

Effets de protéines transactivatrices virales sur l'expression du gène vimentine : application pour l'établissement de lignées cellulaires

L. Zhen Lin, Alain Lilienbaum, Patrick Vicart, Denise Paulin

Le gène de la vimentine appartient, comme celui des proto-oncogènes *c-fos*, *c-myc* ou *c-jun*, à la famille des gènes induits précocement au cours du cycle cellulaire, en absence de toute synthèse protéique. La vimentine fait également partie de la famille des filaments intermédiaires, formant avec l'actine et les tubulines un des trois réseaux du cytosquelette. Si les fonctions de la vimentine ne sont pas encore toutes définies, son ancrage simultané au noyau et à la membrane plasmique ainsi qu'un large éventail de données concourent à lui assigner un rôle essentiel dans le contrôle du transfert de l'information membranaire vers le noyau [1].

La vimentine est synthétisée dans les cellules issues du mésoderme, lignage hématopoïétique, fibroblastes, cellules musculaires lisses, etc., mais aussi dans les précurseurs d'autres dérivés cellulaires tels que les cellules nerveuses ou musculaires. Enfin, lors de l'établissement de cellules en lignées, la synthèse de la vimentine est induite même si la cellule d'origine n'exprimait pas cette protéine. Cette réactivation du

gène codant pour la vimentine est liée à la multiplication cellulaire. Les séquences de régulation du gène de la vimentine sont constituées de modules sensibles à des activateurs variés et qui peuvent différer selon les types cellulaires ou le virus les infectant. Parmi les protéines transactivatrices virales, deux modèles ont été étudiés. La transactivation par la protéine Tax du virus HTLV1 et celle induite par la protéine grand T du virus SV40. Les données montrent que ces protéines transactivatrices agissent sur la fonction de prolifération [2, 3].

Transactivation par la protéine Tax du virus HTLV1

En tant que gène du cycle cellulaire le gène *vimentine* est transactivé par un gène viral *tax* appartenant au virus HTLV1 (*human T-cell leukemia virus, type 1*) dans les lymphocytes T humains, conduisant à une synthèse de vimentine de 3 à 5 fois supérieure à celle de lymphocytes T non producteurs de la protéine Tax. Le virus HTLV1 a été identifié comme agent causal de la leucémie T de l'adulte, provoquant cette maladie 20 à 30 ans après la primo-infection. Il contient le gène codant pour le facteur Tax, capable de transactiver son propre promoteur

viral, mais également des gènes cellulaires codant pour des facteurs de croissance et de différenciation tels que ceux de l'interleukine 2, de la chaîne α du récepteur à l'interleukine 2, du GM-CSF (*granulocyte, macrophages-colony stimulating factor*), et des gènes précoces du cycle cellulaire comme *c-fos*. De plus, il peut transactiver des gènes d'autres virus comme le HIV (virus du SIDA) et celui responsable de l'hépatite B humaine. Il semble actuellement que la protéine Tax agisse indirectement, par l'intermédiaire d'autres facteurs cellulaires. Nous avons montré que l'action de Tax sur la vimentine n'était pas restreinte à la lignée lymphocytaire T, mais qu'elle était également efficace dans les fibroblastes et les cellules épithéliales, ces dernières étant représentées par la lignée issue d'un carcinome de l'épithélium utérin.

Les données suggèrent que Tax est capable de modifier un équilibre entre les gènes représentant des fonctions de prolifération, entre autres celui codant pour la vimentine, et ceux représentant les fonctions de différenciation, notamment ceux codant pour les cyto-kératines. Le mécanisme de cette transactivation passe par le facteur NF- κ B qui est induit dans les cellules transformées ou infectées et qui se fixe sur une séquence d'ADN du promoteur de la vimentine de nucléotides.

L. Zhen Lin, A. Lilienbaum, P. Vicart : Biologie moléculaire de la différenciation, université Paris VII et l'Institut Pasteur.
Correspondance : D. Paulin, Institut Pasteur, SCME, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

Transactivation par l'antigène T du virus SV40

Les cellules transformées par le virus SV40 synthétisent une quantité très supérieure de vimentine comparée à leur équivalent normal. Cette synthèse est due à une suractivation du gène correspondant. Les régions régulatrices du gène *vimentine* comportent de nombreux sites de fixation de l'antigène T. Ces sites sont-ils fonctionnels ? Trois méthodes ont été utilisées pour mettre en évidence le complexe ADN lié à l'antigène sur le promoteur de la vimentine : (1) retard sur gel du fragment d'ADN en présence de l'antigène T ; (2) protection des régions portant des séquences spécifiques de fixation ; (3) visualisation de la liaison antigène T-ADN du promoteur de la vimentine par microscopie électronique.

Intérêt de l'utilisation du promoteur du gène *vimentine* en tant qu'élément de contrôle d'un gène immortalisant

Le principe de l'immortalisation repose sur une observation que nous avons faite au laboratoire et qui concerne le comportement des gènes codant pour la vimentine et la desmine au cours de la myogenèse [4] ou bien des gènes codant pour la vimentine et les neurofilaments au cours de la neuro-genèse. Dans les cellules précurseurs myoblastiques, le gène qui code pour la vimentine est activé, transcrit en un ARN de 1,8 kb qui lui-même est traduit en une protéine de 55 kDa. Cette protéine est essentiellement cytoplasmique et forme un réseau qui va de la membrane au noyau. Si le myoblaste est capable de fusionner en vue de donner un myotube, le gène *vimentine* s'arrête de fonctionner dès le début de la fusion. Lorsque le myotube se forme, le gène *desmine* est lui-même activé, synthétise un ARN de 2,2 kb qui est transcrit en une protéine desmine qui s'intègre dans la future ligne

Z et qui sert aussi à fixer certains récepteurs.

Le principe de l'immortalisation est de coupler un gène immortalisant avec le promoteur de la vimentine, ce qui permettra à la protéine immortalisante d'être présente dans les cellules précurseurs mais, en revanche, d'être totalement absente dans les cellules musculaires lorsqu'elles auront commencé à fusionner, puisque le gène ne fonctionnera plus. La construction plasmidique la plus efficace est celle qui ne contient que les éléments activateurs du gène de la vimentine. Nous avons éliminé les différentes régions du promoteur qui sont inefficaces ou qui pourraient être inhibitrices dans les cellules précurseurs. Nous avons couplé un gène immortalisant conférant deux propriétés aux protéines correspondantes : la première est de ne pas s'intégrer dans la membrane pour ne pas perturber l'activité, la deuxième est d'être rapidement dégradée lorsque la cellule myoblastique fusionne en myotube. Ce gène chimère issu du promoteur vimentine contrôlant l'expression d'un gène immortalisant, modifié, puis introduit dans des types cellulaires différents, confère à ces derniers des propriétés qui permettent d'établir de nouvelles lignées cellulaires ■

Summary

Effect of viral transactivators on the expression of the vimentin gene: application for the establishment of mammalian cell lines

The expression of the vimentin gene, a cytoskeletal growth-regulated gene, is activated in trans by different viral transactivator.

(1) The T transactivator protein encoded by the SV40 virus: Mammalian cell lines can be established in vitro with high efficiency upon expression of the SV40 large T antigen driven by a promoter sequence derived from the human vimentin gene. The sequences

coding for the large T and/or small t antigens were fused downstream some regulatory elements from the vimentin gene, the activation of which characterises the majority of *in vitro* growing cells. Immortalisation was achieved by intranuclear microinjection of the linear insert isolated from the recombinant Hu-Vim-T. (2) the Tax (p40x) transactivator protein encoded by the human T-cell leukemia virus type I. Our findings indicate that constitutive expression of the vimentin gene under the control of the Tax protein may be relevant in understanding the progression of the lymphoproliferative process associated with human T-cell leukemia virus type I infection.

Références

- Steinert PM, Roop DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Bio* 1988 ; 593-625.
- Lilienbaum A, Duc Dodon M, Alexandre C, Gazzolo L, Paulin D. Effect of human T-cell leukemia virus type I tax protein an activation to the human vimentine gene. *J Virol* 1990 ; 67 : 256-63.
- Wagner S, Knippers R. An SV40 large T antigen binding site in the cellular genome is part of a cis-acting transcriptional element. *Oncogene* 1990 ; 5 : 353-9.
- Zhen Lin L, Lilienbaum A, Buttler-Browne G, Paulin D. Human desmin-coding gene : complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development *Gene* 1989 ; 78 : 243-54.