

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**

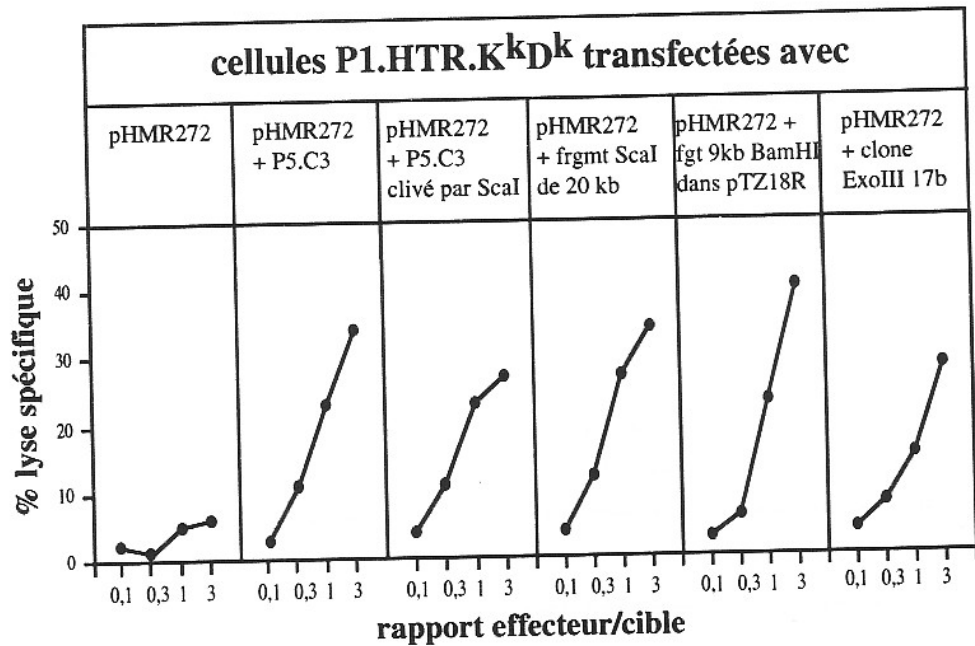
Figures des résultats : 2-11 à 2-20

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



cellules-contrôles :

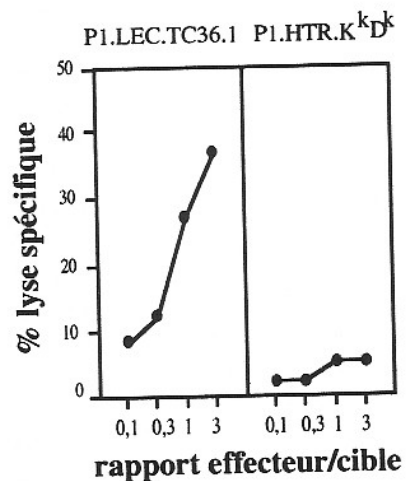
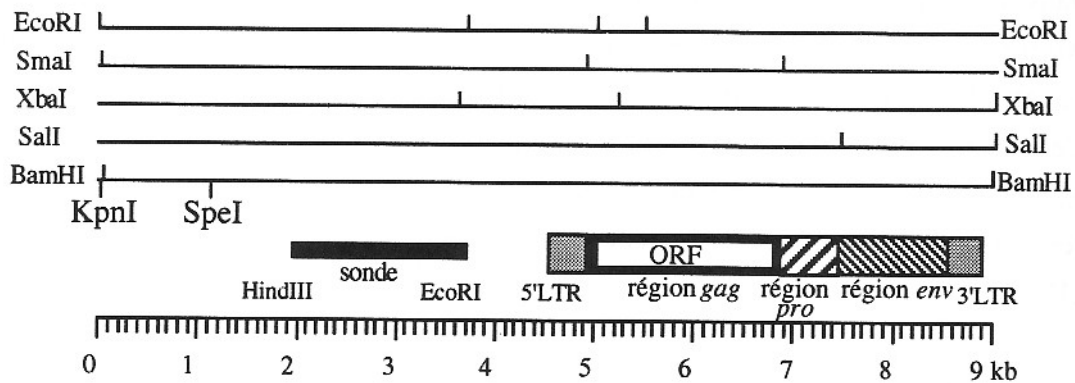


Figure II.11: Identification de fragments capables de conférer l'expression de l'antigène LEC-A par transfection.

L'ADN du cosmide P5.C3 ou de fragments provenant de ce cosmide a été transfecté avec l'ADN du cosmide pHMR272 dans les cellules P1.HTR.K^{kDk} cl.1b. Les populations de transfectants résistant à l'hygromycine B ont été incubées pendant 2 ou 3 jours dans un milieu contenant 25% de surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires. La lyse des transfectants par les CTL-LEC1:5 a été mesurée après un test de relargage de chrome-51 de 4 heures.

A.



B.

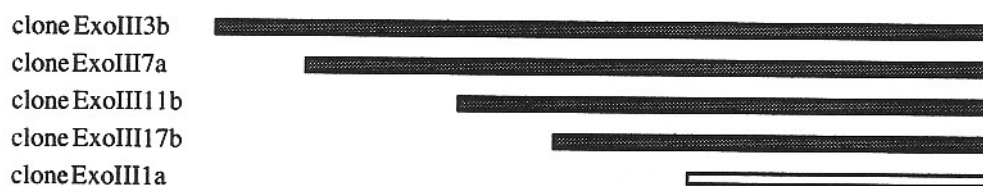


Figure II.12:

A. Carte de restriction du fragment BamHI-BamHI de 9 kb conférant l'expression de l'antigène LEC-A. La localisation et la structure de l'élément LEC-A IAP sont indiquées.

B. Obtention d'un fragment de 4,38 kb codant l'antigène LEC-A. Le plasmide contenant le fragment BamHI-BamHI de 9 kb a été digéré par les enzymes KpnI et SpeI. Les extrémités SpeI des fragments de restriction ont été délétées progressivement par l'exonucléase III. Les extrémités des fragments ont ensuite été traitées par la nucléase S1 et puis par la Klenow. Les fragments ont été circularisés, amplifiés, analysés et transfectés dans les cellules P1.HTR.K^kDK^k c1.1b. Un test de relargage de chrome-51 a été effectué pour évaluer l'expression de l'antigène LEC-A par les transfectants préalablement incubés durant 3 jours dans du milieu contenant 25% de surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires. Les fragments représentés en gris confèrent l'expression de l'antigène LEC-A.

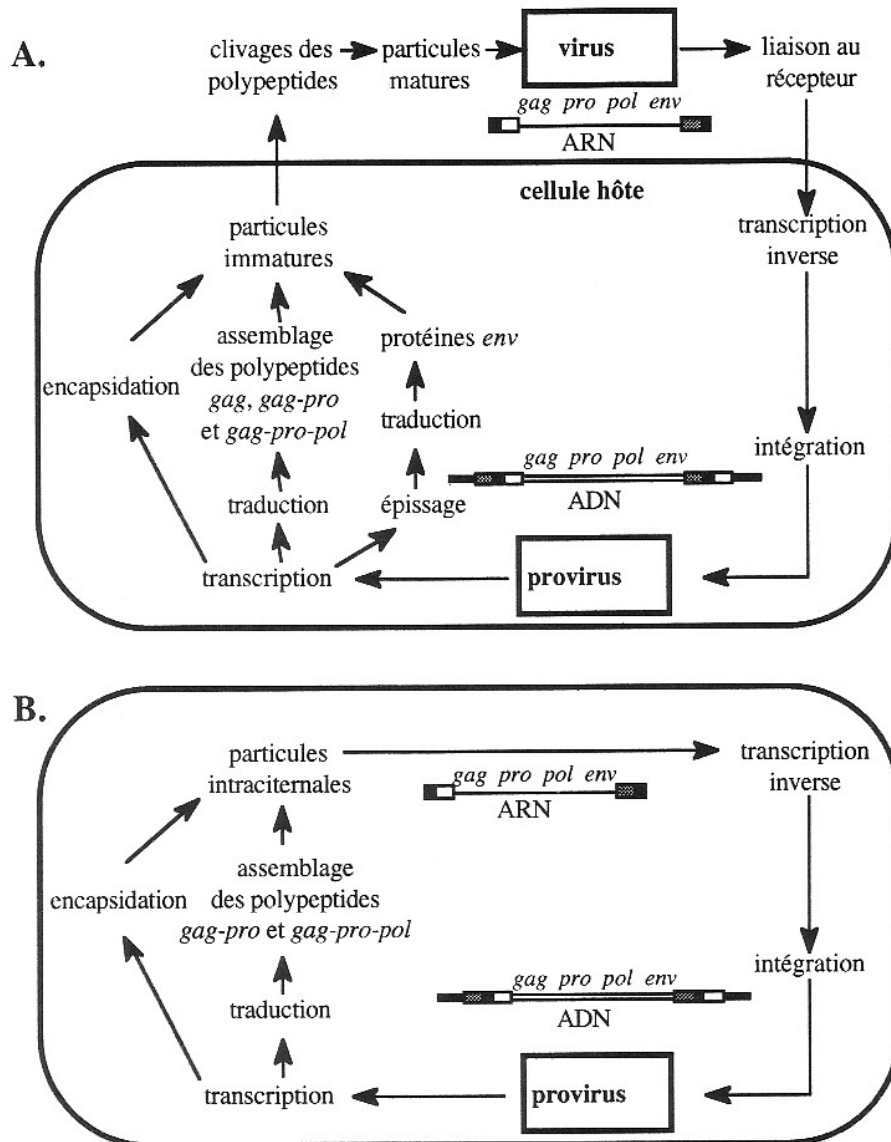


Figure II.14: Comparaison des rétrovirus et des séquences IAP.

A. Le cycle de vie des rétrovirus commence avec la liaison de la particule virale sur son récepteur à la surface de la cellule-hôte. Le virus est ensuite internalisé. L'ARN viral est alors converti en ADN bicaténaire par la transcriptase inverse. L'ADN est intégré dans le génome de la cellule-hôte. Le génome viral intégré porte le nom de provirus, il comporte deux LTR encadrant la région codante. Sa transcription par l'ARN polymérase II fournit des copies d'ARN qui subissent les mêmes modifications que les ARNm cellulaires et qui sont traduites. Les polyprotéines *gag*, *gag-pro* et *gag-pro-pol* s'assemblent pour former des particules virales immatures. Des génomes viraux sont encapsidés dans ces particules sous forme d'ARN. Les particules s'associent avec les protéines d'enveloppe qui sont des glycoprotéines transmembranaires produites à partir d'ARNm subgénomiques. Les particules bourgeonnent hors de la cellule pour former des particules virales extracellulaires. Les polyprotéines *gag*, *gag-pro* et *gag-pro-pol* sont alors clivées ce qui provoque un changement de morphologie des particules virales.

B. Les séquences IAP codent des protéines qui s'assemblent et forment des particules localisées dans les citernes du réticulum endoplasmique rugueux des cellules. Certains transcrits IAP sont transcrits en ADN bicaténaire par transcription inverse. Ces copies d'ADN s'intègrent en de nouveaux loci du génome de la cellule.

Les LTR sont représentés sous forme de rectangles: les parties grises, noires et blanches correspondent respectivement aux régions U3, R, U5.

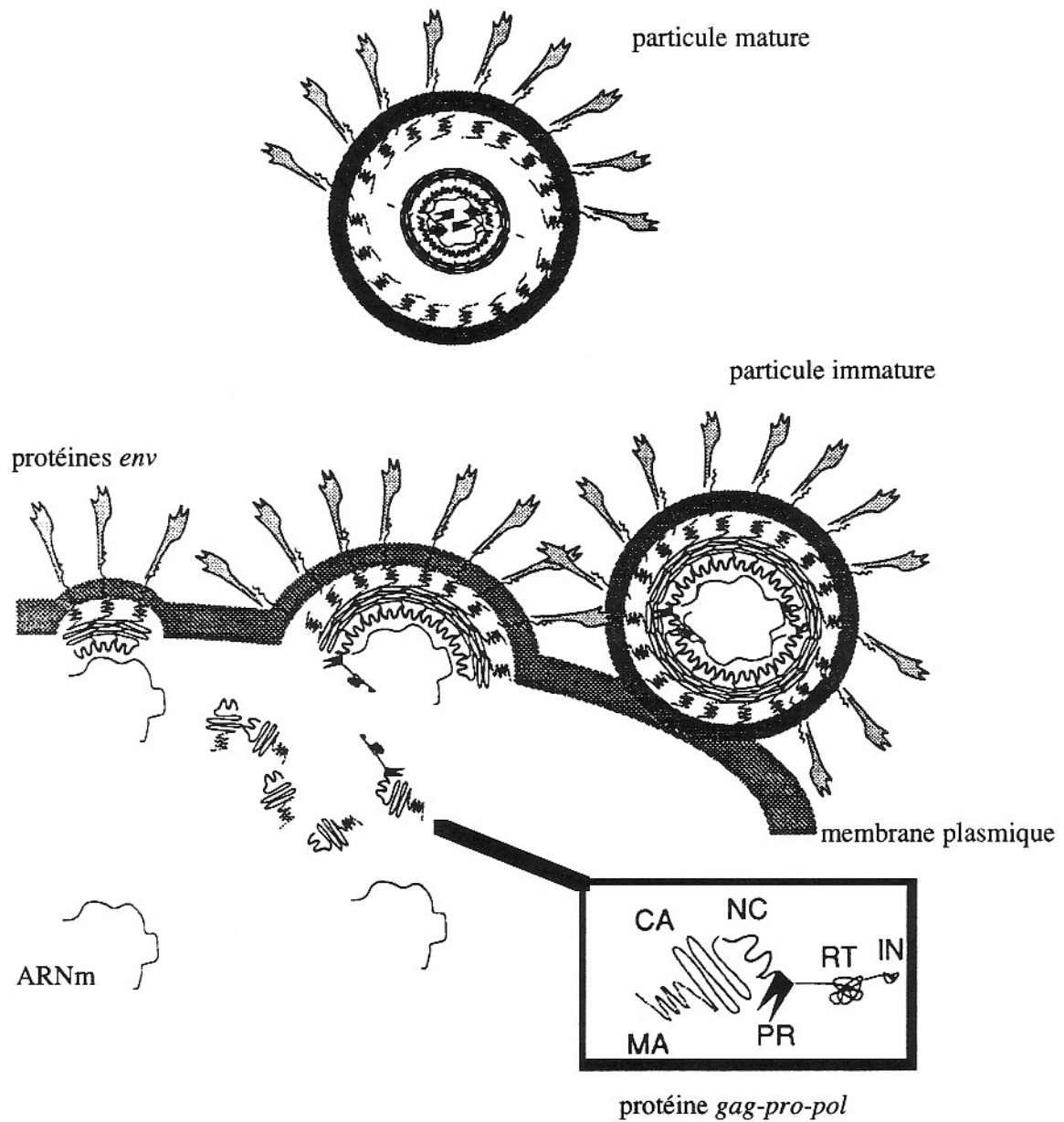


Figure II.15: Formation de particules virales de type C.
(Fields Virology, Raven Press, second edition, page 1474, 1990)

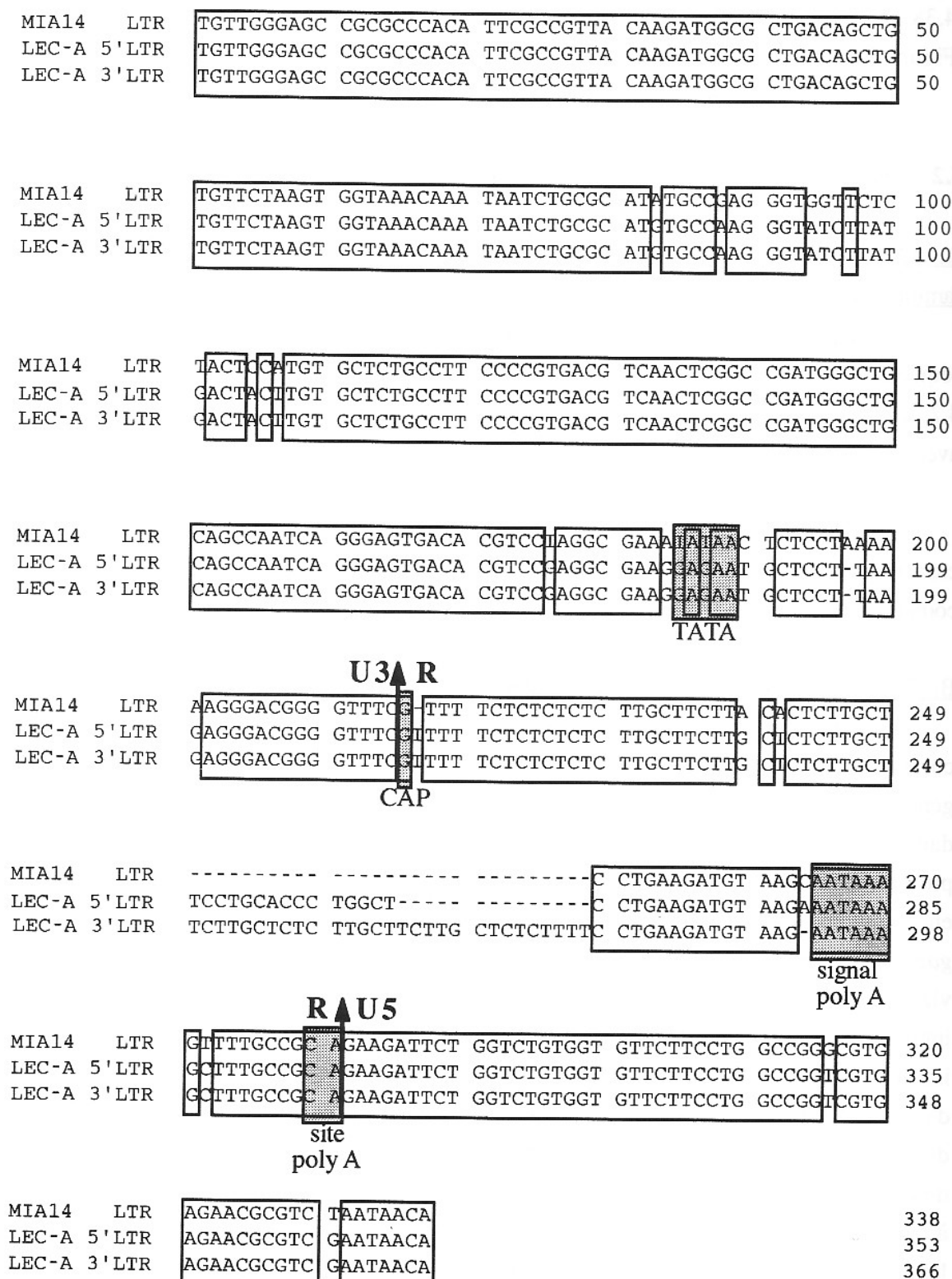


Figure II.16: Alignement des séquences et structure des LTR des éléments LEC-A IAP et MIA14. L'alignement a été réalisé avec le programme GeneWorks. Les traits (-) correspondent aux espaces introduits pour un alignement optimal des séquences. Les boîtes indiquent les identités de séquences. Les boîtes grises indiquent les séquences impliquées dans la synthèse des ARNm.

Protein	Sequence	Position
MIA14	MNSELFVSGT RVPVSTALRG KSDLELSNEI QDSLSEVKWN	10
LEC1A-IAP	MFGLEFFLVVL MFGLEIFLVVL	50
MIA14	EALLFLFTCY QVVKAGRILD EIQDKLSEVK RGERVGTTRK YGTQNKYTGL	60
LEC1A-IAP	GALLFLFTCY QVVKILGRILD EIQDKLSEVK RGERVGTTRK -G---KYTGL	96
MIA14	SKGLEPEEKL RLGRNTWREI RRRKGKREKK KDLAEVSRK KSLCSLDGL	110
LEC1A-IAP	SKGLEPEEKL RLGRNTWREI RRRKGKREKK KDLAEVSRK YS---SLDEL	143
MIA14	GFALSSSEA DEEFSSSEETD WEEEAHYEK KGYQPGKVL NQLKPKAAG	160
LEC1A-IAP	RKALSSSEA DEEFSSSEETD WEEEAHY-- ---QP---AN WSRKPKAAG	185
MIA14	EGQFADWPQG SRLQG--PPY AESPPC---VVRQCAER QCAKRCADS	203
LEC1A-IAP	EGQFADWPQG NRLEGALPPY AESPPCVVRQ EVVRQCAER QCAERQADS	235
MIA14	FIPREEQRKI QQAFVPFEGA EGGRVHAPVE YLQIKETAES VRKYGTNANF	253
LEC1A-IAP	FIPREEQRKI QQAFVPFEGA EGGRVHAPVE YLQIKETAES VRKYGTNANF	285
MIA14	TLVQLDRLAG MALTPADWQT VVKAALPMMG KYMEWRALWH EIAQAQARAN	303
LEC1A-IAP	TLVQLDRLAG MALTPADWQT VVKAALPMG KYMEWRALWH EIAQAQARAN	335
MIA14	AAALTPEQRD WTFDLLTGQG AYSADQTNH WGAYAQISST AIRFWKGLSR	353
LEC1A-IAP	AAALTPEQRD WTFDLLTGQG AYSADQTNH WGAYAQISST AIRFWKGLSR	385
MIA14	AGETTQGLTK VVQGPQESFS DFVARMTEAA ERIFGESEQA APLIEQLIYE	403
LEC1A-IAP	AGETTQGLTK IIQGPQESFS DFVARMTEAA ERIFGESEQA APLIEQLIYE	435
MIA14	QATKECRAAI APRKNKGLQD WLRVCRELGG PLTNAGLAAA ILQSQRNSMS	453
LEC1A-IAP	QATKECRAAI APRKNKGLQD WLRVCRELGG PLTNAGLAAA ILQSQRNSMS	485
MIA14	RNDQRTCFN GKPGHFKKDC RAPDKQGGTL TLSSKSGKY IRADQERSVR	503
LEC1A-IAP	RNDQRTCFN GKPGHFKKDC RAPDKQGGTL TLSSKSGKY IRADQERSVR	535
MIA14	DIKGRVLPPP DSQSAYVPKN GSSGPRSQGL KDMGTGLSGP RKQSERRPRK	553
LEC1A-IAP	DIKGRVLPPP DSQSAYVPKN GSSGPRSQGP QRYGNRFVRT QEAVREATQE	585
MIA14	THKVDLRAAS DFLMPQMSI QPVPVEPIPS LPLGTMGLIL GRGSASTLQG	603
LEC1A-IAP	DPQGWIVPP PTSY.	599

Figure II.17: Alignement de la séquence protéique correspondant à la plus longue phase ouverte de lecture de l'élément LEC-A IAP et des 603 acides aminés N-terminaux de la protéine *gag-pro* de l'élément MIA14. L'alignement a été réalisé avec le programme GeneWorks. Les traits (-) correspondent aux espaces introduits pour un alignement optimal des séquences. Les boîtes indiquent les identités de séquences. Les domaines de ces protéines sont indiqués (CA = protéine de la capsid, NC = nucléoprotéine), ainsi que les cystéines et les motifs Cys-X₂-Cys-X₄-His-X₄-Cys. Ces motifs sont caractéristiques des nucléoprotéines virales et des protéines qui présentent une forte affinité pour les acides nucléiques simple-brin.

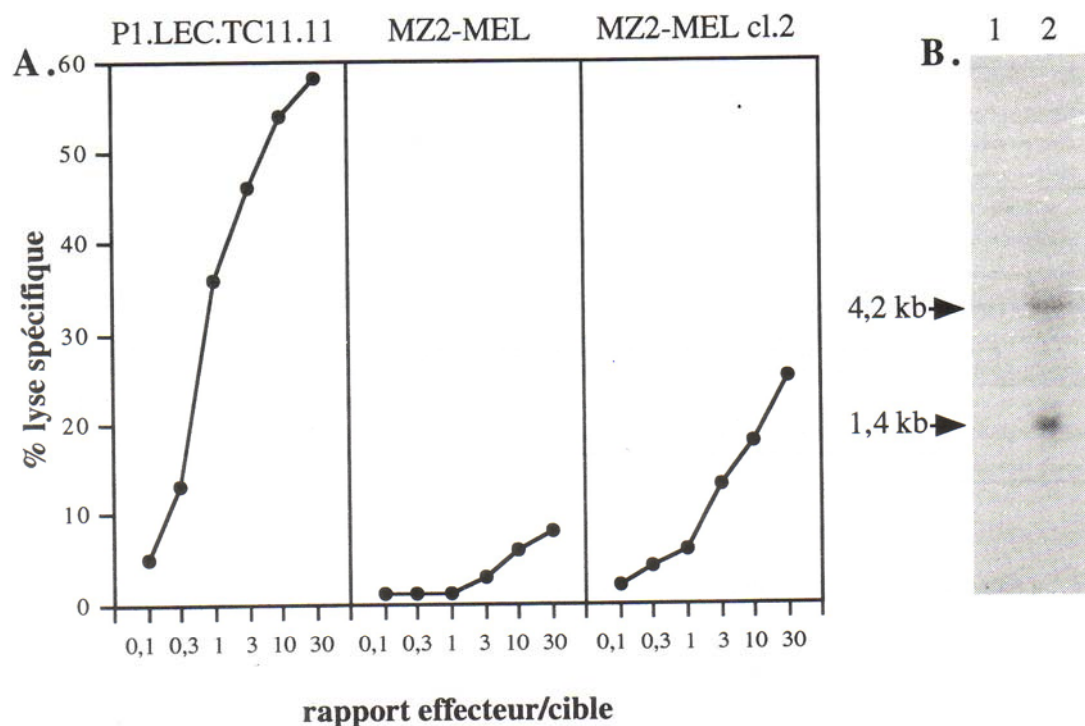


Figure II.18: Deux ARNm sont produits à partir de l'élément LEC-A IAP.

A. Expression de l'antigène LEC-A par un transfectant obtenu en transfectant le fragment BamHI-BamHI de 9 kb (Figure II.12) et le gène H-2 D^k dans les cellules MZ2-MEL.3.1 qui dérivent d'un mélanome humain. La lyse a été mesurée par un test de relargage de chrome-51 de 4 heures.

B. Expression de séquences IAP par les cellules MZ2-MEL (1) et par le transfectant MZ2-MEL cl.2 (2).
Un Northern blot préparé avec 20 µg d'ARN total de ces cellules a été hybridé avec le fragment SalI-SalI de 1,57 kb correspondant à la région *env* et au 3'LTR de l'élément LEC-A IAP.

5' LTR

120
240
360
480
600
3240
3360
3480
3600
3720
3840
3960
4080
4200
4320

3' LTR

aacaaagttt gggagcgcg ccacattcg ccgttacaag atggcgctga cagctgtgtt ctaaglggta aacaaataat ctgcgcattgt gccaaaggta tcttatgaat acttgctc
tgctttccc gtagctcaa ctgggcyat yggctgcagc caatcagga gtgacagtc cgaaggcgaag gagaatgctc cttaagaggg acggggttcc gttttctct ctctcttgc
tcttgctctc ttgcttctcg caccctgctc cctgaagatg taagaataaa agcttthccg cagaagatlc tggctctggg tgttcttctc ggcgggtcgt gagaacgctg cgaataacaa
ttggcgccga AACCGGGAC GAgaaaaaac togggactgg cgaagggaag atccctcaat ccaagaaccg aactgcgggt. cgcggtaata aaggttccc taaagcagac tgttaagaag
gattcaactg tatgaattca gaacttttca gctggggaac gagagtacaa gtgagtacag ctttacyaag taagtctgat ctgaaactt. ctacagaaat toagacagt ctatcagaag
taaaagtgaat tatgtttggc ctgaaattt tctgtgtgtt aggaacctt /----- / agatgtatta tgacaaataa ctacagctgg atgtgaacaa aagtttccg
gattgtgtgt tatttccatt cagtatgtta aatttactag ggcagctaat ttgtcaaaa gtcttttca ctatgttta cagaattgga tggctgaatt tgaacagatc cttcggaat
tgagaettca ggtcaactcc acgcgcttg acctgtccct gaccaaaagg ttaccaaat ggatctctc agcattttcc ttcttataaa aatgggtggg attaatatta tttygagata
cactttgctg tggattatgt ttgcttctt gatgtgtgt taagcttaag gccaaacta ggagagacaa ggtgtgtatt gccaggcgc ttgcaggact agaactgga gcttccctg
atacatctat gcttaggcaa taggtgctg gccactcagc tcttatctcc catgaggtca gactcattgc acgggtaga gtgagtgtgc ttcagcagcc cgaagagatt gccaggctaa
gcaactgcaat ggaaggctc tggcgcatat atgagctat tctagggaga catgtcatct tcatgaagg ttcagtgtcc tagtctccct cccccaggca aaacgacacg ggagcaggtc
agggttgctc tgggtaaaag cctgtaagcc taagagctaa tctgtacat ggctcttta cctacacatt ggggatttga cctctatctc cactctcatt aataggggtg gcttatttgc
tcttattaaa AGGATAGGGG GAGTGTGG GAgcgcgc cactctgccc gttacaagat ggcgctgaca gctgtgtctt aagtgttaa caataatct gcgcatgtgc caagggtatc
ttatgactac ttgtgctctg ccttccctgt gaactcaact cggcgatgg gctgcagcca atcaggaggt gacacgtccg aggcgaaggaa gaatgtctct taagagggac ggggttctgt
ttttctctct ctcttcttct ttgctctctt gcttcttctt ctcttcttct ttcttgaaga tgtaagaata aagctttgcc gcagaagatt ctggtctctg gtgttcttcc
tggcgggtgc tgaagaacygc tgaataacaa aacaaa

Figure II.19: La séquence de l'insert du clone 31 est identique à la séquence de l'élément LEC-A IAP.

La séquence de l'élément LEC-A IAP encadrée en gris correspond à la séquence de l'insert du clone 31. Cet insert provient d'une PCR effectuée avec des oligonucléotides (séquence majuscule) situés en aval du 5'LTR et en amont du 3'LTR de l'élément LEC-A IAP sur de l'ADNc produit à partir de l'ARN des cellules LEC. Les LTR de l'élément LEC-A IAP sont encadrés. Les séquences ressemblant aux sites donneur et accepteur d'intron sont soulignées en gras.

GCCGAACCC GGGACGAGAA AAAACTCGGG ACTGGCGCAA GGAAGATCCC TCATTCCAGA ACCAGAAGCT CGGGTCGGG TAATAAAGT TCCCGTAAAG CAGACTGTIA AGAAGGATTC 120

Exon I ← Exon II

AACGTATGA ATTCAAGAACT TTTCAGCTGG GGAACGAGAG TACCACTGAG TACAGCTTTA CGAGTATATG TTACAGAATT GGATGGCTGA ATTTGAACAG ATCTCTCGGG AATTGAGACT 240

M N S E L F S W G T R V P V S T A L R V Y V T E L D G .

TCAGGTCAAC TCCACGCGCT TGGACCTGTC CCTGACCAA GAATTACCCA ATTGGATCTC CTCAGCATTT TCCTTCTTTA AAAAATGGGT GGGATTAATA TTATTGGAG ATACACTTTG 360

CTGTGGATTA GTGTGCTTC TTGATTGGT CTGTAAGCTT AAGGOCCHAA CTAGGAGAGA CRAAGTGGTT ATTGCCAGG CGCTTGCAGG ACTAGAACAT GGAGCTTCCC CTGATACATC 480

TATGCTIAGG CAATAGGTCG CTGCCCCACT AGCTCTTATA TCCCATGAGG CTAGACTCAT TGCACGGGAT AGAGTGAGTG TGCTTCAGCA GCGGAGAGA GTTCCACGCG TAAGCACTGC 600

AATGGAAAGG CTCTGCGGA TATATGAGCC TATTCTAGGG AGACATGTCA TCTTTCATGA AGTTTCAGTG TCCTAGTICC CTTCGCCAG GCAAAAGCAC ACGGGAGCAG GTACAGGTTG 720

CTCTGGGTAA AAGCCTGTAA GCCTAAGAGC TAATCCTGTA CATGGCTCCT TTAACCTACAG ACTGGGGATT TGACCTCTAT CTCCACTCTC ATTAATATGG GTGGCCTATT TGCTCTTATT 840

AAAAGGATAG GGGGAGATGT TGGG 864

Figure II.20: Séquence du polypeptide codé par l'ORF située à cheval sur les deux "exons" du clone 31.