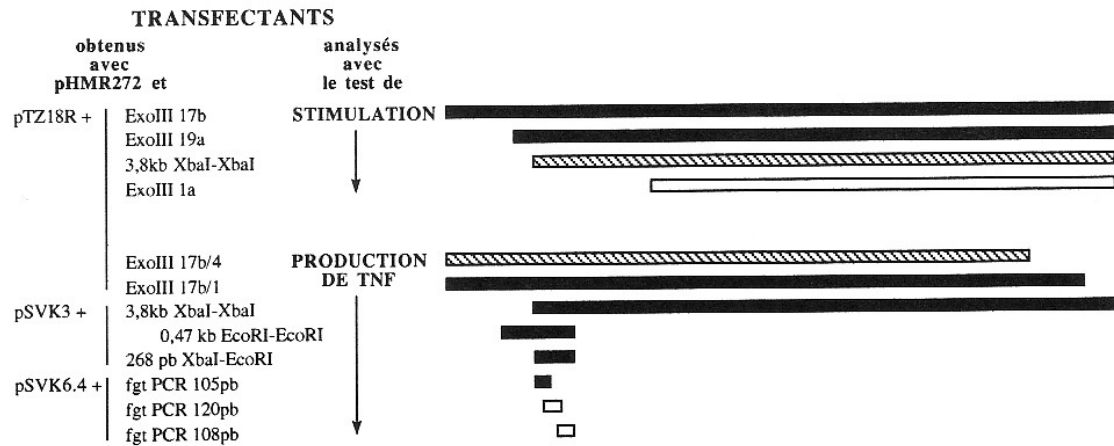


Figure II.23: Localisation du fragment de 105 pb codant l'antigène LEC-A.

A. Structure de l'élément LEC-A IAP. L'ORF codant la protéine *gag*, les sites de clivage des enzymes EcoRI, XbaI, SalI et BamHI, ainsi que le début des clones ExoIII 17b, 19a, et 1a, et la fin des sous-clones ExoIII 17b/4 et 17b/1 sont indiqués.

Les phases de lecture de l'élément LEC-A IAP et des séquences situées en aval du provirus sont analysées. Etant donné que les LTR de certains éléments IAP sont bidirectionnels (Christy & Huang 1988), les 6 phases de lecture sont indiquées. Les phases 1, 2 et 3 correspondent au sens de transcription 5'LTR → 3'LTR, le signe - est utilisé pour le sens de transcription 3'LTR → 5'LTR. Dans chaque phase, les codons ATG et STOP sont représentés respectivement par des petites et des grandes lignes verticales.

B. Des fragments clonés dans le plasmide pTZ18R, ou dans les vecteurs d'expression pSVK3 et pSVK6.4 ont été cotransfectés avec le cosmide pHMR272 dans les cellules P1.HTR.K^D. Des tests de stimulation ou de production de TNF ont été effectués respectivement sur des groupes de 20 ou 2.000 transfectants résistants à l'hygromycine B afin d'analyser l'expression de l'antigène LEC-A.

Les fragments qui conféraient efficacement l'expression de l'antigène LEC-A sont indiqués en noir. Ceux qui transféraient faiblement l'expression de l'antigène sont représentés en hachuré. Le blanc est utilisé pour les fragments qui ne codent pas l'antigène.

Expression de
l'antigène LEC1A
après transfection

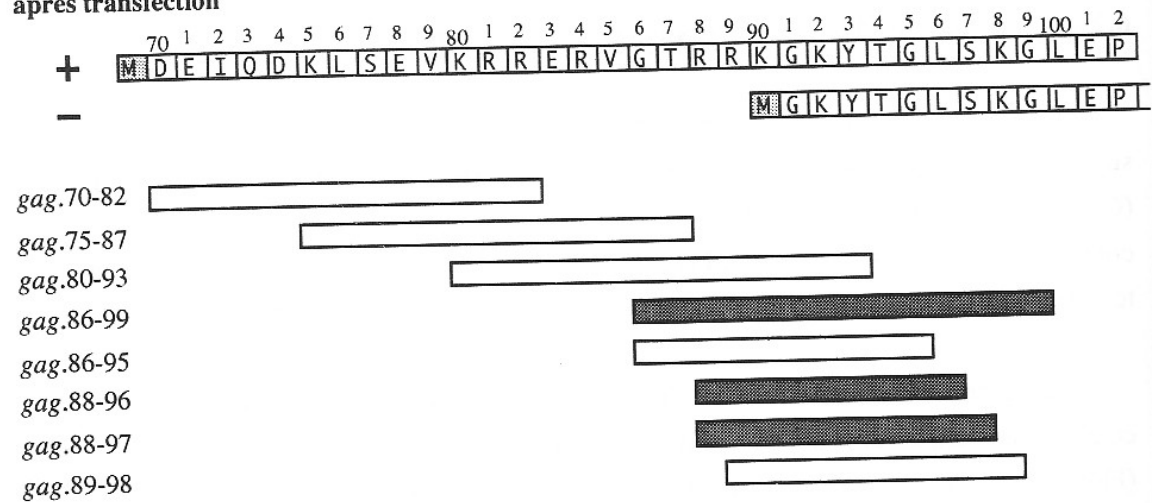


Figure II.24: Séquence du polypeptide codé par le fragment PCR de 105 pb conférant l'expression de l'antigène LEC-A et localisation des peptides reconnus par les CTL-LEC1:5.

Le polypeptide codé par le fragment PCR de 105 pb contient une méthionine introduite par PCR (indiquée dans un rectangle gris) et les acides aminés 70-102 de la protéine *gag* codée par l'élément LEC-A IAP. La partie N-terminale du polypeptide codé par le fragment PCR de 120 pb est aussi représentée.

Les peptides dessinés en gris sont reconnus par les CTL-LEC1:5, les blancs ne le sont pas.

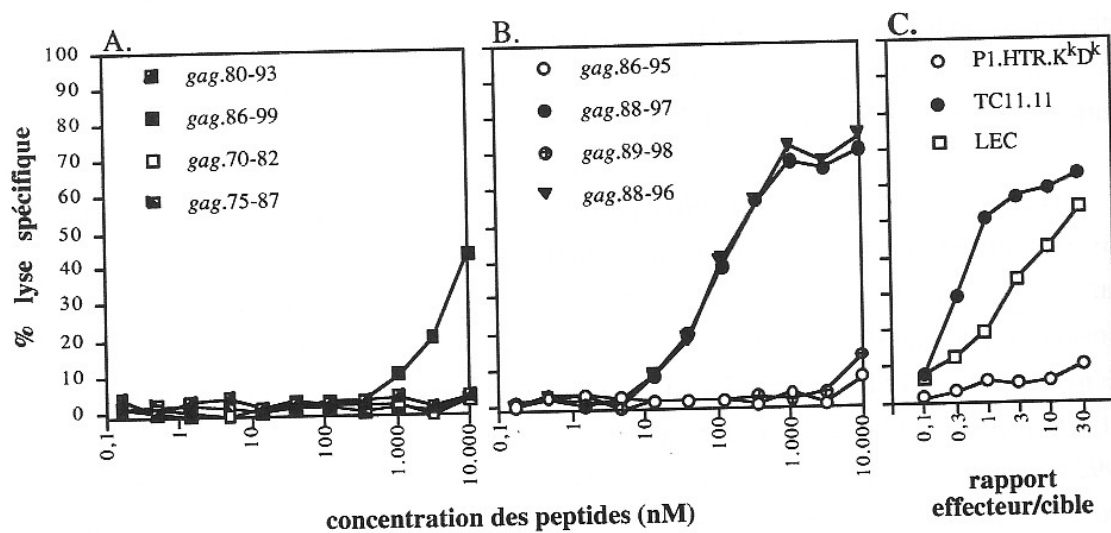


Figure II.25: Les peptides *gag.86-99*, *gag.88-96* et *gag.88-97* induisent la lyse des cellules P1.HTR.K^{kDk} par les CTL-LEC1:5.

A et B: Les cellules P1.HTR.K^{kDk} marquées au chrome-51 ont été incubées pendant 4 heures avec les CTL-LEC1:5 à un rapport effecteur/cible de 10/1 en présence de concentrations croissantes des différents peptides.

C: Activité lytique des CTL-LEC1:5 sur trois cellules-contrôles.

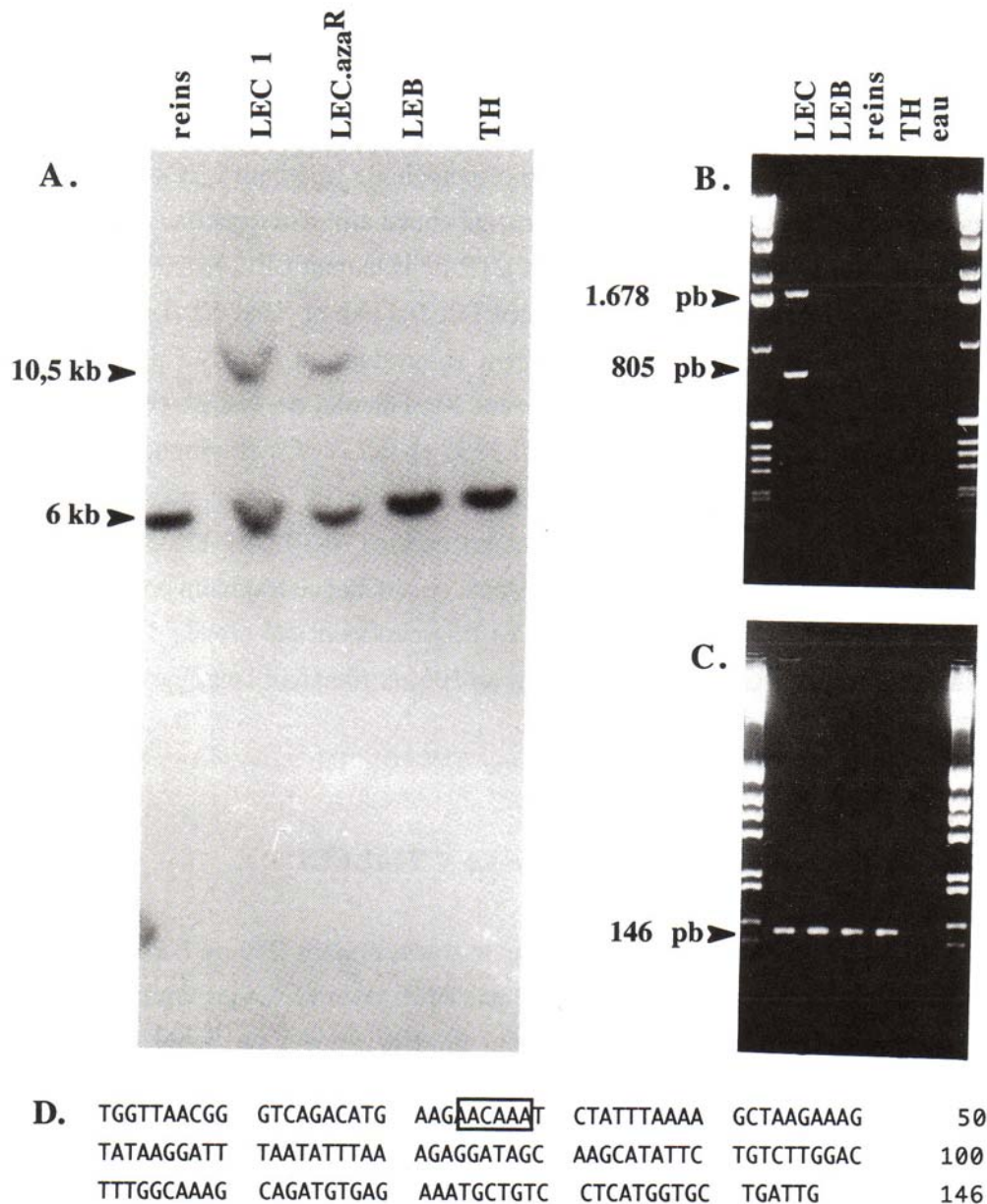


Figure II.26: L'élément LEC-A IAP s'est transposé dans la tumeur LEC.

A. 20 µg d'ADN génomique extrait à partir de reins de souris CBA/Ht, de cellules LEC1, LEC.aza^R et des leucémies LEB et TH ont été digérés par l'enzyme BamHI. Les produits des digestions ont été séparés sur un gel d'agarose 0,5%, dénaturés, transférés sur une feuille de nitrocellulose et hybridés avec le fragment HindIII-EcoRI marqué au phosphore-32. La position de cette sonde est indiquée à la figure II.12.

B. Des PCR ont été effectuées sur 100 ng d'ADN génomique avec des oligonucléotides situés du part et d'autre du 5'LTR ou du 3'LTR de l'élément LEC-A IAP (Figure II.13). Ces amorces permettent d'amplifier respectivement des fragments de 805 et de 1.678 pb. Pour chaque ADN génomique, les produits des deux PCR ont été mélangés et un aliquot a été chargé sur un gel d'agarose 1,5%.

C. Des PCR ont été effectuées sur 100 ng d'ADN génomique avec des oligonucléotides situés en amont et en aval de l'élément LEC-A IAP. Un aliquot des produits PCR a été chargé sur un gel d'agarose "low melting" 3%.

D. Séquence du fragment de 146 pb obtenu à partir de l'ADN génomique des cellules LEC avec les amorces situées en amont et en aval de l'élément LEC-A IAP. Le site d'intégration de l'élément LEC-A IAP est encadré.

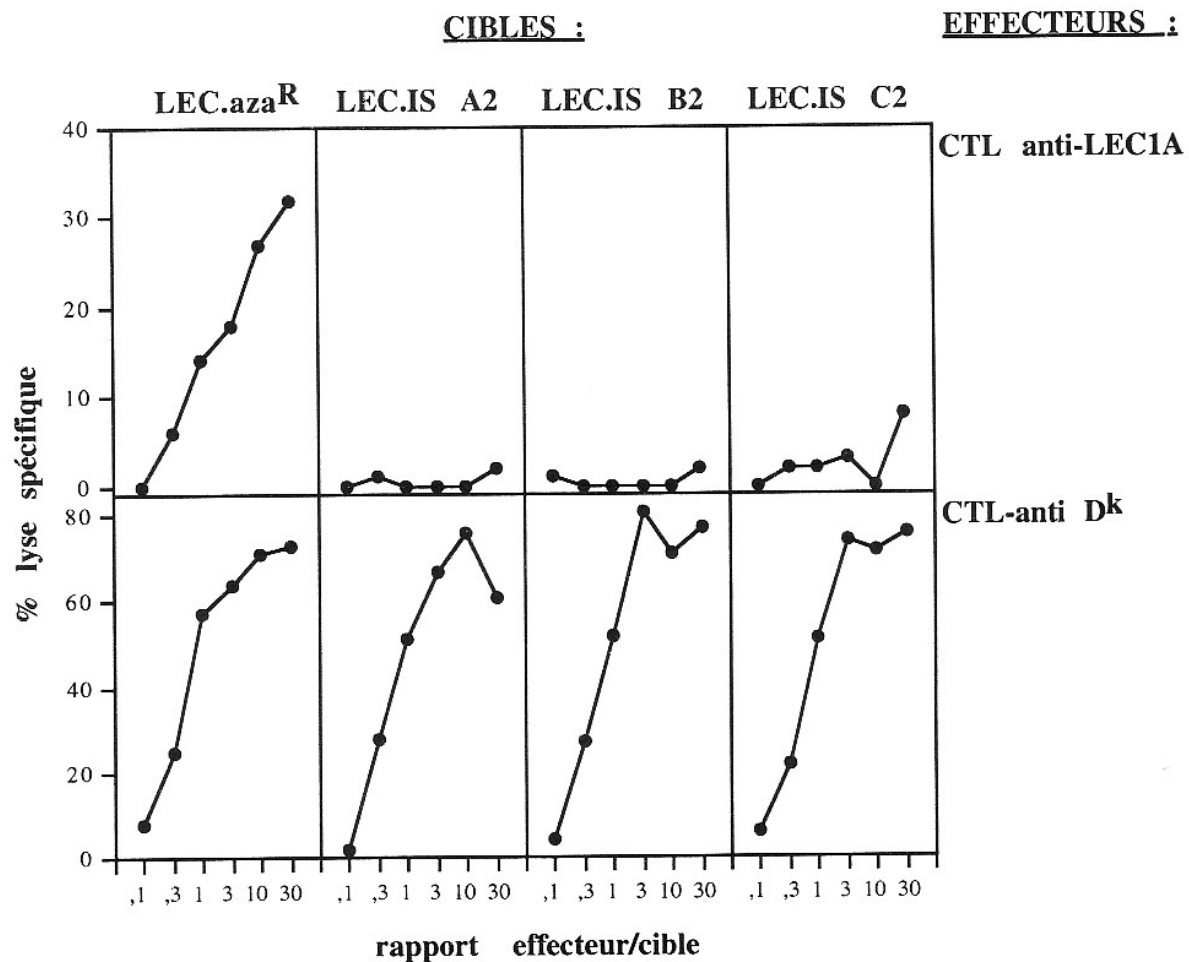


Figure II.27: Obtention de variants de cellules LEC n'exprimant plus l'antigène LEC-A.

La lyse des cellules LEC.aza^R et des trois variants par les CTL-LEC1:5 (anti-LEC-A) et par les CTL-cl1D:16 (anti-D^k) a été mesurée au cours d'un test de relargage de chrome-51 de 4 heures.

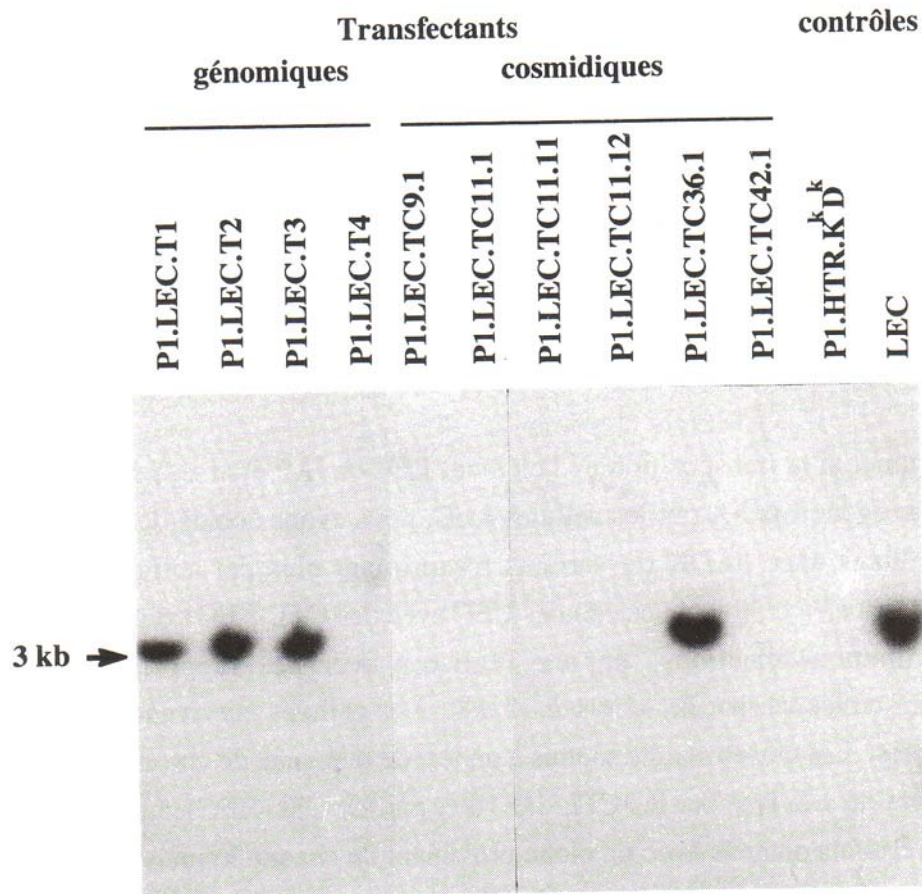


Figure II.28: Le génome des cellules LEC contient plusieurs loci codant l'antigène LEC-A.

Un Southern blot préparé avec 20 µg d'ADN génomique clivé par l'enzyme HindIII a été hybridé avec la sonde HindIII-EcoRI. La position de la sonde est indiquée à la figure II.13.

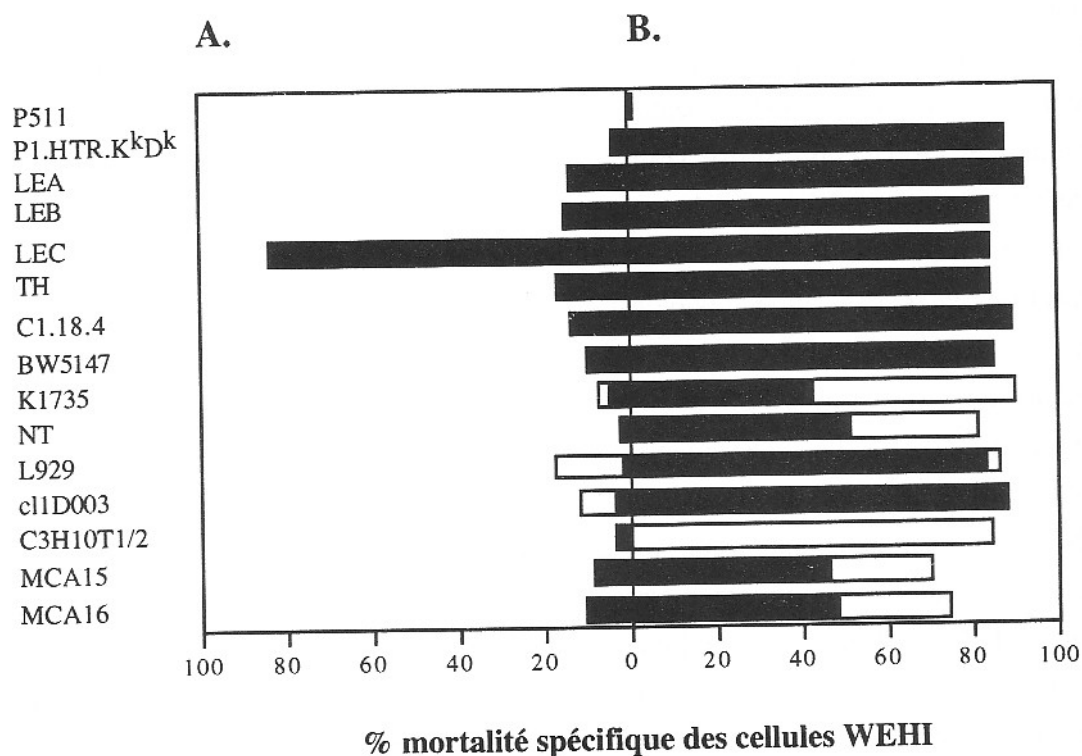


Figure II.29: Expression de l'antigène LEC-A et de son élément de restriction par des lignées cellulaires de l'haplotype H-2^k.

A. Analyse de la production de TNF par les CTL-LEC1:5 incubés avec 2×10^4 cellules qui ont été cultivées dans un milieu normal (rectangles noirs), ou dans du milieu contenant 25% de surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires (rectangles blancs).

B. Analyse de la production de TNF par les CTL-LEC1:5 incubés avec 2×10^4 cellules pré-traitées avec 47 nM du peptide *gag*.88-96. Les rectangles noirs représentent les résultats obtenus avec des cellules cultivées dans un milieu normal, les rectangles blancs indiquent les résultats obtenus avec des cellules incubées pendant trois jours dans du milieu contenant 25% de surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires. Les cellules C3H10T1/2 incubées dans du milieu normal n'ont pas été testées.