50 376
1 977
134

N° d'ordre : 399

50376
1977
134

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

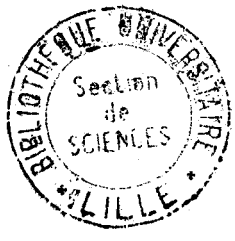
MÉMOIRE

présenté à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille,
pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences Naturelles
(option Biochimie)

par

Pierre LEMAY

ÉTUDE DES PARTICULES VIRALES DE TYPE C PRODUITES PAR UNE LIGNÉE CELLULAIRE ISSUE D'UN PLASMOCYTOME MURIN



Soutenu le 14 Octobre 1977, devant la Commission d'Examen.

Président	:	M. J. MONTREUIL
Rapporteurs	:	M.M. P. BOULANGER J. KREMBEL J.P. LEVY
Examinateurs	:	M.M. D. STEHELIN A. TAVITIAN

A ma Femme,

A mes Filles,

A la Mémoire de mon Père,

A ma Mère,

A mes Beaux-Parents,

A ma Famille,

A mes Amis,

Ce travail a été réalisé àl'Unité de Virologie n° 102 de l'INSERM à Lille. Que son Directeur, le Professeur Jean SAMAILLE trouve ici l'expression de mes remerciements pour la confiance qu'il m'a faite en m'attribuant ce sujet.

L'INSERM, le CNRS, la DGRST, la LIGUE NATIONALE de Lutte contre le Cancer et l'UER III de la Faculté de Médecine m'ont apporté leur support financier. Je les en remercie.

A mon Maître et Président de Thèse,

le Professeur Jean MONTREUIL,
Professeur de Chimie Biologique

L'enthousiasme manifesté lors de vos exposés et la clarté de vos cours ont été des facteurs déterminants pour mon orientation vers la Biochimie. Je vous suis très reconnaissant d'avoir bien voulu présider le jury de cette thèse.

A mes Juges,

Monsieur le Professeur Jean-Paul LEVY ,
Professeur Agrégé d'Hématologie

Vous m'avez accueilli et conseillé avec bienveillance lorsque j'ai abordé la partie immunologique de ce travail. C'est un très grand honneur pour moi que de vous avoir pour juge. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements.

Monsieur le Professeur Pierre BOULANGER,
Maître de Conférence agrégé de Chimie Biologique

Vous m'avez guidé lorsque ce travail en était à ses balbutiements, vous m'avez encouragé et vous m'avez toujours écouté et conseillé. Travailler avec vous a toujours été agréable. Soyez-en très sincèrement remercié.

Monsieur Jean KREMBEL,
Maître de Conférence de Chimie Biologique

J'ai pu apprécier vos travaux sur les ribosomes et les Rétrovirus sont à la limite des ribonucléoprotéines... Vous avez bien voulu accepter de juger ce mémoire. Veuillez trouver ici, l'expression de mes remerciements.

Monsieur Armand TAVITIAN,
Directeur de Recherche à l'INSERM

Votre grande compétence dans le domaine de l'enzymologie des rétrovirus murins m'a permis de développer une voie nouvelle pour la caractérisation des particules virales produites par la cellule MF_2. Je vous remercie très sincèrement pour l'aide et les conseils que vous m'avez prodigués.

Monsieur Dominique STEHELIN,
Chargé de Recherche au CNRS

C'est un honneur pour moi que d'être jugé par un spécialiste des hybridations moléculaires. Soyez-en vivement remercié.

A mes amis, avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer,

Maud COLLYN-d'HOOGHE, Nadine PLUQUET, Jean-Claude LEFEBVRE, Gérard TORPIER et Jacques HERISSE.,

Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements.

Béatrice MAETZ, Marie-Berthe RAES, Christian LAGROU et Didier PETITE m'ont apporté une aide technique précieuse et éfficace. A tous, merci.

Je tiens à remercier également Mesdames COULEMBIER et GARET pour l'illustration photographique.

A mes amis des Unités INSERM n° 102, n° 16 (Professeur P. BOULANGER), n° 107 (Professeur M. BOIRON) et n° 124 (Professeur G. BISERTE) auprès de qui j'ai toujours trouvé aide et compréhension.

IVERSITE DES SCIENCES
TECHNIQUES DE LILLE

08.03.1977

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M. MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M.	BACCHUS Pierre	Astronomie
M.	BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M.	BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BILLARD Jean	Physique du Solide
M.	BIAYS Pierre	Géographie
M.	BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M.	BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M.	BONTE Antoine	Géologie Appliqué
M.	BOUGHON Pierre	Algèbre
M.	BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M.	CELET Paul	Géologie Générale
M.	COEURE Gérard	Analyse
M.	CONSTANT Eugène	Electronique
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M.	DELATTRE Charles	Géologie Générale
M.	DELHAYE Michel	Chimie Physique
M.	DERCOURT Jean	Géologie Générale
M.	DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M.	FAURE Robert	Mécanique
M.	FOURET René	Physique du Solide
M.	GABILLARD Robert	Electronique
M.	GONTIER Gérard	Mécanique
M.	GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M.	GRUSON Laurent	Algèbre
M.	GUILLAUME Jean	Microbiologie
M.	HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M.	LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M.	LEBRUN André	Electronique
M.	LEHMANN Daniel	Géométrie

.../...

Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mle MARQUET Simone	Probabilités
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (Et Chargés d'Enseignement)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie

.../...

M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CARREZ Christian	Informatique
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M. CORDONNIER Vincent.	Informatique
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Géologie
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. FONTAINE Jacques	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GERVAIS Michel	Gestion des Entreprises
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mle LEGRAND Denise	Algèbre
Mle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NOTELET Francis	Electrotechnique
M. NUSSEMBAUM Maurice	Sciences Economiques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie

.../...

Mle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLEZ Roger	Biologie
M. THERY Pierre	Electronique
M. TOP Gérard	Sciences Economiques
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TREANTON Jean-René	Sociologie
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VILLETTE Michel	Mécanique
M. WALLART Francis	Chimie
M. WERNER Georges	Informatique
Mme ZIN-JUSTIN Nicole	Algèbre

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION p.1

GENERALITES p.4

1.- LES PLASMOCYTOMES MURINS p.4

I. Induction des plasmocytomes murins. p.5

A. Les plasmocytomes spontanés de la souris p.5

B. Les plasmocytomes induits p.5

1. - Agents inducteurs et susceptibilité des souches de souris p.6

2. - Développement des tumeurs primitives p.8

II. Les immunoglobulines synthétisées par les tumeurs plasmocytaires p.8

III. Maintien des lignées plasmocytaires p.9

IV. Virus associés aux myélomes p.11

V. Le plasmocytome MOPC 173 et la lignée MF_2 p.12

VI. Conclusion p.14

2. - LES PARTICULES VIRALES DE TYPE C p.15

I. Morphologie et classification des rétrovirus de souris p. 15

A. Morphologie p. 15

B. Classification p.16

II. Caractéristiques biochimiques des rétrovirus de souris p.17

A. Organisation générale et polypeptides de structure p.17

1. - Les glycoprotéïnes p.18

2. - Les polypeptides p30, p15, p12 et p10 p.20

3. - Structure primaire et antigénicité des protéïnes de structure p.20

4. - Les lipides p.21

B. Les RNA viraux p.21

1. - Les espèces légères p.21

2. - Le RNA génomique viral p.23

C. La transcriptase-inverse p.25

1. - Propriétés de l'enzyme p.25

2. - Mécanisme d'action de la transcriptase-inverse p.27

RESULTATS p.29

1. - CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES PARTICULES VIRALES DE TYPE C PRODUITES PAR LA LIGNEE MF_2 p.31

I. Etude critique des procédés de concentration et de purification des particules virales p.31

A. Méthode au polyéthylèneglycol (PEG) p.31

B. Méthode dite de "Moloney" p.33

C. Comparaison des deux méthodes. Choix de la technique de concentration p.35

D. Isolement de noyaux viraux p.38

II. Mise en évidence d'un RNA de haut poids moléculaire p.38

III. Mise en évidence et analyse des protéïnes de structure p.41

IV. Mise en évidence et étude de l'activité de transcriptase-inverse des particules virales de type C produites par la lignée MF2 p.42

A. Mise en évidence d'une activité de transcriptase-inverse endogène p.42

B. Synthèse et caractérisation d'un cDNA p.44

1.- Détermination de la structure secondaire du produit de la réaction de polymérisation endogène p.44

2.-Détermination de la taille du cDNA monocaténaire synthétisé p.47

3.- Détermination de l'étendue de la transcription du génome viral p.47

2. - MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE BIOLOGIQUE. LE TEST XC p.50

I. Essais de titrage des particules virales produites par la lignée MF2 p.50

A. Le test S+L- p.50

B. Le test XC p.51

II. Etude cytologique et ultrastructurale des syncytiums XC induits par la cellule MF2 p.52

A. Etude en microscopie optique p.52

1.- Cellules impliquées dans la fusion p.52

2.- Accivités métaboliques requises par le développement de la polycaryocytose p.54

B. Etude en microscopie électronique p.56

III. Etude dynamique de la polycaryocytose p.62
A. Etude en microcinématographie p.62
B. Etude par la technique du cryodécapage p.65

3. - REGULATION DE LA PRODUCTION VIRALE EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE. PHENOMENE DU "SWITCH-OFF"-"SWITCH-ON" p.74

I. Décription du phénomène d'extinction- réapparition p.74
II. Etude biochimique de la régulation de l'expression du génome viral selon les conditions de culture p.79
A. Isolement des RNA possèdant une séquence polyadénylée p.79
1.- Contrôle de l'efficacité du support utilisé p.79
2.- Isolement des RNA cellulaire possédant une séquence polyadénylée p.80
B. Recherche de l'expression du génome viral parmi les RNA polyadénylés suivant les conditions de culture p.80

4.- ESSAIS DE CARACTERISATION DES PARTICULES VIRALES PRODUITES PAR LA CELLULE MF_2. p.87

I. Technique de LAURELL p.87

II. Typage des particules par inhibition de la formation de syncytiums XC p.88

III. Parenté entre les particules virales produites par la cellule MF2 et les virus endogènes de la souris Balb/c p.91

CONCLUSION p.97

APPENDICE TECHNIQUE p. 101

1. - REACTIFS GENERAUX ET METHODES DE DOSAGE p.102

I. Réactifs généraux. p.102
A. Tampon phosphate isotonique PBS p.102
B. Tampon citrate 1xSSC p.102
C. Tampon NTE p.102

II. Milieux scintillants pour la détermination de la radioactivité p.102
A. Milieu à base de toluène p.102
B. Liquide de BRAY p.103

III. Méthodes de dosage p.103
A. Dosage de protéïnes p.103
B. Estimation de la concentration en DNA ou RNA p.103
C. Détermination de la radioactivité des échantillons p.103

2. - CULTURES CELLULAIRES p.104

I. Lignées utilisées p.104

II. Induction de polycaryons p.105

III. Marquage des cultures cellulaires et des particules virales par des traceurs radioactifs p.105

3. - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES p.107

I. Préparation des immunsérums p.107
A. Chez la souris p.107
B. Chez le lapin p.107

II. Immunoélectrophorèse bidimensionnelle Technique de LAURELL p.107

4. - TECHNIQUES CYTOLOGIQUES MICROSCOPIE ELECTRONIQUE p.109

I. Techniques cytologiques p.109
A. Méthodes de coloration p.109
B. Microcinématographie p.109

II. Microscopie électronique p.110
A. Préparation des coupes fines p.110
B. Immunomicroscopie p.110
C. Cryodécapage p.111

5. - ISOLEMENT ET PURIFICATION DES PARTICULES VIRALES p.112

I. Elimination des débris cellulaires p.112

II. Concentration des particules virales p.112
A. Précipitation au polyéthylène-glycol (PEG) p.112
B. Technique dite de "Moloney" p.112
C. Précipitation par le sulfate d'ammonium p.113

III. Purification des particules virales concentrées p.113

6. - ANALYSE DES POLYPEPTIDES VIRAUX EN GEL DE POLYACRYLAMIDE DISSOCIANT p.115

7. - EXTRACTION ET ANALYSE DES RNA p.117

I. Les RNA viraux p.117

A. Extraction des RNA viraux p.117
B. Analyse en gradient de densité p.117
C. Analyse en gel de polyacrylamide p.118

II. Les RNA cellulaires p.118

A. Extraction du RNA total p.118
B. Sélection des RNA possédant une séquence polyadénylée p.119

8. - REACTION DE TRANSCRIPTION INVERSE. SYNTHESE DE DNA COMPLEMENTAIRES p.120

I. Réaction de polymérisation exogène p.120

II. Réaction de polymérisation endogène p.121

III. Préparation et extraction d'un DNA complémentaire p.122

IV. Analyse de la structure secondaire des cDNA p.122

V. Conditions d'action de la nucléase S-1 p.123

VI. Détermination de la taille du cDNA monocaténaire p.123

VII. Détermination de l'étendue de la transcription p.123

VIII. Recherche des séquences virales dans les RNA cellulaires p.124

BIBLIOGRAPHIE p.125

ABREVIATIONS UTILISEES

5AcU	5 acétyluracile
C	acide cytidylique
Ci	curie
cDNA	DNA complémentaire
Cpm	coups par minute
DATD	diéthyltartardiamide
dATP	désoxyadénosine triphosphate
dCTP	désoxycytosine triphosphate
dGTP	désoxyguanosine triphosphate
DNA	acide désoxyribonucléique
DNP	radical dinitrophényl
DO 260	densité optique à 260nm
DTT	dithiotreitol
dTTP	désoxythymidine triphosphate
dxTP	désoxynucléoside triphosphate
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
G	acide guanylique
gp	glycoprotéïne
M	mole par litre
µCi	microCurie (10^{-6} Curie)
mg	milligramme
µg	microgramme (10^{-6} gramme)
m^7G	acide 7 méthylguanylique
ml	millilitre (10^{-3} litre)
µl	microlitre(10^{-6} litre)
mM	millimole (10^{-3}mole)
µM	micromole (10^{-6}mole)
mn	minute
ng	nanogramme (10^{-9} gramme)
nm	nanomètre (10^{-9} mètre)
nM	nanomole (10^{-9}mole)
oligo (dT)	séquence oligodésoxythymidylique
p	polypeptide

PBS	tampon phosphate isotonique
PEG	polyéthylèneglycol (Carbowax)
pM	picomole (10^{-12} mole)
poly (A)	séquence polyadénylique
r	rads
RNA	acide ribonucléïque
rpm	révolutions par minute
S	constante de sédimentation en unité SVEDBERG (10^{-13} seconde)
SDS	dodécylsulfate de sodium
TCA	trichloracétate
TEMED	N,N,N',N', tétraméthyléthylènediamine
TNP	radical trinitrophényl

INTRODUCTION

Lors de notre arrivée au laboratoire de Virologie, une partie des activités de celui-ci était consacrée à la production massive de cellules animales. Dans ce cadre, nous cultivions pour le Docteur PARAF la cellule MF_2 issue du plasmocytome murin MOPC 173. Cette cellule produit des particules virales de type C qui sont libérées dans le milieu de culture. Si les myélomes murins ont servi de modèle expérimental dans de nombreux travaux d'ordre cancérologique, génétique ou biochimique, les études relatives aux particules virales produites par ces tumeurs ont été peu nombreuses. Notre intérêt s'est porté sur ces particules et nous avons voulu définir les propriétés biochimiques et biologiques des virus produits par la lignée MF_2 ; enfin, nous avons tenté de les caractériser

Du point de vue biochimique, les particules virales de type C produites par les plasmocytomes murins sont-elles semblables en composition aux autres oncornavirus murins bien caractérisés ? Par exemple, possèdent-elles un RNA génomique de haut poids moléculaire, sont-elles formées essentiellement de 7 polypeptides structuraux majeurs, présentent-elles une activité DNA-polymérasique RNA-dépendante ?

Du point de vue biologique, AOKI et coll (1) ont montré que les particules virales produites par des cellules myélomateuses murines appartiennent à trois familles de virus. Ces familles sont : celle des virus leucémogénes, celle des virus associés au myélomes murins, une encore indéterminée. Dans cette dernière se trouvent peut-être des virus endogènes de la souris Balb/c. Il semblait donc interessant d'étudier l'activation de ces particules lors du développement tumoral ainsi que leur expression suivant les conditions de culture.

Il restait à préciser la parenté exacte de nos particules virales avec les autres familles de rétrovirus murins déjà bien définies, c'est-à-dire de typer nos virus.

Après avoir brièvement rappelé les caractéristiques des myélomes murins et des particules virales de type C, nous exposerons les résultats de nos travaux qui ont fait l'objet des publications suivantes :

J. C. LEFEBVRE and P. LEMAY
XC - cell fusion induced by murine plasmocytoma cells. I. Alternate "switching-off" and "switching-on" by in-vivo - in-vitro transfers.
Biomed Exp, (1974), 21, 378 - 381

P. LEMAY, G. TORPIER, J.C. LEFEBVRE and J. SAMAILLE
XC - cell fusion induced by murine plasmocytoma cells. II. Cytological and ultrastructural study.
Biomed Exp, (1975), 23, 168 - 175

J. HERISSE, P. LEMAY and A. TAVITIAN
XC - cell fusion induced by murine plasmocytoma cells. III. RNA-gene expression correlated to syncytium induction.
Biomed Exp, (1976), 25, 3 - 7

P. LEMAY, M. COLLYN-D'HOOGHE and G. TORPIER
XC - cell fusion induced by murine plasmocytoma cells. IV. A dynamic study by microcinematography and freeze-fracture.
Exptl. Cell Res, (1977), 109, 79-86

P. LEMAY, N. PLUQUET et A. TAVITIAN
Expression comparée du virus associé au plasmocytome murin dans des cellules tumorales et dans les cellules embryonnaires de la souche murine d'origine.
C.R. Acad. Sci, Paris, (1977), 284, 2573-2575

Nous avons, en outre, collaboré à d'autres travaux qui ne s'inscrivent pas dans le cadre de ce mémoire :

P.A. BOULANGER, N. HOUDRET, A. SCHARFMAN and P. LEMAY.

The role of surface sialic acid in adenovirus - cell adsorption.

J. Gen. Virol, (1972), 16, 429 - 434.

G E N E R A L I T E S

1. - LES PLASMOCYTOMES MURINS.

L'intérêt du modèle expérimental que constituent les plasmocytomes murins est qu'il permet l'étude de populations cellulaires homogènes quant à leur origine. En effet, la tumeur plasmocytaire est formée par le développement néoplasique d'un seul clone cellulaire ; de plus, ce clone a une fonction différenciée : la sécrétion d'une immunoglobuline. Ce modèle permet donc d'obtenir des quantités de matériel cellulaire ou de sécrétion très importantes et homogènes pour leur origine. Grâce à tous ces avantages, les plasmocytomes murins, ont servi de base expérimentale dans de nombreuses études :

- sur le mécanisme de la synthèse des immunoglobulines (NAMBA et HANAOKA (2), HORIBATA et HARRIS (3), SCHARFF et LASKOV (4)).
- sur la génétique des immunoglobulines(SCHUBERT (5), SCHUBERT et coll (6), HERZENBERG et coll (7), WEIGERT et coll (8)).
- sur la détermination de la structure primaire des immunoglobulines et la déduction des implications génétiques qui se dégagent des comparaisons de séquence (FOUGEREAU et coll (9)).
-études cristallographiques et physicochimiques des immunoglobulines (POLJACK (10), POLLET et coll (11)).
- étude des mRNA des immunoglobulines (Mc LEOD (12), LASKOV et MITELMAN (13), STORB (14), STEVENS et WILLIAMSON (15), COWAN et MILSTEIN (16)).
- étude des RNA polymérases de cellules myélomateuses (SCHWARTZ et coll (17, 18)).
- étude des DNA polymérases (HACHMANN et LEZIUS (19)).
- étude des particules virales de type A et C présentes dans ce type de tumeur (KUFF et coll (20), KARPAS (21), KARPAS et CAWLEY (22), YANG et WIVEL (23), VOLKMAN et KRUEGER (24), KRUEGER (25), KRUEGER et coll (26, 27), AOKI et coll (28)).

Après avoir rappelé les techniques d'induction et les caractéristiques biologiques des plasmocytomes, nous définirons la méthode d'obtention et les caractères de la lignée MF_2 . Nous terminerons ces généralités par une brève revue des principales propriétés biologiques et biochimiques des particules virales de type C.

I. Induction des plasmocytomes murins.

A. Les plasmocytomes spontanés de la Souris :

Les plasmocytomes spontanés se produisent dans la région iléocoecale et se développent habituellement autour d'ulcères de la muqueuse. POTTER et coll (29) ont décrit, en 1957, un plasmocytome spontané et transplantable de la souris C_3H* (le plasmocytome X5563). Les points de départ des plasmocytomes spontanés sont essentiellement des petits ulcères de la région iléocoecale, ulcères qui sont entourés par un tissu réactif contenant des cellules plasmocytaires ; dans quelques cas, ces cellules évoluent vers la néoplasie, infiltrant la paroi intestinale et métastasant aux ganglions lymphatiques mésentériques. Ces tumeurs iléocoecales sont très rarement transplantables.

B. Les plasmocytomes induits :

Nos connaissances sur les plasmocytomes induits de la souris sont essentiellement dues aux travaux de M. POTTER (30) et de M. COHN (31). En 1962, POTTER et BOYCE (32) montraient qu'il était possible d'induire le développement de plasmocytomes chez la souris Balb/c par injection d'huile minérale. Depuis, d'autres agents inducteurs de telles tumeurs ont été découverts.

---

* On trouvera des détails sur les diverses souches de souris dans la revue de STAATS (33) et le manuel de CRISPENS (34).

1.- Agents inducteurs et susceptibilité des souches de souris :

La possibilité d'obtenir le développement de plasmocytomes chez la souris dépend essentiellement de la souche utilisée : certaines souches sont très susceptibles, d'autres ne le sont pas du tout ; enfin, les croisements entre souche susceptible et souche résistante permettent d'obtenir des hybrides de type F_1 susceptibles. Un tableau récapitulatif des réponses des souches de souris à l'induction de plasmocytome est présenté p.7 .Seules les souris Balb/c et NZB montrent une très grande inductibilité du processus tumoral par les différents agents utilisés (Tableau I).

Les divers agents inducteurs qui ont été décrits se classent en deux grandes catégories : les plastiques et les huiles minérales.

L'induction de plasmocytomes par les plastiques a été décrite pour la première fois par MERWIN et ALGIRE (35) qui, voulant étudier le comportement de tissus implantés dans des chambres à diffusion à l'intérieur de la cavité péritonéale de la souris Balb/c, ont obtenu le développement d'un grand nombre de plasmocytomes. Par la suite, il a été montré que des chambres à diffusion vides implantées dans la cavité péritonéale suffisaient à déclencher le processus tumoral. Enfin, des copeaux de plexiglass se sont montrés être des agents encore plus efficaces que ceux précédemment décrits (Tableau I).

LIEBERMAN et coll (36) voulant induire des ascites avec un adjuvant pour obtenir de grandes quantités d'anticorps ont constaté qu'un plasmocytome se développait. POTTER et BOYCE (37) ont par la suite montré que le principe actif pour l'induction de plasmocytomes dans ces adjuvants était l'huile minérale qui entrait dans leur composition.

La plupart de ces huiles sont des mélanges contenant des hydrocarbures saturés, linéaires, branchés ou cycliques non métabolisables.

Tableau I

Susceptibilité de certaines souches de souris à l'induction de plasmocytomes - (d'après POTTER (38)

Agent inducteur (quantité)	Souche ou hybride	Pourcentage de tumeurs obtenu 8 à 12 mois après l'induction
Chambres Millipore + tissu	Balb/c	27,5
	C_3H/He	1,8
	DBA	0
	$C_{57}Bl$	0
	SWR	4
Copeaux de plexiglass	Balb/c	55
Huile minérale Primol D (0,5 ml)	Balb/c	39,2
	DBA/2	0
	CBA	0
Huile minérale Bayol F (3 x 0,5 ml)	Balb/c	61
	A/He	0
	C_3H/LW	1,8
	AL/N	0
	AL/N	3,7
	$C_{57}Bl/Ka$	0
	(Balb/c x AL/N)F1	12,5
	(Balb/c x DBA/2)F1	0
	(Balb/c x $C_{57}Bl/Ka$)F1	25
	(Balb/c x NH/LW)F1	5
Paraffine Médicinale (3 x 0,5 ml)	NZB	35
	(NZB x Balb/c)F1	25,8
Pristane (3 x 0,5 ml)	Balb/c	65
Pristane (0,5 ml) + A-MuLV *	Balb/c	28 **

* Virus de la leucémie murine d'Abelson
** Développement observé 77 à 149 jours après l' injection de pristane (POTTER et coll (39)).

Seules quelques unes sont disponibles à l'état pur comme le pristane (2,6,10,14 - tétraméthylpentadécane), cet agent est celui qui donne la plus courte période de latence pour l'apparition des tumeurs (tableau I). Le pristane a pu être isolé de certains copépodes marins, du foie humain et aussi de la peau (52 µg/g de peau). Il a été suggéré une possible absorption du pristane par la peau. Des huiles minérales ont également été isolées de tissus humains cependant, ces composés n'ont pas été mis en cause dans l'induction des myélomes humains.

2.- Développement des tumeurs primitives :

Les tumeurs à plasmocytes se développent dans un granulome huileux péritonéal et semblent avoir besoin de cet environnement pour se développer. L'injection d'huile provoque la formation de tels granulomes sur la surface péritonéale, la paroi abdominale, le diaphragme, le mésentère, les réqions péripancréatiques et rétropéritonéales. Ce tissu se forme quelques jours après l'injection d'huile. Le granulome est essentiellement constitué d'histiocytes qui adhèrent l'un à l'autre. Il s'attache ensuite à la surface péritonéale et se vascularise. Des plasmocytes s'infiltrent alors entre les histiocytes et les vaisseaux et la tumeur se développe à partir de ces zones.

Ainsi, l'induction des plasmocytomes semble liée à des facteurs génétiques ;Seules les souches Balb/c et NZB sont hautement inductibles. D'autre part, un processus inflammatoire doit être établi avant le développement de la carcinogénèse.

II. Immunoglobulines synthétisées par les tumeurs plasmocytaires.

Environ 66p100 des tumeurs plasmocytaires produisent une immunoglobuline complète et parmi celles-ci, 60p100 synthétisent une immunoglobuline monoclonale de la classe des IgA. Les autres produisent soit des chaînes légères, soit des demi-

molécules (une chaîne lourde-une chaîne légère) soit des produits non caractérisés. La prépondérance des myélomes à IgA peut s'expliquer :

- soit par une susceptibilité plus grande des cellules dont la destinée est de synthétiser des IgA à subir la transformation néoplasique.

-soit par la localisation même des tumeurs primitives qui se forment préférentiellement dans la lame propre du tractus intestinal (lieu de synthèse privilégié pour les IgA).

Enfin, nombre d'immunoglobulines monoclonales myélomateuses sont fonctionnelles en ce sens qu'elles présentent une activité anticorps. Certains exemples sont présentés sur le tableau II. Le tableau III rappelle la terminologie employée dans la désignation des myélomes : au préfixe, on ajoute souvent les deux lettres PC (pour "plasma cell"), le groupe de lettres est suivi d'un numéro d'ordre.

III. - Maintien des lignées plasmocytaires.

Le maintien des souches se fait de préférence par transplantation sous-cutanée de petits fragments de tumeur dans la région inguinale à l'aide d'un trocart. Cette méthode est la seule permettant le maintien de la synthèse des immunoglobulines lors des transplants successifs.

La transplantation par voie intrapéritonéale est également possible ; dans ces conditions, une ascite se développe.On peut accroître la vitesse d'apparition de l'ascite et le pourcentage de réussite de greffe en conditionnant la souris par une injection de pristane avant la greffe (POTTER et coll (40)). L'ascite est le plus souvent hémorragique et la synthèse de l'immunoglobuline disparait le plus souvent au cours des

Tableau II

Déterminants antigéniques révelés par des immunoglobulines monoclonales sécrètées par des plasmocytomes murins (d'après POTTER (41))

Déterminant	Plasmocytome d'origine	Classe d'immunoglobuline sécrétée
DNP, TNP, Ménadione, 5AcU	MOPC 315	IgA
DNP, TNP	MOPC 460	IgA
DNP, TNP (+ DNA dénaturé)	J 504	IgA
5AcU (+ DNA dénaturé)	S 176	IgA
DNP, TNP, 5AcU (+ DNA dénaturé)	S 23	IgA
Phosphorylcholine	S 63	IgA
Phosphorylcholine, choline	M 167	IgA
Nigerotriose	MOPC 104	IgM
α- Méthyl-D-galactoside	MOPC 384	IgA
N-acétyl-β-D-glucosamine	S 117	IgA
N-acétyl-D-mannosamine	M 406	IgA
Fructoses liés en $2 \xrightarrow{\beta} 6$	J 606	IgG_3
$1 \xrightarrow{\beta} 6$-D-galactopyrannose	SAPC 10	IgA
Déterminants de Salmonelle sensibles à la trypsine	MOPC 467	IgA

Tableau III

Nomenclature des plasmocytomes murins

Agent inducteur ou auteur	Préfixe	Auteur	Préfixe
Adjuvant	Adj	SANFORD	S
Huile minérale	MO	Mc INTIRE	Mc
Tetraméthylpentadécane	TE	YANCEY	Y
7n Hexyloctadécane	HO	GOLDSTEIN	G
Salmonella associé	SA	MORIWAKI	MS
MERWIN	M	COHN	S*
DUNN	D	"	J*

* COHN et coll n'utilisent pas les lettres PC après le préfixe dans leur nomenclature.

passages. Cette méthode est donc à utiliser lorsque l'on désire obtenir de grandes quantités d'immunoglobulines pour une expérience mais non pour maintenir une souche tumorale.

Une pathologie associée aux tumeurs plasmocytaires transplantées a été décrite : lésions osseuses, lésions rénales, protéïnurie de type Bence-Jones.

Enfin, il est possible de prévenir le développement d'une tumeur plasmocytaire greffée par injection avant la greffe
-soit d'un sérum anti-immunoglobuline monoclonale (MANNING et JUTILA (42)).
-soit d'anticorps anti-immunoglobuline purifiés (YUTOKU et coll (43)).
-soit d'antigène spécifique de l'activité anticorps de l'immunoglobuline monoclonale (PARAF et coll (44)).

IV. - Virus associés aux myélomes.

Que ce soit dans les plasmocytomes spontanés ou induits, tous présentent en microscopie électronique des particules virales de type A intracisternales. Certains montrent en plus des particules A intracytoplasmiques ; dans ce cas, on peut également observer des particules virales de type C bourgeonnant à la surface des cellules. La production de particules virales est quelquefois très augmentée lors des transplantations successives chez l'animal ou lors de l'établissement de lignées cellulaires à partir de ces tumeurs.

Les particules A intracisternales sont composées d'après KUFF et coll (45) de 80p100 de protéïnes, 15p100 de phospholipides et 5 à 6p100 de RNA. Elles posséderaient un polypeptide majeur de masse moléculaire 70 000 daltons (KUFF et coll (46)) et une DNA polymérase- RNA dépendante (KRUEGER (47)).

Les particulesA intracisternales purifiées n'induisent pas la formation de myélome lorsqu'elles sont injectées à des souriceaux nouveaux-nés et n'ont pas d'antigènes communs avec les particules leucémogènes murines de type C.

Les particules virales de type C produites par les cellules myélomateuses maintenues en culture de tissu appartiennent à trois populations virales ou plus, comme l'ont suggéré AOKI et coll (48) dans leurs études en immunomicroscopie électronique.Ils distinguent :

- des virus associés aux myélomes murins possédant un antigène d'enveloppe spécifique.
- des virus leucémogènes murins de type leucémie de GROSS.
-d'autres virus encore non caractérisés.

Nous développerons les propriétés des particules virales de type C dans la deuxième partie des généralités.

V. - Le plasmocytome MOPC 173 et la lignée MF_2.

Le plasmocytome MOPC 173 a été obtenu par POTTER. La lignée originale sécrète une immunoglobuline monoclonale de la classe des IgG_{2a} dont les chaînes légères sont de type K_1 aucune activité anticorps n'a été décrite pour cette immunoglobuline.Des particules virales de type A et C ont été décrites dans la tumeur mère.

De nombreux plasmocytomes ont pu être adaptés à la culture cellulaire in-vitro et la majorité des lignées poussent en suspension dans le milieu de culture. PARAF et coll (49) ont pu obtenir deux variants phénotypiques à partir du myélome MOPC 173 mis en culture cellulaire. Leur technique de mise en culture est la suivante :

La tumeur est émincée à l'aide de scalpels, et les

gros fragments éliminés. La mise en culture est effectuée dans un milieu très riche en sérum (20p100) et renfermant de l'extrait embryonnaire de souris. Toutes les cellules qui ne se fixent pas au flacon de culture sont éliminées. Après cette sélection, la concentration du milieu en sérum est abaissée à 10p100. Au bout de quelques semaines une hétérogénéité morphologique apparait et le clonage des deux variants peut être réalisé en agissant sur la concentration en sérum du milieu de culture.

En milieu renfermant deux pour cent de sérum, le variant épithélioïde se développe. Il est dénommé ME_2. Il présente une inhibition de contact, il n'a aucun pouvoir oncogène chez la souris Balb/c et ne produit plus de particules virales (ni de type A, ni de type C).

En milieu renfermant 10p100 de sérum, on sélectionne le variant fibroblastique (MF_2). Il ne présente pas d'inhibition de contact. Il peut induire le développement de tumeurs ascitiques chez la souris Balb/c. Il produit des particules virales de type C et présente de nombreuses particules virales de type A. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la sécrétion de l'immunoglobuline monoclonale par ce variant dans notre laboratoire.

Enfin, il est possible d'obtenir des révertants de ces variants en agissant sur la concentration en sérum du milieu de culture (GUERIN et coll (50)).

Toutes nos études sur les particules virales de type C produites par le plasmocytome MOPC 173 ont été réalisées à partir des virus produits par la lignée MF_2 maintenue en culture soit in-vivo sous forme ascitique chez la souris Balb/c, soit in-vitro en culture cellulaire fixée ou en suspension agitée.

VI. - Conclusion.

En résumé, l'induction de plasmocytomes est possible chez la souris Balb/c. Leur développement se fait à partir d'un foyer d'initiation intrapéritonéal. La majorité des myélomes sécrétant produisent une immunoglobuline monoclonale de la classe des IgA. Les immunoglobulines peuvent avoir une activité anticorps. La plupart peuvent être maintenus par transplantation dans une lignée syngénique et être cultivés in-vitro. Enfin, dans tous les plasmocytomes des particules virales de type A intracisternales ont été décrites. Dans certains, on trouve, en outre, des particules A intracytoplasmiques ; il y a, dans ce cas, production de particules virales de type C. La signification de ces particules virales n'a pas encore été déterminée.

2. - LES PARTICULES VIRALES DE TYPE C *

Les particules virales de type C sont des virus enveloppés dont le génome est constitué par un RNA de haute masse moléculaire. Ils ont été pendant un temps appelés oncornavirus. Cependant, comme tous ne sont pas oncogènes, on préfère les désigner maintenant sous le nom de rétrovirus (FENNER (51)), c'est-à-dire des virus possédant une transcriptase-inverse leur permettant de transcrire leur RNA génomique en un DNA complémentaire.

Nous nous limiterons à la description des rétrovirus de souris.

I. - Morphologie et classification des rétrovirus de souris.

A. Morphologie :

Les rétrovirus murins se rangent parmi les particules virales de type C dans la classification proposée par BERNHARD (52). Sur coupes ultrafines deux formes de particules peuvent être distinguées :

- les formes matures souvent sphériques, d'un diamètre de 100 nm possédant une enveloppe externe et un nucléoïde central, dense aux électrons, arrondi, d'un diamètre de 45 nm et entouré d'une fine membrane.
- les formes immatures possédant les mêmes caractéristiques mais un centre clair.

En coloration négative, par suite d'artéfacts, ils présentent une forme pédiculée caractéristique (NERMUT et coll (53)).

* Voir aussi les revues générales de ANON.(54) et BOIRON (55).

Ces virions sont libérés par bourgeonnement à la surface de la cellule productrice. La membrane externe est d'origine cellulaire.

B. Classification :

Les rétrovirus murins peuvent être classés en trois grands groupes : les virus leucémogènes, les virus sarcomatogènes et les virus endogènes.

Les virus leucémogènes sont classés en deux sous-groupes sérologiques :

- le sous-groupe Gross-AKR. Tous les virus leucémogènes naturels présentent cette antigénicité.
- le sous-groupe Friend-Moloney-Rauscher. Les isolats expérimentaux présentent cette antigénicité.

Les virus sarcomatogènes sont des virus défectifs pour la production de progéniture virale infectieuse. Les virus leucémogènes peuvent servir d'auxilliaires pour permettre la production de pseudotypes de virus sarcomatogènes. Ainsi la formation de foyers de transformation sur fibroblastes embryonnaires de souris requiert toujours une double-infection par un virus sarcomatogène et un virus leucémogène.

Les virus endogènes, aussi appelés virus cryptiques, résultent de l'expression soit induite (par des pyrimidines halogénées ou des hormones stéroïdes par exemple) soit spontanée de l'information génétique de virus à RNA, information qui est contenue dans le génome de certaines souches de souris. Trois classes de virus endogènes ont été décrites : la classification est fondée sur le tropisme (voir plus loin) et l'activité biologique de ces virus (STEPHENSON et coll (56)). Des virus endogènes sont certainement activés lors du développement de certaines tumeurs chez des souches de souris. Le régulation de leur expression est donc très intéressante à étudier.

Enfin, les rétrovirus murins sont caractérisés par leur tropisme, c'est-à-dire leur spécificité d'hôte. Les souches de souris peuvent être classées en deux grandes familles : les souches N, apparentées à la souris NIH, et les souches B, apparentées à la souris Balb/c (pour une classification voir GISSELBRECHT et LEVY (57)). Suivant que les rétrovirus se multiplient exclusivement dans leur espèce d'origine ou dans des espèces étrangères ils sont dits écotropiques ou xénotropiques. Les virus écotropiques peuvent à leur tour être classés en trois catégories : les virus N-tropiques infectant préférentiellement les souches de souris ou les fibroblastes de souris apparentées à la souris NIH, les virus B-tropiques infectant préférentiellement les souches de souris ou les fibroblastes de souris apparentées à la souris Balb/c et les virus NB-tropiques qui infectent les deux souches (HARTLEY et coll(58) et OIE et coll (59)).

II. - Caractéristiques biochimiques des rétrovirus de souris.

Du point de vue biochimique, les rétrovirus peuvent être considérés comme des ribonucléoprotéïnes enveloppées composées de 60 à 70p100 de protéïnes, 20 à 30p100 de lipides, 2p100 de sucres et environ 1p100 de RNA (BEARD (60)). Nous allons, dans les paragraphes suivants, préciser le détail et la localisation de ces divers constituants.

A. Organisation générale et polypeptides de structur

Un schéma général de l'organisation d'un rétrovirus est présenté sur la figure 1. L'analyse en gel de polyacrylamide dissociant des protéïnes de structure du virion a permis de mettre en évidence 7 constituants majeurs :

- 2 glycoprotéïnes : l'une de masse moléculaire 69-71000 dalton désignée gp 69/71 et l'autre de masse moléculaire 45000 daltons désignée gp 45.
- 5 polypeptides de masse moléculaire : 30000, 15000, 12000 et 10000 daltons désignés respectivement : p30, p15 (E),p15(C) p12 et p10.

Leur localisation a été précisée selon un protocole résumé dans la figure 1. STROMBERG (61) a montré que l'action du Stérox SL (un détergent non ionique) sur les rétrovirus murins permettait de séparer l'enveloppe externe du noyau viral, donc de "décaper" les virus. Le noyau peut à son tour être rompu grâce à un traitement supplémentaire au Stérox SL et à 30 cycles de congélations-décongélations, en un système membranaire interne et un nucléoïde ribonucléoprotéique. Comme chaque constituant possède une densité apparente bien caractéristique lors d'une ultracentrifugation à l'équilibre en gradient de densité de saccharose (ρ = 1,1 pour l'enveloppe externe, ρ = 1,16 pour la particule virale intacte, ρ = 1,23-1,26 pour le noyau et $\rho > 1,3$ pour le nucléoïde), il est relativement aisé d'obtenir ces fractions purifiées, d'analyser leur composition en polypeptides sur gel de polyacrylamide dissociant et ainsi de préciser la localisation de ces divers polypeptides.

1. - Les glycoprotéïnes:

La localisation de la glycoprotéïne gp 69/71 a été assez difficile à préciser étant donné la fragilité de l'enveloppe externe. Une seule congélation d'un stock viral avant une purification des particules par centrifugation à l'équilibre peut faire perdre jusqu'à 98p100 de la glycoprotéïne gp 69/71. Ainsi, elle peut être facilement isolée de surnageants de congélation d'un stock viral (STRAND et AUGUST (62)). Elle a été localisée dans les spicules de l'enveloppe virale qui sont les parties les plus fragiles de la capside.

La glycoprotéïne gp 45 semble se présenter sous forme agrégée. Elle est très difficile à dissocier même en présence de SDS. Les premières études laissaient penser qu'une glycoprotéïne de masse moléculaire 100 000 daltons existait. En fait, il s'agissait d'agrégats de gp45. La gp45 peut être précipitée par un sérum de souris dénommé $C_6B_3F_1$ (sérum

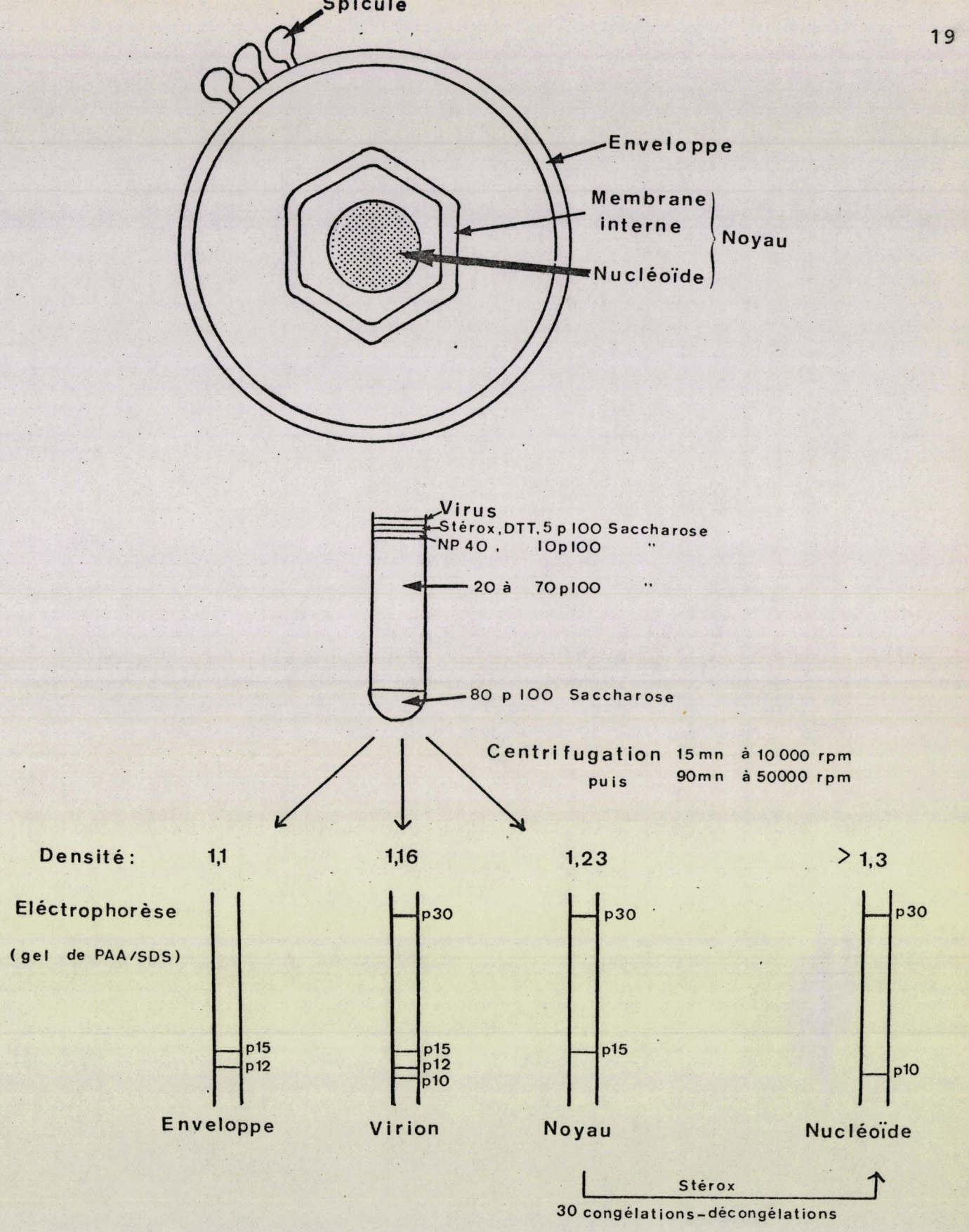


Figure 1. Structure générale d'un rétrovirus murin.
Technique employée pour localiser les polypeptides de structure (LEVY (63)).

autoimmun d'hybride (C_{57}bl/6 x C_3H/An)F_1) obtenu par IHLE et coll (64).

2. - Les polypeptides p30, p15, p12 et p10 :

La protéïne p30 est le constituant protéïque majeur des rétrovirus. Elle possède de multiples déterminants antigéniques. Elle est localisée dans l'enveloppe du nucléoïde.

La protéïne p15 correspond en fait à deux espèces : une localisée dans l'enveloppe du nucléoïde et une localisée dans l'enveloppe externe. On les désigne respectivement p15(c) et p15(E) (IKEDA et coll (65)).

La protéïne p12 est très révélable par action du chlorure de dansyl même sur un virus intact. Cependant, elle n'est pas iodinable in-situ par la technique à la lactoperoxydase. Elle serait donc localisée sur le feuillet interne de la membrane externe.

La protéïne p10 est très basique, très riche en arginine. Elle est associée au RNA viral.

3. - Structure primaire et antigénicité des protéïnes de structure :

Des études de séquence (OROZLAN et coll (66)) et des comparaisons de cartes peptidiques obtenues par hydrolyse trypsique de la protéïne p30 (BUCHHAGEN et coll (67)) ont permis de montrer que la structure primaire de cette protéïne est très conservative parmi les rétrovirus murins étudiés. Sa séquence NH_2-terminale est Pro - Leu - Arg ....

La protéïne p10 montre aussi de telles homologies de séquence parmi les divers rétrovirus étudiés ; par contre, les protéïnes p15 et p12 sont très différentes d'un virus à l'autre (BUCHHAGEN et coll (68)). Voir aussi BARBACID et coll (69)).

Enfin, les spécificités antigéniques portées par les protéïnes de structure des rétrovirus sont résumées dans le tableau IV.

4. - Les lipides :

Ils sont localisés dans la membrane externe qui provient elle-même de la membrane cellulaire. QUIGLY et coll (70) ont analysés les phospholipides du virus du sarcome de Rous (rétrovirus aviaire). Ils décrivent une composition de 33p100 en phosphatidyléthanolamine, 20p100 en phosphatidylcholine, 29p100 en sphingomyéline, 12p100 du mélange phosphatidylsérine et phosphatidylinositol et 4p100 en divers.

B. Les RNA viraux :

L'analyse en gel composite de polyacrylamide-agarose des RNA extraits de rétrovirus montre l'existence de plusieurs espèces : un RNA de haute masse moléculaire constituant le génome viral et des espèces légères. Leur localisation a pu être précisée comme pour les protéïnes par la technique d'isolement des "cores". D'autre part, des espèces 18 et 28 S vraisemblablement ribosomales, emportées lors du processus de bourgeonnement à la surface cellulaire sont parfois mises en évidence.

1. - Les espèces légères :

Des RNA de constante de sédimentation 8 S et 4 S ont été décrits dans les rétrovirus murins (LARSEN et coll(71)) Ces espèces sont localisées dans les coques virales. Le RNA 4 S est du type RNA de transfert. Le RNA 8 S est composé de deux sous-espèces appelées 8 S_A et 8 S_B . Le RNA 8 S représente 4 à 5p100 du RNA total extrait de particules virales intégres. Les espèces 8 S_A et 8 S_B représentent respectivement 75 et 25p100 du RNA 8 S total. Les RNA 8 S_A et 8 S_B sont en fait des isomères conformationnels d'un seul RNA dont

Tableau IV

Spécificités antigéniques portées par les protéïnes de structure des rétrovirus murins (d'après LEVY (72))

Protéine	Antigénicité		
	Type	Groupe	Interespèce
gp 69/71	+++ (45*)	+++ (45*)	+
gp 45	?	+?	?
p 30	+	+++ (60*) (a)	++ (b)
p 15(E)	±	+++	++
p 15(C)	+++	±	+
p 12	+++ (70*)	+ (30*)	0
p 10	0	+++	0

(*) Pourcentage de l'activité antigénique.

(a) Correspond à l'activité gs 1.

(b) Correspond à l'activité gs 3.

l'origine est vraisemblablement cellulaire (LARSEN et coll(73)).

2. - Le RNA génomique viral :

Le RNA de haut poids moléculaire des rétrovirus murins de constante de sédimentation 60-70 S comporte une séquence polyadénylée (GILLESPIE et coll (74)). Il peut être dissocié en sous-unités de 30-35 S par dénaturation thermique ou par action de certains agents dénaturants comme le diméthylsulfoxyde (BADER et STECK (75), DUESBERG (76)). Dans ces conditions, un RNA 4S apparenté aux tRNA et capable d'accepter la proline est libéré du génome des rétrovirus murins (WATERS (77), ERIKSON et ERIKSON (78)) ; son rôle est discuté plus loin. Un RNA 8S semble également être associé au RNA génomique (EMANOIL-RAVICOVITCH et coll (79)).

Le nombre de sous-unités constituant le génome des rétrovirus a été très longtemps contreversé. Les dernières études en microscopie électronique de KUNG et coll (80) sur un virus de chat, le RD 114 et de DUBE et coll sur le virus de la leucémie de Friend (81) montrent qu'il est constitué de deux sous-unités dont l'organisation est donnée dans la figure 2. Les deux sous-unités comportant environ 10 000 nucléotides sont liées entre elles à leur extrémité 5'-phosphate par une structure de liaison dimérique. Cette structure en " oreille de lapin " est très riche en appariements G-C (63p100 d'après les conditions requises pour sa dénaturation) chez le RD-114, elle serait un peu moins riche en de tels appariements chez le virus de Friend. Plusieurs hypothèses ont été émises quant à la structure précise de cette zone de liaison dimérique, elles sont résumées dans la figure 2. Une structure en boucle est visible vers le milieu de la molécule. Le segment polyadénylé, comportant environ 200 résidus d'acide adénylique, est localisé à l'extrémité 3'-OH de chaque sous-unité (MOLLOY et coll (82)). Les deux sous-unités sont identiques, le génome

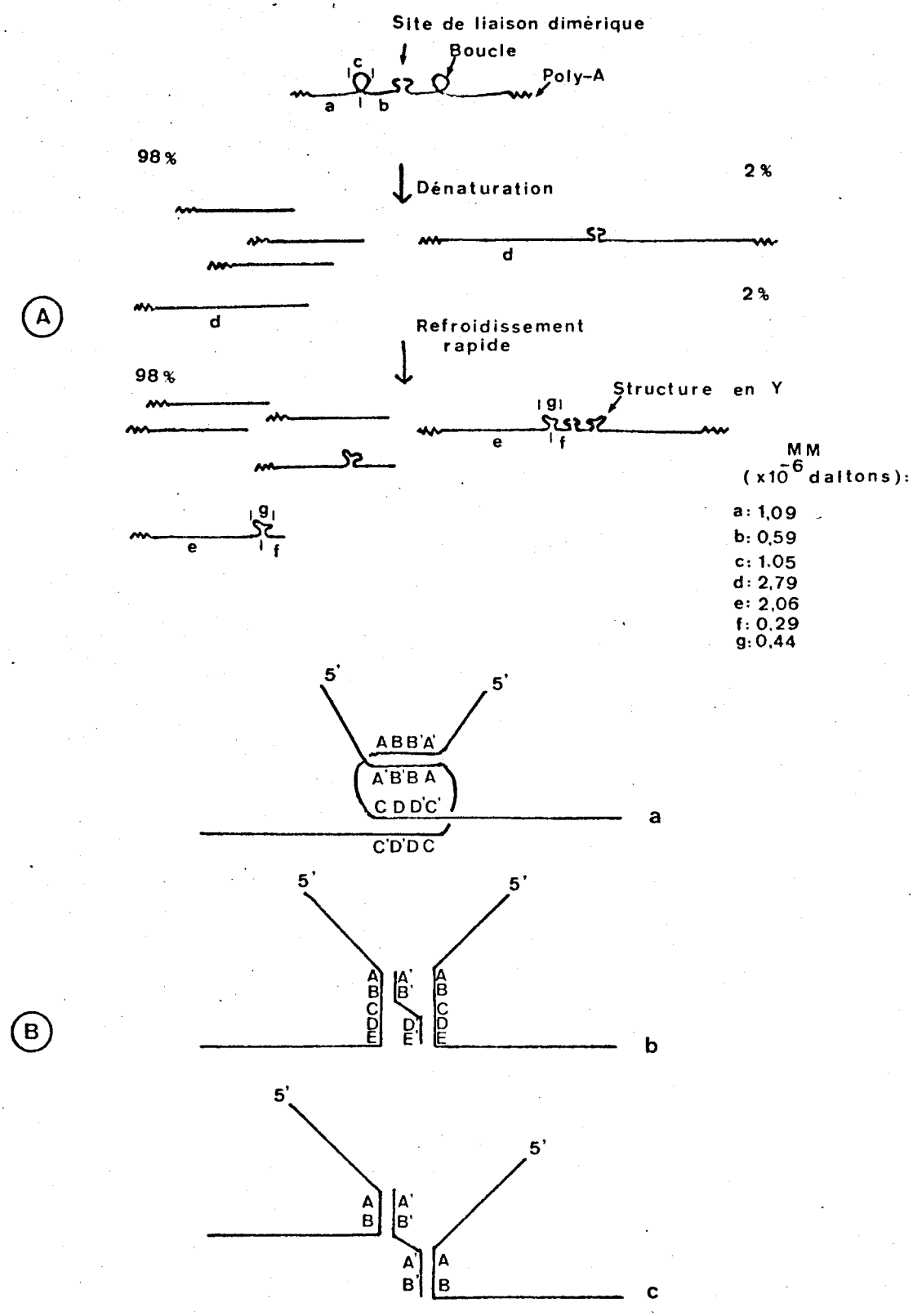


Figure 2. Structure du génome des rétrovirus.

A. Structure et interconversion du RNA génomique du virus RD-114 (d'après KUNG et coll (83)). Les masses moléculaires sont déterminées par des mesures de longueur de molécule en microscopie électronique.

B. Structure possible du site de liaison dimérique. En b et c il y a intervension d'un petit RNA pour assurer la liaison. Les lettres A-E indiquent des séquences de base, les lettres primes indiquent les séquences complémentaires (d'après KUNG et coll (84)).

est donc polyploïde.

Enfin, les extrémités 5'-phosphate sont du type "cap" présentant une séquence m^7G^5 ppp5' GmCp——— comme celle décrite dans les RNA messagers (SHATKIN (85)).

C. La transcriptase-inverse :

1. - Propriétés de l'enzyme :

En 1970, TEMIN et MIZUTANI (86) et BALTIMORE (87) ont mis en évidence une activité DNA polymérasique-RNA dépendante chez les rétrovirus. Cette enzyme encore appelée reverse-transcriptase ou transcriptase-inverse est une déoxynucléoside triphosphate-DNA déoxynucléotidyltransférase (E.C.-2.7.7.7.). Ses propriétés sont les suivantes :

1) Elle demande un initiateur préexistant sur lequel la synthèse de DNA commence.
2) Elle copie des matrices DNA et RNA.
3) Elle copie des ribohomopolymères avec des initiateurs déoxyribopolymériques. Le modèle le plus spécifique étant le poly (rC)-oligo (dG).
4) Elle est distincte de toutes les enzymes trouvées jusqu'à ce jour dans les cellules normales.
5) Elle se présente comme une nouvelle enzyme dans les cellules infectées.
6) Elle est codée par le génome viral.
7) Elle est nécessaire seulement juste après l'infection.
8) Elle est localisée dans le noyau de la particule virale.

La transcriptase-inverse des rétrovirus murins est constituée d'une chaîne polypeptique de masse moléculaire 70 à 80000 daltons et portant une activité antigénique particulière (GOMARD et LEVY (88)). Une activité ribonucléase H a été décrite associée à la transcriptase-inverse du virus de la myéloblastose aviaire ; en ce qui concerne l'enzyme isolée à partir de virus murins, la question est très contreversée : pour certains auteurs (WANG et DUESBERG (89), OLOFSSON et

coll (90), WU et coll (91)).cette activité n'est pas liée à l'enzyme purifiée ; pour d'autres auteurs (GRANDGENETT et coll (92), MOELLING (93), WEIMANN et coll (94), VERMA (95) cette activité est liée à l'enzyme purifiée.

Dans des systèmes acellulaires, la transcriptase inverse peut :
-soit synthétiser des homopolydéoxynucléotides sur des matrices synthétiques tels le poly (rA)-oligo(dT) ou le poly (rC)-oligo(dG), c'est l'activité exogène de l'enzyme.
- soit synthétiser un DNA complémentaire d'un génome viral après perméabilisation d'un virus par les détergents dans un milieu réactionnel approprié, c'est l'activité endogène de l'enzyme.

Dans la réaction endogène, le DNA complémentaire du RNA génomique viral est souvent synthétisé sous forme de petits fragments de 6 à 10 S de constante de sédimentation, ces fragments sont cependant réprésentatifs de la totalité des séquences génomiques virales (voir par exemple TAVITIAN et coll (96)). Pour obtenir des copies complètes du génome sous forme d'une seule longue chaîne polydésoxyribonucléotidique, il faut travailler à haute concentration en désoxynucléosides triphosphates (ROTHENBERG et BALTIMORE (97)).

L'activité DNA polymérasique-DNA dépendante de la transcriptase inverse peut-être inhibée par l'actinomycine D (Mc DONNELL et coll (98)). Cette propriété de la drogue a été utilisée pour obtenir des copies monocaténaires des génomes viraux. Il n'est cependant pas toujours nécessaire d'utiliser cet artifice pour former des DNA monocaténaire complémentaires des génomes viraux (TAVITIAN et coll (99)).

Enfin, de nombreux autres inhibiteurs des transcriptases inverses ont été décrits (voir la revue de SMITH et GALLO (100).

2. - Mécanisme d'action de la transcriptase-inverse :

Le modèle décrit est celui proposé par HASELTINE (101). Il est schématisé figure 3.

Comme toutes les DNA polymérases, la transcriptase-inverse requiert la présence d'une amorce possédant un groupement 3'-hydroxyle-libre : un RNA de transfert, un t-RNA qui accepte la proline pour les rétrovirus murins (WATERS (102)) sert d'amorce à la polymérisation. Le site d'initiation se trouverait à environ 135 nucléotides de l'extrémité gauche du génome. La chaîne néosynthétisée commence par la séquence AATGAA_____ .A l'extrémité 5'phosphate du génome se trouve un fort signal d'arrêt pour la transcription et aux extrémités 5'et 3' se trouvent des séquences subterminales analogues (résidus 65 à 135)

La transcription s'arrête à l'extrémité 5'phosphate, puis l'activité ribonucléase H dégrade le RNA matrice qui vient d'être transcrit et la chaîne néosynthétisée s'hybride avec la séquence complémentaire de l'extrémité 3'hydroxyle soit de la même sous-unité génomique, soit de l'autre sous-unité, et la transcription reprend donnant une seule longue chaîne complémentaire du génome viral. Ceci se produirait in-vitro dans les conditions idéales permettant le franchissement du fort signal d'arrêt de la transcription (conditions de ROTHENBERG et BALTIMORE par exemple(103)).

Il se produit quand même 10 à 20p100 d'initiations secondaires en d'autres sites fournissant des DNA complémentaires composés de petits fragments. C'est ce qui est observé dans les conditions habituelles utilisées dans la réaction de polymérisation endogène.

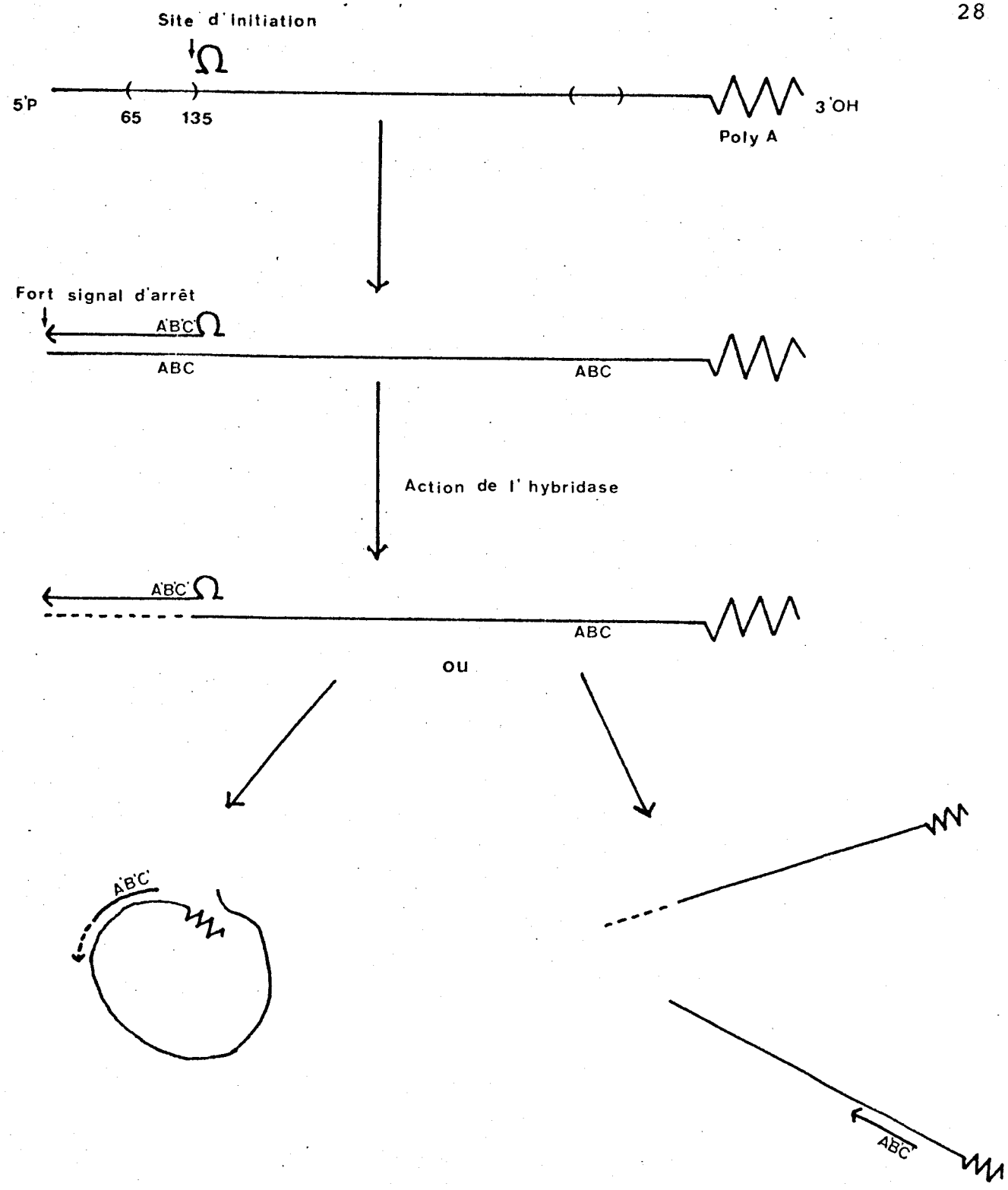


Figure 3. Mécanisme d'action de la transcriptase-inverse d'après HASELTINE (104).

Voir les explications dans le texte.

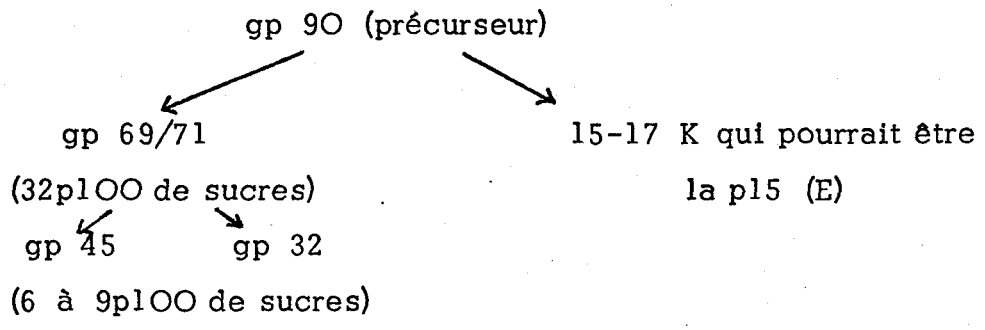
( ) Séquences homologues.

Ω t-RNA servant d'amorce.

Séquence polyadénylique.

Appendice

P 18 Des résultats récents obtenus par KRANTZ, M.J., STRAND, M. and AUGUST, J.T. (J. Virol., (1977), 22, 804-815) permettent de proposer la philogénie suivante pour les glycoprotéines de structure des rétrovirus murins :



P 22 Les glycoprotéines gp 69/71 et gp 32 portent les mêmes déterminants de groupe et de type. La glycoprotéine gp 45 ne possède aucun déterminant inter spécifique et ne possède pas tous les déterminants de groupe des deux glycoprotéines précédentes (même référence que ci-dessus).

P 23 La mise en évidence d'un RNA de haute masse moléculaire chez les rétrovirus murins leucémie de Rauscher est due àGALIBERT, F., CHENAILLE, P., BERNARD, C. and BOIRON, M. (Nature, (1966), 209, 680-682).

P 24 Un modèle plus précis du site de liaison dimérique du génome du virus du sarcome de ROUS a été récemment proposé par HASELTINE, W.A., MAXAM, A.M. and GILBERT, W. (Proc. Nat. Acad. Sci, (1977), 74, 989-993).

P 27 L'identification précise du t-RNA$_{pro}$ comme amorce dans la réaction de transcription inverse endogène a été apportée par PETERS, G., HARADA, F., DAHLBERG, J.E., PANET, A., HASELTINE, W.A., and BALTIMORE, D. (J. Virol, (1977), 21, 1031-1041).

PP 33&112 La modification de la technique de "MOLONEY" que nous avons utilisée est celle décrite par CHENAILLE, P., LEVY, J.P., TAVITIAN, A. and BOIRON, M. (Nature, (1967), 213, 107-108).

R E S U L T A T S

Après avoir décrit une étude critique des procédés d'isolement et de purification des particules virales, nous définirons les caractéristiques biochimiques de celles-ci. Puis, nous montrerons comment la recherche d'une activité biologique de ces particules nous a conduit à étudier le phénomène de polycaryocytose qui se développe dans le test XC ainsi que la modulation de la production des particules virales en fonction des conditions de culture de la cellule MF_2. Enfin, nous décrirons les tentatives de typage de nos particules par des méthodes biologiques et biochimiques.

1. - CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES PARTICULES VIRALES DE TYPE C PRODUITES PAR LA LIGNEE MF_2.

1. Etude critique des procédés de concentration et de purification des particules virales.

Nous avons recherché la méthode de concentration et de purification nous fournissant le meilleur rendement en particules virales intègres.

A. Méthode au polyéthylène-glycol (PEG):

Les premiers essais de purification des particules virales ont été tentés à partir de surnageants de cultures de cellules MF_2 en suspension. Les volumes de milieu à traiter étant très importants, nous avons d'abord procédé à une concentration du virus par la méthode de précipitation au polyéthylène-glycol 6000. Le précipité ainsi obtenu a été resuspendu dans du tampon NTE et deux techniques ont été appliquées pour obtenir une purification plus grande des particules virales : soit la chromatographie ascendante sur colonne de billes de verre calibrées, soit l'ultracentrifugation à l'équilibre en gradient de densité de saccharose.

Un profil d'élution du virus produit par la cellule MF_2 et concentré par précipitation au polyéthylène-glycol est présenté dans la figure 4 A. Le support utilisé est constitué par des billes de verre poreuses et calibrées (Corning,CPG700) de 200 à 400 mesh de diamètre et dont les pores ont un diamètre d'environ 700 Å. A la condition de bien dégazer le support et les tampons et d' introduire dans ces derniers 0,05p100 en poids de P E G 20000 pour éviter les adsorptions à

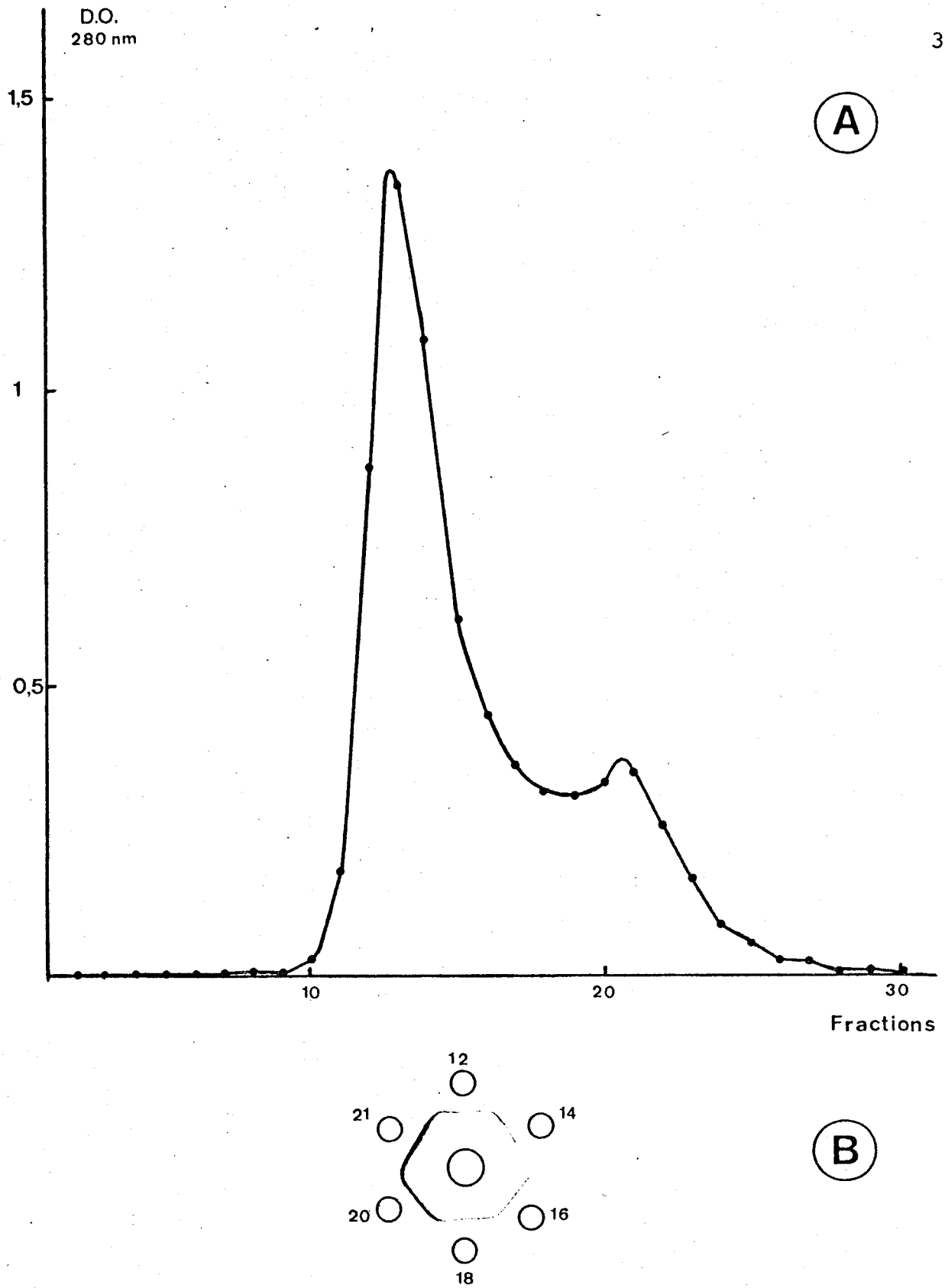


Figure 4. Purification des particules virales concentrées au PEG 6000, par chromatographie ascendante sur colonne de billes de verre CPG 700.

A. Profil d'élution de la colonne. Colonne de 1 x 100 cm. Débit : 100 ml/h. Fractions de 3,5 ml. Tampon : Phosphate de sodium 0,05 M (pH 7,4), NaCl 0,15 M, PEG 20000 0,05p100.

B. Contrôle de pureté des fractions obtenues par immunodiffusion contre un immunsérum de lapin anti-sérum de cheval Les nombres correspondent aux fractions du profil A.

la surface des billes de verre, les profils obtenus sont très corrects et présentent deux pics : le premier exclu renfermant les particules virales et le second composé d'immunoglobulines du sérum de cheval utilisé pour les cultures cellulaires. Ces immunoglobulines sont précipitées par le PEG. Les contrôles de pureté des fractions obtenues (fig. 4B) montrent que les particules virales ainsi isolées sont contaminées par des immunoglobulines. Il est connu que le PEG précipite les immunoglobulines mais il semble que certaines d'entre elles restent agglomérées et soient exclues en même temps que le virus ; une deuxième hypothèse est qu'elles soient adsorbées à la surface des particules virales.

La purification des particules virales, concentrées par le PEG, par la méthode d'ultracentrifugation à l'équilibre en gradient de densité de saccharose a été tentée. Une couche de saccharose à 20p100 dans le tampon NTE a été interposée entre le dépot et le gradient proprement dit pour diminuer au maximum les contaminations par les immunoglobulines. Le résultat d'une telle centrifugation est présenté dans la figure 5C. Le matériel s'équilibrant à une densité de 1,16 g/cm^3 (densité caractéristique des particules virales de type C) représente une très faible partie de la masse protéïque précipitée par le PEG.

B. Méthode dite de "MOLONEY" :

Cette méthode consiste en une simple ultracentrifugation à 100 000g pendant une heure de surnageants de culture clarifiés. Le culot ainsi obtenu renferme les particules virales

Le virus concentré de cette manière a été purifié par ultracentrifugation à l'équilibre dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Une telle expérience est représentée sur la figure 5B. On peut observer qu'il y a beaucoup moins de matériel léger en haut du gradient et un pic de particules virales beaucoup plus important que dans

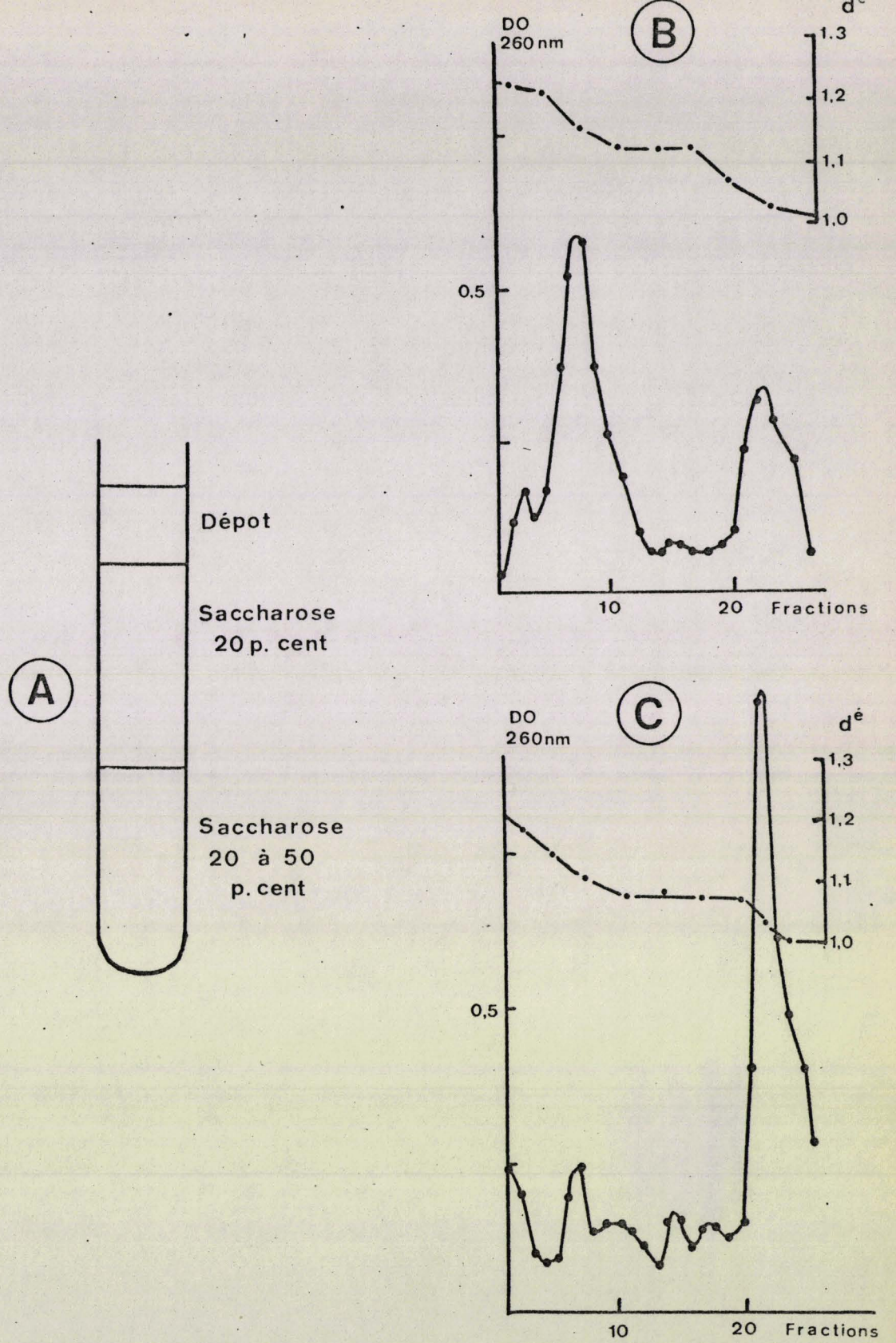


Figure 5. Purification des particules virales par ultracentrifugation à l'équilibre dans un gradient de saccharose.

A. Représentation schématique du gradient utilisé. Les conditions de l'ultracentrifugation sont : Rotor SW 41 (Beckman) 36000 rpm pendant 90 minutes à + 4°C. Fractions de 0,5 ml.

B. Ultracentrifugation d'un culot "Moloney" correspondant à 50 ml de culture.

C. Ultracentrifugation du précipité au PEG d'une culture équivalente.

Les densités optiques sont mesurées après dilution au demi des fractions par du tampon NTE.

l'expérience précédente alors que le matériel déposé sur gradient était obtenu à partir d'un volume de surnageant de culture identique.

Nous avons tenté de quantifier cette différence de rendement en utilisant des particules virales marquées dans leur RNA génomique par de l'uridine tritiée.

C. Comparaison des deux méthodes. Choix de la technique de concentration.

Des cultures cellulaires ont été marquées pendant 16 heures par de l'uridine tritiée (10 µCi/ml de milieu), leurs surnageants ont été mélangés, clarifiés et séparés en deux fractions égales. L'une a été traitée par le PEG, l'autre a été soumise à une ultracentrifugation à 100 000g.

Les particules virales ont alors été purifiées par centrifugation à l'équilibre en gradient de saccharose. La dégradation des particules par le PEG est très importante et des composés de densité apparente assez élevée faisant penser à des noyaux viraux sont présents en proportion relative plus grande que lors de l'ultracentrifugation à l'équilibre de culots "Moloney" (figure 6A et tableau V).

Ainsi, la technique de concentration au PEG, non seulement présente l'inconvénient de précipiter les immunoglobulines sériques en même temps que les particules virales mais en plus semble dégrader les particules virales. Pour ces deux raisons nous avons abandonné cette technique de concentration d'autant plus que les études ultérieures ont été menées en utilisant des traceurs radioactifs. La sensibilité de telles méthodes rendant les volumes de culture à traiter beaucoup moins importants, nous avons adopté la technique dite de "Moloney" pour la purification de nos particules virales.

A titre indicatif, l'ultracentrifugation à l'équilibre

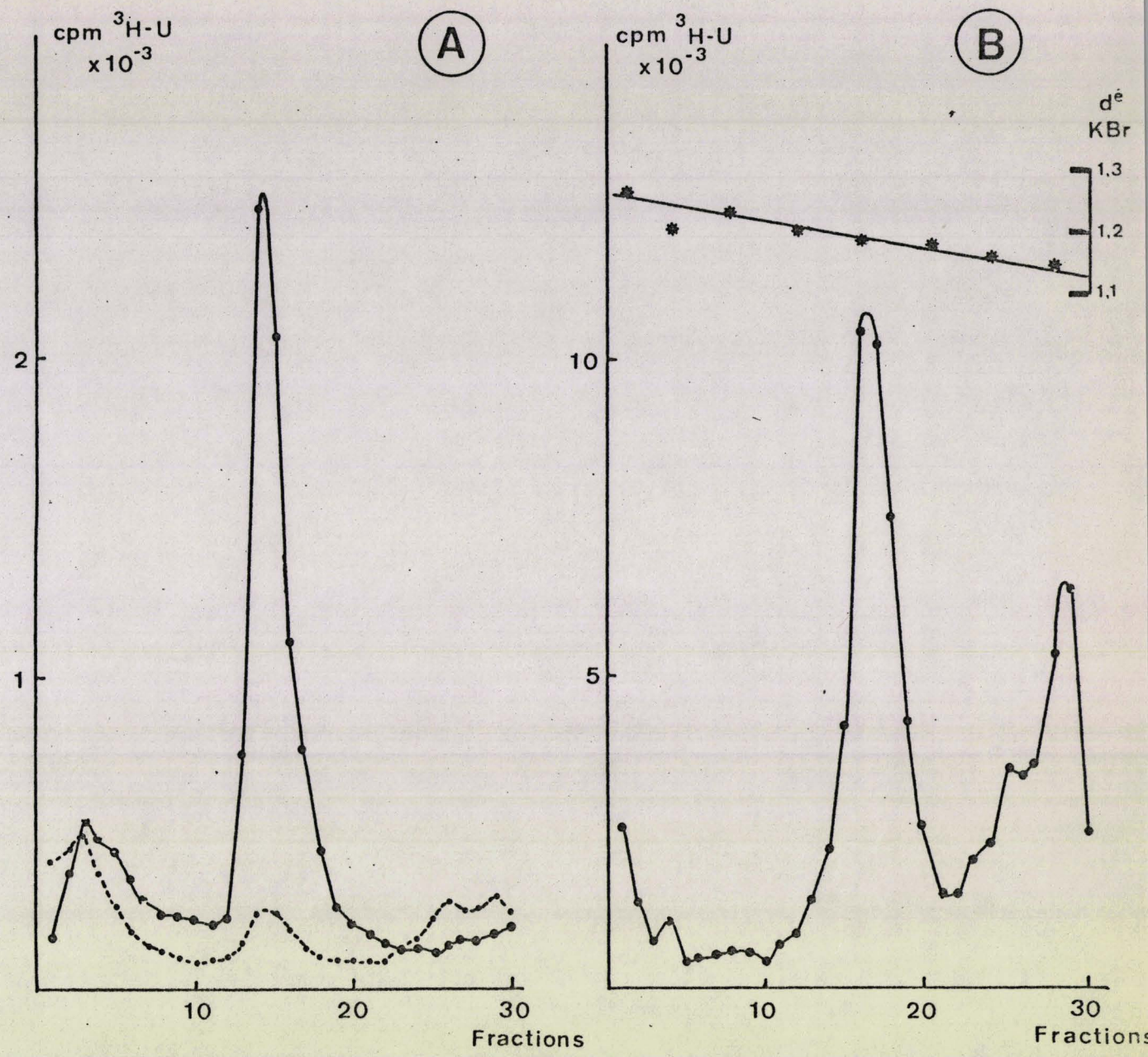


Figure 6. Ultracentrifugation à l'équilibre de particules virales concentrées par la technique de "Moloney".

A. Conditions de centrifugation de la figure 5. Les fractions sont de 0,2 ml et seule la partie linéaire du gradient de densité est représentée. Les particules virales ont été marquées dans leur RNA par de l'uridine tritiée (10 µCi/ml de milieu pendant 40 h) la radioactivité indiquée correspond à la radioactivité insoluble dans le TCA à 10p100.

•——• Virus concentré par la méthode dite "Moloney".

•·····• Virus concentré par le PEG à partir d'un même volume de surnageant de culture.

B. Ultracentrifugation d'un culot "Moloney" à l'équilibre dans un gradient préformé de densité de bromure de potassium. Mêmes conditions de marquage que précédemment. Rotor SW 41, 40000 rpm, 100 mn. Radioactivité insoluble dans le TCA à 10p100.

Tableau V

Comparaison des rendements en particules virales obtenus suivant la méthode de concentration (en pourcentage de la radioactivité totale déposée sur gradient) *

Zone du gradient	Méthode de concentration	
	PEG	"Moloney"
Zone lourde	12,4	16,1
Particules virales	7,4	48,0
Matériel léger	47,4	15,5

* Ces résultats correspondent à des expériences du type de celle décrite dans la figure 6A.

du virus MF_2 en gradient de bromure de potassium (présentée sur la figure 6B) montre une densité apparente des particules de 1,19 g/cm^3.

D. Isolement de noyaux viraux :

Une des propriétés des particules virales de type C est de pouvoir être "décapées" de leur enveloppe externe par l'action de certains détergents. Un noyau viral de densité apparente caractéristique de 1,23 à 1,26 g/cm^3 en gradient de saccharose est alors obtenu (STROMBERG (105)).

L'action du Stérox SL (un alcool aliphatique polyoxyéthylénique, $C_{14-15}O(CH_2CH_2O)_{12}H$) sur nos particules virales nous a permis de préparer de tels noyaux ainsi qu'il est montré sur la figure 7.

II. Mise en évidence d'un RNA de haut poids moléculaire.

Le génome des rétrovirus murins est constitué d'un RNA de haut poids moléculaire ($\simeq 10^7$ daltons, constante de sédimentation : $60 < S < 70$) composé de deux sous-unités de constante de sédimentation 35S. Nous avons entrepris l'isolement de ce RNA génomique viral ainsi que son analyse soit en gradient de densité de saccharose, soit en gel composite de polyacrylamide-agarose. Les résultats de ces expériences sont résumés dans la figure 8.

Le diagramme présenté en A correspond au profil d'ultracentrifugation à l'équilibre des particules virales marquées dans leur RNA par l'adénine tritiée. Les fractions correspondant au sommet de pic ont été rassemblées, diluées et les particules virales concentrées par ultracentrifugation. Après extraction au phénol, à pH acide en présence de SDS, le RNA a été analysé en gradient de sédimentation de saccharose.

Le diagramme d'une telle analyse est représenté en B

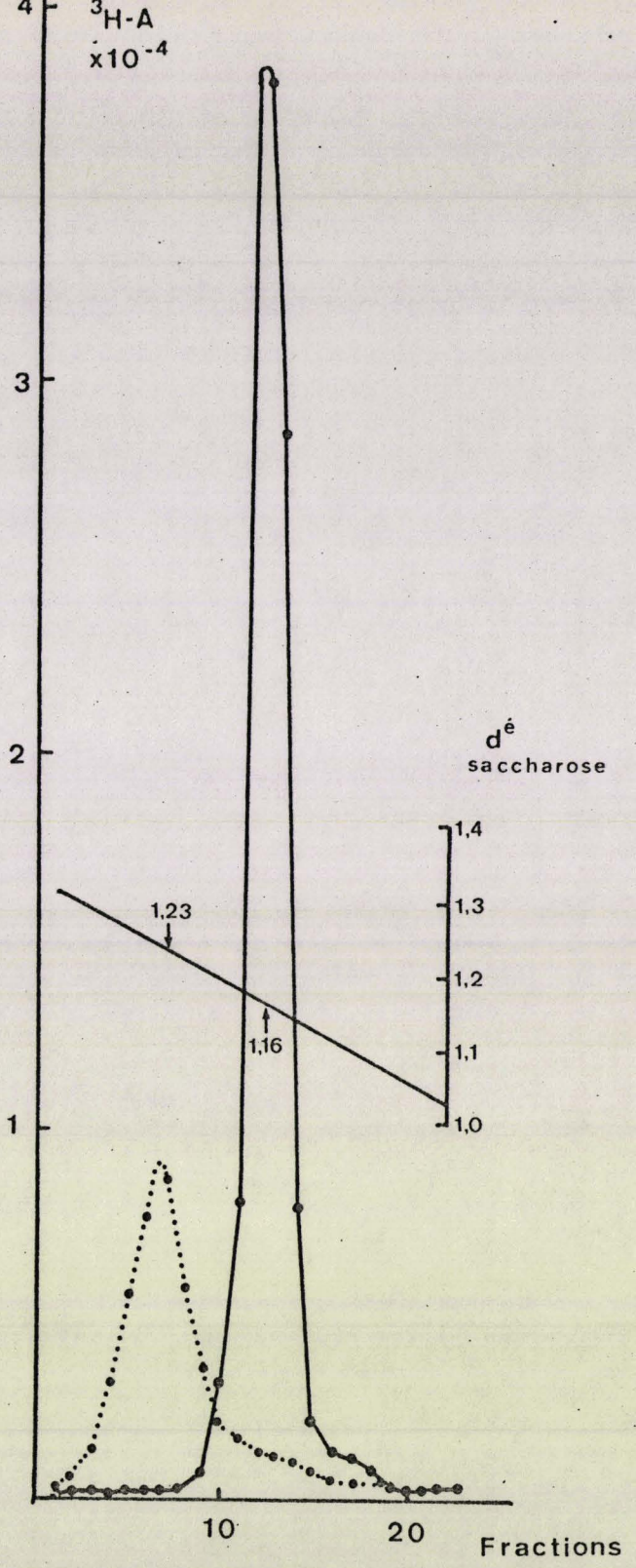


Figure 7. Obtention de noyaux viraux.

Les particules virales ont été marquées pendant 40 h avec de l'adénine tritiée (5 µCi/ml de milieu), concentrées par la technique de "Moloney" et séparées en deux fractions.

- l'une native (●——●)
- l'autre traitée au Stérox SL, 1,5p100 final dans le tampon NTE pendant 10 minutes à 20°C (•·····•)

puis centrifugées dans les mêmes conditions (rotor SW50-1), 45000 rpm, 3 heures à + 4°C. Gradient de 10 à 65p100 en saccharose (p : p) dans le tampon NTE. Fractions de 0,2 ml. Radio activité précipitable par l'acide trichloracétique à 10p100.

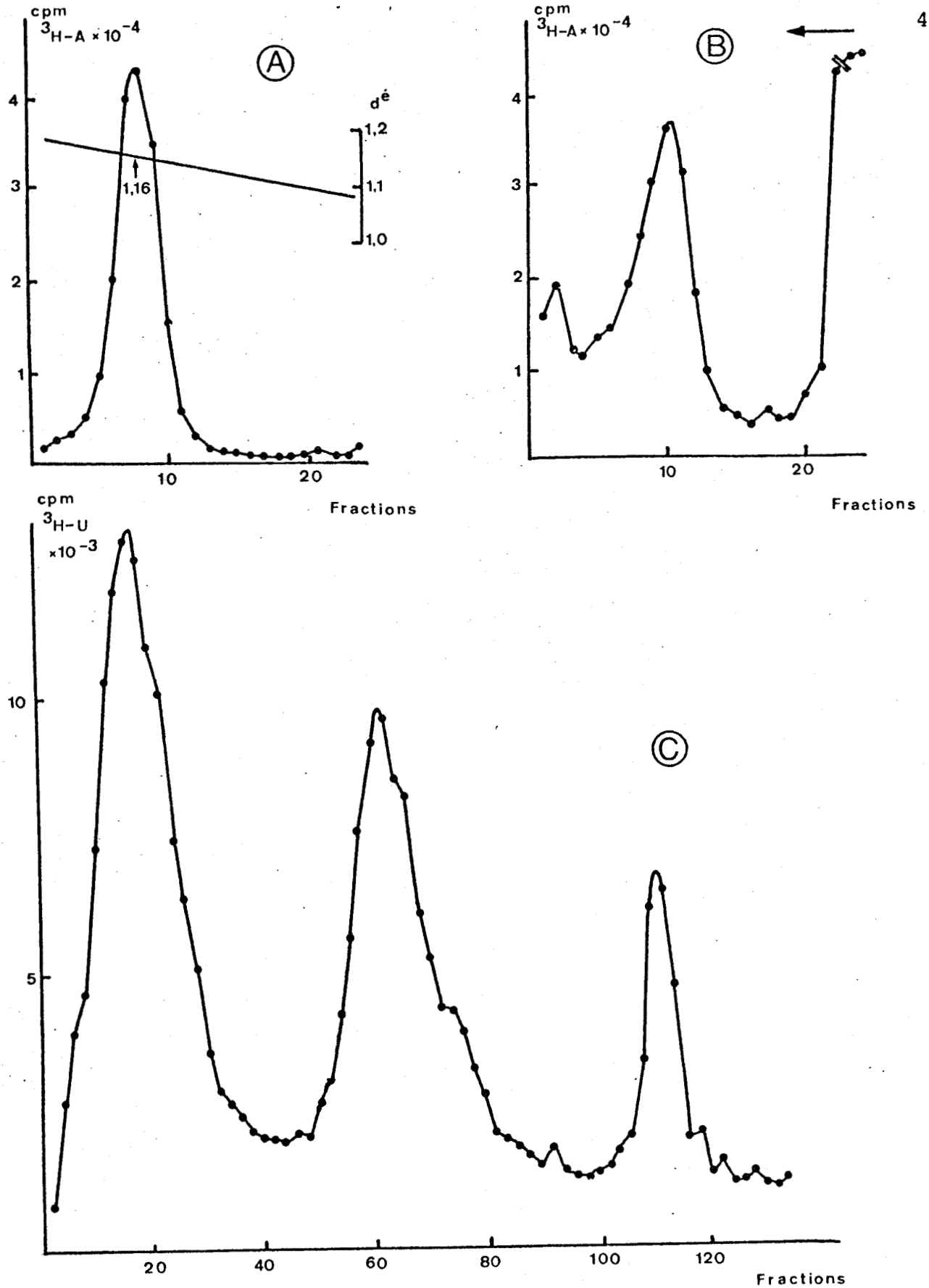


Figure 8. Mise en évidence et analyse des RNA viraux.

A. Profil de centrifugation à l'équilibre des particules virales marquées par l'adénine tritiée.

B. Analyse du RNA extrait des particules en gradient de densité de saccharose. (5 à 20p100 dans de l'acétate de sodium 0,01 M pH 5,2, DTT 2x10-3. Rotor SW41, 40000 rpm, 100 minutes. Fractions 0,5 ml. Radioactivité totale.

C. Analyse en gel de polyacrylamide DATD-agarose (1,7-0,5p100 respectivement) du RNA extrait de particules virales par dissociation pendant 15mn à 37°C dans du SDS 1p100. Conditions de TIOLLAIS et coll (106). Gel de 25cm. Fractions de 2mm. Elution par HIO_4, 2p100.

Un pic de RNA lourd est visible, sa position coïncide avec celle du RNA génomique extrait du complexe leucémie-sarcome de Moloney extrait et analysé dans les mêmes conditions (non représenté). Des espèces légères sont également présentes.

Afin d'obtenir une meilleure résolution des diverses espèces de RNA présentes dans nos particules, des cultures ont été marquées pendant 16 heures à l'uridine tritiée et les particules virales isolées à partir de ces cultures ont été soumises à l'action du SDS. Le lysat a été déposé et analysé sur un gel composite d'acrylamide-agarose (acrylamide : 1,7p100 agarose 0,5p100) en milieu dissociant. Nous avons remplacé la bisacrylamide par de la diéthyéltartardiamide pour former des gels dont la structure soit plus lâche et qui soient solubilisables dans l'acide periodique, l'élution du RNA est ainsi facilitée (ANKER (107), BOULANGER et WAROCQUIER (108)). Le profil de migration obtenu est présenté en C. On peut distinguer du RNA génomique intègre (43,4p100 de la radioactivité), des sous-unités 35S qui peuvent provenir soit d'une dégradation des génomes viraux lors du chauffage en présence de SDS, soit de RNA extraits de particules immatures (elles représentent 33,6p100 de la radioactivité) et des espèces légères 4 à 10S qui ne sont pas résolues dans ce système et représentent 8,9p100 de la radioactivité.

Ainsi, en ce qui concerne leur composition en RNA, nos particules virales ne se distinguent pas des autres rétrovirus murins.

III. Mise en évidence et analyse des protéïnes de structure.

L'analyse des polypeptides de structure de nos particules virales a été réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide dissociant de particules virales purifiées, marquées à la leucine tritiée dans leurs protéïnes et rompues

par traitemant au SDS à chaud. L'autoradiographie d'un tel gel est reproduite figure 9. Des marqueurs, de masse moléculaire connue , constitués par les polypeptides de structure de l'adénovirus type 2 ont été analysés sur le même gel.

On distingue très bien la glycoprotéïne gp 69/71 et la protéïne p30. Les polypeptides p15 et p12 sont également bien visibles. Par contre, il faut remarquer une faible teneur en glycoprotéïne gp 45 et en polypeptide p10.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence les 6 polypeptides structuraux caractéristiques des rétrovirus murins dans nos particules virales.

IV. Mise en évidence et étude de l'activité de transcriptase-inverse des particules virales de type C produites par la lignée MF_2.

Les rétrovirus ont la propriété de pouvoir synthétiser un DNA complémentaire (cDNA) de leur RNA génomique grâce à une enzyme appelée reverse-transcriptase ou transcriptase-inverse. Nous avons pu mettre en évidence cette activité dans nos particules et nous l'avons utilisée pour synthétiser un cDNA dont nous avons par la suite défini les caractéristiques.

A. Mise en évidence d'une activité de transcriptase-inverse endogène :

Des particules virales concentrées par précipitation au sulfate d'ammonium et purifiées selon la méthode décrite page 113 ont été incubées dans le mélange réactionnel décrit page 121. Il est à remarquer que ce mélange ne contient pas d'actinomycine D. Dans ces conditions, le RNA génomique viral sert de matrice pour la synthèse du cDNA. Cette synthèse est suivie par l'incorporation de désoxythymidine triphosphate tritiée dans des polymères insolubles dans l'acide trichloracétique à 10p100.

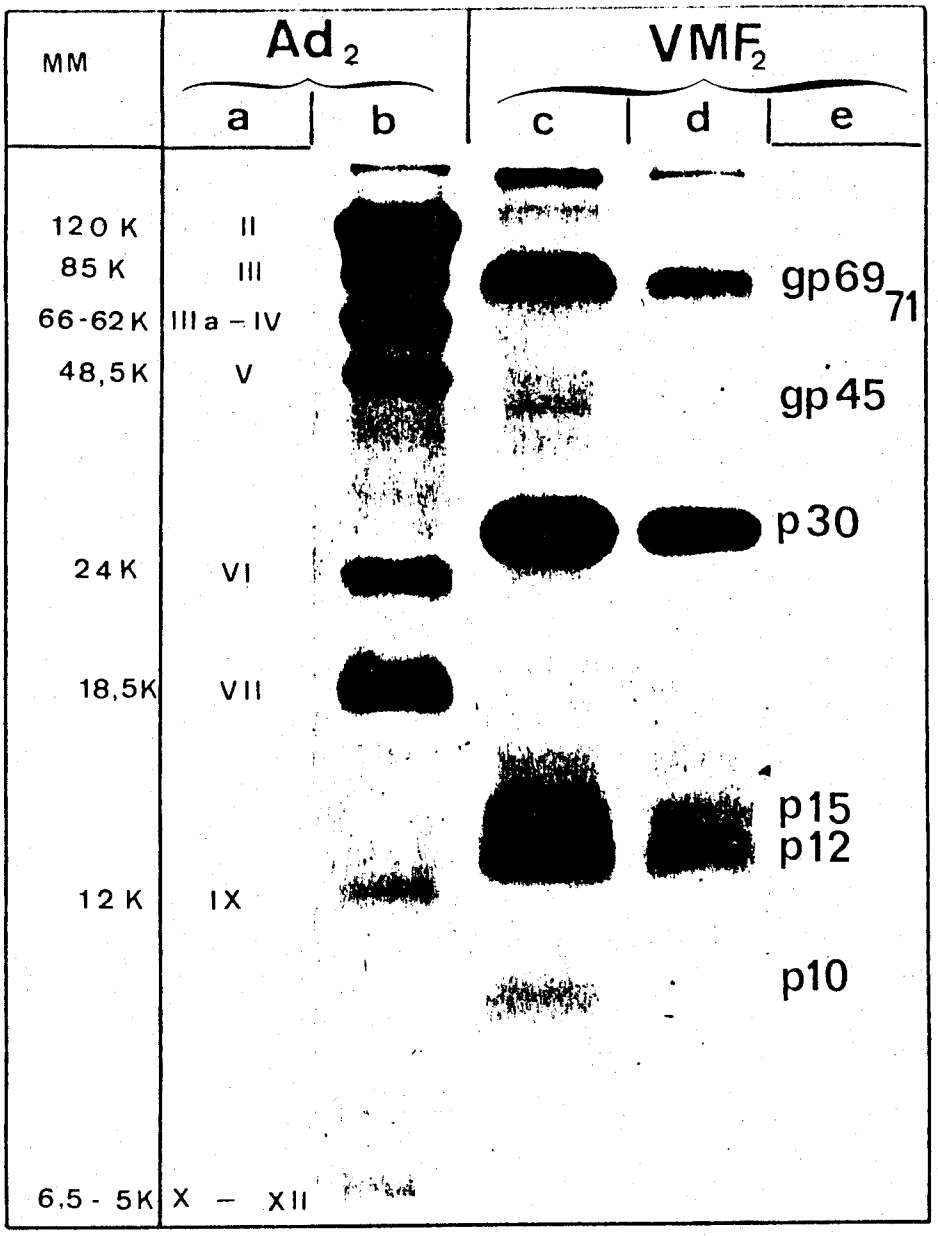


Figure 9. Analyse en gel de polyacrylamide dissociant des polypeptides de structure des particules virales produites par la cellule MF_2

a) Désignation des polypeptides de structure de l'adénovirus type 2 utilisés comme marqueurs (nomenclature d'ANDERSON et coll (109)).

b) Autoradiographie de la migration des polypeptides de l'adénovirus type 2 marqués par la valine tritiée.

c et d) Autoradiographie de la migration des polypeptides de structure de nos particules virales (la piste c correspond à un dépôt double de celui effectué en d).

e) Désignation des polypeptides de nos particules.

Le gel de résolution a une concentration de 17,5p100 en acrylamide et renferme 0,1p100 de SDS. La migration a lieu pendant 15 heures sous une différence de potentiel de 4 V/cm dans le tampon Tris-Glycocolle-SDS de LAEMLLI (110). Fluorographie après traitement par le P P O (BONNER et LASKEY (111)).

Une cinétique d'incorporation de désoxythymidine tritiée est présentée figure 10. La courbe d'incorporation obtenue est semblable à la cinétique que présentent des particules du complexe leucémie-sarcome de Moloney (produites par la lignée $78A_1$) incubées dans les mêmes conditions. L'activité de transcriptase-inverse endogène de nos particules a toujours été plus basse que celle observée avec le complexe leucémie-sarcome de Moloney.

B. Synthèse et caractérisation d'un cDNA :

Nous avons mis à profit l'activité transcriptasique endogène très élevée (> 2pM de TMP incorporées par µg de protéïnes virales) de certains lots de virus pour synthétiser des cDNA, à haute activité spécifique (> 6500 cpm/pM), du RNA génomique de nos particules. Ces cDNA ont été utilisés comme sonde dans certaines de nos études ultérieures.

Pour être considérés comme des sondes valables, nos cDNA devaient répondre à trois critères :
1. être formés d'une chaîne polydésoxyribonucléotidique monocaténaire.
2. être suffisamment longs pour pouvoir s'hybrider avec d'autre acides nucléïques.
3. représenter une copie la plus fidèle et la plus complète possible du génome viral.

1. - Détermination de la structure secondaire du produit de la réaction de polymérisation endogène :

La structure mono ou bicatenaire du produit formé lors de la réaction de polymérisation endogène a été déterminée par adsorption-élution sur hydroxyapatite. Un profil d'élution est présenté dans la figure 11 A.

Le DNA monocaténaire s'élue à une concentration de

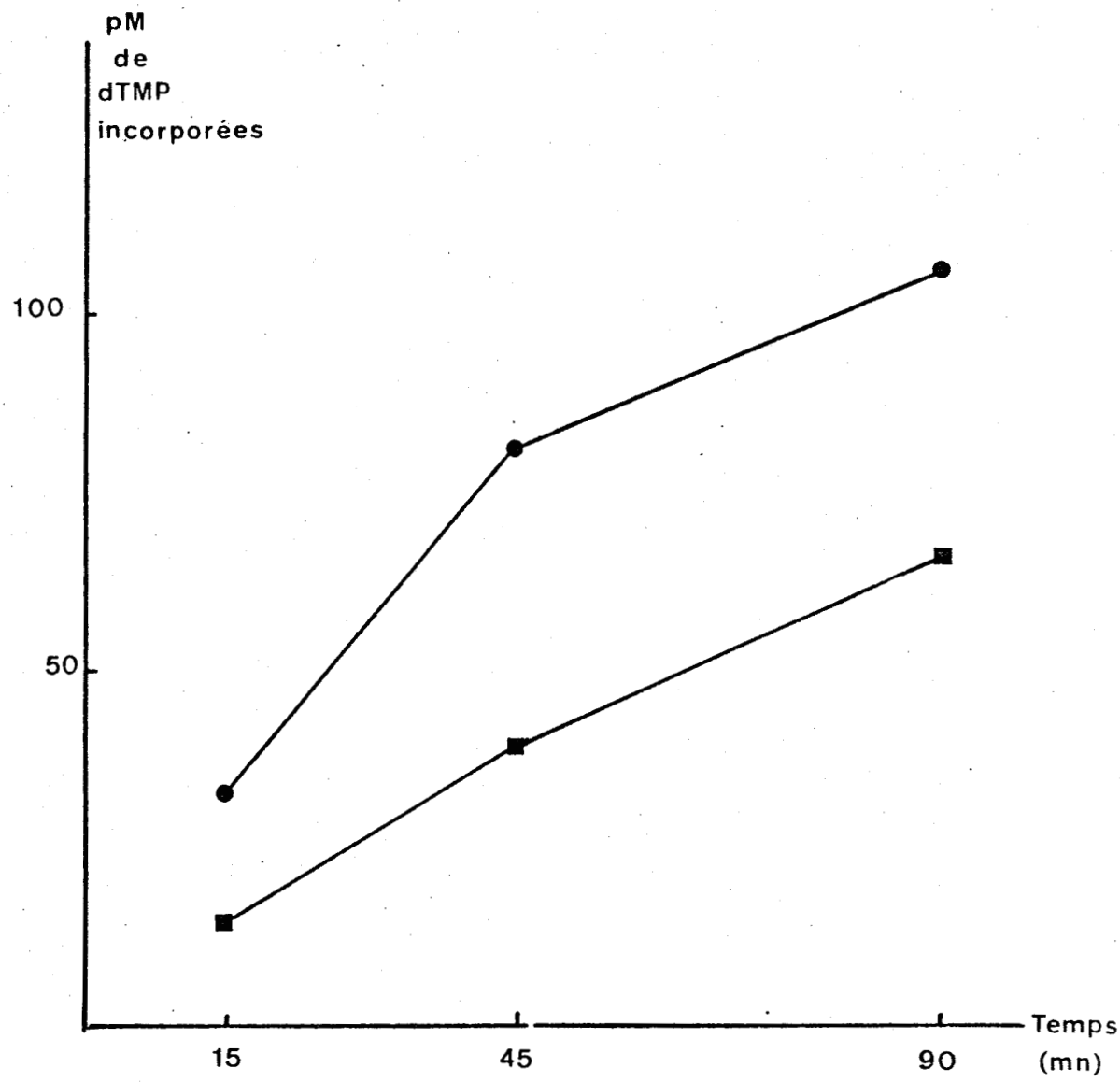


Figure 10. Mise en évidence d'une activité de transcriptase-inverse endogène.

Des particules virales représentant 150 µg de protéïnes ont été incubées dans les conditions décrites par TAVITIAN et coll (112), en l'absence d'actinomycine D, et en présence des 4 désoxyribonucléosides triphosphates dont un, le dTTP est tritié . L'incorporation de thymidine tritiée dans des polymères insolubles dans l'acide trichloracétique est suivie.

■—■ Particules virales produites par la lignée MF_2

●—● Particules virales du complexe leucémie-sarcome de Moloney.

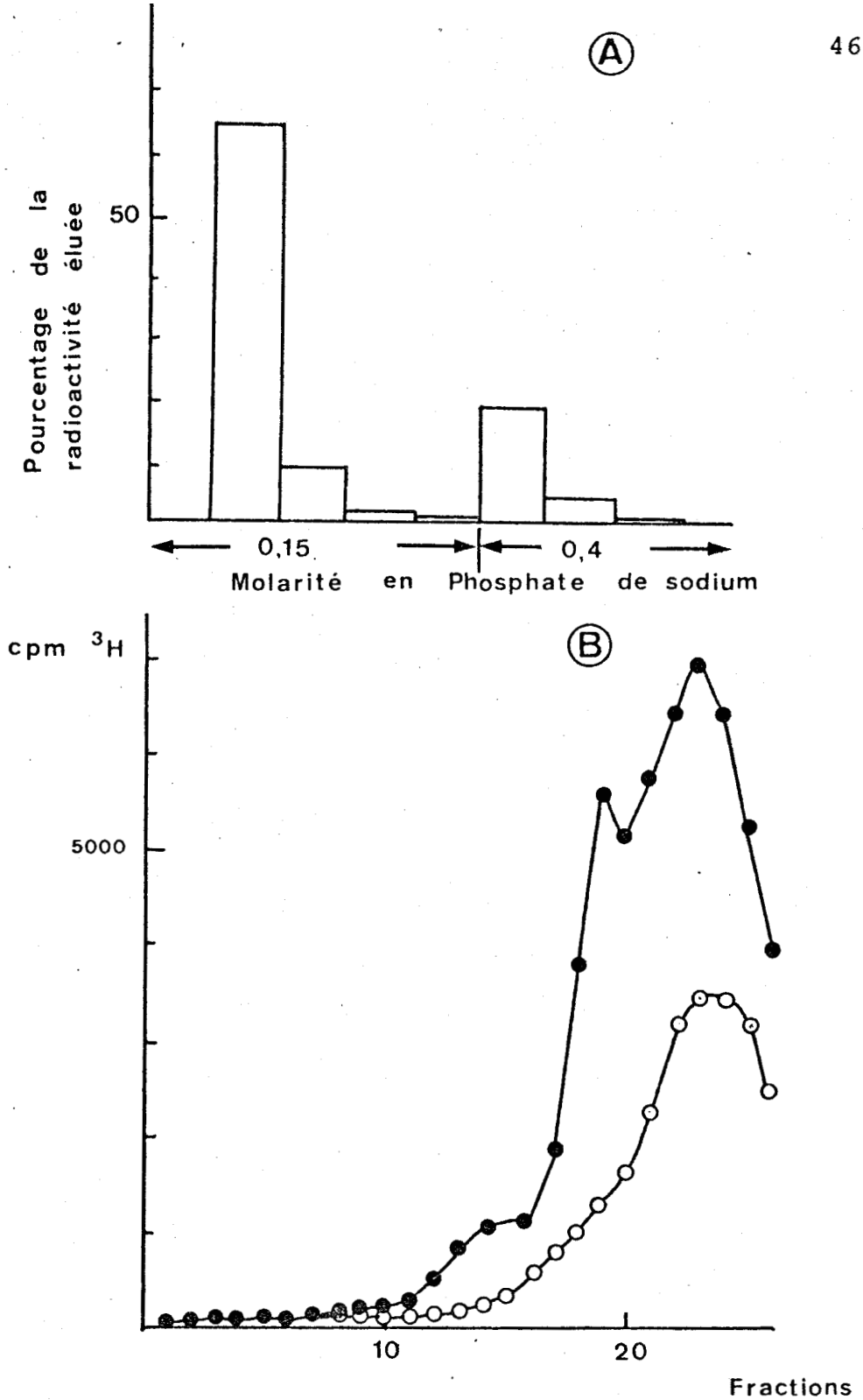


Figure 11. Etude du produit de la réaction endogène.

A. Détermination de la structure secondaire par adsorption sur hydroxyapatite. Toutes les manipulations se déroulent à 68°C. La fixation s'effectue en tampon phosphate 10mM pH 6,8. La radioactivité précipitable à l'acide trichloracétique est déterminé sur des fractions aliquotes.

B. Détermination de la taille des fragments monocaténaires. Cette figure représente le profil d'une centrifugation en gradient de saccharose linéaire de 5 à 20p100 dans un tampon Tris/HCl $1,5 \times 10^{-3}$M pH 7,4. Rotor SW50-1, 33000rpm, 17 heures. Fractions 0,2ml. Radioactivité TCA précipitable. ●—● : ^{3}H cDNA. o—o ^{3}H tRNA (4S) centrifugé dans le même rotor comme marqueur.

0,15 M en phosphate de sodium et représente 78p100 du produit de la réaction. De plus, 45p100 du produit qui s'élue à 0,4 M en phosphate de sodium est sensible à l'action de la nucléase S-1, cette fraction doit être formée de molécules possédant des structures telles que des épingles à cheveux.

Le cDNA est donc composé à 90p100 de chaînes monocaténaires bien que le mélange réactionnel ne contienne pas d'actinomycine D.

2. - Détermination de la taille du cDNA monocaténaire synthétisé :

La taille des fragments monocatenaires synthétisés a été évaluée par la mesure de la vitesse de sédimentation dans un gradient de saccharose (figure 11B). Cette taille est comprise entre 4 et 8S pour la majorité des chaînes synthétisées. Elles représentent donc des enchaînements composés de 80 à 400nucléotides. Ces fragments sont donc tout à fait capables de s'hybrider à d'autres acides nucléïques.

3. - Détermination de l'étendue de la transcription du génome viral :

L'étendue de la transcription a été déterminée par la mesure de la fraction de RNA viral rendue résistante à l'hydrolyse par la nucléase S-1 après hybridation de quantités croissantes de cDNA avec une quantité fixe et déterminée de RNA viral marqué au radiophosphore (activité spécifique du RNA : $>$ 200 000 cpm/ µg). Cette mesure se fait à l'aide d'un cDNA à basse activité spécifique (500 cpm/pM) synthétisé parallèlement à la sonde.

Les résultats présentés sur la figure 12permettent

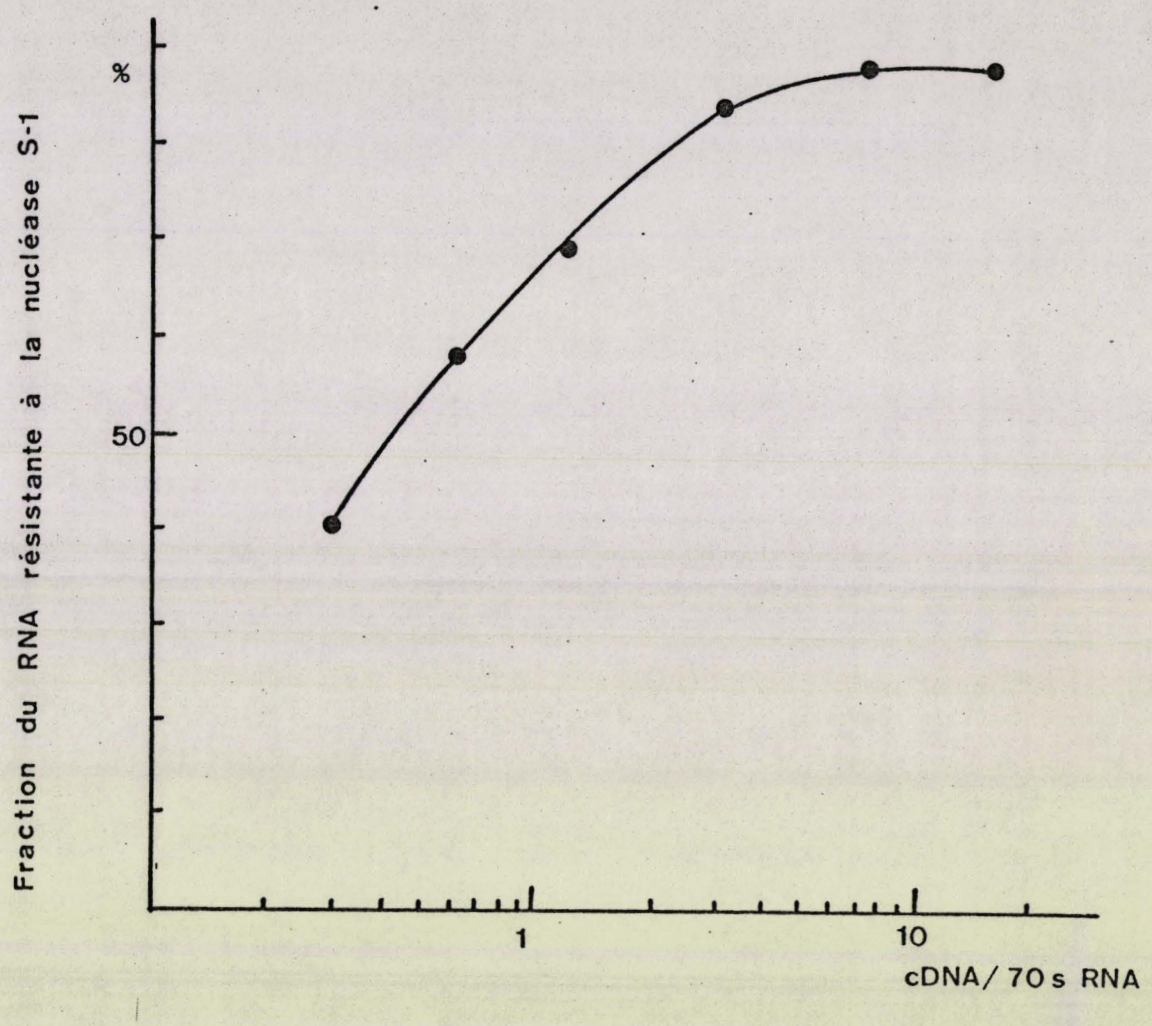


Figure 12. Détermination de l'étendue de la transcription.

Des quantités croissantes de cDNA ont été hybridées avec une quantité fixe et déterminée de RNA 70S marqué au radiophosphore (7,5 ng soit 1500 cpm). L'hybridation a lieu en pipettes scellées de 200 µl pendant 72 heures à 68°C dans du tampon phosphate 0,4 M pH 6,8. A la fin de l'incubation, les fractions sont diluées à 20 ml avec du mélange réactionnel pour l'action de la nucléase S-1, 10ml sont précipités au TCA, les autres 10ml sont soumis à une hydrolyse pendant 30mn à 45°C par la nucléase S-1 puis précipitées au TCA. Le pourcentage de résistance à l'hydrolyse est alors déterminé pour chaque fraction.

de voir qu'un excès de 5 à 7 fois en cDNA suffit à rendre le RNA viral résistant à l'action de la nucléase S-1. Des résultats similaires ont été obtenus par TAVITIAN et coll(113) avec le complexe leucémie-sarcome de Moloney.

Ainsi, les cDNA que nous synthétisons peuvent être utilisés comme sonde dans la recherche de séquences virales apparentées à celles constituant le génome des particules virales de type C produites par la lignée MF_2.

Ainsi, du point de vue biochimique nos particules virales sont tout à fait comparables aux autres rétrovirus murins qui ont été décrits jusqu'à présent.

2. - MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE BIOLOGIQUE - LE TEST XC.

Afin de déterminer si la production de particules virales dans les plasmocytomes est une cause ou une conséquence du développement tumoral, nous avons inoculé des particules virales de type C produites par la cellule MF_2 à des nouveaux-nés de souris Balb/c. Les animaux en expérience ont été suivis pendant des périodes s'étendant jusqu'à 18 mois. Quel qu'ait été le mode d'inoculation : intrapéritonéal, intraveineux ou intracranial, aucun des sujets n'a présenté de tumeurs pendant la période d'observation.

Les particules virales isolées n'ont pas montré d'activité biologique in-vivo. Par contre, l'injection de cellules MF_2 par voie intrapéritonéale à la souris Balb/c provoque le développement d'une tumeur ascitique. L'ascite atteint un volume de 12 à 15 ml en trois semaines et renferme environ 80 millions de cellules par millilitre de liquide.

D'autre part, il nous fallait une méthode rapide de contrôle de la production de particules virales par la lignée MF_2. Nous avons essayé de titrer cette production par des techniques jusque là employées pour titrer les virus leucémogènes murins.

I. Essais de titrage des particules virales produites par la lignée MF_2.

A. Le test S + L⁻ :

Dans une première série d'expériences, nous avons

tenté d'utiliser le test S + L-de BASSIN et coll (114). Le test est fondé sur la complémentation in-vitro d'un virus sarcomatogène dont le génome est présent dans une cellule de souris transformée, par un virus leucémogène fourni par la cellule dont on veut quantifier la production. Cette complémentation se traduit par l'apparition de foyers de transformation dans la culture cellulaire. Si donc nos particules virales présentent une parenté avec les virus leucémogènes murins, l'infection d'un tapis de cellules S + L-par des surnageants acellulaires de cultures de la lignée MF_2 devait se traduire par le développement de foyers de transformation. Cependant, la lignée S + L-est très instable et doit être clonée régulièrement. Avec notre virus, ce test est difficilement interprétable et n'a pas donné de résultats satisfaisant.

Nous nous sommes donc tourné vers le test XC de ROWE et coll (115) qui est beaucoup plus simple d'emploi et plus facile à interpréter.

B. Le test XC :

Le titrage de la production de virus leucémogènes par cette méthode est fondé sur la propriété qu'ont les cellules XC de fusionner entre elles lorsqu'elles sont cocultivées avec des cellules productrices de virus leucémogènes.

La lignée MF_2 est capable d'induire la formation de tels syncytiums. Cette aptitude de cellules myélomateuses à induire le déclenchement du phénomène de polycaryocytose a été décrite à une époque contemporaine de la notre par VOLKMAN et KRUEGER (116) avec des cellules issues du plasmocytome FLOPC-1.

Nous avons étudié plus en détail ce phénomène de fusion des cellules XC induite par la coculture avec des cellules MF_2. Les résultats de ces études sont présentés dans les chapitres suivants.

II. Etude cytologique et ultrastructurale des syncytiums XC induits par la cellule MF_2.

A. Etude en microscopie optique :

Une étude cinétique de l'induction de polycaryons XC par la cellule MF_2 a été effectuée. Dès trois heures après le début de la coculture, de nombreux hétérocaryons renfermant deux ou trois noyaux sont visibles. Après une coculture de 18 heures, on peut dénombrer environ un syncytium formé pour 10 cellules MF_2 ajoutées au départ et les syncytiums comprennent en moyenne 10 noyaux.

1. - Cellules impliquées dans la fusion :

L'origine de ces noyaux a été déterminée de la manière suivante : des syncytiums ont été induits par des cellules MF_2 marquées à la thymidine tritiée pendant 18 heures. Dans ces conditions, tous les noyaux des cellules MF_2 sont marqués et une moyenne de 50 grains par noyau est observée par autoradiographie. L'autoradiographie des polycaryons obtenus par induction à l'aide de cellules MF_2 marquées dans leur DNA ne montre qu'un seul noyau de cellule MF_2 par syncytium (figure 13). De plus, si l'on observe des syncytiums induits par des cellules MF_2 qui ont été traitées avec de la colchicine (0,5 µg/ml de milieu pendant 6 heures avant la coculture), beaucoup renferment un noyau en métaphase et un seul. Enfin, le noyau des cellules MF_2 est plus grand que celui des cellules XC (dont le ou les nucléoles sont centrés) ; dans les polycaryons, on ne trouve, en général, qu'un seul noyau volumineux.

Les syncytiums sont donc formés par la fusion primitive d'une cellule MF_2 et d'une cellule XC, leur taille s'accroit par la fusion ultérieure d'autres cellules XC avec l'hétérocaryon primitif.

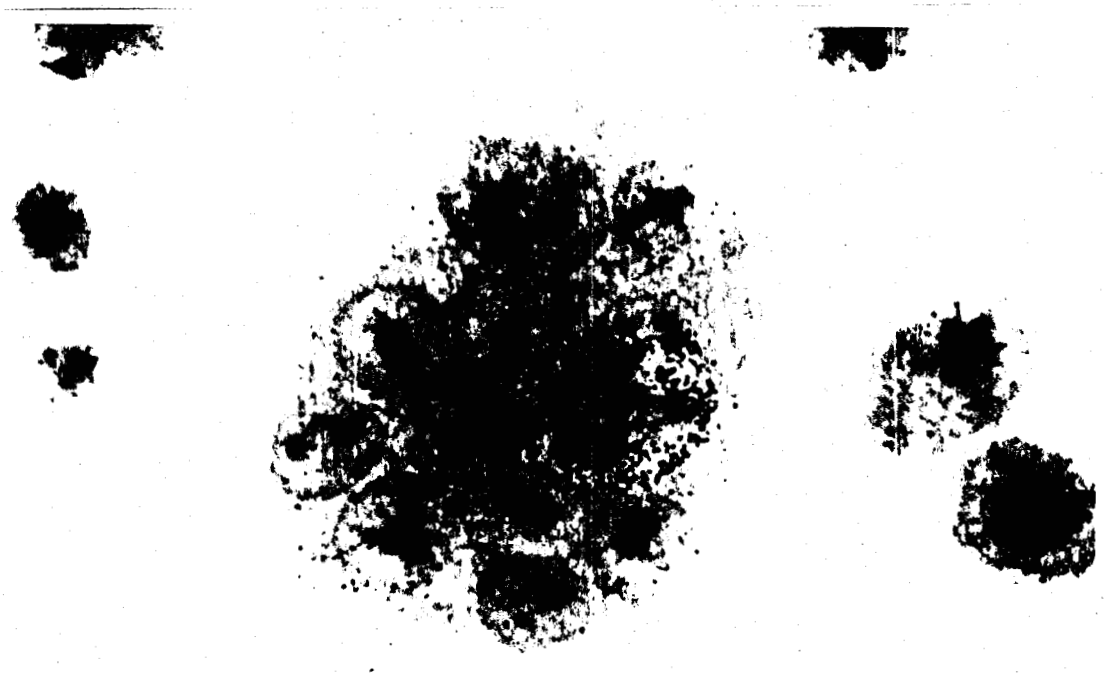


Figure 13. Autoradiographie d'un syncytium.

Des cellules MF_2 ont été marquées pendant 18 heures avant la coculture avec de la thymidine tritiée(1 µci/ml, activité spécifique : 15 Ci/mM). Dans ces conditions, tous les noyaux des cellules MF_2 sont marqués (plus de 50 grains par noyau).

Un seul noyau marqué est visible par syncytium.

L'autoradiographie a été réalisée suivant la méthode de RAO et JOHNSON (117). Coloration à l'hémalun-éosine. Emulsion : Ilford L 4. Grossissement : x1200. (Photo G.TORPIER)

2.- Activités métaboliques requises pour le développement de la polycaryocytose :

Afin de déterminer les synthèses macromoléculaires indispensables à l'induction de la polycaryocytose, les cellules MF_2 et XC ont été préincubées dans du milieu renfermant des inhibiteurs de la synthèse du DNA (hydroxyurée), du RNA (actinomycine D) ou des protéïnes (cyclohéximide). Ce prétraitement d'une heure a été appliqué pour définir si une production virale normale à la surface de la cellule MF_2 était nécessaire pour obtenir une induction et un développement normaux de la polycaryocytose.

Les résultats de telles expériences sont présentés dans le tableau VI. Il peut être observé que l'hydroxyurée à la concentration de 4 mM n'a aucun effet sur la polycaryocytose alors que la cyclohéximide produit une légère inhibition lorsque les cellules MF_2 sont prétraitées pendant une heure avec de la cyclohéximide à la concentration de 10 µg/ml de milieu .

Par contre, des synthèses normales de RNA semblent être indispensables pour l'obtention d'un développement normal des syncytiums et ceci surtout dans la cellule MF_2. En effet, le prétraitement des cellules XC ou MF_2 par cette drogue (1 µg/ml) provoque une diminution très importante du nombre de syncytiums. De plus, les polycaryons observés dans ces conditions sont beaucoup plus petits que dans les cocultures non traitées servant de contrôle. Enfin, dans les cocultures établies en présence d'actinomycine D, le nombre de syncytiums observés est également diminué mais à une moindre degré que lors du prétraitement des cellules.Il est à préciser qu'aucun effet cytopathique n'a été observé à la concentration d'actinomycine D utilisée dans ces expériences.

En conclusion, aucune néosynthèse de DNA ne semble

Tableau VI

Influence du traitement des cellules MF_2 et XC avec des inhibiteurs de la synthèse de macromolécules sur l'induction des polycaryons.

Cellule	Traitement	Temps de préincubation (en heures)	Nombre de syncytiums pour 3×10^3 cellules MF_2* (écart type)	% d'inhibition
	Non traitées		240 (± 6,6)	
MF_2	Hydroxyurée	1	224 (± 5,1)	0
MF_2	Actinomycine D	1	12 (± 3,2)	95
MF_2	Cycloheximide	1	126 (± 4,2)	48
XC^2	Hydroxyurée	1	220 (± 5,9)	0
XC	Actinomycine D	1	66 (± 4,6)	75
XC	Cycloheximide	1	204 (± 5,8)	0
XC + MF_2	Hydroxyurée	0 **	222 (± 4,5)	0
XC + MF_2	Actinomycine D	0 **	144 (± 5,9)	40
XC + MF_2	Cycloheximide	0 **	222 (± 4,7)	0

3×10^3 cellules MF_2 ont été cocultivées avec 25×10^3 cellules XC pendant 18 heures dans chaque alvéole d'une plaque de culture Microtest II (Falcon plastics) sous un volume total final de 200 µl.
La concentration en inhibiteur était de 5 mM pour l'hydroxyurée 1 µg/ml pour l'actinomycine D et 10 µg/ml pour la cycloheximide.
Après une période de préincubation d'une heure, l'excès d'inhibiteur a été éliminé par deux lavages avec du milieu.

* Moyenne de 6 comptages à partir de trois expériences différentes.
** Le développement des syncytiums a eu lieu en présence de l'inhibiteur.

nécessaire pour obtenir une polycaryocytose normale. Donc, la formation de polycaryons ne résulte pas d'un processus d'endomitose. Le traitement des cellules MF_2, c'est-à-dire les cellules inductrices, par l'actinomycine D et la cyclohéximide montre que des synthèses macromoléculaires de RNA et de protéïnes normales dans la lignée MF_2 sont nécessaires pour obtenir une induction et une croissance normale des syncytiums. Ceci suggére qu'une synthèse normale de RNA et particulièrement de RNA viral (voir aussi SHANNON et coll (118)) est indispensable pour obtenir le développement des syncytiums. La réduction du nombre de syncytiums pourrait donc être due à une réduction du nombre de sites d'induction pour la polycaryocytose c'est-à-dire du nombre de particules virales bourgeonnant à la surface de la cellule MF_2. La persistance d'une capacité d'induction résiduelle de la cellule MF_2 après un prétraitement par les drogues trouverait son origine dans les particules virales déjà en bourgeonnement lors de l'addition de la drogue.

B. Etude en microscopie électronique*:

En microscopie électronique, la cellule XC présente quelques villosités comme le montre la figure 14A. Aucune particule virale qu'elle soit de type A ou de type C n'a jamais été observée dans ces cellules. La figure 14B présente une image du bourgeonnement d'une particule virale de type C à la surface d'une cellule MF_2.

Une certaine forme de la fusion cellulaire pourrait être due à des phénomènes rappelant la phagocytose ainsi que le montre l'image présentée dans la figure 14C.

D'autres aspects de la fusion, au niveau des membranes cellulaires cette fois, sont présentés sur la figure 15. Les particules virales de type C (indiquées par des flèches) permettent de localiser la position des cellules MF_2. Les flèches courbes (figure 15C) schématisent l'échange de matériel cytoplasmique entre les deux types cellulaires.

* En collaboration avec G. TORPIER.

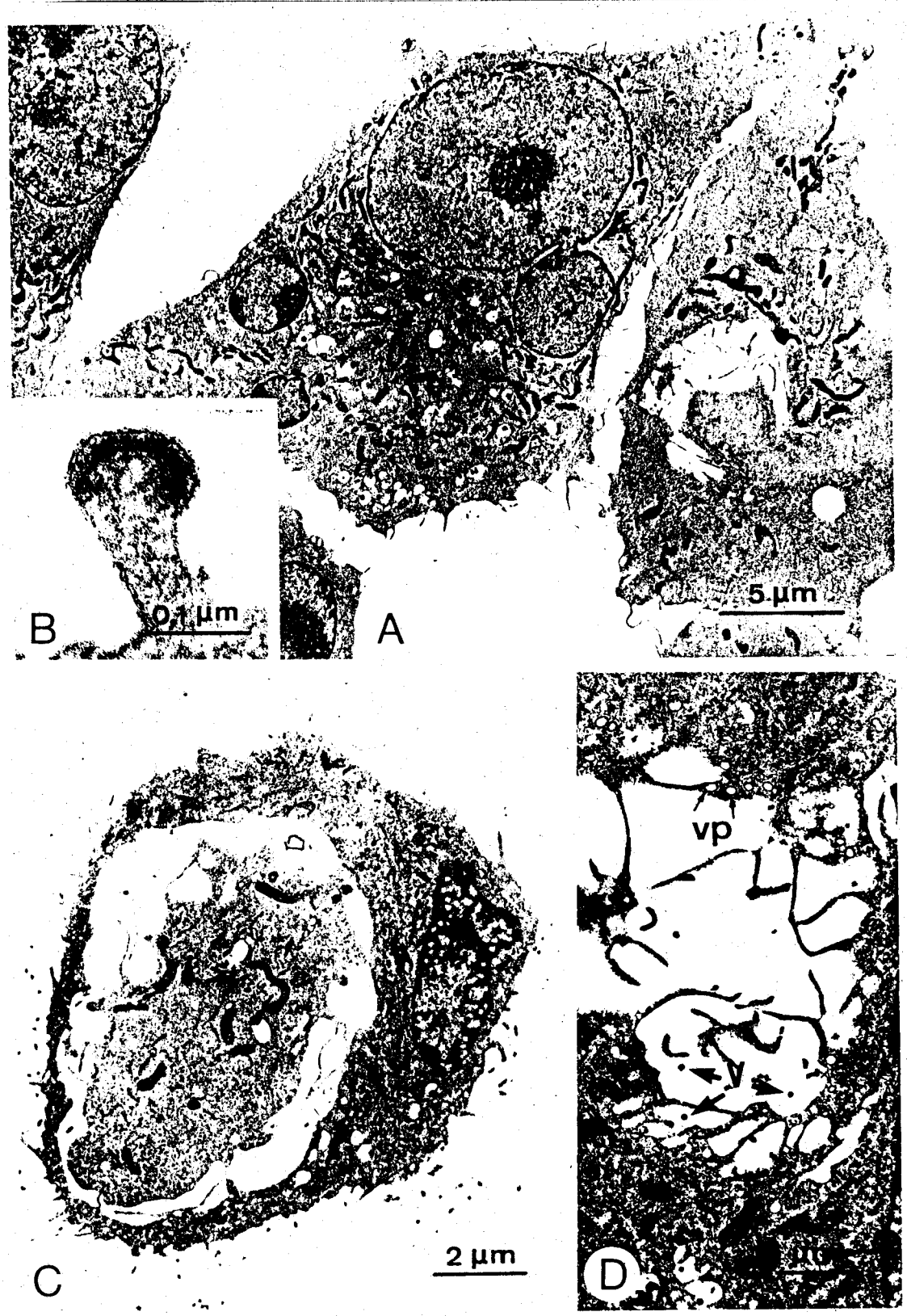


Figure 14. Images de microscopie électronique.

A. Cellules XC présentant quelques villosités (x4000).

B. Particule virale de type C bourgeonnant à la surface d'une cellule MF_2 (x170 000).

C. Image rappelant de la phagocytose dans une coculture de cellules MF_2 et XC (x7500).

D. Villosités à l'intérieur d'un syncytium. vp:vésicules de pinocytose , V: particules virales. (x 13000).

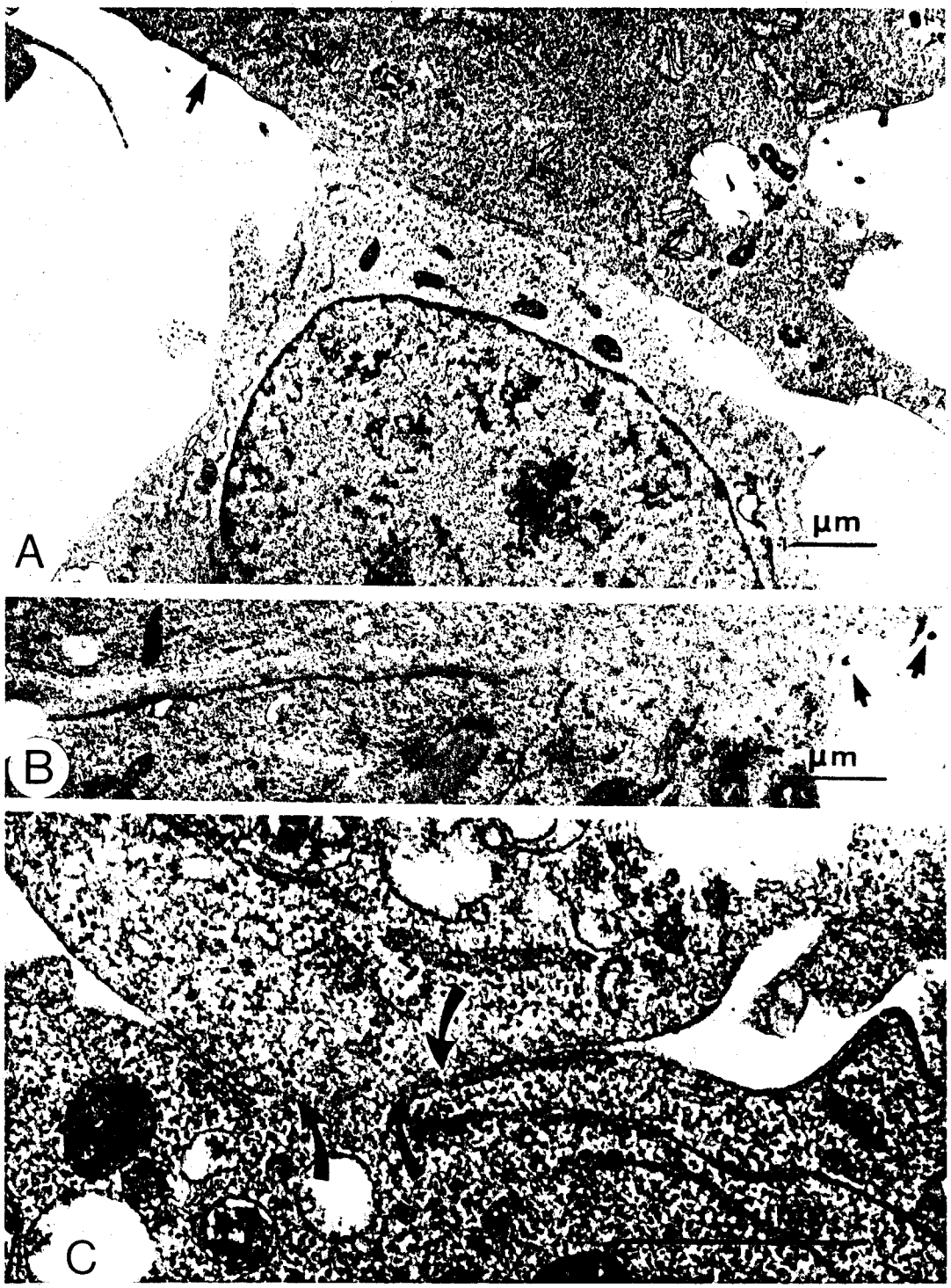


Figure 15. Images de la fusion des membranes.

A. Deux cellules sont en contact étroit, la flèche indique une particule virale de type C bourgeonnant à la surface d'une cellule MF_2 (x13000).

B. Les deux membranes en contact commencent à s'estomper (x 16000). Les flèches indiquent des particules virales.

C. La fusion des membranes est partiellement achevée. Les flèches courbes symbolisent l'échange de matériel cytoplasmique (x 70000).

Des vues d'ensemble de syncytiums achevés sont montrées sur la figure 16. La présence d'au moins une cellule MF_2 dans le syncytium est révelée par la présence de particules virales à l'intérieur de celui-ci (encart de la fig.16A). Ces particules "intrasyncytiales" ainsi que des villosités visibles à l'intérieur de certains polycaryons montrent la rapidité du phénomène de fusion. Enfin, nous n'avons jamais pu observer de particules virales faisant office de pont entre deux cellules en cours de fusion.

Nous avons voulu connaître la répartition des sites membranaires des cellules MF_2 et XC après leur fusion. Pour l'étudier, nous avons appliqué la technique d'immunomicroscopie électronique . Les cellules seules ou les polycaryons ont été incubés avec un sérum anti-cellule MF_2 préparé chez la souris Balb/c. Les sites de fixation des anticorps à la surface des cellules ont été révélés par un sérum de mouton anti-immunoglobulines de souris couplé à la péroxydase. Les images obtenues sont présentées sur la figure 17. La cellule MF_2 montre des zones de marquage par la péroxydase (fig. 17A), de telles zones sont également visibles aux sites de bourgeonnement de particules virales (fig. 17A, encart). Par contre, la cellule XC montre un marquage non spécifique caractérisé par une fine ligne dense située à la membrane plasmatique (fig. 17 B). Dans les polycaryons, en revanche, le marquage à la péroxydase vu avec la cellule MF_2 alterne avec des zones de marquage non spécifique (fig. 17C). Il y a donc une large redistribution des sites cellulaires à la surface du polycaryon.

Une dilution des sites inducteurs de la polycaryocytose à la surface du syncytium lors de sa croissance pourrait influer sur la taille finale de ce syncytium. En admettant qu'une densité minimale de sites soit nécessaire pour induire ou permettre le développement d'un syncytium, on peut penser que plus une cellule produit de particules virales (qui pourraient représenter ces sites d'induction), plus les syncytiums

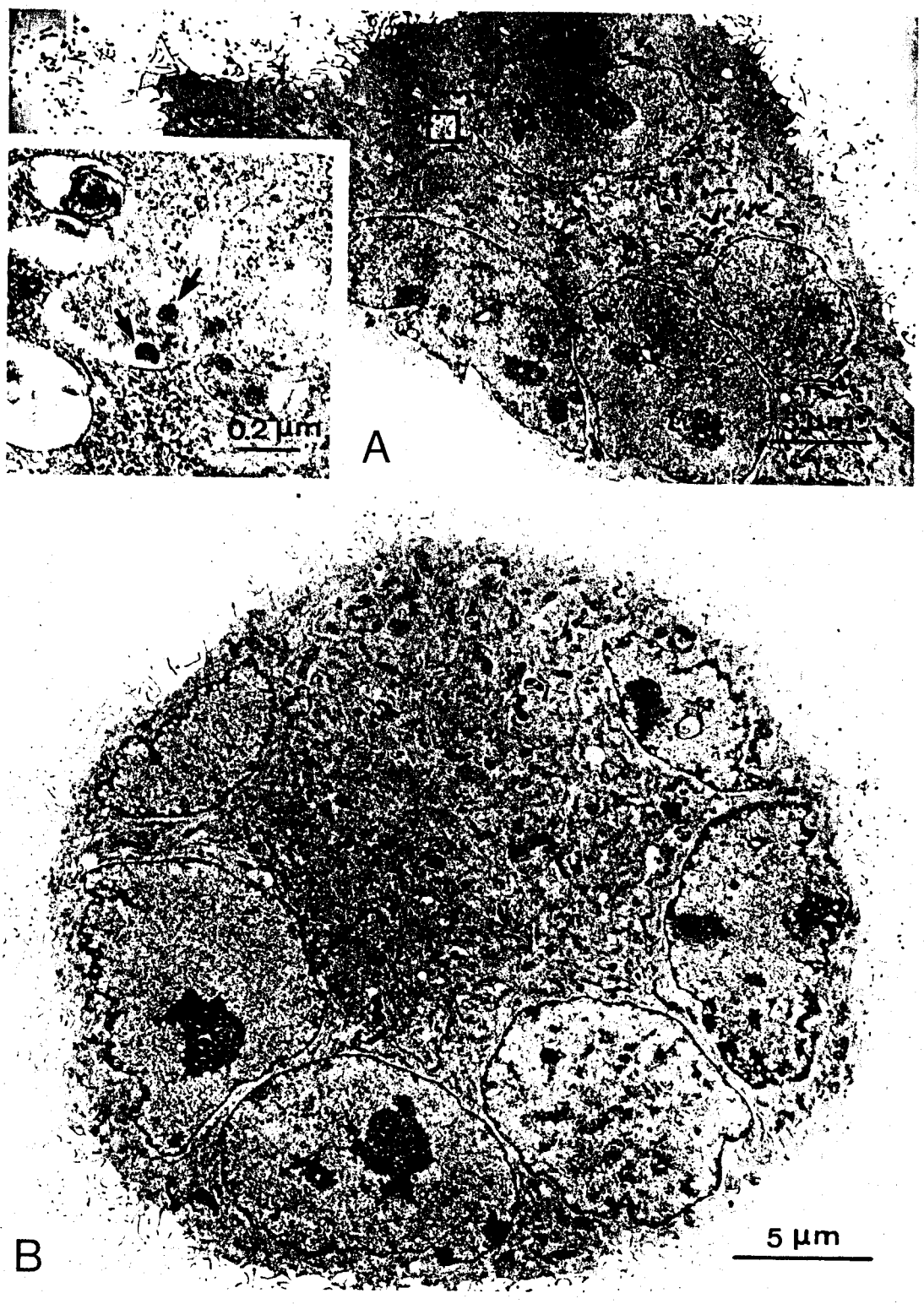


Figure 16. Images de polycaryons formés.

A. Vue générale à faible grossissement (x 3200).L'encart présente des particules virales emprisonnées dans le polycaryon (x 50000).

B. De nombreuses villosités sont visibles à la surface du syncytium (x 4400).

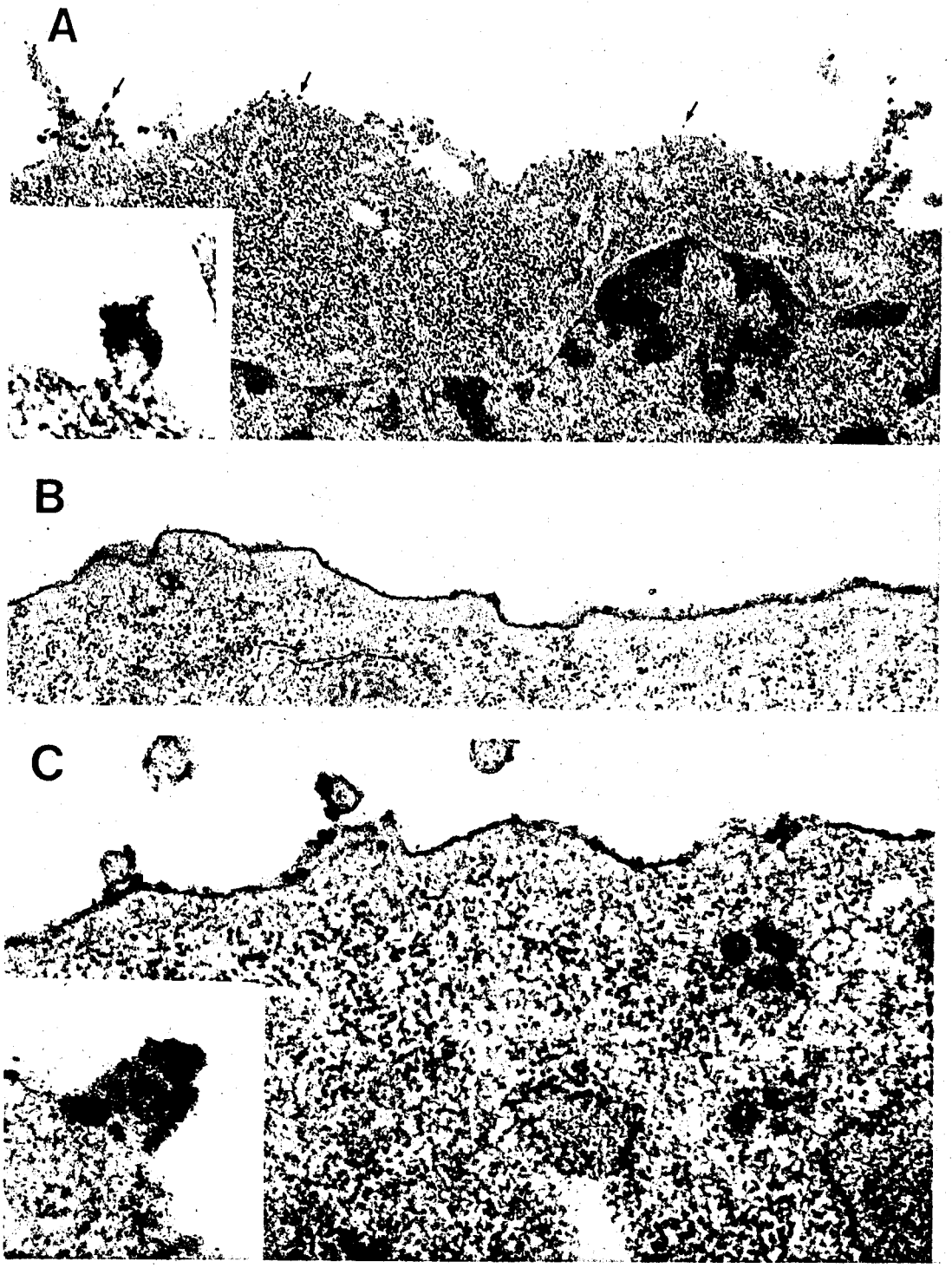


Figure 17. Immunomicroscopie électronique.

Les cellules MF_2, XC et les syncytiums ont été traités de la même manière par le sérum de souris anti-cellule MF_2. Les sites réactionnels sont alors révélés par un sérum de mouton anti-immunoglobulines de souris couplé à la peroxydase.

A. Des sites de marquage à la peroxydase (flèches) peuvent être vus à la surface de la cellule MF_2 (x36000). Encart particule virale bourgeonnante, marquée à la peroxydase (x100000

B. Sur la cellule XC, marquage non spécifique à la peroxydase caractérisé par une ligne dense localisée à la membrane plasmatique (x 36000).

C. Un polycaryon présentant en alternance des sites de marquage spécifique et des lignes denses (x 80000). Encart : particule virale bourgeonnante dont le système membranaire est originaire à la fois de cellules XC et MF_2 (x 100 000).

obtenus seront grands et nombreux. Ceci est vérifié par exemple lors du traitement ou du non traitement des cellules MF_2 par l'actinomycine D ou lorsque l'on compare les syncytiums XC-MF_2 avec les syncytiums obtenus avec des lignées hautement productrices de virus leucémogènes telle la lignée 78 A1.

Cette étude cytologique et ultrastructurale ne nous donne qu'une idée statique du phénomène de polycaryocytose. La microcinématographie et la technique du cryodécapage ont permis une approche plus dynamique de la formation et de l'évolution des polycaryons XC-MF_2.

III. Etude dynamique de la polycaryocytose.

A. Etude en microcinématographie * :

Une étude microcinématographique de la fusion se produisant entre une cellule MF_2 et une cellule XC a été entreprise. Un montage de photographies obtenues à partir d'un film est présenté sur la figure 18. Une vue était exposée toutes les quatre minutes. Au début de la séquence, on peut suivre une cellule MF_2 descendant dans le milieu de culture et arrivant à proximité d'une cellule XC (on laisse les cellules XC se fixer pendant 5 heures avant le début de la coculture). La fixation de la cellule MF_2 au support est achevée en environ 20 minutes. On peut considérer que la fusion entre les deux cellules est terminée 92 minutes après le début de la coculture (vue H). Puis une seconde cellule XC "s'approche" de l'hétérocaryon précédemment formé et fusionne avec celui-ci. Un syncytium comprenant 3 noyaux est achevé 180 minutes après le début de la coculture (vue N). Cette cinétique est en accord avec nos observations précédentes (voir p.52). Les mêmes résultats, en microcinématographie, ont été obtenus que les cocultures aient été traitées ou non avec de l'hydroxyurée.

Des phénomènes plus tardifs sont montrés sur la fig.19.

* En collaboration avec Madame COLLYN-D'HOOGHE.

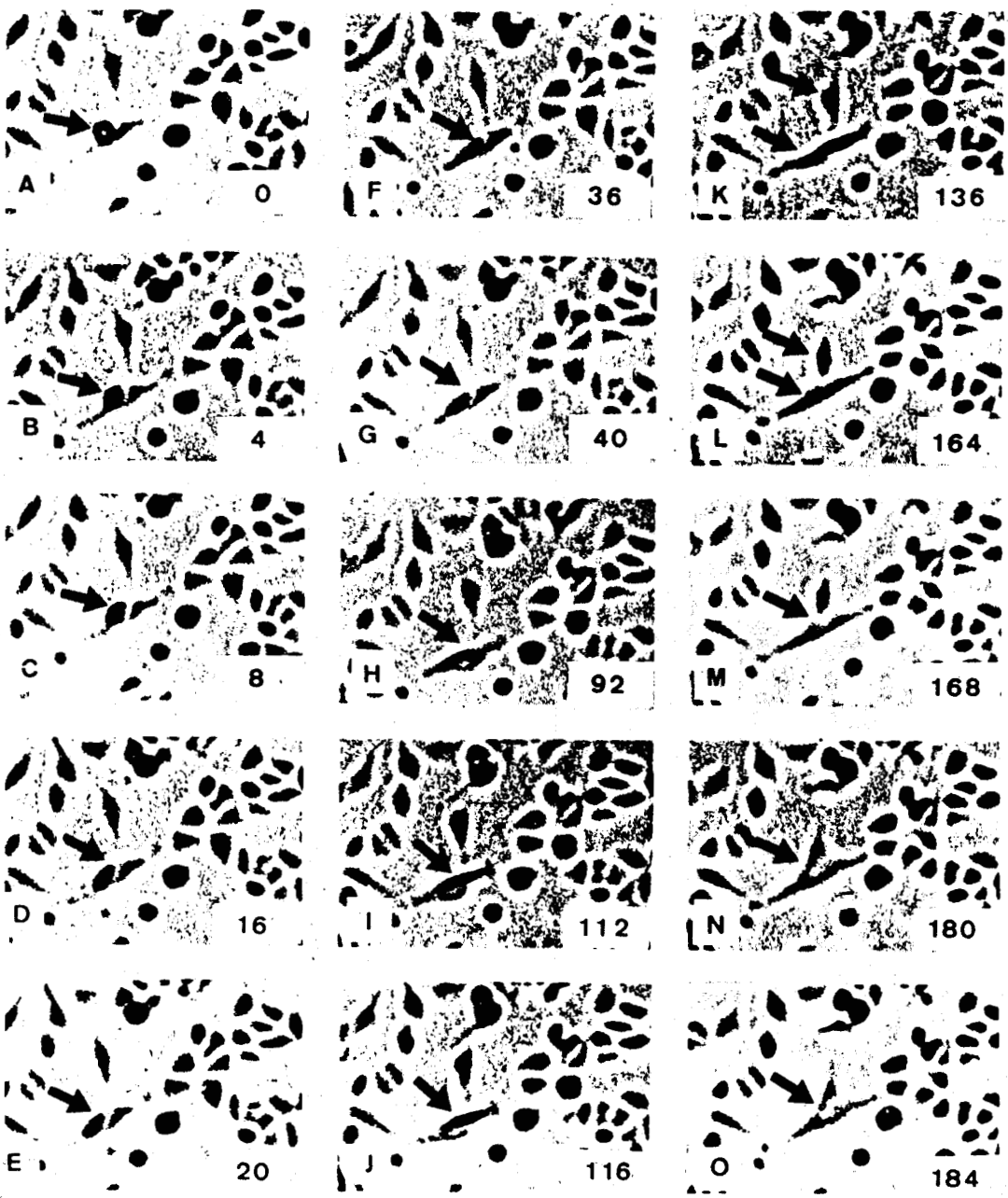


Figure 18. Etude microcinématographique de la polycaryocytose.

Des photographies ont été réalisées à partir des films 16 mm utilisés dans cette étude. Ce montage présente les évènements se déroulant au début d'une coculture. Les vues ont été exposées toutes les quatre minutes. Les chiffres indiquent le temps écoulé depuis le début de la coculture (en mn)

Vues A à J : la flèche indique une cellule MF_2 fusionnant avec une cellule XC.

Vues K à O : une seconde cellule XC vient fusionner avec l'hétérocaryon précédemment formé.

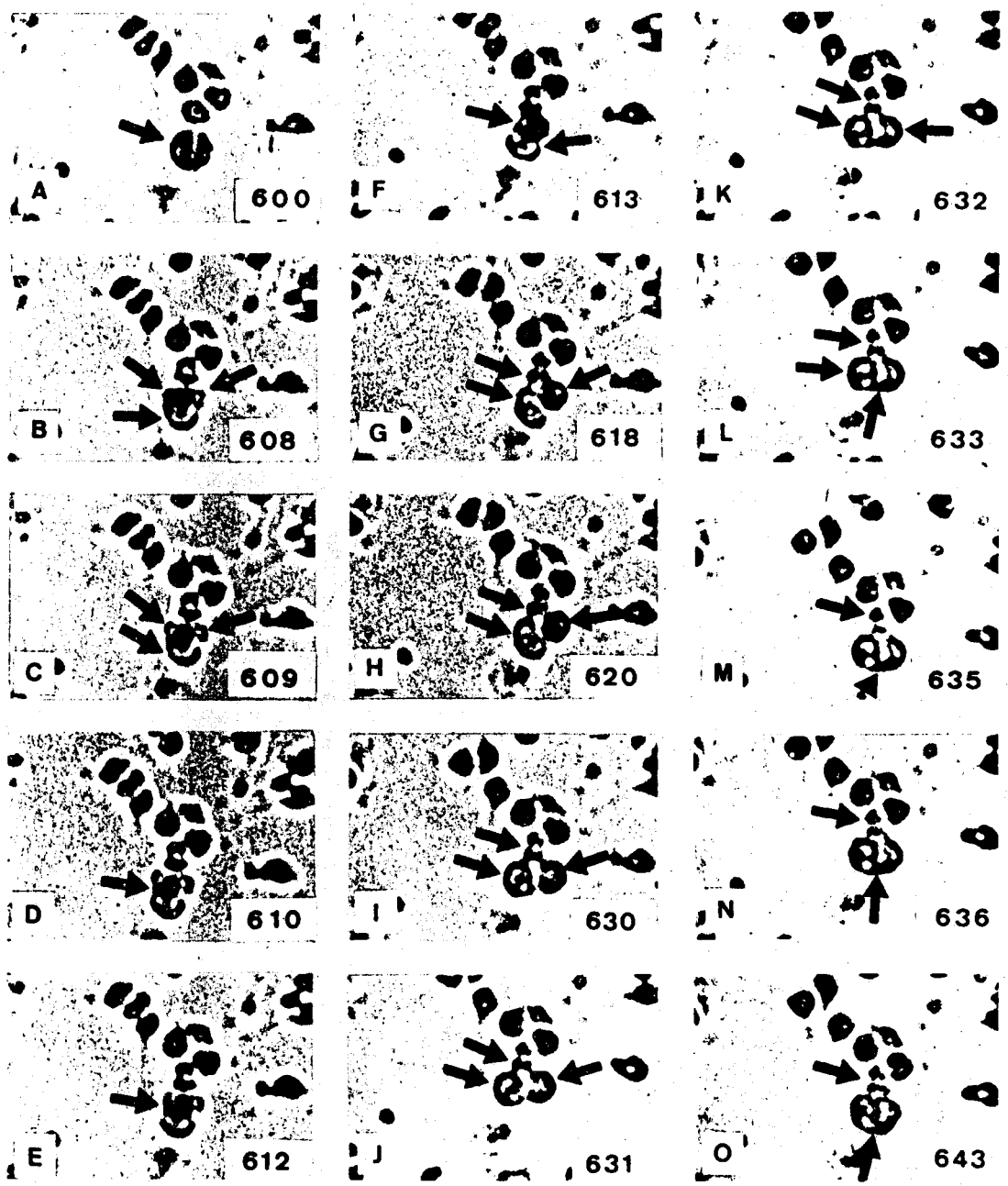


Figure 19. Division multipolaire d'un syncytium.

Des vues ont été exposées toutes les minutes. Les nombres indiquent le temps écoulé depuis le début de la co-culture (en minutes).

Les flèches indiquent un polycaryon sujet à un processus mitotique anormal.

La petite cellule fille (fléchée en M) issue de cette division ne refusionne pas avec les deux autres grandes cellules.

Une vue était exposée toutes les minutes. Un polycaryon dont l'arrondissement a commencé 421 minutes après le début de la coculture est visible en A (soit au temps 600 minutes). Il subit une division multipolaire qui évolue jusqu'à la vue référencée J puis les deux grandes cellules filles refusionnent, la petite restant à l'écart du polycaryon ainsi reformé. Trois points importants sont à remarquer dans cette deuxième série d'expériences :

- ces observations n'ont été faites qu'en absence d'hydroxyurée
- la durée de la division du polycaryon est très importante.
- le temps nécessaire à la fusion des deux cellules filles est le même que dans le cas précédent (fig. 18 vues L à N).

Cette étude permet donc de confirmer que la formation de polycaryons est rapide et qu'elle peut se dérouler sans divisions cellulaires ou endomitoses car l'hydroxyurée n'a aucune influence sur le nombre et la taille des syncytiums obtenus.

B. Etude par la technique du cryodécapage * :

Les modifications survenant dans les membranes cellulaires au niveau des zones de fusion ou dans les syncytiums achevés ont été suivies par la méthode du cryodécapage.

L'aspect général des membranes fracturées de cellules MF_2 et XC est présenté dans la figure 20. Les faces de fracture sont désignées selon la nomenclature de BRANTON et coll (119) c'est-à-dire que la face P correspond à la demi-membrane liée au cytoplasme et donc vue par sa face externe ; et la face E correspond au feuillet externe de la membrane, il est donc vu par sa face interne. La figure 20 C est une représentation schématique de la fracture montrée en A.

Le cryodécapage d'une membrane de syncytium en formation (fig. 21) montre des zones presque totalement dépour-

* En collaboration avec G. TORPIER.

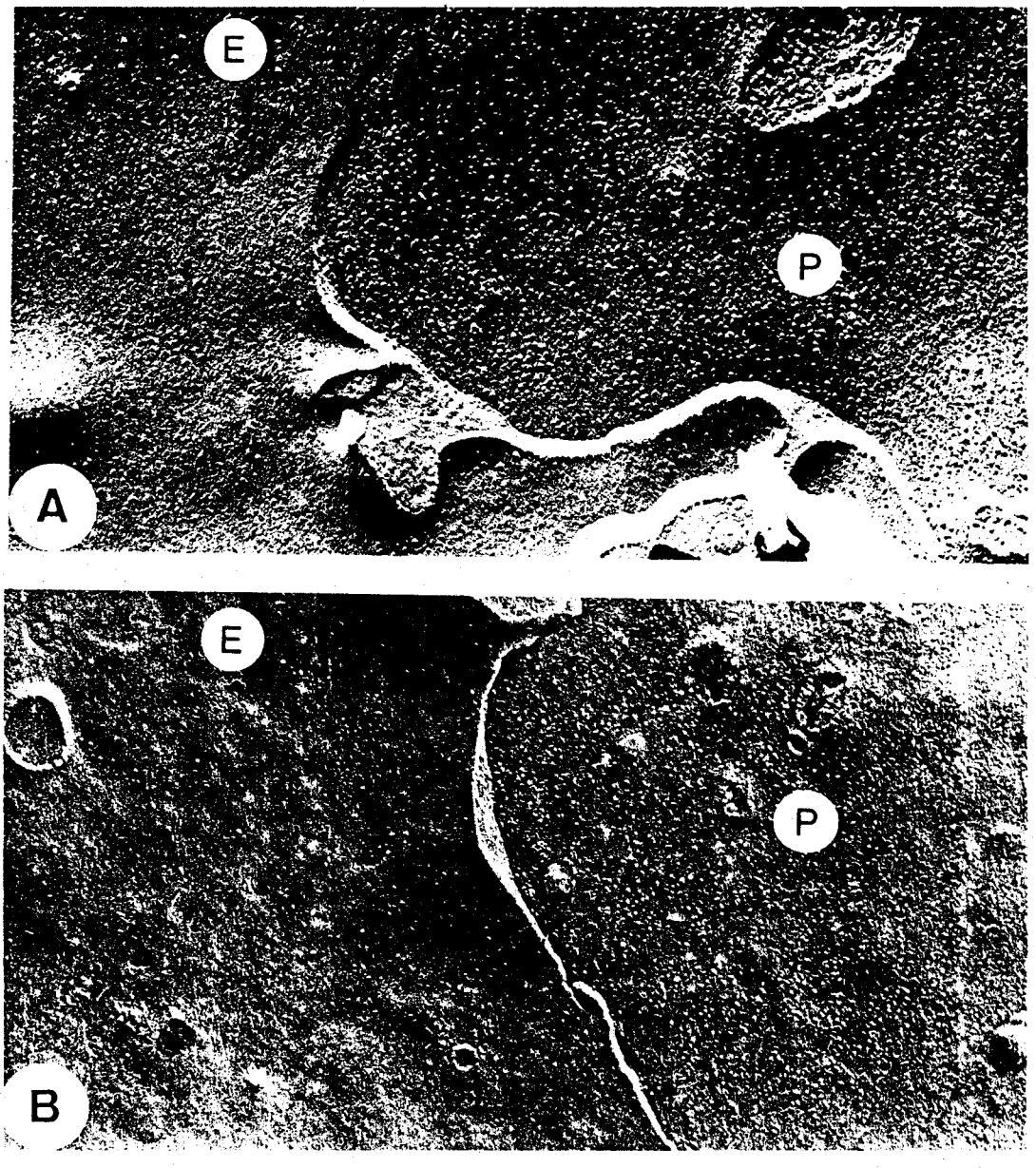


Figure 20. Aspect de membranes fracturées de cellules MF_2 et XC.

A. Membranes fracturées de cellules MF_2.
B. Membranes fracturées de cellules XC.
C. (Voir ci-contre). Représentation schématique de la fracture montrée en A.

La nomenclature adoptée est celle de BRANTON et coll (120).
L'espace entre les cellules ① et ② est rempli de glace.

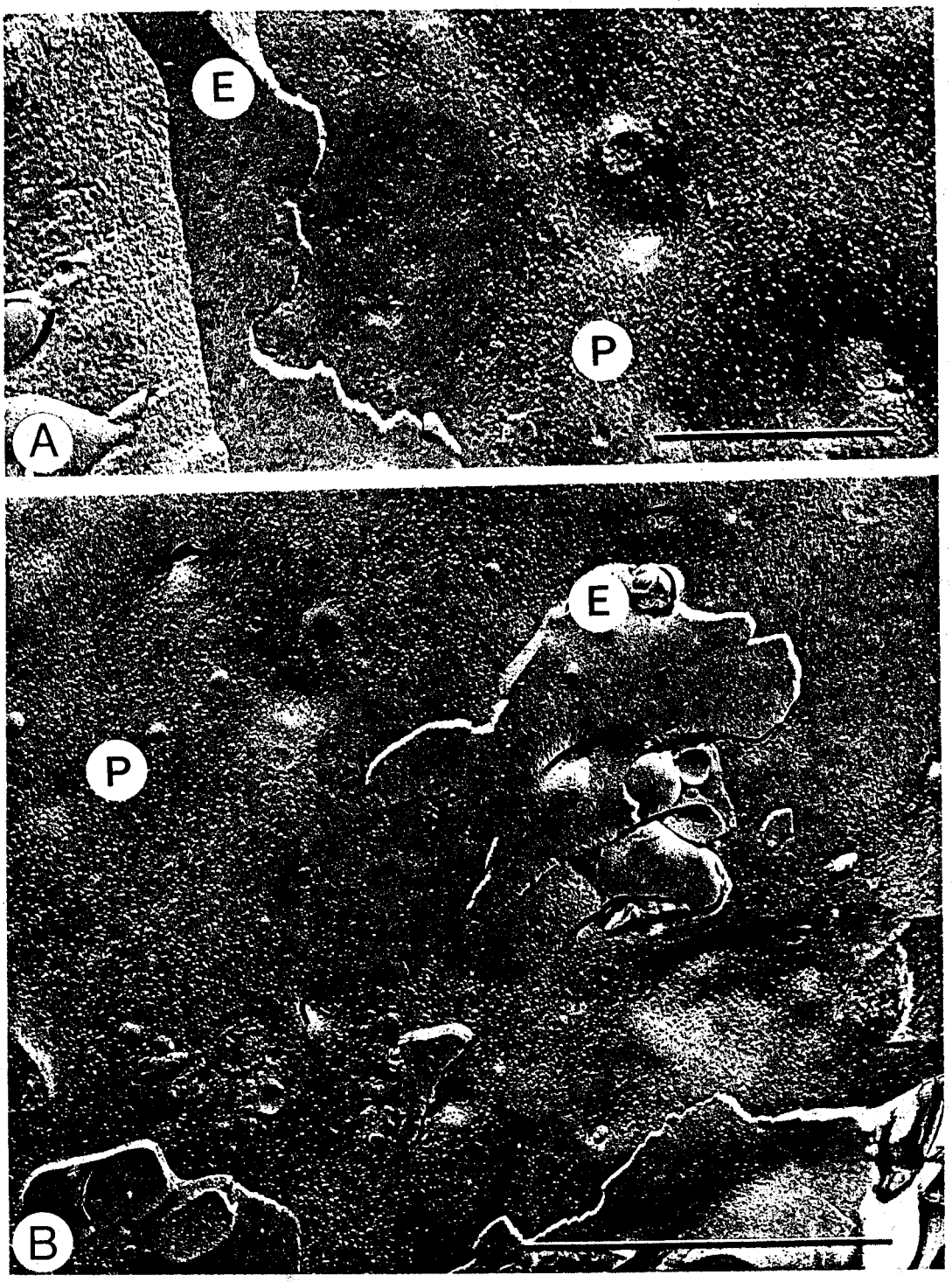


Figure 21. Cryodécapage d'une zone de fusion.
Les faces de fracture sont désignées selon la nomenclature de BRANTON et coll (121).
A. Une zone pratiquement dépourvue de particules est visible, elle correspond à une zone où les lipides sont très exposés. Les particules protéïques sont repoussées à la périphérie de cette zone.
Le trait représente 0,5 µm (x70000).
B. Une vue plus large d'une telle zone de contact est présentée. Le trait représente 1 µm (x54000).

vues de particules intramembranaires qui doivent correspondre aux zones de fusion entre deux cellules ou aux zones de contact entre des villosités cellulaires (décrites fig. 14 A) et une autre membrane cellulaire. Les particules protéïques semblent être repoussées à la périphérie de ces zones lipidiques Cette disposition n'est observée que sur les faces P des membranes fracturées. Pour obtenir de telles plages, nous avons ralenti le processus de fusion en plaçant les cocultures, 3 heures après leur établissement, pendant 2 heures à +4°C avant de pratiquer la fracture. Nous avons vérifié, par ailleurs, que ce traitement n'altère pas la distribution ni le nombre des particules intramembranaires des cellules MF_2 ou XC. De même, cette incubation à +4°C n'a aucune influence sur un développement ultérieur de la polycaryocytose : en effet, des cocultures incubées de cette manière puis replacées à 37°C ont présenté autant de syncytiums renfermant le même nombre de noyaux que des cocultures maintenues en permanence à 37°C.

Une analyse statistique * de la distribution des particules intramembranaires à la surface des syncytiums a été effectuée pour compléter l'étude en immunomicroscopie électronique du réarrangement des sites membranaires précédemment décrite (voir p.59). Les particules intramembranaires ont été comptées sur des agrandissements photographiques quadrillés des images de microscopie électronique. Environ 30 images choisies au hasard ont été comptées pour chaque type cellulaire et, pour chaque image, la valeur obtenue correspond à la numération d'environ 1 μm^2 de membrane. Les résultats des comptages ont été traités par la méthode d'analyse bidirectionnelle de variance.

Les faces E des membranes fracturées ne montrent aucune différence significative quant à la distribution des particules intramembranaires que ce soient des membranes provenant de cellules XC, MF_2 ou de syncytiums.

* Nous remercions le Docteur J.P. DESSAINT pour l'aide qu'il nous a apportée dans cette analyse.

En ce qui concerne les faces P des membranes fracturées de cellules XC et MF_2, une différence significative apparaît dans la densité des particules intramembranaires (voir tableau VII). Dans les syncytiums achevés, les faces P des membranes fracturées montrent des zones ayant la densité des cellules MF_2, d'autres ayant la densité des cellules XC, d'autres enfin ayant une densité intermédiaire.

Un cas particulier est représenté par les zones de fusion. Un diagramme de fréquence de densité des particules intramembranaires dans une telle zone (fig. 21A) montre une totale redistribution de la densité des particules au contact entre deux cellules(fig. 22). Cette distribution semble correspondre à la somme des courbes obtenues avec les deux types cellulaires considérés séparément.

L'analyse statistique de la distribution des particules intramembranaires des faces des membranes fracturées de syncytiums a permis d'observer des zones avec une densité rappelant celle de la cellule XC, d'autres avec une densité rappelant celle de la cellule MF_2 et des zones ayant une densité intermédiaire. Ceci se rapproche des résultats obtenus en immunomicroscopie électronique (p.59).

De nombreux auteurs ont décrit la formation de plages lisses lors de la fusion de membranes, nos résultats concordent avec les leurs. Ils sont en accord avec le mécanisme de la fusion membranaire décrit par AHKONG et coll(122), mécanisme qui est schématisé dans la fig. 23.

Cependant, le rôle exact joué par les particules virales bourgeonnant à la surface des cellules MF_2 dans l'induction de la polycaryocytose reste difficile à définir. Il en est de même pour la propriété particulière qu'ont les cellules XC de fusionner entre elles lorsqu'elles sont cocultivées avec

Tableau VII

Densité en particules intramembranaires des faces de fracture P et E des membranes plasmatiques des cellules XC et MF_2

Cellule	Face P	Face E
XC	596 (± 80)	75± 9
MF_2	937 (± 100)	99±10

Les valeurs sont données en nombre de particules par μm^2 (± écart type). Ces valeurs représentent la moyenne de 30 comptages de plaques photographiques pour chaque type cellulaire.
Les faces de fracture sont désignées selon la nomenclature de BRANTON et coll (123).

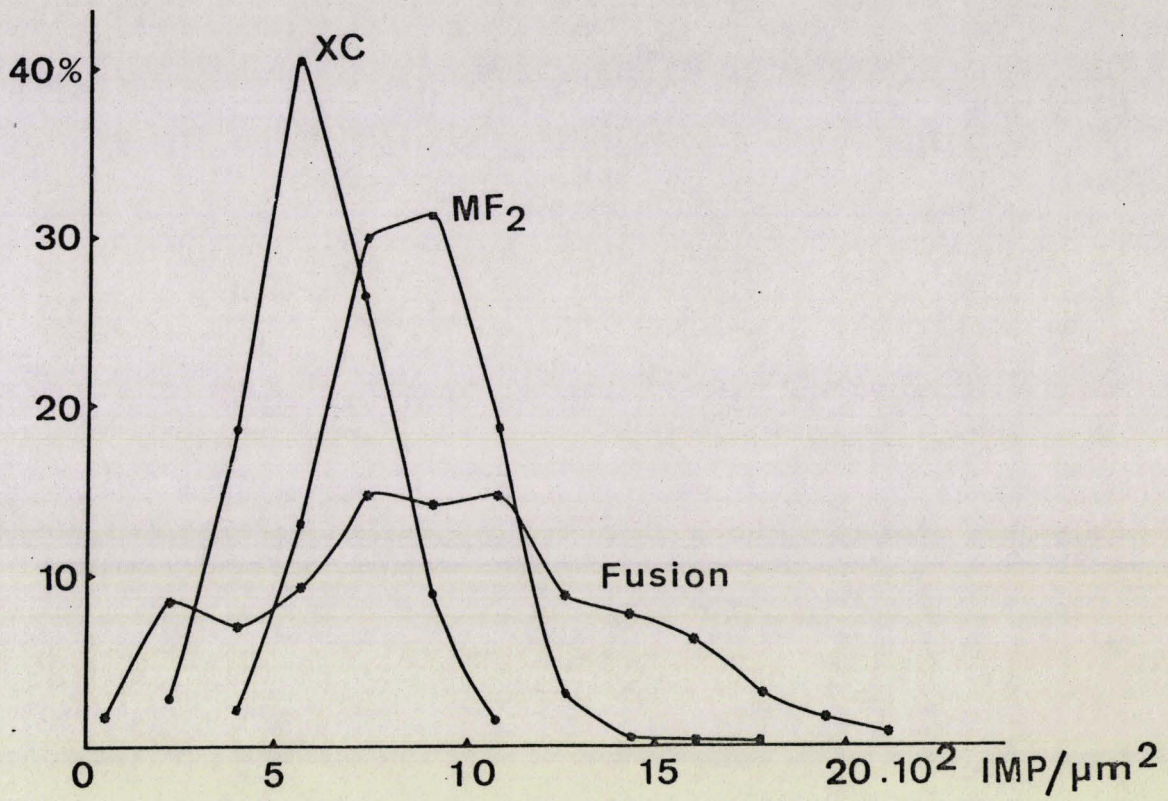


Figure 22. Représentation schématique de la densité en particules.

Ce diagramme représente la distribution de la densité en particules intramembranaires (IMP) dans les faces P de fracture des membranes plasmatiques de cellules XC, de cellules MF_2 et dans une zone de fusion (voir fig. 21A).

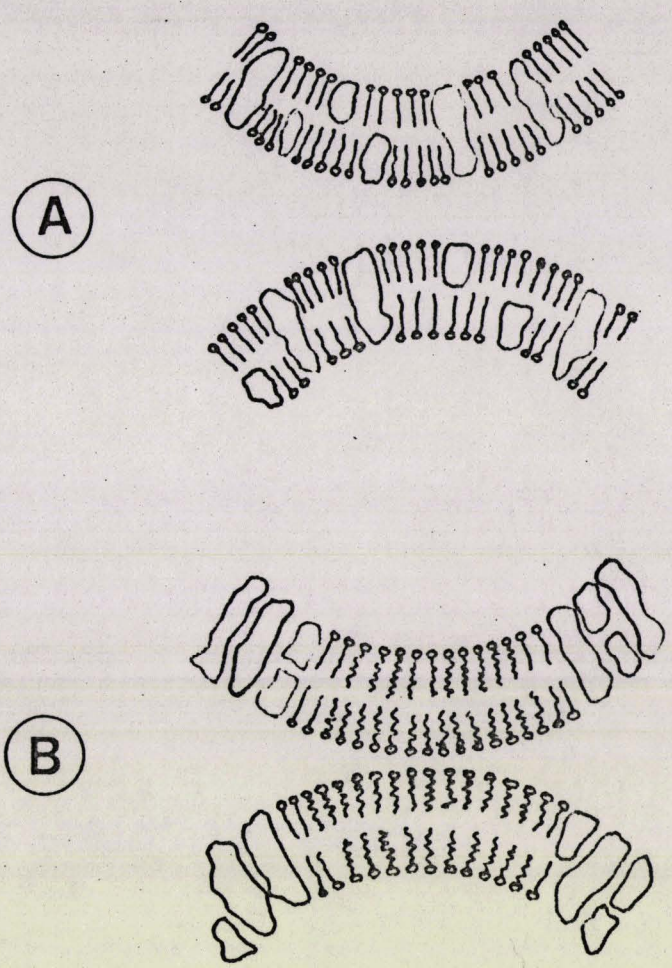


Figure 23. Schématisation de la disposition des constituants membranaires lors d'une fusion de membranes biologiques (d'après AHKONG et coll (124)).

A. Ces deux membranes ne peuvent fusionner car les protéïnes sont réparties au hasard dans les couches lipidiques.

B. Disposition favorable pour une fusion. Les protéïnes sont à la périphérie de zones composées de lipides très fluides.

des cellules productrices de virus leucémogènes. Peut-être cette capacité vient-elle d'une mobilité particulière de ses composants membranaires qui lui permettent une formation rapide et aisée de zones lisses dépourvues de protéïnes.

3.- REGULATION DE LA PRODUCTION VIRALE EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE. PHENOMENE DU "SWITCH-OFF" - "SWITCH-ON" *.

La propriété des cellules MF_2 de provoquer le développement d'une ascite abondante lorsqu'elles sont injectées par voie intrapéritonéale à des souris Balb/c nous avait fait songer à utiliser ce mode de culture cellulaire pour nos productions virales. En effet, ce type de culture in-vivo est très commode, peu onéreux et peu sujet aux contaminations. Nous avons contrôlé la production virale par le test XC précédemment décrit et nous avons pu constater une disparition progressive de l'aptitude des cellules MF_2 à induire des polycaryons au cours des passages successifs chez l'animal. Cette observation a été étendue à un autre type de plasmocytome.

I. Description du phénomène d'extinction-réapparition.

Le protocole expérimental est schématisé dans la figure 24 et les cellules utilisées dans ces expériences dérivent de deux plasmocytomes de la souris Balb/c :
- le plasmocytome MOPC173 dont sont issues la lignée MF_2 et la lignée 173/2A établie dans notre laboratoire.
- le plasmocytome MOPC 315 dont sont originaires la lignée $315F_1$ obtenue chez le Docteur PARAF et la lignée 315/2A établie dans notre laboratoire.

Les tumeurs mères sont maintenues par transplantation sous-cutanée chez la souris Balb/c.

Quand les diverses lignées cellulaires sont cultivées

* En collaboration avec J.C. LEFEBVRE.

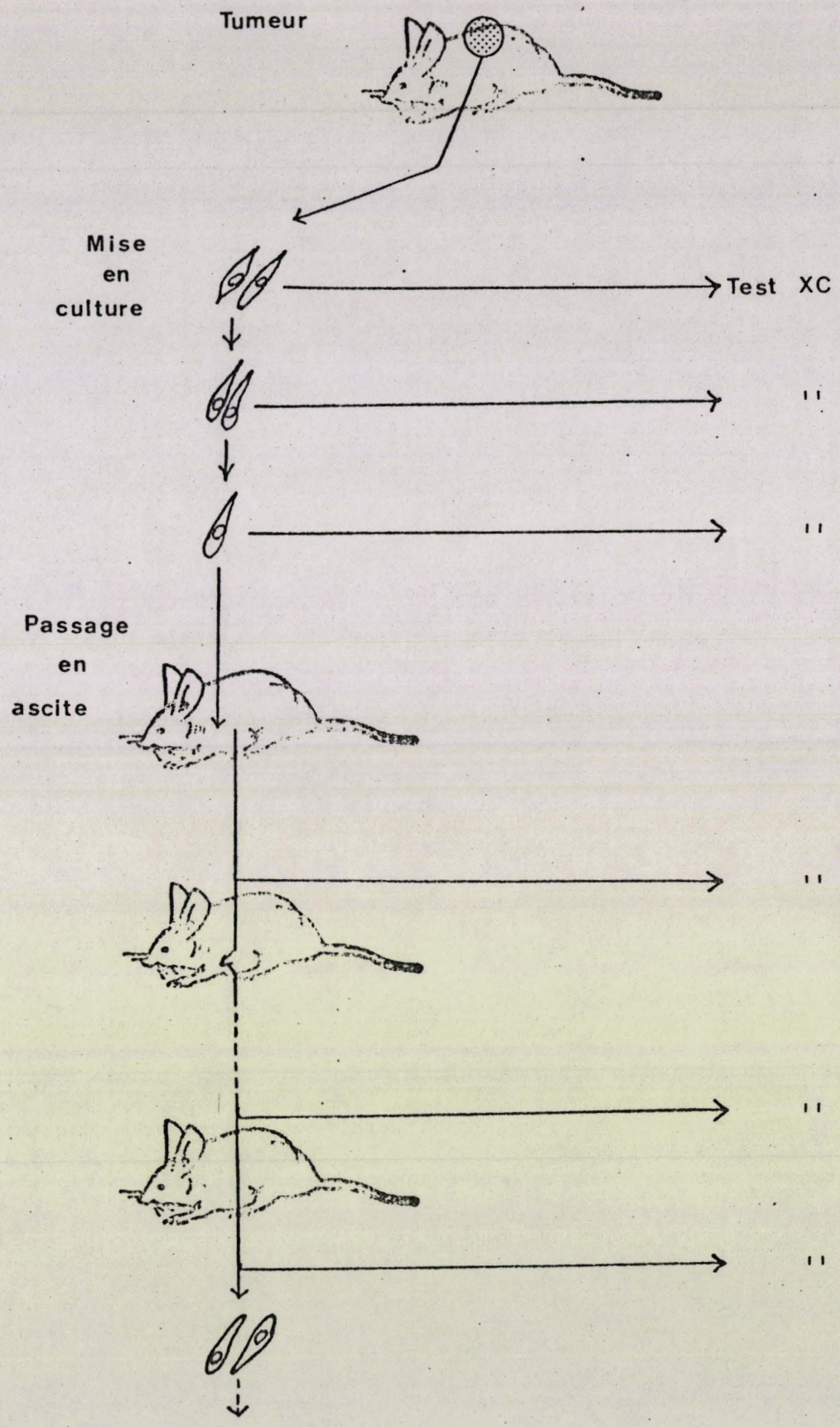


Figure 24. Schématisation du phénomène d'extinction-réapparition.

La tumeur originale a été mise en culture de tissus. A chaque subculture un test XC a été effectué. Puis, les cellules ont été injectées à l'animal, une ascite s'est développée; à chaque passage, un contrôle de production virale est effectué par le test XC. Les cellules ascitiques peuvent ensuite être remises en culture cellulaire.

in-vitro, c'est-à-dire en culture de tissus, toutes induisent la formation de polycaryons XC sauf la lignée 315 F1 qui en induit très peu (moins de 10 pour 10^6 cellules), la lignée la plus"active" est la lignée MF_2 (voir tableau VIII).

Après transfert in-vivo, une perte de la capacité d'induire des polycaryons a été rapidement observée (tableau IX) La lignée MF_2 qui est la plus active pour l'induction de syncytiums est aussi celle qui perd le plus lentement sa propriété et celle qui récupère le plus lentement son pouvoir inducteur in-vitro après l'avoir perdu lors du transfert in-vivo. Il faut enfin noter que la même lignée cellulaire réaquiert sa propriété d'induction plus rapidement lorsqu'elle est cultivée en monocouche (c'est-à-dire soumise à l'action de la trypsine lors des subcultures) que lorsqu'elle est cultivée en suspension.

Si l'on examine parallèlement la production des particules virales en microscopie électronique, les cellules MF_2 maintenues in-vivo présentent de très rares bourgeonnements et le rapport particules C/particules A est de 1 : 300 ; par contre, les cellules MF_2 cultivées in-vitro montrent beaucoup d'images de bourgeonnement et le rapport particulesC/particules A devient alors 450 : 300 (nos résultats et communication personnelle du Dr PENIT).

Ainsi, une disparition réversible de l'aptitude des cellules MF_2 à induire la formation de polycaryons suivant les conditions de culture est possible. Ceci rappelle les observations faîtes avec le virus de la leucémie de Gross lors de son passage in-vivo chez le rat. Un même phénomène d'extinction-réapparition d'un caractère phénotypique (l'antigène spécifique de groupe, gs 1) a été décrit par IOACHIM et coll (125) en utilisant des techniques d'immunofluorescence.

Dans notre cas, l'extinction-réapparition de l'aptitude des cellules à induire la polycaryocytose est parallèle à la non-production-production de particules virales de type C par la cellule MF_2. L'expression du génome viral semble

Tableau VIII

Influence des conditions de culture sur l'aptitude de diverses lignées cellulaires à induire la polycaryocytose.

Tumeur d'origine	Cellule	Culture in-vitro Nombre de syncytiums pour 10^6 cellules	Indice de fusion	Culture in-vivo Nombre de syncytiums pour 10^6 cellules	Indice de fusion
MOPC 173	Tumeur originale			5	1+
	MF2	5000	5+	5	1+
	173/2A	3000	4+	5	1+
MOPC 315	Tumeur originale			5	1+
	315 F1	10	1+	5	1+
	315/2A	1000	4+	5	1+

10^6 cellules XC ont été cocultivées avec 10^6 cellules à tester dans des boites de Pétri de 6 cm de diamètre. L'indice de fusion est fondé sur le nombre de cellules multinucléées et le nombre de noyaux par syncytium (JOHNSON et coll (126)). Dans cette échelle, quand les cocultures présentent un petit nombre de polycaryons renfermant très peu de noyaux, on donne l'indice +1; quand environ 50p100 des cellules XC sont fusionnées dans des polycaryons renfermant de 10 à 12 noyaux, on donne l'indice +3; l'indice +5 est donné quand toutes les cellules XC sont fusionnées dans des polycaryons renfermant plus de 20 noyaux.

Tableau IX

Perte et réacquisition successives de l'aptitude des cellules à induire la polycaryocytose

Lignée Cellulaire	Numéro d'expérience	Nombre minimal de passages pour obtenir		
		L'extinction in-vivo	La réacquisition in-vitro	
			Culture en monocouche	Culture en suspension
MF_2	1 2 3	3 4 4	9 7 7	16 10 14
173/2A	1 2	1 2	6 5	NT NT
315/2A	1 2	2 2	3 5	NT NT

NT : non testé - Seule la cellule MF_2 a été étudiée pour la réacquisition de la propriété d'induire la polycaryocytose en culture en suspension.

réprimée in-vivo par des facteurs immunologiques de l'hôte et déréprimée lors du passage in-vitro. Nous avons voulu approfondir l'étude de l'expression du génome viral en fonction des conditions de culture par des techniques biochimiques.

II. Etude biochimique de la régulation de l'expression du génome viral selon les conditions de culture.

Pour aborder ce problème, nous avons utilisé un DNA complémentaire du génome viral synthétisé par la réaction de transcription-inverse endogène, cDNA dont les caractéristiques sont décrites p.44 . Le cDNA nous a servi de sonde dans la recherche des séquences virales exprimées dans la cellule MF_2 suivant les conditions de culture (in-vivo ou in-vitro). Comme le RNA viral est polyadénylé, nous avons recherché son expression parmi les RNA possédant une séquence poly (A) extraits des cellules MF_2 cultivées soit in-vivo soit in-vitro.

A. Isolement des RNA possèdant une séquence polyadénylée :

Nous nous sommes inspiré des techniques d'isolement sur cellulose non-estérifiée décrites par KITOS et coll(127) et LARSEN et coll (128). Cet isolement est fondé sur la propriété qu'à la séquence poly (A) de prendre une configuration telle à haute force ionique qu'elle peut se fixer sur de la cellulose.

1. - Contrôle de l'efficacité du support utilisé :

Nous avons utilisé comme support la cellulose Cellex 410 (Biorad). Après un prétraitement (décrit p.119), son efficacité et sa spécificité ont été contrôlées de la manière suivante : du RNA viral a été isolé dans les conditions décrites figure 8B. Les fractions correspondant au RNA génomique viral

d'une part et aux espèces légères d'autre part ont été rassemblées, équilibrées en tampon H puis chromatographiées sur une colonne de Cellex 410.

Les résultats obtenus sont présentés sur la fig.25. Les espèces légères, non polyadénylées ne sont pas retenues sur la colonne alors que le RNA 70S, qui est polyadénylé, est retenu à 68p100. Une fraction du RNA génomique a été testée, parallèlement, pour son contenu en poly (A) sur filtre Millipore dans les conditions décrites par BRAWERMAN et coll (129). Les résultats sont résumés dans le tableau X.

La fraction du RNA 70S non retenue sur la colonne de cellulose ou sur filtre Millipore peut représenter soit des RNA légèrement dégradés, soit des RNA viraux non polyadénylés ainsi que le suggèrent les résultats de D'AURIOL et coll (130). En effet, selon ces auteurs, suivant les lots de sérum utilisés pour les cultures cellulaires, la qualité de la production virale varie notamment en ce qui concerne la polyadénylation des RNA lourds isolés des particules virales purifiées.

2. - Isolement des RNA cellulaires possèdant une séquence polyadénylée :

Le fractionnement des RNA totaux extraits à pH neutre des cellules MF_2 cultivées soit in-vivo soit in-vitro sur colonne de cellulose Cellex 410 est représenté sur la Fig. 26. Environ 7p100 des RNA ainsi fractionnés possèdent une séquence poly (A).

B. Recherche de l'expression du génome viral parmi les RNA polyadénylés suivant les conditions de culture

Les RNA possèdant une séquence poly (A) isolés des

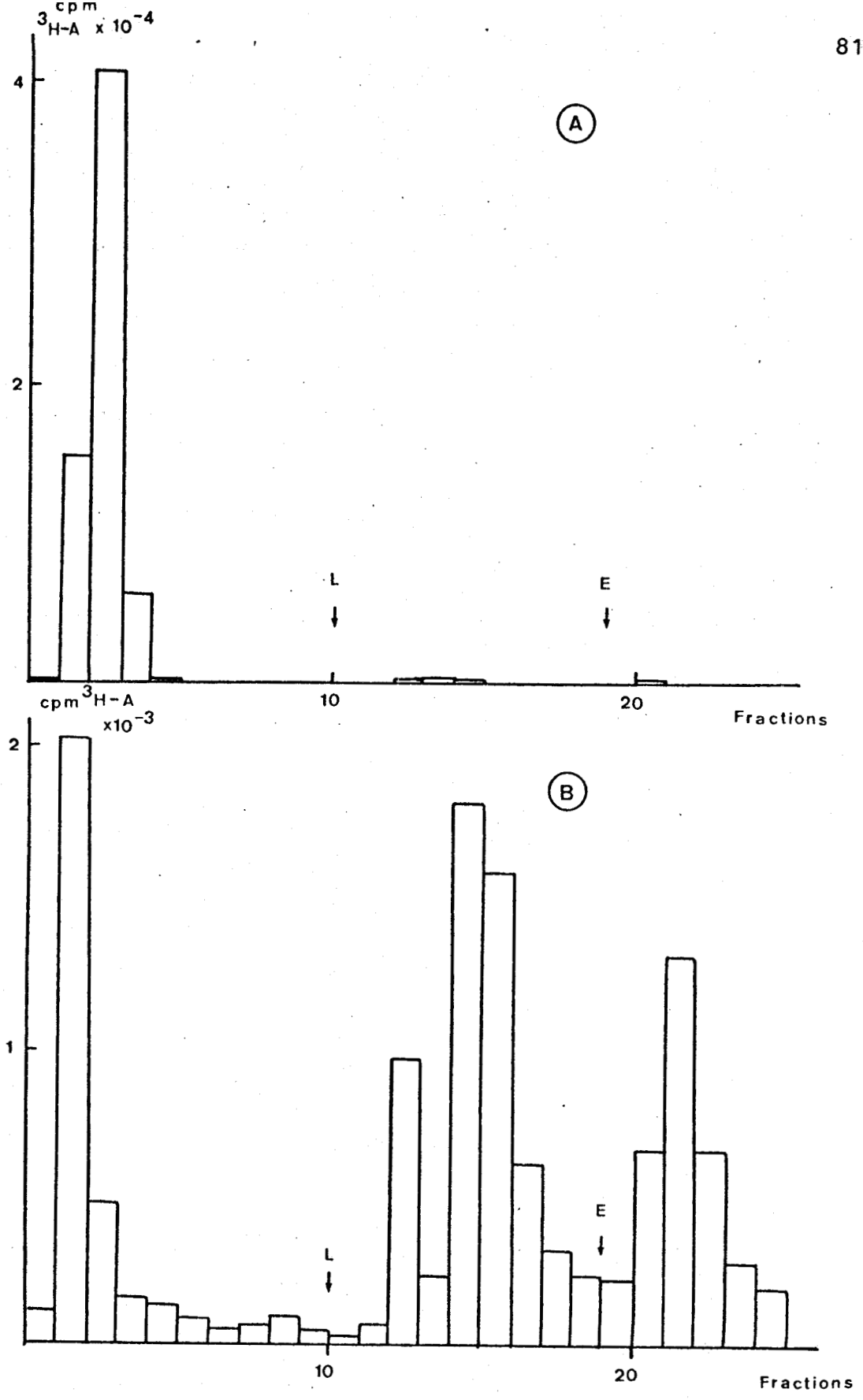


Figure 25. Contrôle de l'efficacité de la cellulose utilisée pour isoler les RNA possédant une séquence polyadénylée.

A. Profil d'élution d'espèces légères isolées de particules virales.

B. Profil d'élution du RNA de haute masse moléculaire.

Colonne de 2 ml. Débit 4 ml/h. Fractions : 2 ml Radioactivité précipitable à l'acide trichloracétique.

Les flèches indiquent les changements de tampon. 1-10 Tampon H, 11-18 : tampon L, 19-24 : eau.

Tableau X

Contrôle de la spécificité et de la sélectivité de la cellulose Cellex 410 (en pourcentage de radioactivité)

RNA	Cellex 410			Millipore
	Tampon H	Tampon L	Eau	KCl 0,5 M
RNA 4 à 10 S	95,5	2,1	1,5	--
RNA 70 S	22,5	42,3	25,3	62,5

Ces valeurs correspondent à une chromatographie telle que celle décrite dans la figure 25.

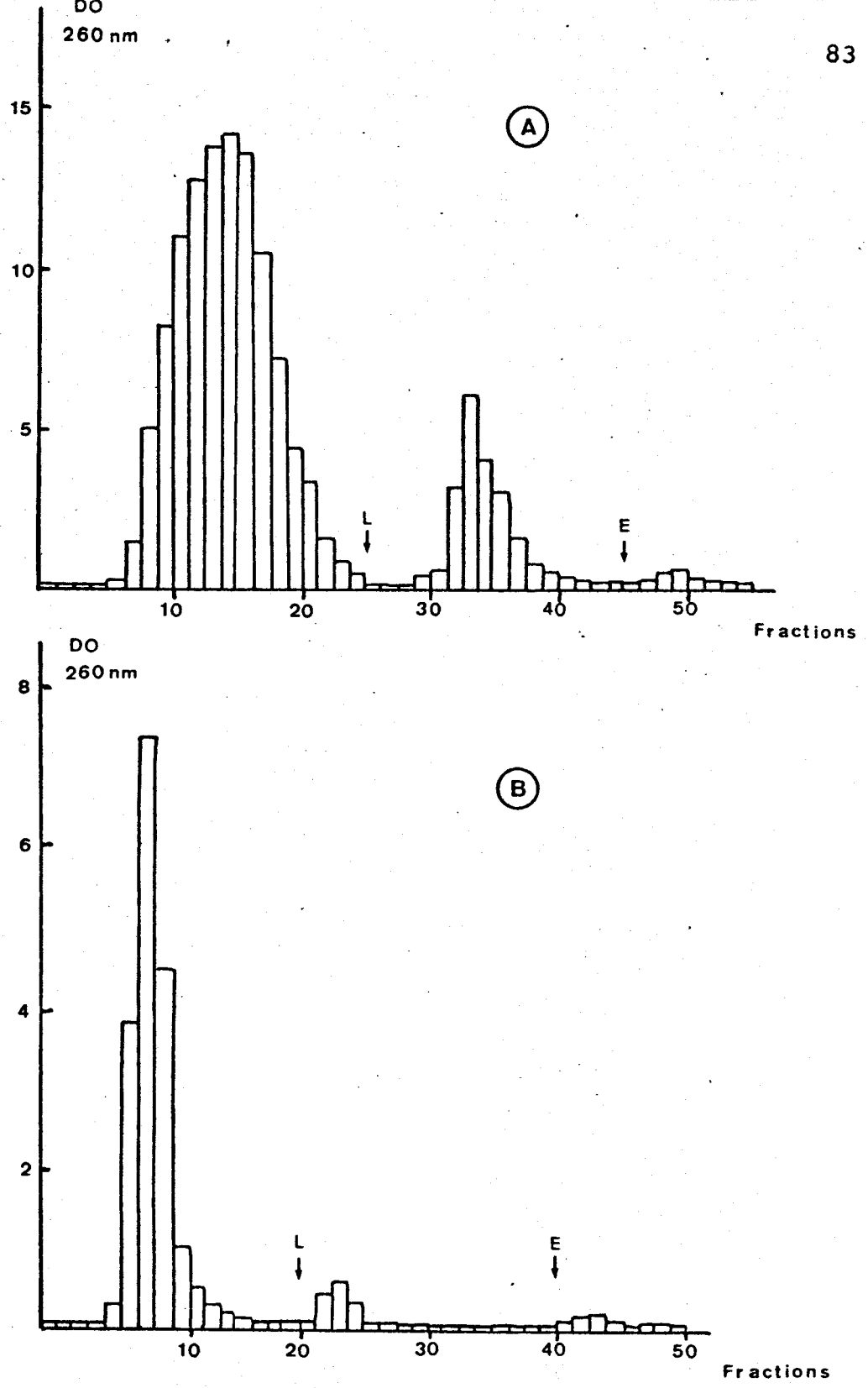


Figure 26. Fractionnement de RNA cellulaires sur colonne de Cellex 410.

A. RNA de cellules MF_2 cultivées in-vitro.Dépot 20 mg.
B. RNA de cellules MF_2 cultivées en ascite.Dépot 10 mg

Débit : 3 ml/h. Fractions de 1,1 ml. Les flèches indiquent les changements de tampon. (voir légende de la fig.25)

cellules MF_2 cultivées soit in-vivo soit in-vitro ont été hybridés avec notre sonde. Des quantités croissantes de RNA ont été hybridées avec une quantité fixe et déterminée de cDNA (2000 cpm soit environ 0,1 ng). Les taux d'hybridation ont été déterminés par la fraction du cDNA qui résiste à l'hydrolyse par la nucléase S-1, c'est-à-dire la fraction du cDNA qui est hybridée avec le RNA polyadénylé.

On a pu déterminer (fig.27) que le RNA riche en séquences poly (A) de cellules MF_2 cultivées in-vitro montre un taux d'hybridation de 45p100 lorsque 50 µg de RNA sont ajoutés alors qu'une valeur de 19p100 seulement est atteinte pour une même quantité de RNA riche en poly (A) extrait de cellules MF_2 maintenues en ascite. Les RNA riches en poly (A) extraits de fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c ou SWISS utilisés comme contrôles donnent des taux d'hybridation résiduelle de 4 et 6p100 respectivement.

Les séquences virales semblent donc être plus exprimées dans les cellules MF_2 cultivées in-vitro que dans les cellules maintenues in-vivo. Cependant, ce type d'hybridation ne nous permet pas de trancher entre une différence qualitative ou quantitative dans l'expression du RNA génomique viral. En d'autres termes, les mêmes séquences sont-elles exprimées en nombre plus grand ou d'autres séquences sont-elles exprimées in-vitro ?

Nous ne pouvons répondre à cette question car les particules virales produites par les cellules issues des myélome ont été décrites comme formées d'au-moins 3 populations (AOKI et coll (131)) et notre sonde représente un DNA complémentaire du stock viral produit par la cellule MF_2. Enfin, il faut remarquer que plusieurs facteurs peuvent influer sur la perte de l'effet cytopathogène de la cellule MF_2 maintenue en ascite et qu'il n'y a peut-être pas une relation directe entre

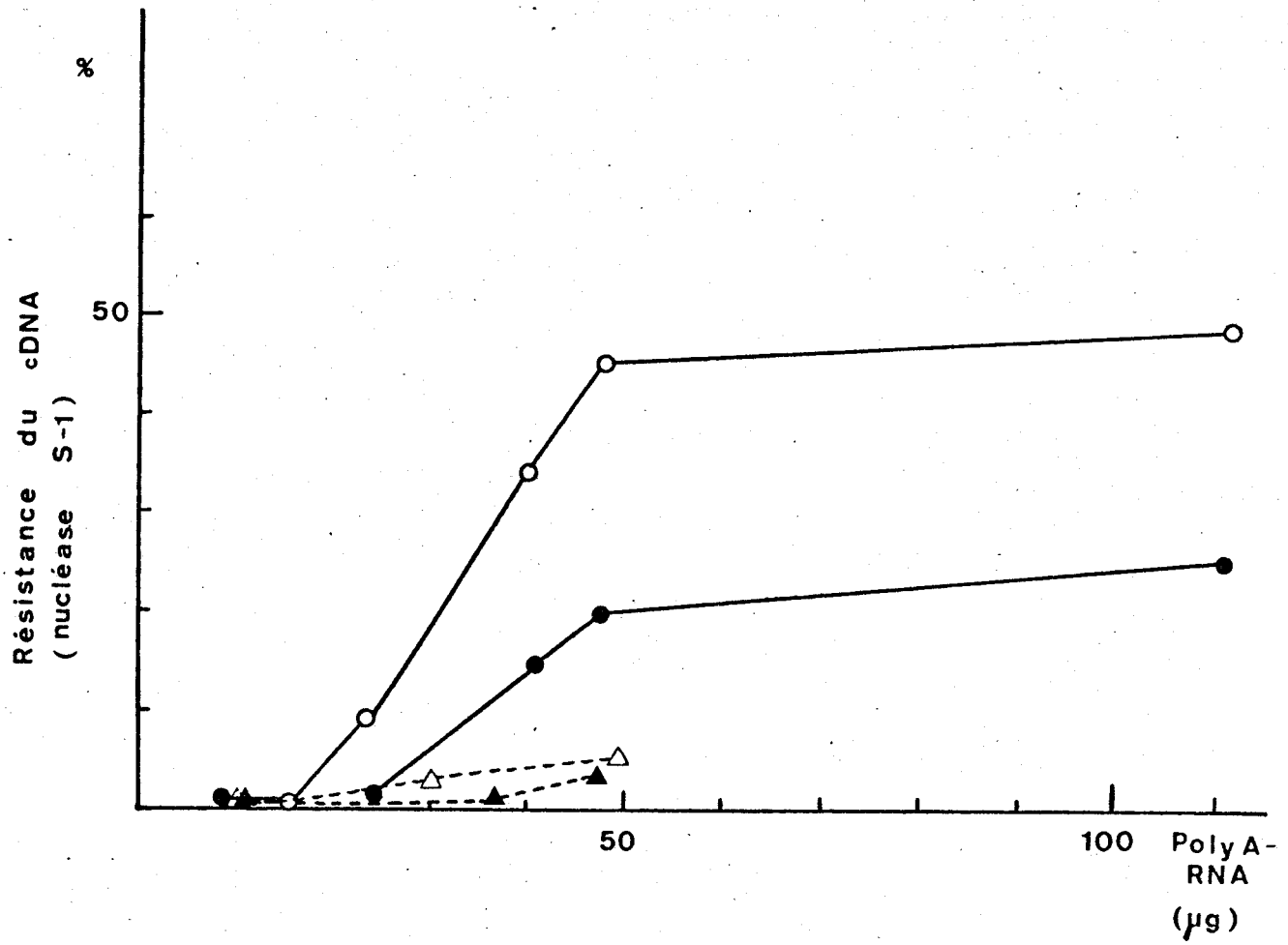


Figure 27. Hybridation du cDNA avec différents RNA cellulaires possèdant une séquence polyadénylée.

Des quantités croissantes de RNA polyadénylé ont été hybridées avec une quantité fixe et déterminée de cDNA tritiée (≃ 2000 cpm soit environ 0,1 µg). l'hybridation s'est déroulée dans des micropipettes scellées, à 68°C pendant 72 h dans du tampon 4 x SSC, tris 0,01 M ph 7,4. Les taux d'hybridation ont été déterminés par résistance à l'hydrolyse des hybrides par la nucléase S-1.

- o—o RNA polyadénylé de cellules MF2 cultivées in-vitro.
- ●—● RNA polyadénylé de cellules MF2 cultivées en ascite.
- △···△ RNA polyadénylé de fibroblastes embryonnaires de souris SWISS.
- ▲···▲ RNA polyadénylé de fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c.

l'expression génomique virale et la fusion de cellules XC, il est possible que les deux mécanismes soient liés de façon indépendante à un autre évènement cellulaire encore inconnu.

4.- ESSAIS DE CARACTERISATION DES PARTICULES PRODUITES PAR LA CELLULE MF_2.

Plusieurs populations virales ont été décrites dans les stocks produits par des cellules issues de plasmocytome murin. Pour AOKI et coll (132), il y a au-moins trois populations virales associées aux myélomes :
- une de type leucémie de Gross.
- une dîte associée aux myélomes murins (MuMAV) caractérisée par un antigène d'enveloppe spécifique de type dit xVEA.
- d'autres populations non déterminées.

Nous avons tenté de caractériser ces diverses populations dans nos stocks viraux par trois approches :
- l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle selon LAURELL (133).
- l'inhibition de la formation de syncytiums XC.
- les recherches de séquences virales spécifiques par hybridation moléculaire.

I. Technique de LAURELL.

L'avantage de cette technique est qu'elle permet une détermination qualitative et quantitative des antigènes que l'on veut étudier. Nous avons donc préparé chez le lapin des immunsérums:

- contre des extraits de diverses cellules productrices de virus : MF_2, 78 A_1, E81, organes de souris AKR agées (qui renferment des antigènes du virus de la leucémie de Gross).
- contre des extraits de cellules de souris $C_{57}Bl/6$ utilisés comme contrôle.
- contre des particules virales, purifiées par deux

cycles d'ultracentrifugation à l'équilibre en gradient de saccharose, provenant de la lignée MF_2 ou de la lignée 78 A_1.

Les résultats se sont révélés être ininterprétables car lors du contrôle de spécificité de nos sérums (fig.28) le sérum considéré comme étant dirigé contre les particules virales produites par la cellule MF_2 s'est révélé être anti-protéïnes du sérum de veau (utilisé pour la culture).

Ceci rejoint les constatations faîtes par TARONE et COMOGLIO (134) au sujet de l'adsorption des polypeptides du sérum à la surface des cellules en culture. Les immunoglobulines sériques présentes, malgré deux cycles d'ultracentrifugation à l'équilibre de nos particules virales se sont donc révélées être plus immunogènes que les polypeptides viraux.

II. TYPAGE DES PARTICULES PAR INHIBITION DE LA FORMATION DE SYNCYTIUMS XC. *

Si la production de particules virales leucémogènes ou l'expression de certains de leurs antigènes à la surface des cellules productrices sont responsables de la polycaryocytose observée par coculture avec la cellule XC, un masquage de ces sites par des immunsérums spécifiques devrait inhiber l'effet cytopathogène. Nous avons donc incubé des cellules MF_2 avec divers immunsérums et effectué un test XC avec ces cellules

Les résultats de telles expériences sont résumés dans le tableau XI. Après le sérum anti-cellules MF_2, le sérum anti-virus de Gross est le plus efficace pour l'inhibition de la formation de syncytiums XC. L'inhibition est nettement moins grande avec les sérums anti-virus de Graffi et anti-virus de Moloney.

Il semble donc qu'une fraction de nos stocks viraux soit constituée de particules virales de type leucémie de Gross,

* Nous remercions vivement le Professeur J.P.LEVY qui nous a fourni les sérums anti-Gross, anti-Graffi et anti-Moloney. Ces sérums ont été préparés selon la méthode décrite par GOMARD et coll (135).

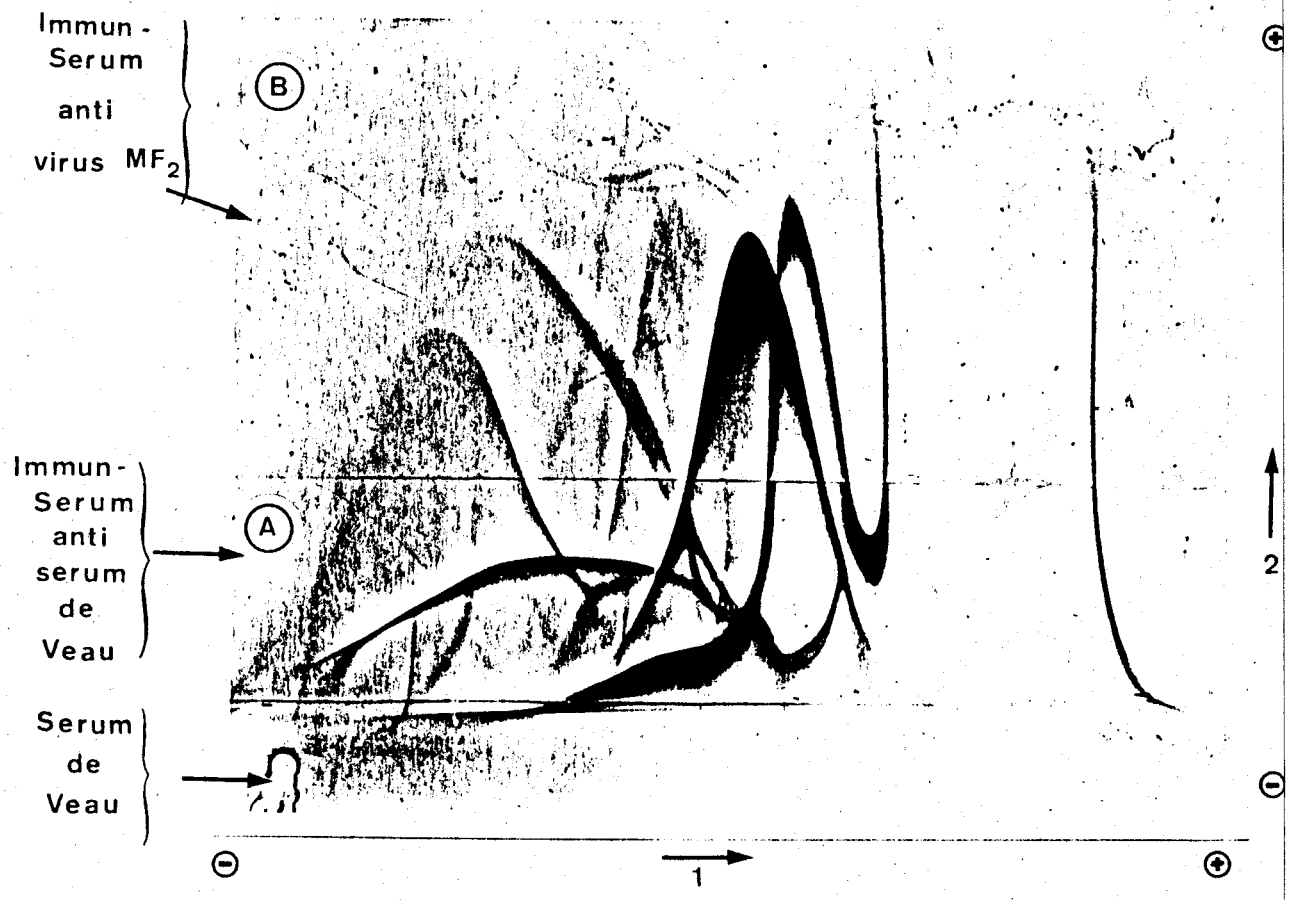


Figure 28. Immunoélectrophorèse bidimensionnelle selon LAURELL

5 µl de sérum de veau ont été soumis à une première électrophorèse dans un gel d'agarose à 1p100 (Tampon Véronal, force ionique 0,02 pH 8,6), pendant 70 minutes sous une différence de potentiel de 10 V/cm.

Une seconde migration est alors effectuée dans une direction perpendiculaire à la première. Le gel A renferme 100 µl d'immunsérum de lapin anti-globulines du sérum de veau, le gel B renferme 300 µl de sérum de lapin anti-particules virales de la cellule MF_2 migration pendant 16 h sous une différence de potentiel de 3 V/cm dans le tampon véronal.

Tableau XI

Typage des particules virales par inhibition de la formation de syncytiums XC

Traitement (dilution du sérum)	Temps de préincubation (en minutes)	Nombre de syncytiums pour 3 x 103 cellules MF_2*	Pourcentage d'inhibition
Cultures non traitées		240	—
Sérum de souris Balb/c anti-cellule MF_2 (1 : 10)	0	104	57
	15	80	67
	60	20	92
Sérum de rat anti-virus de Gross (1 : 10)	60	25	90
Sérum de souris anti-virus de Graffi (1 : 10)	60	180	25
Sérum de souris anti-virus de Moloney (1 : 10)	60	196	23
Sérum de rat témoin (1 : 10)	60	237	0
Sérum de souris témoin (1 : 10)	60	228	0

$3x10^3$ cellules MF_2 ont été cocultivées avec $25x10^3$ cellules XC dans des puits de plaque Microtest II (Falcon) sous un volume final total de 200 µl. Le sérum a été ajouté aux cellules MF_2 avant ou au moment de la coculture. Après la préincubation, l'excès de sérum a été éliminé par deux lavages avec du milieu de culture.

* Moyenne de 6 numérations correspondant à 3 expériences différentes.

Ceci est en accord avec les résultats obtenus par AOKI et coll (136). Cependant, à la dilution de l'immunsérum anti-virus de Gross utilisé ici, on ne peut pas définir si des anticorps de ce sérum de rat dirigés contre l'antigène d'enveloppe virale commun à tous les virus murins (dont le xVEA des virus associés aux myèlomes murins) n'ont pas réagi avec les antigènes de surface de la cellule MF_2 provoquant une inhibition de l'effet cytopathogène plus importante qu'avec un immunsérum anti-virus de Gross vraiment monospécifique (sérum qui est très difficile à obtenir).

III. Parenté entre les particules virales produites par la cellule MF_2 et les virus endogènes de la souris Balb/c.

Nous avons pu mettre en évidence un taux d'hybridation résiduel entre notre sonde et des RNA polyadénylés extraits de fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c (voir fig.27). Ces résultats pouvaient suggérer l'expression d'une (ou plusieurs) population (s) virale (s) endogène (s) par la cellule MF_2.

Nous avons hybridé notre sonde avec des RNA extraits soit de cellules MF_2 soit de fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c et nous avons recherché l'expression de séquences virales dans le RNA total et dans le RNA riche en séquences polyadénylées. Les résultats obtenus (fig.29) montrent que le RNA total extrait des cellules MF_2 hybride plus rapidement (plateau atteint pour 650 µg de RNA) et plus efficacement (100p100 d'hybridation) avec notre sonde que ne le fait le RNA total extrait de fibroblastes embryonnaires (980 µg et 70p100 respectivement). Le taux maximal d'hybridation obtenu avec le RNA possédant une séquence poly (A) extrait de fibroblastes embryonnaires est de 27p100 (pour 110 µg de RNA) ; alors qu'une même quantité de RNA polyadénylé extrait de cellule MF_2 protège totalement notre sonde de l'action de la nucléase S-1.

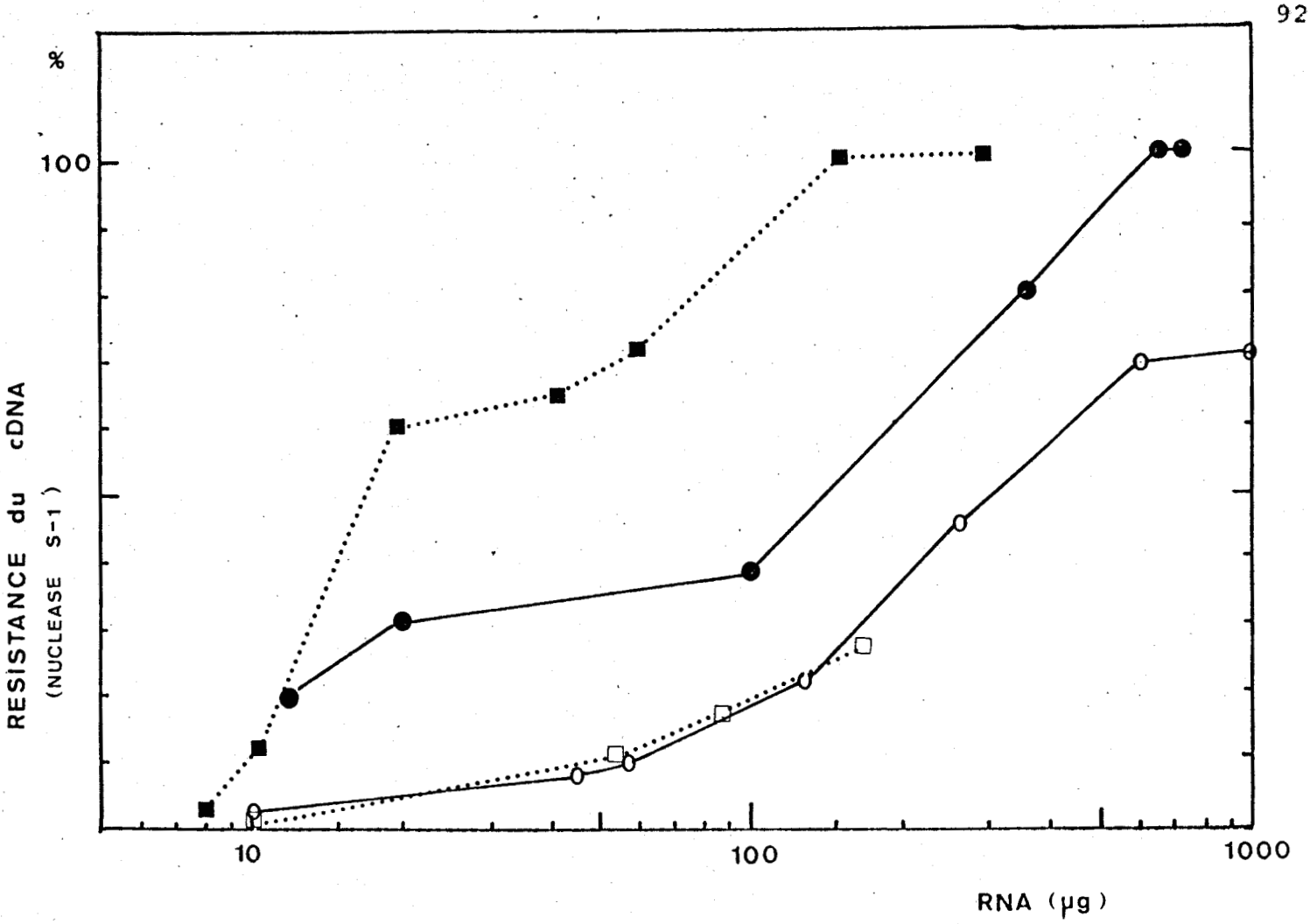


Figure 29. Hybridation du cDNA avec différents RNA cellulaires extraits de cellules MF2 et de fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c.

Le taux d'association d'une quantité constante de cDNA tritié (2800 cpm) avec des quantités croissantes de divers RNA cellulaires a été mesuré par le taux de résistance à l'hydrolyse par la nucléase S-1. Les hybridations ont eu lieu dans des pipettes scellées, à 68°C, pendant 72 heures dans du tampon 4xSSC, Tris 0,01M pH 7,4 sous un volume final de 200 µl.

●—● RNA total extrait de cellules MF_2.
o—o RNA total extrait de fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c.
■····■ RNA polyadénylé extrait de cellules MF_2.
□····□ RNA polyadénylé extrait de fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c.

Il semble donc que les séquences génomiques des virus produits par la cellule MF_2 soient exprimées dans les fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c sous une forme non-polyadénylée. La dérepression de la production de particules virales lors du développement d'un myélome pourrait alors être la conséquence de la polyadénylation de certaines séquences polyribonucléotidiques, polyadénylation qui permettrait à ces séquences d'être traduites en protéïnes et un bourgeonnement des particules virales à la surface de la cellule.

Il reste à déterminer si les séquences virales révélées par notre sonde dans les fibroblastes embryonnaires sont reliées aux virus endogènes de la souris Balb/c déjà décrits : le virus Balb/v:1 et le virus Balb/v:2. Pour ce faire, nous avons induit la production de ces virus à partir de fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c en traitant ces cellules à l'iododésoxyuridine (25 µg/ml de milieu de culture). L'efficacité de l'induction a été vérifiée de la manière suivante :

Nous avons cocultivé une fraction des fibroblastes induits pendant 4 jours (pic dans la production du Balb virus :2) avec des cellules de rein de rat (NRK) qui sont permissives au virus Balb/v:2 et servent de système amplificateur pour la production de ce virus. Après 15 jours de coculture, les surnageants clarifiés ont été ultracentrifugés sur un coussin de glycérol à 20p100 dans le tampon NTE et le culot obtenu a été incubé dans les conditions décrites p.120 afin de déterminer l'activité de transcriptase inverse exogène de ces culots. Nous avons utilisé comme témoin positif des surnageants de coculture de fibroblastes embryonnaires de souris NZB (qui mis en culture produisent spontanément un virus endogène ayant le même tropisme que le virus Balb/v:2 et de cellules de rein de rat). Dans les deux cas (fig.30), une activité transcriptasique exogène a été mise en évidence, l'induction de la production de particules virales endogènes

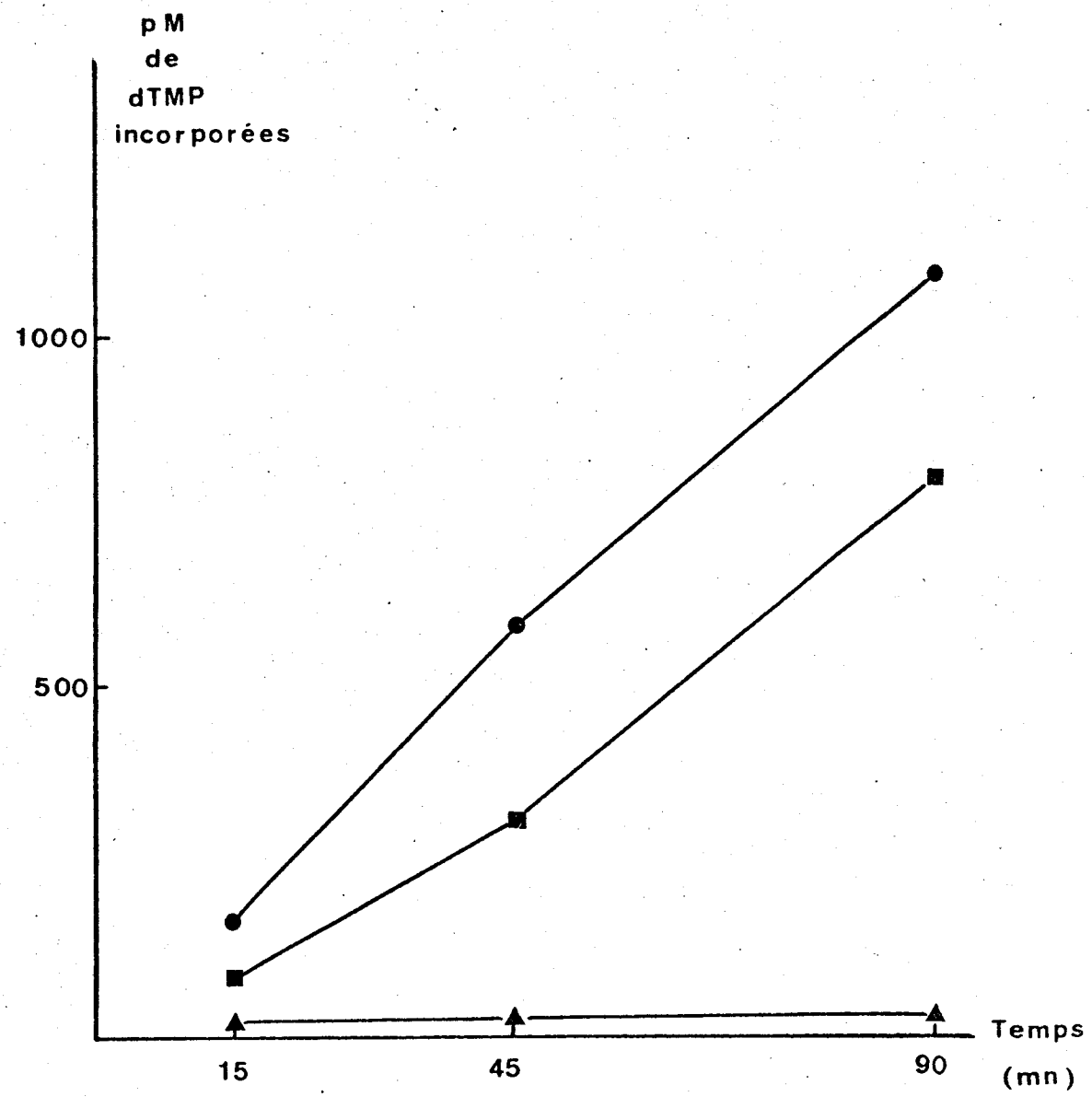


Figure 30. Contrôle de l'efficacité de l'induction de virus endogènes par traitement à l'IUdR de fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c.

L'activité de transcriptase inverse des surnageants de culture a été déterminée.

■—■ Activité des surnageants de coculture de fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c induits par l'IUdR et de cellules de rein de rat.

●—● Activité des surnageants de coculture de fibroblastes embryonnaires de souris NZB et de cellules de rein de rat.

▲—▲ Activité des surnageants de culture de fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c non induits.

par les fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c par l'iododésoxyuridine pouvait donc être considérée comme correcte.

Nous avons extrait les RNA de fibroblastes induits et nous les avons sous-fractionnés en espèces possédant une séquence polyadénylée et en espèces ne la possédant pas. Les résultats obtenus (tableau XII) montrent que les taux d'hybridation entre les espèces homologues de RNA extraits de fibroblastes induits ou non et notre sonde sont comparables.

Il semble donc que les populations virales exprimées par la cellule MF_2 ne soient pas reliées au virus Balb/v:2 (ni au virus Balb/v:1 qui est déjà un peu exprimé après 4 jours d'induction). Mais il se peut que l'expression des génomes des virus endogènes qui sont défectifs pour certaines fonctions se fasse sous forme non-polyadénylée. Pour élucider ce point, il faudrait disposer de DNA complémentaires spécifiques des génomes de ces virus endogènes.

Tableau XII

Essai de détermination d'une parenté entre les particules virales de type C et les virus endogènes de la souris Balb/c par hybridation moléculaire

Cellule d'origine	Sous-espèce de RNA	Quantité de RNA hybridée	Pourcentage d'hybridation
Fibroblaste embryonnaire de Balb/c	Total Polyadénylé Non-polyadénylé	225 µg 55 µg 125 µg	28,8 8,6 9,7
Fibroblaste embryonnaire de souris Balb/c induit par l'IUdR pendant 4j. (présence de Balb/virus:2)	Total Polyadénylé Non polyadénylé	225 µg 55 µg 125 µg	29,7 10,38 8,7
Fibroblaste embryonnaire de souris Balb/c induit par l'IUdR pendant 12 j. (présence de Balb/virus:1)	Total	225 µg	26,6

CONCLUSION

Nous avons pu montrer que les particules virales de type C produites par une lignée cellulaire issue d'un plasmocytome murin sont en tout point comparables, du point de vue biochimique aux autres rétrovirus murins (complexe leucémie-sarcome de Moloney par exemple). Leurs principales caractéristiques biochimiques sont :

Une densité apparente de 1,16 g/cm^3 en ultracentrifugation à l'équilibre dans un gradient de densité de saccharose.

Une composition en protéïnes de structure montrant 6 polypeptides majeurs.

Un RNA génomique de haute masse moléculaire.

Une activité DNA polymérasique-RNA dépendante.

D'autre part, la production de ces particules peut être modulée en fonction des conditions de culture de la lignée productrice. Cette modulation est parallèle à l'activité biologique de la cellule productrice, activité qui est l'aptitude à induire la polycaryocytose lors de la coculture de la lignée MF_2 avec la lignée XC. Nous avons effectué une étude détaillée de cet effet cytopathogène qui nous a permis de montrer que le développement des syncytiums s'effectue par fusion de cellules XC à un hétérocaryon formé par la fusion primitive d'une cellule XC et d'une cellule MF_2. Il nous a été possible de mettre en évidence par des techniques d'immuno-microscopie et de cryodécapage une redistribution des sites cellulaires de surface sur toute la périphérie du polycaryon Enfin, nous avons pu préciser qu'une production normale de particules virales par la lignée MF_2 était indispensable pour produire et développer l'effet cytopathogène, ceci par l'utilisation d'inhibiteurs des synthèses de macromolécules ou par l'utilisation du DNA complémentaire du génome de nos particules virales.

Les essais de typage des particules virales, produites par la lignée MF_2 par des méthodes immunologiques ou biochimiques nous ont amené aux constatations suivantes : il semble qu'une partie de la production virale soit constituée de particules apparentées au virus de la leucémie de Gross (ceci rejoint les études d'AOKI et coll (137)). D'autre part, des séquences ribonucléïques apparentées à celles du génome de nos virus sont exprimées sous une forme non-polyadénylée dans les fibroblastes embryonnaires de souris Balb/c. Ainsi, un virus cryptique est peut-être exprimé par la cellule MF_2, cette expression ne serait que partielle dans les fibroblastes embryonnaires de souris. Ceci rappelle les hypothèses de GILLESPIE et GALLO (138) concernant l'expression des RNA génomiques viraux dans les cellules. Selon eux, cette expression se ferait suivant une voie parallèle à celle des RNA messagers cellulaires (il existe de nombreuses analogies entre les RNA messagers et les RNA génomiques viraux), voie qu'ils dénomment "paraprocessing" et qui pourrait expliquer la transformation cellulaire, la production virale ou même la différenciation.

Les résultats que nous venons de résumer sont pour certains fragmentaires ou incomplets et ceci pour plusieurs raisons :

Nous avons voulu aborder la définition de ces particules par une étude pluridisciplinaire, chaque voie d'approche constituant une étude en soi.

De nombreuses techniques ont été mises en oeuvre dont certaines nécessitaient l'obtention de grandes quantités de matériel cellulaire ou viral purifié,

Pour les expériences d'hybridation moléculaire , nous ne pouvions pas préparer des sondes spécifiques de chaque rétrovirus murin, en particulier des virus endogènes de la souris Balb/c, de plus les résultats obtenus par cette méthode ne nous permettent pas de déceler des différences inférieures à 5p100 entre deux espèces.

Un manque en réactifs immunologiques spécifiques ne nous a permis que des approches du typage de nos particules par ces méthodes.

Si nous avons pu cerner les divers aspects abordés dans la caractérisation des particules virales de type C produites par la lignée MF_2, nous n'avons pas pu donner une réponse définitive à ce problème. Ainsi, il faudrait développer l'étude des polypeptides viraux notamment celle des antigènes spécifiques d'espèce pour pouvoir typer les particules. Si les recherches sur les rétrovirus s'orientent maintenant plus particulièrement vers l'étude des polypeptides et de leur antigénicité, notamment par le radio-immuno-essai, qui sont des techniques plus sensibles et plus précises que les techniques d'hybridation moléculaire, ces dernières ont toujours leur intérêt dans l'étude de l'évolution des gènes tumoraux (BENVENISTE et TODARO (139)), dans l'étude de la régulation de la production des particules virales ou même dans l'étude du rôle que pourraient jouer les virus endogènes dans la régulation de la physiologie et de la différenciation cellulaires (voir REANNEY (140) par exemple).

En effet, même si le rôle des rétrovirus dans le développement de certaines tumeurs n'est pas toujours clairement défini, leur étude demeure très intéressante pour les modifications métaboliques qu'ils entrainent lors de l'infection d'une cellule ou lors de leur activation dans une cellule apparemment saine. Le rôle que pourraient jouer les virus écotropiques ou xénotropiques dans le développement tumoral, l'embryogénèse, la différenciation cellulaire ou dans les maladies auto-immunes (LEVY (141)) mérite d'être élucidé.

APPENDICE TECHNIQUE

1. - REACTIFS GENERAUX ET METHODES DE DOSAGE.

I. Réactifs généraux.

Les solutions suivantes ont été d'un emploi très fréquent dans les techniques qui vont être décrites.

A. Tampon phosphate isotonique P.B.S. :

0,15	M	NaCl
3	mM	KCl
8	mM	Na_2HPO_4
15	mM	KH_2PO_4
0,5	mM	$MgCl_2,6H_2O$
1	mM	$CaCl_2$ pH 7,4 - 7,5

B. Tampon citrate 1xSSC :

0,15	M	NaCl
0,015	M	Citrate trisodique

C. Tampon NTE :

0,1	M	NaCl
0,01	M	Tris/HCl pH 7,4
0,001	M	EDTA

II. Milieux scintillants pour la détermination de la radioactivité.

A. Milieu à base de toluène :

5	g	P.P.O. (2,5 diphényloxazol)
0,3	g	P.O.P.O.P. (1,4-di(2-5)-phényloxazolyl) benzène)
1000	ml	Toluène

B. Liquide de BRAY (142) :

60	g	Naphtalène
4	g	P P O
0,2	g	P O P O P
20	g	éthylène-glycol
100	ml	éthanol
		Dioxane qs 1000 ml

III. Méthodes de dosage.

A. Dosage de protéïnes :

Toutes les concentrations en protéïnes ont été déterminées par la méthode de LOWRY et coll (143) en utilisant le sérum albumine comme protéïne de référence.

B. Estimation de la concentration en DNA ou en RNA:

Elle est effectuée par spectrophomètriedans l'ultra-violet à 260 nm par rapport aux valeurs de référence suivantes :

Pour le DNA- 1 DO_{260}^{1cm} correspond à une concentration de 50µg/ml double-brin

Pour le RNA 1 DO_{260}^{1cm} correspond à une concentration de 40µg/ml

C. Détermination de la radioactivité des échantillons:

La radioactivité des échantillons a été évaluée :

- soit par comptage direct d'une aliquote dans la solution de BRAY.
- soit après précipitation des macromolécules par l'acide trichloracétique (TCA, 10p100 concentration finale) pendant 30 minutes à +4°C en présence de sérum albumine (concentration finale : 50 µg/ml) utilisée comme entraineur. Les précipités sont recueillis par filtration sur filtres en fibre de verre (Whatman GF/c), lavés 5 fois par une solution d'acide trichloracétique à 5p100 froid et 3 fois avec de l'éthanol absolu froid ; après séchage, ils sont comptés dans 8 ml de milieu scintillant à base de toluène.

2. - CULTURES CELLULAIRES.

I. Lignées utilisées.

Les trois lignées cellulaires qui ont été utilisées sont :

- la lignée MF_2* obtenue par le Dr PARAF (144) à partir du plasmocytome MOPC 173 de la souris Balb/c.
- la lignée $78A_1$* qui est une cellule de rat transformée et productrice du complexe leucémie-sarcome de Moloney (BERNARD et coll (145)). Cette cellule produit environ une particule sarcomatogène pour 100 à 1000 particules leucémogènes.
- la lignée XC* qui est une cellule de rat transformée par le virus du sarcome de ROUS, souche Prague (SVOBODA (146)).

Ces lignées ont été maintenues en culture en monocouche dans du milieu minimum d'EAGLE (147) renfermant 1,5 fois la concentration normale en aminoacides et en vitamines (MEM 1,5) supplémenté avec 10p100 de sérum de veau décomplémenté. Les subcultures sont réalisées par dissociation des cellules dans une solution isotonique d'EDTA tamponnée.

La cellule MF_2 a été adaptée (par C. LAGROU en notre laboratoire) à la culture en suspension agitée par remplacement progressif du milieu MEM par du milieu MEM modifié par JOKLIK pour la culture en suspension, (J-MEM), le J-MEM est supplémenté avec 5p100 de sérum de cheval décomplémenté.

Nous avons également utilisé des fibroblastes embryonnaires de souris de première explantation. Ces cultures

* Nous adressons nos plus vifs remerciements aux Docteurs PARAF, PERIES et HILL qui nous ont, respectivement, procuré les lignées MF_2, $78A_1$ et XC.

ont été établies de la manière suivante : les embryons (agés de 17 à 19 jours) sont prélevés stérilement in-utéro. Ils sont alors décapités, mélectomisés puis éviscérés. Après dilacération, ils sont soumis à un traitement par la trypsine (trypsine 1/250 Difco, solution à 2,5p1000 dans la solution saline de PUCK (148) pendant 30 minutes à 37°C. Le lysat est alors filtré sur gaze et les cellules ainsi obtenues sont maintenues en culture dans du MEM 1,5.

II. Induction de polycaryons.

Pour les contrôles de production de particules virales nous avons utilisé le test XC de ROWE et coll (149). Des cellules productrices de virus leucémogènes cocultivées avec des cellules XC induisent la formation de syncytiums formés essentiellement de cellules XC fusionnées. La cellule MF_2 a les mêmes propriétés d'induction de syncytiums XC (LEFEBVRE et LEMAY (150)).

Pour les études cytologiques et ultrastructurales, l'induction de polycaryons est effectuée dans des flacons de culture en plastique (Falcon plastics) soit de 30 cm^2 (dans ce cas $1,2x10^6$ cellules XC sont cocultivées avec $1,2x10^6$ cellules MF_2), soit de 75 cm^2 dans ce cas $3x10^6$ cellules XC sont co-cultivées avec $3x10^6$ cellules MF_2.

Pour les études d'inhibition de syncytiums, une microméthode a été développée. L'induction a lieu dans des plaques Microtest II (Falcon plastics). Pour avoir un nombre interprétable de syncytiums $3x10^3$ cellules MF_2 sont mélangées à $25x10^3$ cellules XC sous un volume final de 0,2 ml de milieu.

III. Marquage des cultures cellulaires et des particules virales par des traceurs radioactifs.

La production de particules virales marquées par les

traceurs radioactifs a été réalisée dans les conditions suivantes :

- marquage du RNA par les nucléosides ou les bases tritiés (Uridine ^{3}H-5, activité spécifique 25 Ci/mM et adénine ^{3}H-2, activité spécifique 19 Ci/mM, C E A). Le précurseur est simplement ajouté dans le milieu de culture. Le plus souvent, on utilise des doses de 5 ou 10 µCi/ml de milieu de culture.
- marquage des acides ribonucléïques par le radiophosphore (acide phosphorique en solution HCl 0,01N, C E A). Le milieu de culture utilisé a une concentration en phosphates abaissée à 10^{-5}M et le sérum qui supplémente le milieu a été préalablement dialysé extensivement contre du sérum physiologique ceci permet d'obtenir des activités spécifiques élevées pour le RNA génomique viral. On ajoute le plus fréquemment 20 µCi du traceur par millilitre de milieu.
- marquage des polypeptides par la leucine tritiée(activité spécifique 55 Ci/mM,Amersham). Le milieu de culture est appauvri au 1/10^{e} de la concentration normale en leucine. Le marquage est effectué avec des quantités de 5 ou 10 µCi de leucine radioactive par millilitre de milieu.

Le milieu de culture est ensuite recueilli au temps désiré et les particules virales purifiées comme indiqué ci-après (p.112).

3. - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES.

I. Préparation des immunsérums.

A. Chez la souris :

Des souris syngéniques Balb/c ont été immunisées par 3 injections intrapéritonéales de $50x10^6$ cellules MF_2 tuées aux rayons X (6000 r dose totale). Les injections sont espacées d'une semaine. Le recueil du sang est réalisé par ponction dans le sinus caverneux de l'oeil.

B. Chez le lapin :

La préparation d'immunsérums anti-particules virales ou anti-extraits cellulaires a été effectuée selon le protocole suivant : les virus purifiés ou les extraits cellulaires ont été soumis à l'action des ultrasons puis congelés et décongelés cinq fois avant d'être injectés à des lapins "Fauve de Bourgogne". Les injections consistent en 0,5 mg d'antigènes dissous dans 0,5 ml de PBS auxquels on ajoute 0,5 ml d'adjuvant de Freund. L'émulsion est injectée par voie intradermique sous forme de 20 à 40 piqûres. Les rappels sont effectués tous les quinze jours. Les prises d'essai sont réalisées par prélèvement à la veine marginale de l'oreille. Les sérums dont le titre en anticorps est suffisamment élevé sont recueillis par cathétérisation de l'artère carotide.

II. Immunoélectrophorèse bidimensionnelle. Technique de LAURELL (151).

L'analyse de mélanges d'antigènes a été réalisée par la technique de LAURELL qui est une méthode à la fois

qualitative et quantitative. Nous avons appliqué la modification décrite par WEEKE (152).

La première migration est effectuée dans un gel d'agarose (agarose à 1p100 dans un tampon véronal de force ionique 0,02 à pH 8,6). Quatre dépots correspondant à 10-20 µl d'extrait antigénique peuvent être effectués sur des plaques de 9x11 cm (soit 15 ml d'agarose). L'électrophorèse a lieu sous une différence de potentiel de 10 V/cm pendant 70 minutes la cuve étant réfrigerée par une circulation d'eau.

Après la migration, le gel est divisé en quatre languettes (de 2x10 cm), chacune correspondant à une piste de migration. Chaque languette est transférée sur le bord d'une plaque de verre (10x10 cm), le reste de la plaque est recouvert par de la gélose qui renferme l'anticorps. La seconde migration est effectuée pendant la nuit sous une différence de potentiel de 3 V/cm dans du Tampon Véronal à pH 8,6.

Après la seconde migration, les gels sont lavés dans du sérum physiologique, séchés et colorés au bleu de Coomassie R250(solution à 0,5p100 dans le mélange éthanol/acide acétique/eau (50:10:40)) et décolorés dans ce même mélange.

4. - TECHNIQUES CYTOLOGIQUES - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

L'étude des syncytiums XC induits par la lignée MF_2 a été réalisée avec des techniques cytologiques classiques, par microcinématographie et par microscopie électronique.

I. Techniques cytologiques.

A. Méthodes de coloration :

L'examen des syncytiums en vue de leur numération a été facilité par coloration des cocultures. Après fixation pendant 20 minutes au méthanol, les tapis cellulaires sont colorés pendant 10 minutes à l'hématoxyline de Harris, l'excès de colorant est éliminé par lavage à l'eau.

Pour d'autres examens cytologiques, la fixation a été réalisée avec le réactif de Carnoy(chloroforme/acide acétique/ éthanol : 60:20:120). Les cocultures étant ensuite colorées à l'hémalun-éosine.

B. Microcinématographie :

Une étude séquentielle de la formation de polycaryons a été possible par cette méthode. L'appareillage utilisé est composé d'un microscope inversé Leitz couplé à une caméra Paillard Bolex de 16 mm. Le déclenchement des prises de vue est effectué grâce à un interrupteur relié à une minuterie réglable. Le tout disposé dans une enceinte obscure et thermostatée . A chaque prise de vue, la culture est éclairée par une lumière monochromatique verte pendant 0,5 seconde.

Les films, Eastman Kodak + X, 80A80, sont traités dans du révélateur D 19. Ils sont ensuite analysés sur une table de montage Steinbeck 16 mm qui permet de visionner le film dont les images sont grossies 400 fois. Un compteur électronique relié à la table permet de repérer les vues intéressantes.

II. Microscopie électronique.

A. Préparation des coupes fines :

Pour obtenir des coupes non déformées, les tapis cellulaires ont été fixés et traités in-situ dans le flacon de culture. La fixation est effectuée au glutaraldéhyde et tétroxyde d'osmium en solution dans du tampon cacodylate de sodium (0,1 M ; pH 7,0). La déshydratation est réalisée dans un gradient d'éthanol. Les inclusions sont faites en araldite et le contraste obtenu avec du citrate de plomb. Les coupes ultrafines sont examinées avec un microscope électronique Hitachi HU 12 (Institut Pasteur de Lille).

B. Immunomicroscopie électronique :

Nous avons utilisé la technique des anticorps marqués à la peroxydase. Après deux lavages par le tampon PBS, les cellules ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C avec le sérum anti-cellule MF_2 préparé chez la souris Balb/c (utilisé dilué 10 fois). L'excès d'immunsérum a été éliminé par lavage et les cellules ont été incubées pendant 20 minutes à la température ambiante avec un immunsérum de mouton anti-immunoglobulines de souris couplé à la peroxydase (Institut Pasteur Production), utilisé dilué 50 fois. La révélation de la peroxydase a été effectuée par la réaction à la 3-3' diaminobenzidine-eau oxygénée (5 mg et 0,01p100 respectivement dans 10 ml de tampon Tris/HCl 0,1 M, pH 7,6) pendant 5 minutes à la température ambiante. Les cellules sont alors fixées puis traitées comme précédemment.

C. Cryodécapage :

Les cellules sont rincées au PBS à la température ambiante puis fixées pendant 1 heure à +4°C dans une solution de glutaraldéhyde à 1p100 dans du tampon cacodylate de sodium 0,05M pH 7,4. Après un rinçage au tampon cacodylate, les cellules sont incubées pendant deux heures à +4°C dans une solution de glycérol à 30p100.

Les fractures sont effectuées dans un appareil Balzers BAF 300. Les cellules sont montées entre deux disques d'or, congelées dans de l'azote fondant (azote liquide refroidi à -210°C) puis maintenues dans de l'azote liquide. Les fractures sont réalisées à -120°C en utilisant le dispositif à double réplique. Après évaporation d'un mélange carbone-platine, les répliques sont nettoyées à l'hypochlorite de sodium pendant 3 heures, lavées à l'eau distillée et montées sur des grilles de cuivre de 250 mesh avant d'être examinées.

5 - ISOLEMENT ET PURIFICATION DES PARTICULES VIRALES.

I. Elimination des débris cellulaires.

Quelle que soit la technique de purification ultérieure, la première étape de l'isolement des particules virales consiste en deux centrifugations successives à 10000g pendant 10 minutes des surnageants de culture pour éliminer les cellules et les débris cellulaires qu'ils pourraient contenir.

II. Concentration des particules virales.

Trois méthodes ont été appliquées :

A. Précipitation au polyéthylèneglycol (PEG) :

Des polymères neutres comme le PEG 6000 permettent la concentration de particules virales en les précipitant du surnageant de culture (CALOTHY et coll (153)). Les surnageants de culture clarifiés sont amenés à une concentration finale de 5p100 en polyéthylène-glycol 6000 (à partir d'une solution à 50p100 (p:v) dans le sérum physiologique), après agitation pendant au moins 3 heures à +4°C, le précipité renfermant les particules virales est recueilli par centrifugation à 15000 g pendant 20 minutes.

B. Technique dite de "Moloney".

Cette méthode consiste en une simple ultracentrifugation à 100 000 g pendant une heure des surnageants de

culture clarifiés. Le culot ainsi obtenu renferme les particules virales.

C. Précipitation par le sulfate d'ammonium :

Pour les études sur l'activité de transcriptase-inverse, les particules virales peuvent être concentrées par précipitation des surnageants de culture clarifiés au sulfate d'ammonium (357 g de sulfate d'ammonium et 12,5 ml de Tris/HCl 1M, pH 8,5 par litre de surnageant de culture) pendant une heure sous agitation à +4°C. Le précipité est recueilli par centrifugation à 10000 g pendant 20 minutes. (TAVITIAN et coll (154)).

III. Purification des particules virales concentrées.

Les précipités obtenus par la méthode au PEG ou les culots "Moloney" sont resuspendus dans du tampon NTE, déposés sur un gradient linéaire de concentration en saccharose (20 à 50p100 dans du tampon NTE) et soumis à une ultracentrifugation à l'équilibre (230 000 g pendant 100 minutes ou $\int \omega^2 t$ équivalente). Les particules virales s'équilibrent à une densité apparente de 1,16g/cm^3. Dans le cas de virus concentré par le PEG, un coussin de saccharose à 20p100 peut être intercalé entre le dépot et le gradient pour arrêter les immunoglobulines qui coprécipitent avec le virus.

Les précipités au sulfate d'ammonium sont repris dans du tampon NTE (1/20^e du volume de départ) et déposés sur deux couches de saccharose l'une à 20p100, l'autre à 70p100 dans du tampon NTE. Le tout est centrifugé pendant une heure à 90000 g. La bande virale qui se trouve à la surface du coussin de 70p100 est rehomogénéïsée dans celui-ci. Un gradient de concentration linéaire de 20 à 50p100 de saccharose est alors coulé sur la couche dense et le tout est ultracentrifugé à 90000 g pendant 16 heures. Le virus remonte

par flottation à sa densité apparente de 1,16 g/cm^3. Après prélèvement de la bande virale et dilution de celle-ci dans du NTE, le virus est recueilli par ultracentrifugation à 100 000 g pendant une heure et conservé dans du tampon Tris 10^{-2}M (pH 8,3), EDTA 0,1 mM, DTT 2mM, glycérol bidistillé 10p100, à -20°C.

6. - ANALYSE DES POLYPEPTIDES VIRAUX EN GEL DE POLYACRYLAMIDE DISSOCIANT.

Les particules virales marquées par la leucine tritiée et purifiées par centrifugation à l'équilibre en gradient de saccharose sont dissociées par chauffage à 100°C pendant 3 minutes dans le minimum du mélange : SDS 4p100, Mercaptoéthanol 10p100, urée 6M, bleu de bromophénol 0,01p100, glycérol 10p100. Des dépots de 10 à 20 µl (soit 80 à 100 000cpm) sont effectués sur des gels de polyacrylamide en plaque (système Biorad).

L'acrylamide et la bisacrylamide (Apelab) sont recristallisées selon la méthode décrite par LOENING (155).

Le gel d'espacement est à 5p100 en acrylamide (solution mère : 50p100 d'acrylamide, 1,33p100 de bisacrylamide) dans du tampon tris 0,125 M pH 6,8 renfermant 0,1p100 de SDS. La polymérisation est catalysée par le système redox : persulfate d'ammonium 0,1p100-TEMED 1p1000.

Le gel de résolution est à 17,5p100 en acrylamide (solution mère : 50p100 d'acrylamide, 0,235p100 de bysacrylamide) dans du tampon tris 0,37M pH 8,9 renfermant 0,1p100 de SDS. La polymérisation est assurée par le même système redox que précédemment.

La migration a lieu pendant 15 heures sous une différence de potentiel de 4 V/cm. Le tampon de cuve est constitué d'un tampon tris/glycocolle (3g et 14,4g respectivement par

litre d'eau), de pH 8,3 et renfermant 0,1p100 de SDS (LAEMMLI (156)).

Après la migration, en vue de l'autoradiographie (fluorographie), les gels sont déshydratés dans des bains de diméthylsulfoxyde pendant une heure, puis traités pendant 3 heures par une solution de PPO à 20p100 dans le diméthyl sulfoxyde (BONNER et LASKEY(157)). Ils sont ensuite rehydratés pendant une heure dans de l'eau distillée et desséchés à chaud sous vide (système Biorad). Les films utilisés pour l'exposition sont des films Kodak RP royal X-Omat. L'exposition se déroule à -70°C.

7. - EXTRACTION ET ANALYSE DES RNA.

Pour ces études et celles décrites dans le chapitre suivant, toutes les solutions ont été faites dans de l'eau bidistillée stérile et toute la verrerie a été autoclavée. Dans les études sur les RNA, tous les tampons renfermaient du polyvinyl-sulfate de potassium à la concentration finale de 10 µg/ml pour inhiber l'action de ribonucléases éventuelles, et le saccharose utilisé pour les ultracentrifugations en gradient de densité était dépourvu d'activité nucléasique (saccharose Mann).

I. Les RNA viraux.

Ces expériences ont été réalisées avec des particules virales purifiées dont le RNA était marqué par des traceurs radioactifs.

A. Extraction des RNA viraux :

Les particules virales purifiées sont reprises dans du tampon acétate de sodium 10 mM pH 5,2. La suspension est amenée à une concentration de 2p100 en SDS (SDS Serlabo recristallisé dans l'éthanol) et de 2 mM en dithiotréitol puis soumises à deux extractions par le phénol (Merck, fraichement redistillé en solution à 80p100 dans le tampon acétate) sous agitation douce, à +4°C, pendant une heure au total. Les RNA extraits sont alors précipités par deux volumes d'éthanol absolu pendant 1 nuit à -20°C après que la phase aqueuse ait été amenée à une concentration de 0,1 M en chlorure de sodium.

B. Analyse en gradient de densité :

Les RNA extraits sont repris dans du tampon acétate de sodium 10 mM pH 5,2, dithiotreitol 2 mM et déposés sur un gradient linéaire de 5 à 20p100 en saccharose dans le même tampon. Les gradients sont centrifugés pendant 100 minutes à 40000 rpm (rotor SW41, Beckman), les fractions recueillies et leur radioactivité déterminée soit par comptage direct dans le liquide de Bray, soit après précipitation par l'acide trichloracétique, soit par effet CERENKOV (dans le cas de marquage par le radiophosphore).

C. Analyse en gel de polyacrylamide :

Nous avons appliqué la technique décrite par TIOLLAIS et coll (158). La concentration des gels en acrylamide est de 1,7p100 , leur texture est renforcée par l'adjonction d'agarose (0,5p100 concentration finale). Pour obtenir des pores plus grands et des gels solubilisables par l'acide per-iodique, nous avons remplacé la bisacrylamide par de la diéthyltartardiamide (ANKER (159)). Les gels sont coulés dans des tubes de 23 cm de long. L'électrophorèse est effectuée en tampon tris/Borate/ EDTA/SDS de pH 8,3, pendant cinq heures sous une différence de potentiel de 8 V/cm.

Après la migration, les gels sont coupés en tranches de 2 millimètres d'épaisseur, la radioactivité éluée par traitement à l'acide per-iodique à 2p100 (0,4 ml, 3 heures à 37°C)et le comptage effectué dans 8 ml de la solution de Bray.

II. Les RNA cellulaires.

Nous avons choisi une méthode d'extraction par le phénol à chaud, à pH neutre qui selon BRAWERMAN (160) fournit les mêmes rendements en RNA polyadénylés que l'extraction à pH 9 à froid.

A. Extraction du RNA total :

Les culots cellulaires sont repris dans 20 volumes

de tampon tris 10^{-2}M, EDTA 1 mM pH 7,4. La suspension est ajustée à 0,5p100 en SDS et 0,25p100 en Nonidet P40 (Lensex TAO1, Shell Co.). Sitôt après, on ajoute un volume égal d'une solution de phénol (à 85p100 dans le tampon tris-EDTA) portée à 60°C. L'extraction est poursuivie 3 minutes à 60°C puis 20 minutes à +4°C. Après centrifugation à 10000 g pendant 10 minutes, la phase aqueuse est réextraite par un égal volume de phénol pendant 20 minutes à +4°C. La phase aqueuse est amenée à une concentration de 0,1 M en chlorure de sodium et précipitée par deux volumes d'éthanol absolu pendant une nuit à -20°C.

B. Sélection des RNA possédant une séquence polyadénylée :

Les séquences polyriboadényliques sont retenues à haute force ionique sur certaines celluloses non modifiées (KITOS et coll (161), LARSEN et coll (162)). Nous avons utilisé cette propriété pour préparer les RNA polyadénylés à partir des RNA cellulaires totaux.

Les RNA dissous dans le tampon H (tris/HCl 10 mM, pH 7,6, KCl 0,5 M, $MgCl_2$ 0,2 mM) sont chromatographiés sur une colonne de cellulose Cellex 410 (Biorad) équilibrée dans le même tampon. La cellulose est préalablement lavée à l'éthanol, à la soude 0,5N et à l'acide chlorhydrique 0,01N. Pour la séparation, la concentration en RNA total dans le dépot est de 0,5 mg/ml de tampon H et on utilise 2 ml de cellulose par milligramme de RNA total à fractionner. Après un lavage par du tampon H, les RNA polyadénylés sont élués à basse force ionique par du tampon L (tris/HCl 10mM pH 7,6, $MgCl_2$ 0,2 mM) puis par de l'eau bidistillée.

8. - REACTION DE TRANSCRIPTION-INVERSE SYNTHESE DE DNA COMPLEMENTAIRES. *

I. Réaction de polymérisation exogène.

La matrice fournie à la transcriptase-inverse virale est un polymère synthétique : le poly (rA)-oligo (dT) (Miles). On mesure l'activité de l'enzyme par l'incorporation de déoxythymidine triphosphate marquée au tritium (^{3}H-dTTP, NEN, activité spécifique : 5 mCi/0,062 mg) dans des polymères insolubles dans l'acide trichloracétique à 10p100.

Le virus est perméabilisé pendant 15 minutes à la température ambiante dans le mélange (en concentration finale pour 50 µl) :

Tris	5	µM	pH 8,2
DTT	0,2	µM	
KCl	4	µM	
DB 311	0,8	p 100	
protéïnes virales	15 à 40	µg	

On ajoute alors la matrice, le précurseur et l'ion divalent indispensable (Mn^{++}) sous 50 µl qui renferment :

$MnCl_2$	30	nM	
dTTP	5	nM	
^{3}H-dTTP	40	pM	soit 2 µCi
oligo (dT)	4	nM	
poly (rA)	80	nM	

L'incubation a lieu à 37°C. Des aliquotes sont préle-

* Les techniques utilisées sont toutes dérivées de celles de TAVITIAN et coll (163).

vées à différents temps et la radioactivité précipitable à l'acide trichloracétique est déterminée. On exprime les résultats en nombre de picomoles de dTMP incorporées en fonction du temps.

II. Réaction de polymérisation endogène.

Dans ce type d'expériences, le RNA génomique viral sert de matrice pour la synthèse d'un DNA complémentaire. Le virus est perméabilisé par un détergent : le DB 311 (Cémulsol DB 311, Melle-Bezons à Neuilly). La réaction se déroule en présence des 4 désoxyribonucléosides triphosphates (P.L. laboratories), dont un est radioactif. Le mélange réactionnel est composé de (en concentration finale pour 100 µl de mélange) :

Tris/HCl pH 8,2	5	µM	
DTT	0,2	µM	
KCl	4	µM	
$MnCl_2$	0,1	µM	
dGTP	20	nM	
dATP	20	nM	
dCTP	20	nM	
dTTP	10	nM	
^{3}H-dTTP	80	pM soit 4 µCi	Activité spécifique: 240cpm/pM
Protéïnes virales	100 à 150	µg	

Les incubations ont lieu à 37°C et des aliquotes sont prélevées comme lors de la réaction exogène.

Lorsque de basses activités spécifiques sont désirées le mélange réactionnel contient en plus du nucléoside triphosphate radioactif son homologue froid. Lorsque de hautes activités spécifiques veulent être obtenues, le précurseur radioactif est concentré par lyophilisation puis ajouté au mélange réactionnel (seul, sans précurseur froid) à la concentration finale précédemment décrite.

III. Préparation et extraction d'un DNA complémentaire (cDNA).

Des stocks viraux possédant une très bonne activité de transcriptase-inverse endogène ont été utilisés pour synthétiser des DNA complémentaires de leur génome.

La réaction endogène est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment, à haute activité spécifique, mais sous un volume final de 1ml. Après 3 heures d'incubation à 37°C, le mélange réactionnel est soumis à deux extractions par du phénol à 80p100 dans du tampon tris 10^{-2} M pH 8,2, à froid pendant une heure au total. La phase aqueuse est dialysée deux fois contre une solution neutre d'EDTA 3mM pendant une heure puis traitée par la ribonucléase pancréatique pendant une heure à 37°C (concentration finale : 50 à 100 µg d'enzyme par millilitre). La ribonucléase est éliminée par deux extractions au phénol (phénol à 80p100 dans de l'EDTA 3mM) en présence de SDS pendant une heure au total, à froid. Après dialyse extensive contre du tampon NTE, le cDNA est gardé congelé à -20°C.

IV. Analyse de la structure secondaire des cDNA.

Elle est effectuée par adsorption-élution sur hydroxyapatite. On utilise la propriété du DNA double-brin d'être retenu à basse force ionique sur ce substrat, alors que le DNA simple brin s'élue déjà à une molarité de 0,15 M en phosphate de sodium. Le cDNA est équilibré en tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,8, on ajoute alors de l'hydroxyapatite à 25p100 (p:v) dans le même tampon et on laisse le cDNA s'adsorber pendant 10 minutes. Toutes les manipulations se déroulent à 68°C. Après un lavage par le même tampon, le DNA monocaténaire est élué par 4 lavages en tampon phosphate de sodium 0,15 M (pH 6,8) et le DNA bicaténaire est élué par 3 lavages au tampon phosphate de sodium 0,4M pH 6,8.

L'efficacité de la séparation est vérifiée par la

mesure de la résistance du DNA élué à l'action de la nucléase S-1 qui est spécifique des chaînes monocaténaires (voir paragraphe ci-dessous). Les fractions éluées doivent être diluées avant l'action de la nucléase S-1 car celle-ci est inhibée par un excès de phosphate.

V. Conditions d'action de la nucléase S-1.

Les conditions que nous avons retenues pour l'hydrolyse des polynucléotides par la nucléase S-1 (que nous avons préparée suivant la méthode de ANDO (164)) sont les suivantes : au tampon acétate de potassium 0,025M pH 4,5 - sulfate de zinc 0,1mM - chlorure de sodium 0,1M on ajoute 10 µg/ml de DNA dénaturé et 5 µl/ml d'enzyme. On laisse l'hydrolyse se poursuivre 30 minutes à 45°C.

VI. Détermination de la taille du cDNA monocaténaire.

La taille du cDNA est analysée par détermination de la vélocité de sédimentation dans un gradient linéaire de densité en saccharose (5 à 20p100 dans du tampon Tris $1,5 \times 10^{-3}$M, pH 7,4 dans un rotor Beckman SW50-1, à 33000 rpm pendant 16 heures). Un RNA de transfert est cocentrifugé avec la sonde, il sert de valeur de référence (4S).

VII. Détermination de l'étendue de la transcription.

Elle est effectuée par hybridation d'une quantité fixe de RNA génomique marqué au radiophosphore avec des quantités croissantes de cDNA à basse activité spécifique. Le taux d'hybridation est déterminé par le degré de résistance à l'action de la nucléase S-1. On exprime les résultats en fonction du rapport cDNA/RNA 70S.

Les conditions d'hybridation sont les suivantes : une quantité fixe de RNA 70S (environ 1500 cpm soit 7,5 ng, activité spécifique : $2x10^5$ cpm/µg) est hybridée avec des quantités croissantes de cDNA. L'incubation se déroule dans des micropipettes de 200 µl scellées , à 68°C pendant 72 heures dans du tampon phosphate de sodium 0,4M pH 6,8. Les incubats sont ensuite dilués à 20 ml avec du mélange réactionnel pour l'action de la nucléase S-1, 10 ml sont précipités à l'acide trichloracétique, l'autre moitié est traitée pendant 30 minutes à 45°C par la nucléase S-1 avant d'être précipitée. On détermine alors le pourcentage de résistance à l'hydrolyse par la nucléase S-1 pour chaque valeur du rapport cDNA/RNA.

VIII. Recherche des séquences virales dans les RNA cellulaires.

Des quantités croissantes de RNA cellulaire sont hybridées avec une quantité fixe de cDNA. Le taux d'hybridation est défini par le pourcentage de résistance à l'action de la nucléase S-1.

Les hybridations se déroulent dans des fioles scellées sous un volume de 100 ou 200 µl en tampon 4xSSC. Du tampon tris/HCl pH 7,4 (0,01M concentration finale) est ajouté pour stabiliser le pH pendant l'incubation (72 heures à 68°C). Les fractions sont ensuite diluées à 2 ml avec du mix S-1. Un millilitre est précipité à l'acide trichloracétique, l'autre moitié est traitée pendant 30 minutes à 45°C par la nucléase S-1 avant d'être précipitée.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de résistance à l'hydrolyse par la nucléase en fonction de la quantité de RNA cellulaire ajoutée.

B I B L I O G R A P H I E

	Réf.	Page
AHKONG, Q.F., FISHER, D., TAMPION, W., LUCY, J.A. Nature, (1975), 253, 194-195	122 124	69 72
ANDERSON, C.W., BAUM, P.R.,GESTELAND, R.F. J. Virol., (1973), 12, 241-252	109	43
ANDO, T. Biochim.Biophys.Acta., (1966), 114, 158-168	164	123
ANKER, H.S. FEBS Letters, (1970), 7, 293-293	107 129	41 57
Anon. "The molecular biology of tumor viruses." J.Tooze ed. Cold Spring Harbor Lab.(1973) pp 502-584	54	15
AOKI, T., POTTER, M., STURM, M.M. J.Nat.Cancer Inst., (1973), 51, 1609-1617	1 28 48 131 132 136 137	1 4 12 84 87 91 99
BADER, J.P., STECK, T.L. J.Virol, (1969), 4, 454-459	75	23
BALTIMORE, D. Nature, (1970), 226, 1209-1211	87	25
BARBACID, M., STEPHENSON, J.R., AARONSON, S.A. J.Biol.Chem., (1976), 251, 4859-4866	69	20
BASSIN, R.H., TUTTLE, N., FISHINGER, P.J. Nature, (1971), 229, 564-566	114	51
BEARD, J.W. Adv.Cancer.Res., (1963), 7, 1-127	60	17

	Réf.	Page
BENVENISTE, R.E., TODARO, G.J. Proc.Nat.Acad.Sci, U.S., (1975), 72,4090-4094	139	100
BERNARD, C., BOIRON, M., LASNERET, J. C.R. Acad.Sci., (1967), 264D, 2170-2173	145	104
BERNHARD, W. Cancer Res., (1960), 20, 712-727	52	15
BOIRON, M., "Les virus", Institut Pasteur Ediscience, Mac GRAW-Hill Paris, (1976)pp 253-267	55	15
BONNER, W.M., LASKEY, R.A. Eur. J. Biochem, (1974), 46, 83-88	111 157	43 116
BOULANGER, P.A., WAROCQUIER, R. Appl. Microbiol, (1971), 22, 760-762	108	41
BRANTON, D., BULLIVANT, S., GILULA, N.B., MOOR, H., MUHLETHALER, K., NORTHCOTE, D.H., PACKER, L., SATIR, B., SATIR, P., SPETH, V., STAEHELIN, L.A., STEERE, R.L., WEINSTEIN, R.J. Science, (1975), 190, 54-56	119 120 121 123	65 66 67 70
BRAWERMAN, G., Methods in Enzymology-Moldave et Grossman ed. Acad. Press., N.Y., (1974), 30, 605-612	160	118
BRAWERMAN, G., MENDECKI, J., LEE, S.Y. Biochemistry, (1972), 11, 637-641	129	80
BRAY, G.A. Anal.Biochem, (1960), 1, 279-285	142	103
BUCHHAGEN, D.L., STUTMAN, O., FLEISSNER, E. J. Virol., (1975), 15, 1148-1157	67 68	20 20
CALOTHY, G., DIGEON, M., RAYNAUD, M. C.R. Acad. Sci, (1967), 265D, 1764-1765	153	112

	Réf.	Page
COHN, M. Cold SP.Harbor.Symp.Quant.Biol., (1967), 32, 211-221	32	5
COWAN, N.J., MILSTEIN, C. J. Mol.Biol., (1974), 82, 469-482	16	4
CRISPENS, C.G.Jr. "Handbook on the laboratory mouse" CC. THOMAS Publisher, Springfield Illinois, (1975)	34	5
D'AURIOL, L., EMANOIL-RAVICOVITCH, R., ROBERT, J., C.R.Acad.Sci., (1976), 283D, 865-868	130	80
DUBE, S., KUNG, H.J., BENDER, W., DAVIDSON, N., OSTERTAG, W. J. Virol., (1976), 20, 264-272	81	23
DUESBERG, P.H. Proc.Nat.Acad.Sci., U.S., (1968), 60, 1511-1518	76	23
EAGLE, H. Science, (1959), 130, 432-437	147	104
EMANOIL-RAVICOVITCH, R., LARSEN, C.J., BAZILIER, M., ROBIN, J., PERIES, J., BOIRON, M. J. Virol., (1973), 12, 1625-1627	79	23
ERIKSON, E., ERIKSON, R.L. J. Virol., (1971), 8, 254-256	78	23
FENNER, F. Ann Microbiol.Inst.Pasteur, (1976), 127A,323-331	51	15
FOUGEREAU, M., BOURGEOIS A., DE PREVAL, C. ROCCA-SERRA, J., SCHIFF, C. Ann. Immunol., (1976), 127C, 607-631	9	4

	Réf.	Page
GILLESPIE, D., GALLO, R.C. Science, (1975), 188, 802-811	138	99
GILLESPIE, D., MARSHALL, S., GALLO, R.C. Nature, N.B., (1972), 236, 227-231	74	22
GISSELBRECHT, S., LEVY, J.P. Biomed., (1974), 20, 95-101	57	17
GOMARD, E., LEVY, J.P. Pathol.Biol., (1974), 22, 621-632	88	25
GOMARD, E., LECLERC, J.C., LEVY, J.P. J.Nat.Cancer Inst., (1973), 50, 955-961	135	88
GRANDGENETT, D.P., GERARD, G.F., GREEN, M. J.Virol., (1972), 10, 1136-1142	92	26
GUERIN, C., PRIGENT, B., MOYNE, M.A., PARAF, A. Bull.Cancer, (1972), 59, 367-379	50	13
HACHMANN, H.J., LEZIUS, A.G. Eur.J.Biochem., (1975), 50, 357-366	19	4
HARTLEY, J.W., ROWE, W.P., HUEBNER, R.J. J.Virol., (1970), 5, 221-225	58	17
HASELTINE, W.A., KLEID, D.G., PANET, A., ROTHENBERG, E., BALTIMORE, D. J.Mol.Biol., (1976), 106, 109-132	104	28
HASELTINE, W.A. Xth European Tumor virus group. Grindenwald 3-7 octobre 1976	101	27
HERZENBERG, L.A., Mc DEVITT, H.O., HERZENBERG, L.A., Ann.Rev.Genet., (1968), 2, 209-244	7	4

	Réf.	Page
HORIBATA, K., HARRIS, A.W. Exptl.Cell res., (1970), 60, 61-77	3	4
IHLE, J.N., HANNA, M.G. Jr, ROBERTSON L.E., KENNEY, F.T. J. Exp.Med., (1974), 134, 1568-1581	64	20
IKEDA, H., HARDY, W.Jr, TRESS, E., FLEISSNER, E., J.Virol., (1975), 16, 53-61	65	20
IOACHIM, H.L., DORSETT, B., SABBATH, M., KELLER,S. Nature, N.B., (1972), 237, 215-218	125	76
JOHNSON, G.S., FRIEDMAN, R.M., PASTAN, I. J.Virol., (1971), 7, 753-758	126	77
KARPAS, A. Eur.J.Cancer, (1973), 9, 803-808	21	4
KARPAS, A., CAWLEY, J. Eur.J.Cancer, (1972), 8, 601-604	22	4
KITOS, P.A., SAXON, G., AMOS, H. Biochem.Biophys.Res.Com., (1972), 47,1426-1437	127 161	79 119
KRUEGER, R.G. J.Virol., (1975), 16, 1137-1145	25	4
KRUEGER, R.G. J.Virol., (1976), 18, 745-756	47	11
KRUEGER, R.G., MILLER, G.C. J.Nat.Cancer Inst., (1974), 53, 997-1004	26	4
KRUEGER, R.G., WILLIAMS, W.H., MILLER, G.C. J.Nat.Cancer Inst., (1974), 52, 1203-1210	27	4
KUFF, E.L., LUEDERS,K.K., OZER, H.L., WIVEL, N.A. Proc.Nat.Acad.Sci., U.S. , (1972), 69, 218-222	46	11

	Réf.	Page
KUFF, E.L., WIVEL, N.A., LUEDERS,K.K. Cancer Res., (1968), 28, 2137-2148	20 45	4 11
KUNG, H.J., BAILEY, J.M., DAVIDSON, N., NICOLSON, M.O., Mc. ALLISTER, R.M. J. Virol., (1975), 16, 379-411	80 83	23 24
KUNG, H.J., HU, S., BENDER, W., BAILEY, J.M. DAVIDSON, N., NICOLSON, M.O., Mc ALLISTER, R.M. Cell, (1976), 7, 609-620	84	24
LAEMMLI, U.K. Nature, (1970), 227, 680-685	110 156	43 116
LARSEN, C.J., MARTY, M., EMANOIL-RAVICOVITCH, R., BOIRON, M. Febs letters, (1973), 33, 61-64	128 162	77 119
LARSEN, C.J., RAVICOVITCH, R.E., HAMPE, A., MAUCHAUFFE, M., BAZILLIER, M., ROBERT-ROBIN, J. Nucl.Ac.Res., (1974), 1, 849-854	73	23
LARSEN, C.J., SAMSO, A., MAUCHAUFFE, M., EMANOIL-RAVICOVITCH, R., BOIRON, M. C.R.Acad.Sci., (1972), 275D, 1453-1456	72	21
LASKOV, R., MITELMAN, S. J. Immunol., (1975), 114, 566-570	13	4
LAURELL, C.B. Anal.Biochem., (1965), 10, 358-361	133 151	87 107
LEFEBVRE, J.C., LEMAY, P. Biomed.Exp., (1974), 21, 378-381	150	105
LEVY, J.A. Biomed, (1976), 24, 84-93	141	100

	Réf.	Page
LEVY, J.P. 3ème réunion du groupe d'étude des Oncornavirus Gif-sur-Yvette, 24-26 septembre 1975	63 72	19 22
LIEBERMAN, R., DOUGLAS, J.O., MANTEL, N. J.Immunol., (1960), 84, 514-529	36	6
LOENING, U. Biochem J., (1967), 102, 251-257	118	39
LOWRY, O.H., ROSEBROGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.C. J.Biol.Chem., (1951), 193, 265-275	143	103
Mc DONNELL, J.P., GARAPIN, A.C., LEVINSON, W.E., QUINTRELL, N., FANSHIER, L., BISHOP, J.M. Nature, (1970), 228, 433-435	98	26
Mc LEOD, M.C. Biochemistry, (1975), 14, 4011-4018	12	4
MANNING, D.D., JUTILA, J.W. J.Immunol., (1974), 113, 78-93	42	11
MERWIN, R.M., ALGIRE, G.H. Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., (1959),101,437-439	34	6
MOELLING, K. Virology , (1974), 62, 46-59	93	26
MOLLOY, G.R., SPORN, M.B., KELLEY, D.E., PERRY,R.P. Biochemistry, (1972), 11, 3256-3260	82	23
NAMBA, Y., HANAOKA, M. J. Immunol., (1969), 102, 1486-1497	2	4
NERMUT, M.V., HERMANN, F., SCHAFER, W. Virology, (1972), 49, 345-358	53	15

	Réf.	Page
OIE, H.K., RUSSELL, E.K., DOTSON, J.H., RHOADS, J.M., GAZDAR, A.F. J.Nat.Cancer Inst., (1976), 56, 423-426	59	17
OLOFSSON, B., HAMELIN, R., TCHEN,P.,TAVITIAN,A. C.R.Acad.Sci., (1974), 278D, 2851-2854	90	26
OROZLAN, S., COPELAND, J., SUMMERS, M.R., SMYTHERS, G., GILDEN, R.V. J.Biol.Chem., (1975), 250, 6232-6239	66	20
PARAF, A., GUERIN-MARCHAND, C., AUBRY, J., DUBERT, J.M. Annal.Immunol., (1975), 126C, 411-421	44	11
PARAF, A., MOYNE, M.A., DUPLAN ,J.F., SCHERRER, R., STANISLAWSKI, M., BETTANE, M., LELIEVRE, L. ROUZE, P., DUBERT, J.M. Proc.Nat.Acad.Sci., U.S., (1970), 67, 983-990	49 144	12 104
POLJACK, R.J. Adv.Immunol, (1975), 21, 1-30	10	4
POLLET, R., RUDIKOFF, S., POTTER, M., EDELHOCH,H. J.Biol,Chem., (1974), 249, 5188-5194	11	4
POTTER, M. Physiol.Rev., (1972), 52, 631-719	30 38 41	5 7 10
POTTER, M., BOYCE, C. Nature, (1962), 193, 1086-1087	32 37	5 6
POTTER, M., FAHEY, J.L., PILGRIM, H.I. Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., (1957), 94, 327-339	29	5
POTTER, M., SKLAR, M.D., ROWE, W.P. Science, (1973), 182, 592-594	39 40	7 9

	Réf.	Page
PUCK, T.T, CIECIURIA, S.J., ROBINSON, A.J. J.Exp.Med., (1958), 108, 945-956	148	105
QUIGLY, J.P., RIFKIN, D.B., REICH, E. Virology, (1971), 46, 106-116	70	21
RAO, P.N., JOHNSON, R.T. Nature, (1970), 225, 159-164	117	53
REANNEY, D.C. J.Theor.Biol., (1975), 49, 461-492	140	100
ROTHENBERG, E., BALTIMORE, D. J.Virol., (1976), 17, 168-174	97 103	26 27
ROWE, W.P., PUGH, W.E., HARTLEY, J.W. Virology, (1970), 42, 1136-1139	115 149	51 105
SCHARFF, M.D., LASKOV, R. Progr.Allergy., (1970), 14, 37-80	4	4
SCHUBERT, D. Proc.Nat.Acad.Sci., U.S., (1968), 60, 683-690	5	4
SCHUBERT, D., MUNRO, A., OHNO, S.J. J.Mol.Biol., (1968), 38, 253-262	6	4
SCHWARTZ, L.B., ROEDER, R.G. J.Biol.Chem., (1974), 249, 5898-5906	17	4
SCHWARTZ, L.B., SKLAR, V.E.F., JAEHNING, J.A. WEINMANN, R., ROEDER, R.G. J.Biol.Chem., (1974), 249, 5889-5897	18	4
SHANNON, W.M., BROCKMAN, R.W., WESTBROOK, L., SHADDIX, S., SCHABEL, F.M. Jr J.Nat.Cancer Inst., (1974), 52, 199-205	118	56

	Réf.	Page
SHATKIN, A.J. Proc.Nat.Acad.Sci., U.S., (1974), 71,3204-3207	85	25
SMITH, R.G., GALLO, R.C. Life Sciences, (1974), 15, 1711-1730	100	26
STAATS, J. Cancer Res, (1968), 28, 391-420	33	5
STEPHENSON, J.R., REYNOLDS, R.K., TRONICK, S.R. AARONSON, S.A. Virology, (1975), 67, 404-414	56	16
STEVENS, R.H., WILLIAMSON, A.R. Nature, (1972), 239, 143-145	15	4
STORB, U. Biochem.Biophys.Res.com., (1973),52,1483-1492	14	4
STRAND, M., AUGUST, J.T. J.Biol.Chem., (1976), 251, 559-564	62	18
STROMBERG, K. J.Virol., (1972), 9, 684-697	61 105	18 38
SVOBODA, J. Nature, (1960), 186, 980-981	146	104
TARONE, G., COMOGLIO, P.M. FEBS Letters, (1976), 67, 364-367	134	88
TAVITIAN, A., HAMELIN, R., TCHEN, P., OLOFSSON,B., BOIRON, M., Proc.Nat.Acad.Sci., U.S., (1974), 71,755-759	96 99 112 113 154 163	26 26 45 49 113 120

	Réf.	Page
TEMIN, H.N., MIZUTANI, S. Nature, (1970), 226, 1211-1213	86	25
TIOLLAIS, P., GALIBERT, F., LEPETIT, A.,AUGER,M.A. Biochimie, (1978), 51, 339-353	106 158	40 118
VERMA, I.M. J.Virol., (1975), 15, 843-854	95	26
VOLKMAN, L.E., KRUEGER, R.G. J.Virol., (1973), 12, 1589-1597	24	4
VOLKMAN, L.E., KRUEGER, R.G. J.Nat.Cancer, Inst., (1973), 51, 1205-1209	116	51
WANG, L.H., DUESBERG, P.H. J.Virol., (1973), 12, 1512-1521	89	25
WATERS, L.C. Biochem.Byophys.Res.Com., (1975),65,1130-1136	77 102	23 27
WEEKE, B. Scand.J.Immunol, (1973), 2(suppl.1),37-46	152	108
WEIGERT, M., POTTER, M., SACHS, D. Immunogenetics, (1975), 1, 511-523	8	4
WEIMANN, B.J., SCHMIDT, J., WOLFRUM, D.I. FEBS Letters, (1974), 43, 37-44	94	26
WU, A.M., SARANGADHARN, M.G., GALLO, R.C. Proc.Nat.Acad.Sci.,U.S., (1974),71,1871-1876	91	26
YANG, S.S., WIVEL, N.A. J. Virol., (1973), 11, 287-298	23	4
YUTOKU, M., GROSSBERG, A.L., PRESSMAN, D. J.Nat.cancer Inst., (1974), 53,201-208	43	11