

L'adénovirus humain : une fenêtre sur l'apoptose et le cancer

**Philip E. Branton
Emmanuelle Querido**

Les produits du gène *E1A* des adénovirus humains induisent l'expression d'autres gènes viraux et la synthèse d'ADN cellulaire, pour permettre la réplication du virus dans les cellules épithéliales différenciées. Cependant, ils induisent aussi une accumulation de la protéine cellulaire p53 et l'apoptose relayée par p53. Cette réponse cellulaire pourrait nuire à la production efficace de virions, mais le gène *E1B* code pour deux protéines qui bloquent la mort cellulaire : une protéine de 55 kDa qui se lie à p53 et l'inactive, et une protéine de 19 kDa qui bloque l'apoptose d'une façon similaire à la protéine cellulaire Bcl-2. Les adénovirus induisent aussi l'apoptose d'une façon indépendante de p53 par un processus qui implique une ou plusieurs protéines de la région *E4*. Cette région *E4* code pour au moins sept protéines qui, outre leur rôle dans la mort cellulaire, sont impliquées dans le contrôle de l'expression des gènes et la régulation de p53. L'étude des protéines de l'adénovirus apportera un éclairage nouveau sur une autre fonction cellulaire importante, l'apoptose, et devrait permettre la mise au point de nouveaux vecteurs pour la thérapie génique et le traitement des cancers.

ADRESSE

P.E. Branton : directeur et professeur de biochimie Gilman Cheney. E. Querido : étudiante au doctorat. Département de biochimie, Université McGill, McIntyre Medical Sciences Building, 3655, rue Drummond, Montréal, Québec, H3G 1Y6 Canada.

Les virus ont évolué pendant des millions d'années pour optimiser leur cycle de multiplication grâce à un long et rigoureux processus de sélection en faveur des interactions les plus efficaces avec certaines protéines cellulaires. L'identification de ces interactions et des homologues cellulaires de ces protéines virales représente un moyen très efficace de

comprendre la biologie cellulaire fondamentale, ainsi qu'un élément important pour développer des thérapies fondées sur les virus. Les adénovirus humains n'y font pas exception. L'épissage de l'ARN a été découvert chez les adénovirus et la recherche, qui se continue sur ces virus ainsi que sur les autres virus oncogéniques à ADN, a permis des découvertes importantes sur la répli-

RÉFÉRENCES

1. Horwitz MS. Adenoviridae and their replication. In : Fields BN, Knipe DM, eds. *Virology*. New York : Raven Press, 1990 : 1679-721.
2. Bayley ST, Mymryk JS. Adenovirus E1A proteins and transformation: a review. *Int J Oncol* 1994 ; 5 : 425-44.
3. White E, Cipriani R, Sabbatini P, Denton A. Adenovirus E1B 19-kilodalton protein overcomes the cytotoxicity of E1A proteins. *J Virol* 1991 ; 65 : 2968-78.
4. McLorie W, McGlade CJ, Takayesu D, Branton PE. Individual adenovirus E1B proteins induce transformation independently but by additive pathways. *J Gen Virol* 1991 ; 72 : 1467-71.
5. Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996 ; 10 : 1054-72.
6. Bondesson M, Svensson C, Linder S, Akusjärvi G. The carboxy-terminal exon of the adenovirus E1A protein is required for the E4F-dependent transcription activation. *EMBO J* 1992 ; 11 : 3347-54.
7. Marcellus RC, Teodoro JG, Wu T, Brough DE, Ketner G, Shore GC, Branton PE. Adenovirus 5 early region 4 is responsible for E1A-induced p53-independent apoptosis. *J Virol* 1996 ; 70 : 6207-15.
8. Howe JA, Mymryk JS, Egan C, Branton PE, Bayley ST. Retinoblastoma growth suppressor and a 300-kDa protein appear to regulate cellular DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 5883-7.
9. Yee SP, Branton PE. Detection of cellular proteins associated with human adenovirus type 5 early region 1A polypeptides. *Virology* 1985 ; 147 : 142-53.
10. Harlow E, Whyte P, Franza BR Jr, Schley C. Association of adenovirus early-region 1A proteins with cellular polypeptides. *Mol Cell Biol* 1986 ; 6 : 1579-89.
11. Egan C, Jelsma TN, Howe JA, Bayley ST, Ferguson B, Branton PE. Mapping of cellular protein-binding sites on the products of early-region 1A of human adenovirus type 5. *Mol Cell Biol* 1988 ; 8 : 3955-9.
12. Whyte P, Ruley HE, Harlow E. Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. *J Virol* 1988 ; 62 : 257-65.
13. Barbeau D, Charbonneau R, Whalen SG, Bayley ST, Branton PE. Functional interactions within adenovirus E1A protein complexes. *Oncogene* 1994 ; 9 : 359-73.

cation de l'ADN, l'expression des gènes, la synthèse des protéines et l'oncogenèse, surtout pour l'identification des anti-oncogènes et de leurs fonctions. Au cours de ce travail, une nouvelle voie de recherche s'est ouverte : l'utilisation des adénovirus pour étudier la mort cellulaire programmée ou apoptose.

Les adénovirus humains peuvent causer une variété d'affections chez l'homme, incluant des infections des voies respiratoires supérieures, de l'intestin et de l'œil, qui permettent la réplication virale dans des cellules épithéliales différenciées [1]. Bien que ces virus ne soient associés à aucun cancer humain, ils sont capables dans certains cas de produire des tumeurs chez les rongeurs et de transformer des cellules de rats ou de souris non permissives pour l'infection productive. Peu de temps après l'infection de cellules épithéliales humaines par l'adénovirus (figure 1), le gène précoce *E1A* est exprimé et *trans-active* l'expression

des autres gènes précoces *E1B*, *E2*, *E3* et *E4*. L'expression d'*E1A* déclenche la synthèse d'ADN cellulaire et le génome viral est répliqué en grande quantité par la machinerie synthétique de la cellule hôte. Plus tard dans l'infection, les protéines structurales virales codées par les gènes tardifs sont synthétisées et les cellules infectées se remplissent de virions. Éventuellement, la cellule infectée meurt, principalement par apoptose, ce qui permet la propagation du virus aux cellules avoisinantes par endocytose des vésicules apoptotiques relâchées par les cellules mourantes. Cette forme d'effet cytopathique aide à réduire l'inflammation et à protéger les cellules infectées de la réponse immunitaire de l'hôte. Dans le cas des cellules de rongeurs, bien que les gènes précoces soient exprimés et que la synthèse d'ADN cellulaire soit induite, l'ADN viral n'est pas répliqué et les gènes tardifs ne sont pas exprimés. L'intégration d'ADN viral dans les chromosomes

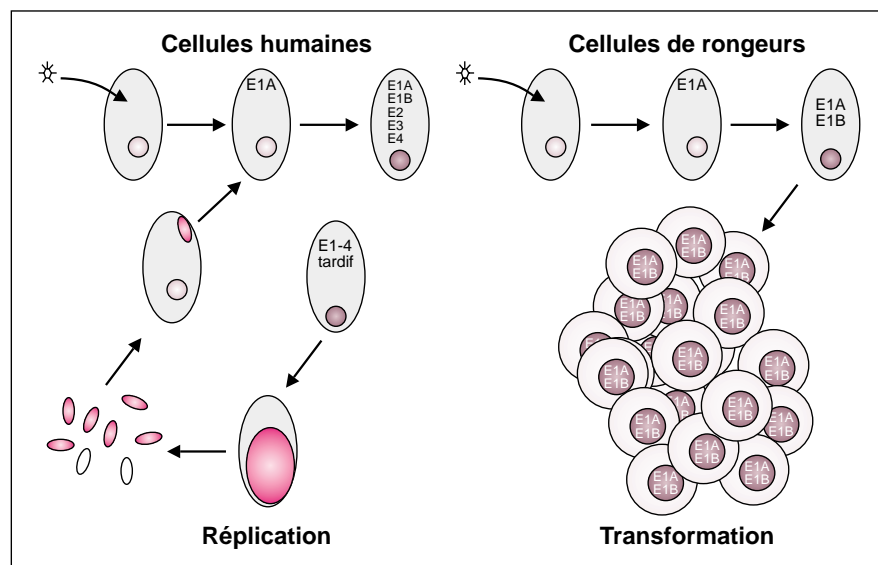


Figure 1. **L'adénovirus humain : cycle lytique et infection abortive menant à la transformation.** Peu après l'infection de cellules épithéliales humaines, le gène précoce *E1A* est exprimé et son produit *trans-active* l'expression des autres gènes précoces *E1B*, *E2*, *E3* et *E4*. L'ADN est synthétisé en quantité et le génome viral répliqué. Puis la cellule synthétise les protéines virales structurales, et se remplit de virions. La cellule infectée meurt éventuellement d'apoptose et les virions vont se propager aux cellules voisines. Dans les cellules de rongeurs, les gènes précoces sont aussi exprimés, la synthèse d'ADN cellulaire est induite, mais l'ADN viral n'est pas répliqué et les gènes tardifs ne sont pas exprimés. En revanche, l'intégration virale dans les chromosomes aboutit à l'expression constitutive des protéines *E1A* et *E1B* qui entraînent la transformation de la cellule qui croît alors de façon incontrôlée.

des cellules de rongeurs et l'expression constitutive des protéines E1A et E1B (figure 1) peut conduire à la formation de cellules transformées qui croissent d'une manière incontrôlée en culture cellulaire et qui peuvent former des tumeurs chez les rongeurs nouveau-nés ou à la situation immunologique compromise [2].

Le mécanisme de l'oncogenèse par les adénovirus est maintenant bien connu. E1A est le principal oncogène viral et est capable d'induire une entrée dérégulée en phase S du cycle cellulaire et d'immortaliser les cellules [2]. Cependant, E1A n'est pas suffisant pour induire la transformation oncogénique complète. La formation de cellules transformées stables requiert en plus l'expression de E1B. Les gènes E1A et E1B codent pour des transcrits multiples (figure 2) du fait de l'épissage alternatif. Les deux transcrits principaux de E1B codent pour des protéines de 55 et 19 kDa. La synthèse de la protéine E1A et de l'une ou l'autre de ces pro-

téines permet la transformation cellulaire, bien que l'efficacité soit beaucoup plus grande quand les deux protéines E1B sont présentes [3, 4]. Ces résultats suggèrent que les effets de 55K et 19K sont additifs et qu'ils pourraient fonctionner sur la même voie cellulaire. Le rôle de ces protéines dans la transformation est maintenant beaucoup mieux compris. L'expression de E1A induit la synthèse d'ADN et la transformation, mais ce processus induit l'apoptose, en partie à cause de l'activation de l'anti-oncogène P53. P53 est un régulateur de la transcription et fonctionne comme le gardien de la fonction cellulaire normale [5]. Après son activation, la protéine p53 induit, soit l'arrêt de croissance, soit l'apoptose, probablement en activant ou réprimant des gènes associés à la mort ou à la croissance cellulaire. La protéine E1B-55K se lie à p53 et l'inactive, alors que 19K agit plus tard dans cette voie pour bloquer directement l'apoptose [2]. Ces deux pro-

téines E1B permettent donc à la cellule de survivre aux effets toxiques de E1A et, dans le cas des cellules de rongeurs, des lignées transformées sont créées. Cette séquence d'événements reflète probablement le processus général de l'oncogenèse, où l'activation des oncogènes cellulaires mène à une croissance dérégulée, mais déclenche aussi la mort cellulaire programmée. Toutes les cellules tumorales doivent probablement enrayer l'apoptose pour survivre et un mécanisme fréquent semble être l'inactivation de P53. Ce processus est aussi important pour l'infection lytique des cellules humaines car une mort prématurée ou l'arrêt de croissance bloquerait la formation des virions.

Fonctions des protéines E1A d'adénovirus

On connaît maintenant bien la biologie moléculaire des protéines E1A, grâce à une analyse génétique détaillée [2]. Plus de quarante différents sérotypes d'adénovirus ont été répertoriés. Les deux protéines E1A de l'adénovirus de type 5 ont 289 et 243 résidus d'acide aminés (289R et 243R), et sont identiques à l'exception d'une séquence interne de 46 acides aminés qui est seulement présente dans E1A 289R (figure 3). Ces deux protéines contiennent une séquence de localisation nucléaire à l'extrémité carboxy-terminale. La comparaison des séquences des différents sérotypes a révélé l'existence de trois régions très conservées. Le domaine CR3 (*conserved region*) est spécifique de E1A-289R, et les deux autres domaines CR1 et CR2, plus amino-terminaux, sont présents dans E1A-243R et 289R. Ces trois domaines sont très importants pour la fonction d'E1A. La *trans*-activation par E1A requiert CR3 et les résidus 186-188. Pour le promoteur de la région E4, les deux régions auxiliaires (AR1 et AR2) ainsi que la partie aminotermi-

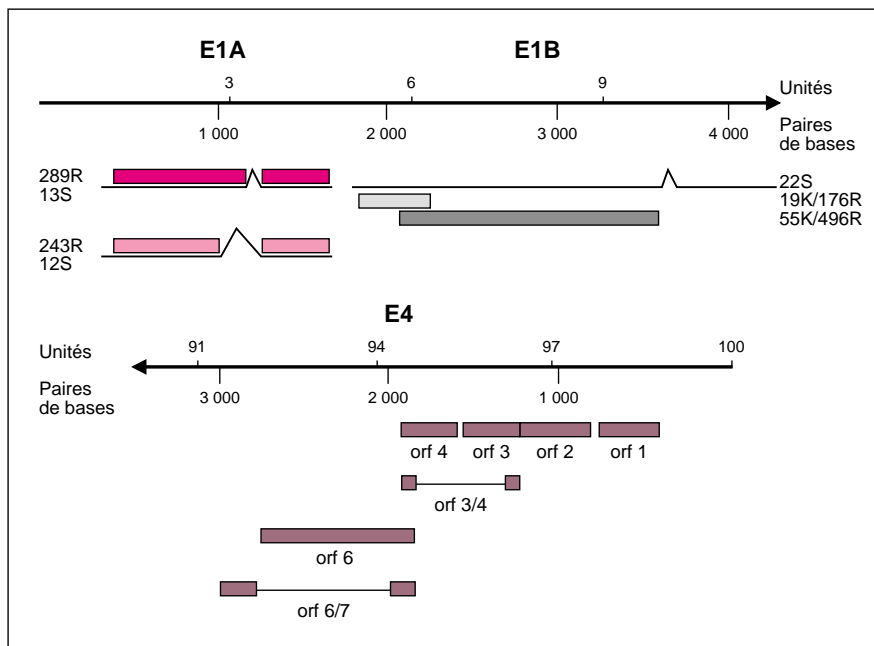


Figure 2. Messages multiples et protéines des régions précoces E1 et E4 de l'adénovirus. La région E1 donne naissance à deux oncogènes : (1) E1A, le principal, est capable d'induire une entrée dérégulée en phase S dans le cycle cellulaire et d'immortaliser les cellules ; il comporte deux transcrits de 289 et de 243 acides aminés. (2) E1B, avec là aussi deux transcrits codant pour deux protéines de 19kDa et 55 kDa. E1A seul n'est pas capable de transformer complètement la cellule, ce qui requiert en plus l'expression de E1B. La région E4 comporte de nombreux cadres de lecture (orf pour open reading frame).

RÉFÉRENCES

14. Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; 334: 124-9.
15. Egan C, Bayley ST, Branton PE. Binding of the Rb1 protein to E1A products is required for adenovirus transformation. *Oncogene* 1989; 4: 383-8.
16. Knudsen, A. Genetics and the etiology of human cancer. *Adv Hum Genet* 1977; 8: 1-66.
17. Eckner R, Ewen ME, Newsome D, Gerdes M, DeCaprio JA, Lawrence JB, Livingston DM. Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adapter. *Genes Dev* 1994; 8: 869-84.
18. Shaepfer U, Boyd JM, Verma S, Uhlmann E, Subramanian T, Chinnadurai G. Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10467-71.
19. Lee WS, Kao CC, Bryant GO, Liu X, Berk AJ. Adenovirus E1A activation domain binds the basic repeat in the TATA box transcription factor. *Cell* 1991; 87: 365-76.
20. Liu F, Green MR. Promoter targeting by adenovirus E1a through interaction with different cellular DNA-binding domains. *Nature* 1994; 368: 520-5.
21. Nevins JR. Transcriptional activation by viral regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* 1991; 16: 435-9.
22. Ludlow JW, Skuse GR. Viral oncoprotein binding to pRb, p107, p130 and p300. *Virus Res* 1995; 35: 113-21.
23. Wolowiec D, Ffrench M. Kinases dépendantes des cyclines: rôle biologique et implications dans la pathologie humaine. *Med Sci* 1996; 12: 165-73.
24. Missero C, Calautti E, Eckner R, Chin J, Tsai HL, Livingston DM, Dotto GP. Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5451-5.
25. Debbas M, White E. Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev* 1993; 7: 546-54.
26. Lowe SW, Ruley HE. Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus E1A in mouse thymocytes. *Genes Dev* 1993; 7: 535-45.

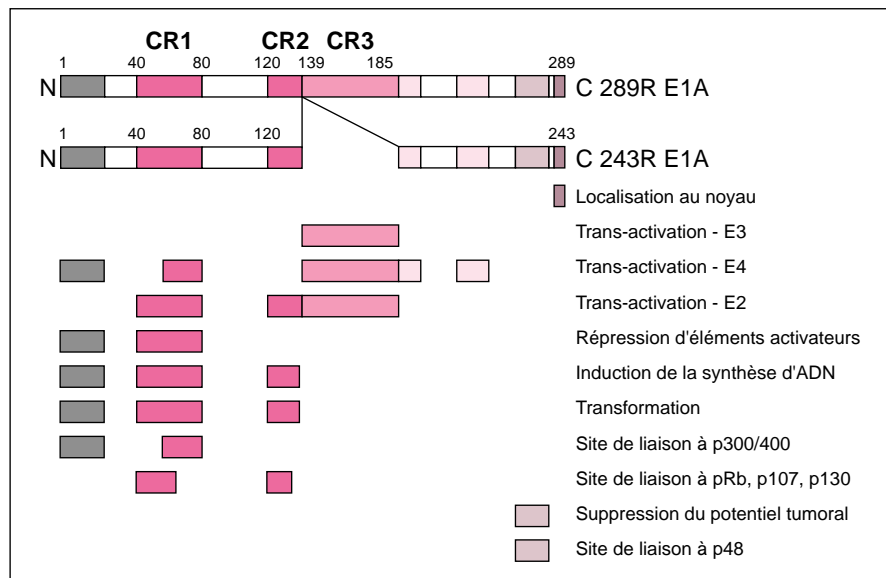


Figure 3. **Les fonctions de la protéine E1A.** Le gène E1A code pour deux protéines de 289 résidus d'acides aminés (R) et de 243R, identiques à l'exception d'un segment de 46 acides aminés présent seulement dans E1A-289R. E1A-289R et E1A-243R induisent la synthèse d'ADN et la transformation cellulaire mais seule E1A-289R est capable de trans-activer les promoteurs des gènes précoces et de certains gènes cellulaires.

nale, CR1 et CR2. Donc E1A-289R et 243R peuvent induire la synthèse d'ADN et la transformation, mais seul E1A-289R est capable de trans-activer les promoteurs viraux de gènes précoces et de certains gènes cellulaires. La présence d'une région plus carboxy-terminale est associée à une baisse du potentiel tumorigène des cellules transformées par E1A [2].

Il est probable que toutes les fonctions de E1A soient associées à la formation de complexes avec un large spectre de protéines cellulaires. Il y a une dizaine d'années, notre groupe et celui d'Ed Harlow ont démontré que la protéine E1A se lie à une série de protéines cellulaires de 105K, 107K, 130K et 300K [9, 10]. Nous avons montré ensuite que l'interaction avec ces protéines dépend des mêmes régions que la transformation cellulaire [11, 12]. La liaison à p300 implique la partie aminotermine d'E1A ainsi qu'une partie de CR1. Les interactions avec pRb, p107 et p130 nécessitent une séquence minimale dans CR2 (Leu-X-Cys-X-Glu) en plus d'une portion de CR1 [3]. L'identification de p105 comme le produit de l'anti-oncogène rétinoblastome *RB* a permis de mieux comprendre un des mécanismes de la

transformation cellulaire par E1A [14, 15]. Le gène *RB* est souvent inactivé ou la cible d'une délétion dans une variété de cancers, en particulier dans le rétinoblastome bilatéral, causé dans la plupart des cas par une délétion du gène *RB* dans les cellules germinales et l'apparition d'une mutation somatique dans le second allèle *RB* [16]. Il a donc été proposé que la formation de complexe avec E1A mène à l'inactivation fonctionnelle de la protéine Rb [14, 15]. Des études sur les protéines E1A et grand T de SV40 (*simian virus 40*) ont montré que p107 et p130 sont aussi des limiteurs de croissance et des membres de la famille Rb (*m/s n° 8, vol. 7, p. 864*) [2]. L'ADNc de p300 a été cloné [17] et p300 s'est révélé être un modulateur de la transcription. Les membres de la famille p300, incluant la protéine CBP (*cAMP-responsive element [CREB] binding protein*) et p400 [13], se lient aussi aux protéines E1A (*m/s n° 10, vol. 12, p. 1113*). Donc, l'induction de la synthèse d'ADN par E1A semble nécessiter sa liaison à des membres des familles pRb ou p300, et la transformation cellulaire requiert les deux. La partie carboxy-terminale de E1A est impliquée dans la suppression du potentiel tumorigène des cellules transformées par

RÉFÉRENCES

27. Oltvai, ZN, Korsmeyer, SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 1994; 79: 189-92.
28. Kerr JFR, Winterford CM, Varmon BV. Apoptosis; its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-26.
29. Querido E, Teodoro JG, Branton PE. Accumulation of p53 induced by the adenovirus E1A protein requires regions involved in the stimulation of DNA synthesis. *J Virol* 1997 (sous presse).
30. Yew PR, Berk AJ. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early region 1B protein. *Nature* 1992; 357: 82-5.
31. Teodoro JG, Halliday T, Whalen SG, Takayesu D, Graham FL, Branton PE. Phosphorylation at the carboxy terminus of the 55-kilodalton adenovirus type 5 E1B protein regulates transforming activity. *J Virol* 1994; 68: 776-6.
32. Teodoro JG, Branton PE. Regulation of transformation, transcriptional repression and p53-dependent apoptosis by phosphorylation of the 55-kDa E1B protein of human adenovirus type 5. *J Virol* 1997; 71: 1739-46.
33. Rao L, Debbas, M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7742-6.
34. Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, White E. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev* 1996; 10: 461-77.
35. Subramanian T, Tarodi B, Chinnadurai G. p53-independent apoptotic and necrotic cell death induced by adenovirus infection: suppression by E1B 19K and Bcl-2 proteins. *Cell Growth Differ* 1995; 6: 131-7.
36. Farrow SN, White JHM, Martinou I, Raven T, Pun K-T, Grinham CJ, Martinou JC, Brown R. Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 1995; 374: 731-3.
37. Han J, Sabbatini P, White E. Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5857-64.
38. Boyd JM, Malstrom S, Subramanian T, Venkatesh LK, Schaeper U, Elangovan B, D'Sa-Eipper C, Chinnadurai G. Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins (see comments) [published erratum appears in *Cell* 1994; 79: following 1120]. *Cell* 1994; 79: 341-51.
- E1A. Une protéine de 48 kDa, qui est en cours de caractérisation [18], se lie au domaine carboxyterminal de E1A.
- La transactivation par CR3 dépend elle aussi d'interactions protéine-protéine. CR3 contient une structure en doigt de zinc qui est impliquée dans la liaison directe à des éléments de la machinerie transcriptionnelle basale, principalement TBP (*TATA-binding protein*) [19]. La portion carboxyterminale de CR3 interagit aussi avec plusieurs facteurs de transcription, dont ATF-2 et SP-1, et il est probable que la liaison permet l'activation de ces facteurs et facilite les interactions avec la machinerie transcriptionnelle basale [20].

La formation de complexes, la croissance cellulaire et la transformation par E1A

Une grande quantité d'information a été accumulée sur les fonctions des protéines de la famille Rb. Rb règle le cycle cellulaire en inactivant une série de facteurs de transcription très importants, appelés E2F. Le facteur de transcription E2F, qui est en fait l'hétérodimère de E2F et DP-1, règle l'expression de gènes nécessaires à l'entrée en phase S et à la synthèse d'ADN [21]. Dans sa forme active sous-phosphorylée, Rb se lie à une région de E2F qui contient le motif Leu-X-Cys-X-Glu et bloque l'activité de E2F. La phosphorylation de Rb par les Cdk (*cyclin-dependent protein kinase*) inhibe la liaison à E2F, activant donc E2F et dirigeant l'entrée en phase S [22, 23]. Dans les cellules confluentes, Rb est habituellement très phosphorylé. Durant la stimulation de croissance, l'hétérodimère Cdk4/cycline D est activé et se lie à Rb via le motif Leu-X-Cys-X-Glu, activant donc E2F. Il existe au moins cinq membres de la famille E2F. L'activité de E2F-1, E2F-2, et E2F-3 est réglée par Rb. E2F-4 et E2F-5 sont contrôlés par les protéines p107 et p130, de la famille de RB. Ces protéines sont très voisines de Rb dans la région de liaison à E2F, mais sont réglées par leur interaction avec Cdk2 et les cyclines E ou A. L'activation de E2F par CR2 et CR1 de E1A entraîne aussi l'activation partielle de

l'expression du gène viral E2, qui comme on peut le déduire de son nom, est réglé par E2F (voir figure 3). La protéine p300 est moins bien connue. Cette protéine interagit avec une série de facteurs de transcription et de composantes de la machinerie transcriptionnelle basale. CPB, une autre protéine de la même famille, est le régulateur de l'activité du facteur de transcription CREB. On sait peu de choses sur p400, l'autre protéine de cette famille.

Il est facile de concevoir comment la formation de complexes entre les protéines E1A et celles de la famille RB permet de stimuler la synthèse d'ADN cellulaire. Le CR1 d'E1A interagit avec Rb et déloge E2F, qui est donc libéré pour activer la machinerie de synthèse d'ADN (*m/s n° 9, vol. 11, p. 1358*). Il est probable que la formation de complexes entre les protéines E1A et p300 ou les protéines de cette famille affecte l'expression de gènes impliqués dans la synthèse d'ADN ou l'arrêt de croissance qui sont réglés par p300. Par exemple, il a été démontré que la liaison de E1A à p300, directement ou indirectement, fait décroître l'expression du gène inhibiteur de croissance *p21^{WAF1}*, qui est ciblé par p53, pour augmenter son expression (*m/s n° 6, vol. 7, p. 744*) [24]. L'élimination de cet inhibiteur de croissance pourrait donc stimuler l'entrée en phase S.

Les protéines E1A induisent l'apoptose dépendante de p53

Il a été montré que l'expression de E1A cause une augmentation de la concentration de p53 et, en l'absence de E1B, induit l'apoptose [25, 26]. L'apoptose est un programme de suicide cellulaire contrôlé génétiquement qui joue un rôle important dans l'homéostasie de la cellule, le développement et la défense de l'hôte. Toutes les cellules sont programmées pour mourir quand elles reçoivent le signal approprié. L'activation de p53 est un signal important, qui semble se produire en réponse à une variété de stimulus, incluant un dommage à l'ADN ou l'expression de certains oncogènes activés. Récemment, l'existence de deux points de

RÉFÉRENCES

39. Teodoro JG, Shore GC, Branton PE. Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* 1995; 11: 467-74.
40. Hitt, M, Addison, C, Graham, FL. Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells. In: August JT, ed. *Advances in pharmacology – Gene therapy*. Orlando, FL: Academic Press: 1997 (sous presse).
41. Brough DE, Lizonova A, Hsu C, Kulesa V, Kovacs I. A gene transfer vector-cell line system for complete functional complementation of adenovirus early regions E1 and E4. *J Virol* 1996; 70: 6497-501.
42. Javier R, Raska K Jr, Shenk T. Requirement for the adenovirus type 9 E4 region in production of mammary tumors. *Science* 1993; 257: 1267-71.
43. Obert S, O'Connor RJ, Schmid S, Hearing, P. The adenovirus E4-6/7 protein inactivates the E2 promoter by inducing dimerization of a heterodimeric E2F complex. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1333-46.
44. Bridge E, Medghalchi S, Ubol S, Leesong M, Ketner G. Adenovirus early region 4 and viral DNA synthesis. *Virology* 1993; 193: 794-801.
45. Querido E, Marcellus RC, Lai A, Teodoro JG, Ketner G, Branton PE. Regulation of p53 levels by the E1B-55kDa protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J Virol* 1997 (sous presse).
46. Dobner T, Horikoshi N, Rubenwolf S, Shenk T. Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* 1996; 272: 1470-3.
47. Müller U, Kleinberger T, and Shenk T. Adenovirus E4orf4 protein reduces phosphorylation of c-Fos and E1a proteins while simultaneously reducing the level of AP-1. *J Virol* 1992; 66: 5867-78.
48. Bondesson M, Öhman K, Mannervik M, Fan S, Akusjärvi G. Adenovirus E4 open reading frame 4 protein autoregulates E4 transcription by inhibiting E1A transactivation of the E4 promoter. *J Virol* 1991; 70: 3844-51.
49. Whalen SG, Marcellus RC, Ahn N, Whalen A, Ricciardi RP, Branton PE. Phosphorylation within the transactivation domain of adenovirus E1A protein by MAP kinase regulates expression of early region 4. *J Virol* 1997 (sous presse).
50. Tollefson AE, Abraham S, Hermiston TW, Ryerse JS, Wold LJ, Wold WSM. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol* 1996; 70: 2296-306.

contrôle de l'apoptose a été proposée [27]. Le premier point de contrôle serait l'inhibition de l'homodimérisation de Bax et de ses homologues par la liaison à Bcl-2 et les protéines de cette famille (figure 4). Ces hétérodimères bloquent l'apoptose et permettent à la cellule de survivre. Le programme de l'apoptose peut être restauré par la liaison de Bcl-2 à Bad, qui laisse Bax libre de s'homodimériser et de favoriser la mort. Le second point de contrôle se situerait en aval sur cette voie et

impliquerait l'activation de la classe de protéases ICE ou caspases (*interleukin β converting enzyme*), dont les cibles sont les enzymes qui tuent réellement la cellule. L'apoptose est caractérisée par des signes particuliers, qui incluent l'arrondissement de la cellule, la condensation de la chromatine en des masses granulaires denses, le démantèlement du cytosquelette, la formation de vacuoles et, enfin, la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques, qui sont des vésicules entourées de

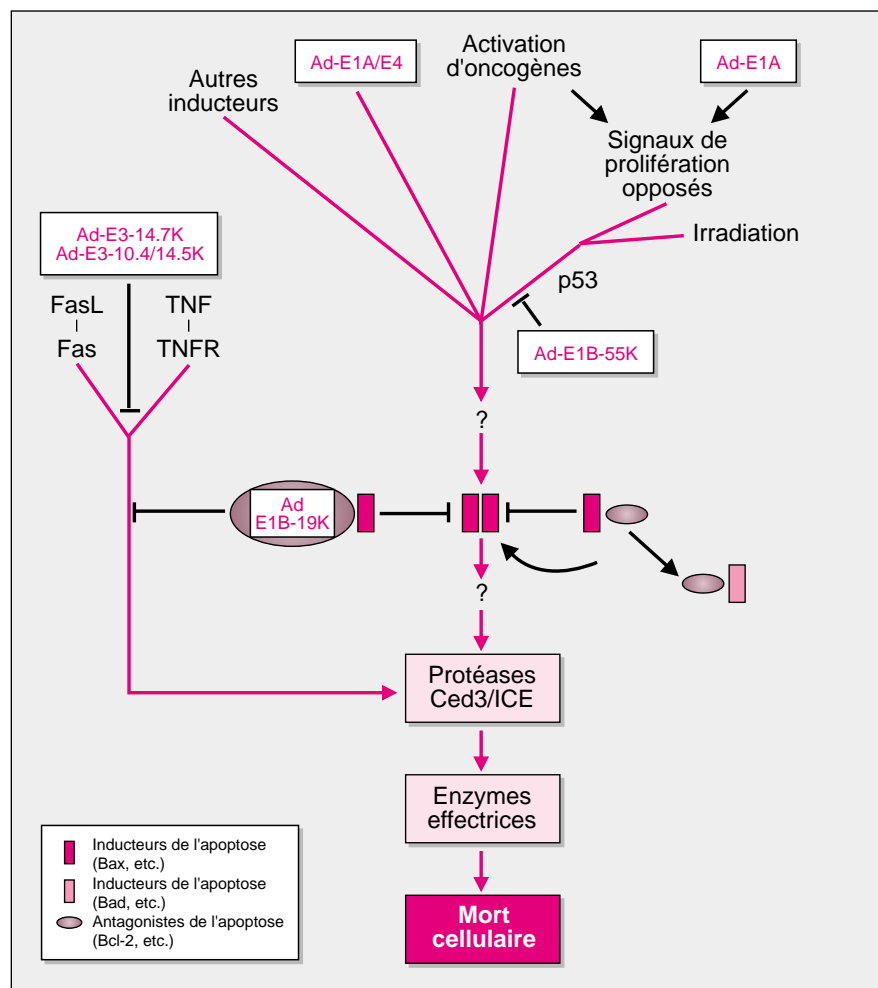


Figure 4. **Induction de l'apoptose par l'adénovirus humain.** Les protéines E1A induisent l'apoptose dépendante de P53 en élevant le niveau de synthèse de P53. À l'inverse, les protéines E1B sont anti-apoptotiques : E1B-55K se lie à P53 et l'inactive, et la protéine E1B-19K semble être un analogue fonctionnel de Bcl-2. La protéine E1A-289R est aussi capable d'induire l'apoptose en l'absence de P53, vraisemblablement par l'intermédiaire de la trans-activation d'un gène de la région E4. Les protéines virales sont indiquées en lettres rouges et encadrées. Les protéines des familles Bax, Bad et Bcl-2 sont représentées par des symboles, tel qu'indiqué dans la figure.

membrane rapidement absorbées par les cellules avoisinantes [28]. Nous avons récemment employé une approche génétique pour identifier les régions de la protéine E1A-243R qui sont responsables de l'augmentation de la concentration de p53 après l'infection. Nos études ont démontré que, dans les cellules de rongeurs, seules les régions impliquées dans la liaison à p300 étaient nécessaires, alors que dans les cellules humaines, la liaison à p300 ou à Rb était suffisante [29]. Ces résultats suggèrent que l'induction forcée de la synthèse d'ADN ou d'une autre fonction réglée par p300 et Rb pourrait être responsable de l'augmentation de la concentration de p53. Il semble pro-

bable que l'élévation de p53 soit suffisante pour induire l'arrêt de croissance et/ou l'apoptose (figure 5). Cette réponse pourrait sérieusement compromettre la réplication du virus dans les cellules humaines et causerait la mort des cellules transformées par E1A.

Le mécanisme moléculaire de l'accumulation de p53 en réponse à E1A-243R n'est pas connu. Les protéines E1B ont comme rôle d'empêcher la mort précoce des cellules infectées par adénovirus. E1B-55K se lie à p53 et l'inactive [30, 31]; elle est donc capable de bloquer l'activation de l'apoptose [32] (figure 5). Des études sur 55K sont en train d'apporter de nouveaux éléments sur les fonctions

de p53. La protéine E1B-19K semble être un analogue fonctionnel de Bcl-2 [33] et il a été montré qu'elle se lie à Bax et bloque les stades terminaux de l'apoptose [34, 35]. E1B-19K se lie aussi à deux autres inducteurs de l'apoptose, Bak [36] et Bik [37], ainsi qu'à d'autres protéines cellulaires dont la fonction n'est pas connue, appelées Nip-1, -2 et -3 [38]. Une analyse plus poussée des différences entre les protéines de la famille Bcl-2 et E1B-19K devrait permettre des avancées majeures dans notre compréhension des voies de la mort cellulaire programmée.

L'apoptose indépendante de p53

Lors de plusieurs études, nous avons observé que E1B-19K mais pas E1B-55K était capable de bloquer l'apoptose induite par E1A-289R qui *trans*-active les autres gènes précoces. Récemment, notre groupe a montré que E1A-289R, mais pas E1A-243R, est capable d'induire une mort cellulaire qui possède les caractéristiques de l'apoptose dans des cellules déficientes en p53 [39].

Ces résultats indiquent que E1A-289R est capable d'induire l'apoptose d'une façon indépendante de p53. Le fait que E1A-289R, mais pas E1A-243R, possède cette activité suggère l'action d'un produit cellulaire ou viral d'un gène *trans*-activé par E1A-289R [39]. Il était peu probable que ce soit un gène de la région E2, car elle est exprimée à un bon niveau en présence de E1A-243R (figure 3). Une série d'expériences avec des vecteurs adénovirus de thérapie génique ayant une délétion des régions E3 ou E4 a indiqué qu'un produit de la région E4 est impliqué dans l'apoptose indépendante de p53 [7].

On a remarqué, en outre, que des cellules humaines P53^{-/-} infectées par Ad5 wt commencent à mourir environ six jours après l'infection et sont complètement mortes dix jours après, alors que les cellules infectées par un virus ne contenant pas la région E4 survivent aussi longtemps que les cellules témoins non infectées.

Ces résultats suggèrent que les protéines létales E4 pourraient être chargées de tuer la cellule à la fin du cycle de réplication productive et sont

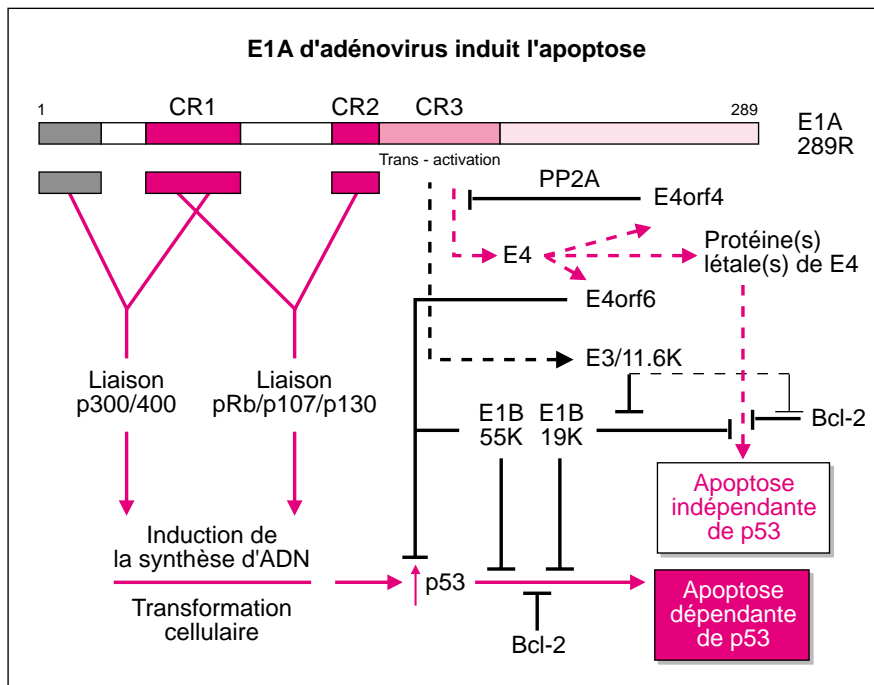


Figure 5. **E1A induit la mort cellulaire programmée.** La protéine E1A de l'adénovirus exerce un contrôle complexe des voies menant à l'arrêt de croissance et l'apoptose. Par son effet inducteur de la synthèse d'ADN, elle augmenterait le niveau de synthèse de la protéine P53 qui conduirait à l'apoptose. Par son pouvoir transactivateur de la région E4, elle induirait la synthèse de protéines létales déclenchant l'apoptose par un mécanisme indépendant de P53. Mais, l'apoptose est contrecarrée par un certain nombre de protéines, permettant à la cellule humaine de répliquer le virus avant de mourir: les protéines anti-apoptotiques usuelles de la famille Bcl-2, mais aussi les deux protéines E1B et des protéines codées par des gènes transactivés par E1A, appartenant à la région E3 (E3/11,6K), et à la région E4; E4orf4, activant la protéine phosphatase PP2A, entraîne la déphosphorylation de E1A-289R et de certains facteurs de transcription, ce qui aurait pour conséquence de diminuer l'expression de E4; E4orf6 coopérerait avec E1B-55K pour bloquer l'accumulation de P53.

capables de contrer les effets protecteurs de E1B-19K. Donc, une combinaison de la protéine E1A et de une ou plusieurs protéines de la région *E4* induisent l'apoptose indépendante de p53. *E4* code pour au moins sept produits. La recherche en cours vise à identifier les protéines *E4* impliquée et d'établir le mécanisme d'induction de l'apoptose.

Les protéines *E4* et la mort cellulaire

On connaît relativement peu de chose sur le rôle des protéines produites par *E4* (figure 2) dans l'infection virale, ou sur leur mécanisme d'action. Le fait que une ou plusieurs de ces protéines induise l'apoptose indépendamment de p53 est d'un grand intérêt pour plusieurs raisons. Premièrement, les adénovirus humains sont des vecteurs importants pour la thérapie génique [40].

Les vecteurs de première génération ont des délétions des régions *E1A/E1B* et *E3*, afin d'empêcher la réplication du virus et de permettre l'insertion d'une information génétique nouvelle.

Ces virus induisent éventuellement une réponse inflammatoire, interférant donc avec la thérapie à long terme. Il est probable qu'une des principales sources de l'inflammation soit l'induction de cytotoxicité par les protéines létales *E4*. Même en l'absence de *E1A*, le promoteur *E4* s'exprime à bas niveau, et ces vecteurs adénoviraux produisent donc des protéines létales *E4*. La région *E3* code pour une série de protéines qui bloquent la réponse inflammatoire induite par le virus (figure 4).

La nouvelle génération de vecteurs devrait donc contenir *E3* mais pas *E4*. De tels vecteurs ont été construits [41] et sont en train d'être testés pour des applications thérapeutiques. En outre, les effets toxiques des protéines létales *E4* pourraient être utilisés dans la thérapie des cancers avec disparition de p53.

On connaît mal les rôles des produits de *E4orf2*, *E4orf3* et *E4orf3/4*. La protéine *E4orf1* a un potentiel oncogénique, au moins dans l'adénovirus de type 9 [42]. La protéine *E4orf6/7* augmente l'activité du facteur de transcription E2F en stabilisant l'interaction entre deux hétérodi-

mères E2F [43] et la production efficace de virions requiert *E4orf3* ou *E4orf6* [44]. Il est aussi connu que *E4orf6* forme des complexes avec E1B-55K qui contrôlent le transport et la stabilité des ARN messagers viraux tardifs et jouent un rôle dans la suppression tardive du métabolisme de la cellule hôte. Nous avons récemment découvert que *E4orf6* et E1B-55K bloquent l'accumulation de p53, et que ces trois protéines interagissent directement [45]. Ces effets pourraient être reliés à la découverte récente que l'interaction de *E4orf6* et p53 bloque l'activité de *trans*-activation de p53 [46]. Ces résultats suggèrent que *E4orf6* et p53 peuvent coopérer dans la régulation de p53 et l'inhibition de l'apoptose dépendante de p53. Il y a encore beaucoup à apprendre sur la protéine *E4orf6*. Finalement, il a été démontré que *E4orf4* se lie à la phosphatase PP2A (*protein phosphatase 2A*) et l'active, ce qui déphosphoryle E1A-289R et certains facteurs de transcription [47, 48].

Tôt après l'infection, des sites de la partie carboxy-terminale du domaine CR3 de E1A-289R sont phosphorylés par MAPK (*mitogen activated protein kinase*), ce qui active spécifiquement l'expression de *E4* induite par E1A [49]; l'activation de PP2A vient sans doute inactiver MAPK, induisant ainsi une baisse de la phosphorylation de E1A. La protéine *E4orf4* agit donc pour diminuer l'expression de *E4*, et réduit sans doute les effets toxiques des produits de *E4*. Ces résultats concordent avec le fait qu'un virus qui n'exprime pas *E4orf4* est extrêmement toxique [47].

E1B-19K bloquant aussi l'apoptose indépendante de p53 induite par les protéines létales *E4*, comment l'adénovirus finit-il par tuer la cellule infectée afin de relâcher la progénie virale? L'accumulation des produits de *E4* pourrait éventuellement noyer l'effet protecteur de 19K, menant à la mort de la cellule. Cependant, une protéine *E3* produite très tardivement dans l'infection pourrait jouer un rôle. Les virus qui ne contiennent pas la protéine E3-11.4K exercent une mise à mort de la cellule retardée [50]. Cette protéine de *E3* est co-localisée avec 19K, et nous proposons qu'elle pourrait inhiber

l'activité de 19K, permettant donc aux protéines létales *E4* de tuer la cellule (figure 5). Cette hypothèse ainsi que d'autres sur l'induction de la mort cellulaire nécessitent plus de recherche.

Conclusion

Les protéines E1A permettent aux autres régions virales précoces d'être exprimées et à travers des interactions avec les familles d'anti-oncogènes Rb et p300, induisent les cellules cibles épithéliales différenciées à entrer en phase S pour que l'ADN viral puisse être répliqué. Cependant, ce processus active deux voies de mort cellulaire. L'une d'elles implique l'induction de l'apoptose dépendante de p53, qui peut être activée par la stimulation dérégulée de synthèse d'ADN. L'autre dépend de un ou plusieurs des produits de *E4* qui induisent l'apoptose indépendante de p53 par un mécanisme inconnu. Ce processus pourrait être responsable de la mort éventuelle des cellules humaines infectées de façon productive. L'évolution du virus a créé plusieurs mécanismes pour bloquer ou retarder la mort cellulaire, afin d'assurer une réplication efficace.

L'apoptose dépendante de p53 est bloquée directement par E1B-55K, ou en combinaison avec *E4orf6*. E1B-19K bloque aussi l'apoptose, probablement en se liant à des protéines qui induisent la mort, comme Bax. L'apoptose indépendante de p53, induite par *E4*, est inhibée par l'expression de *E4orf4* qui limite l'expression de *E4*, et par E1B-19K qui bloque l'apoptose. Cette voie démontre la complexité de la réplication des adénovirus et à quel point le virus se sert de la cellule hôte pour optimiser la production de virions. On a souvent dit au cours des dix dernières années que nous connaissons tout des adénovirus et que leur utilité en tant que modèle est épuisée. Cependant chaque nouvelle découverte a fait conclure que nous ne faisons que commencer à révéler leurs secrets. Bientôt, une nouvelle génération de vecteurs adénoviraux de thérapie génique vont permettre d'exprimer des gènes pour guérir certaines maladies humaines.

En fait, les vecteurs adénovirus pourraient devenir l'outil majeur de la thérapie génique. Ils vont nous en apprendre encore plus sur la biologie cellulaire et moléculaire fondamentale. Il semble exister encore d'autres protéines associées à E1A, et leur identification devrait révéler beaucoup sur leurs fonctions, comme cela a été le cas pour la famille Rb.

Des études sur E1B-55K vont contribuer à une meilleure compréhension du rôle de p53, qui apparaît comme l'une des protéines les plus importantes pour le cancer humain. L'information acquise sur E1B-19K est déjà en train d'aider à lever le voile sur les interactions très complexes qu'implique le point de contrôle Bax-Bcl-2 de l'apoptose. L'étude des protéines E3 d'adénovirus apportera beaucoup d'information sur l'inflammation et pourra contribuer au développement de meilleurs vecteurs de thérapie génique.

Enfin, l'étude des protéines E4 vont permettre de comprendre les mécanismes de l'apoptose indépendante de p53 et d'envisager des outils potentiels pour attaquer le grand nombre de cancers humains qui ont perdu la réponse p53. Les adénovirus humains sont une fenêtre sur la biologie moléculaire fondamentale de la vie. Il nous reste encore beaucoup à voir ■

Summary

Human adenoviruses: windows on apoptosis and cancer

Products of the E1A gene of human adenoviruses induce both expression of other viral genes and DNA synthesis to allow viral replication in terminally differentiated epithelial target cells. However, E1A products also cause an increase in the cellular p53 protein and the induction of apoptosis by a p53-dependent pathway. This response would prevent adequate production of progeny virions in human cells and block transformation of rodent cells which fail to replicate virus. The viral E1B gene encodes two products which inhibit this process, a 55kDa protein which binds to and inactivates p53, and a 19kDa species which blocks apoptosis in a fashion similar to the cellular Bcl-2 cell death suppressor. We have shown recently that adenoviruses also induce p53-independent apoptosis in a process which requires expression of one or more E4 proteins. The E4 region encodes at least seven proteins which, in addition to cell killing, are involved in regulation of gene expression and control of p53. As was the case previously with RNA splicing, transcription, DNA synthesis and oncogenesis, the study of adenovirus products is providing new insights into another important cell function, apoptosis, and may offer the possibility of new therapeutics in the treatment of human cancer.

TIRÉS À PART

P.E. Branton.

Association Française pour la Sauvegarde de la Main Centre Permanent d'Initiation à l'Environnement

Le VII^e Colloque de Sireuil-Les-Eyzies, organisé par l'Association Française pour la Sauvegarde de la Main, aura pour thème :

« MAIN ET COMMUNICATION : DE LA PRÉHISTOIRE À NOS JOURS »

les 4-5 et 6 septembre 1997
à Sireuil-Les-Eyzies-de-Tayac (Dordogne)

Pour tous renseignements, s'adresser à :

Annie CAPLIEZ – Secrétariat du Colloque
16, boulevard Émile-Zola
92000 NANTERRE, France
Tél. : 01 46 69 66 99 – Fax : 01 47 21 39 44

L'Association
et troubles
apparentés

FRANCE
ALZHEIMER

attribuera en 1997
Une bourse de 200 000 F

destinée à un chercheur non statutaire, français ou étranger, de niveau post-doctoral ou plus élevé, souhaitant travailler dans un laboratoire français dans le domaine de la maladie d'Alzheimer ou des troubles apparentés.

Cette bourse est éventuellement renouvelable.

Le dossier de candidature, adressé par le laboratoire ou le service d'accueil, comprendra :

– Pour le chercheur :

- Un curriculum vitae, précisant son statut et ses ressources, en 1997 et 1998.

- Ses titres et travaux.

- La nature des recherches déjà effectuées et résultats obtenus (description 5 pages).

- La présentation du projet de recherche envisagé auquel sera affecté le candidat (5 pages).

– Pour le laboratoire ou le service d'accueil :

- Une lettre du responsable justifiant l'insertion du projet dans l'activité du laboratoire.

- La liste des publications du laboratoire (3 dernières années).

Les dossiers devront être remis en TROIS EXEMPLAIRES

avant le 1^{er} mai 1997

Le lauréat sera désigné en juin 1997 par le Jury composé des membres du COMITÉ SCIENTIFIQUE de l'Association.

Pour le retrait des dossiers de candidature et tous renseignements, s'adresser à :

FRANCE ALZHEIMER

21, boulevard Montmartre
75002 PARIS

Tél. : 01 42 97 52 41