

50376
1978
15

50376
1978
15

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DE LILLE I

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR DE 3^e CYCLE

EN BIOCHIMIE



Martine ROUSSEL

ETUDE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CELLULAIRES APPARENTÉES AU GENE TRANSFORMANT DES RETROVIRUS AVIAIRES



030 054230 2

soutenue le 21 Février 1978 devant la Commission d'Examen:

MM.	J. MONTREUIL	Président
	J. KREMBEL	Examinateur
	M. HILL	Examinateur
	C.J. SHERR	Examinateur
	D. STEHELIN	Rapporteur

S O M M A I R E

INTRODUCTION

A - HISTORIQUE DES RETROVIRUS AVIAIRES	1
B - PRESENTATION DU GROUPE DES RETROVIRUS AVIAIRES	2
C - LES VIRUS ENDOGENES	10
D - LE GENE SRC	11
E - LES SEQUENCES SARC CELLULAIRES	13
F - PRESENTATION DE NOS TRAVAUX	14

MATERIEL ET METHODES

A - CELLULES ET VIRUS	15
B - TITRAGE DU VIRUS	15
C - PREPARATION D'ARN 70S VIRAL	15
D - PREPARATION D'ARN CELLULAIRE TOTAL	16
E - ISOLEMENT DE L'ARN POLYADENYLE (POLYA ⁺)	16
F - PREPARATION D'ADN CELLULAIRE	17
G - PREPARATION D'ADN CELLULAIRE MARQUE SEQUENCE UNIQUE	18
H - PREPARATION DE L'AMORCE ADN DE THYMUS DE VEAU	18
I - PREPARATION DE SONDES cDNA VIRALES	18
J - PREPARATION DE SONDES SPECIFIQUES	20
K - HYBRIDATION MOLECULAIRE	21
L - MESURE DE LA TEMPERATURE DE FUSION DES HYBRIDES SUR HYDROXYAPATITE	21

RESULTATS

PREMIERE PARTIE

A - DEFINITION DES CONDITIONS OPTIMALES	22
B - EVOLUTION DES SEQUENCES SARC CELLULAIRES DANS L'ADN DES ESPECES AVIAIRES	25
C - MESURE DE L'EVOLUTION DES SEQUENCES SARC CELLULAIRES DANS L'ADN DE VERTEBRES	29
D - CONCLUSION	30

DEUXIEME PARTIE	pages
A - INTRODUCTION	32
B - CONDITIONS EXPERIMENTALES	32
C - ETUDE DE LA TRANSCRIPTION DES SEQUENCES SARC CELLULAIRES	33
D - CONCLUSION	35
 DISCUSSION ET CONCLUSIONS	 36
 APPENDICE TECHNIQUE SUR L'HYBRIDATION MOLECULAIRE	
A - INTRODUCTION	41
B - DEFINITION DE L'HYBRIDATION MOLECULAIRE EN MILIEU LIQUIDE	41
C - FACTEURS IMPLIQUES DANS LA REACTION D'HYBRIDATION	41
D - FORMULE GENERALE DE LA REACTION D'HYBRIDATION	44
E - REPRESENTATION GRAPHIQUE D'UNE COURBE D'HYBRIDATION	46
F - COMPLEXITE ET Cot ou Crt $1/2$	46
G - PREPARATION DE SONDAS	47
H - ANALYSE DES HYBRIDES	48
I - EXEMPLES DE REACTIONS D'HYBRIDATION	49
 BIBLIOGRAPHIE	 56

Les travaux de recherches et de réflexion présentés dans cette thèse doivent beaucoup à l'aide et aux conseils indulgents du Docteur Dominique STEHELIN, auquel j'exprime ma sincère gratitude pour sa présence aussi constante qu'efficace.

Je voudrais aussi remercier le Professeur Michel BOIRON qui s'est montré un guide amical pour m'initier à la Biologie Moléculaire.

Mes remerciements vont également à Maryvonne GARDES et Marie Berthe RAES qui ont participé concrètement avec patience et amitié aux investigations que j'ai dû mener et approfondir.

Je tiens enfin à remercier tous ceux qui ont eu la gentillesse de répondre à nos demandes de matériel biologique et biochimique, les Docteurs M. BELLARD, B. BOILLY, D. BOLOGNESI, C. CHAMBON, J. DELAFONTEYNE, M. DURCHON, R. FRANKLIN, T. GRAF, A. LANGLOIS, S. LERMAN, J. LEVY, C. MOSCOVICI, A. PERRAMON, K. SCHERRER, H. TEMIN et A. THERWATH.

"L'étonnement est surtout le facteur de la découverte de nouvelles réalités qui, bien plus que le jeu des explications, constitue la substance même de la connaissance scientifique. Dans de nombreux domaines, le travail en équipe s'impose, mais l'initiative individuelle garde sa verdeur".

Jean FOURASTIE

"Qu'est-ce qui me fait paraître composer de la musique si nécessaire que toute autre activité devient par comparaison moins importante ? Et pourquoi l'instinct de création n'est-il jamais satisfait, pourquoi faut-il recommencer sans cesse ?

A la première question -le besoin de créer- la réponse est toujours la même : le désir d'exprimer le moi, le besoin fondamental de manifester ce qu'on pense de plus profond au sujet de la vie. Mais pourquoi ce travail n'en finit-il jamais, pourquoi recommence-t-il toujours ? La raison qui pousse la créativité à se renouveler sans cesse est, me semble-t-il, que chaque nouvelle oeuvre apporte avec elle un élément de découverte de soi. Je dois créer afin de me connaître moi-même, mais puisque la connaissance de soi est une recherche qui ne se termine jamais, chaque nouvelle oeuvre n'est qu'un fragment de réponse à la question : "qui suis-je ?" et relance chaque fois le besoin de chercher encore d'autres fragments de réponse".

Aaron COPLAND

I N T R O D U C T I O N

A - HISTORIQUE DES RETROVIRUS AVIAIRES

La transmission des leucémies dans les espèces aviaires par un agent filtrable a été mise en évidence la première fois par Ellerman et Bang en 1908 et c'est P. Rous qui donna la description en 1911 du virus du sarcome qui porte son nom. Cependant, ces virus et les virus apparentés appelés maintenant Rétrovirus, ont été largement délaissés en tant que matériel expérimental jusqu'à ces vingt dernières années. A l'heure actuelle, de nombreuses équipes dans le monde entier se penchent sur cette famille des Rétroviridae et tentent de les impliquer dans un grand nombre de processus biologiques incluant l'étiologie des cancers humains, le développement embryologique, les mutations somatiques et l'évolution.

Les Rétrovirus, répartis dans tout l'embranchement des vertébrés, sont des agents oncogènes puissants qui se perpétuent par infection horizontale ou par transmission génétique. Ces virus à génomes ARN possèdent la particularité de dépendre, pour l'établissement de l'infection, d'un intermédiaire ADN synthétisé par l'ADN-polymérase ARN dépendante (rétropolymérase), d'où leur nom de Rétrovirus.

Ils sont rarement non pathogènes et ont été impliqués comme agents responsables de néoplasmes variés (sarcomes, carcinomes, leucémies diverses) chez de nombreuses espèces animales ; bien qu'ils soient capables, dans certains cas, de transformer des cellules humaines in vitro, aucun néoplasme humain n'a pu leur être attribué, malgré un grand nombre de recherches menées en ce sens.

Les virus sarcomatogènes aviaires constituent l'un des meilleurs modèles expérimentaux actuels de par la précision de la connaissance que l'on a de leur carte génétique ainsi que par les nombreux mutants conditionnels ou de délétion qui ont été isolés et caractérisés. Ce sont en outre les seuls pour lesquels le rôle d'un gène spécifique associé à l'initiation et au maintien de la transformation sarcomatogène de la cellule hôte a été démontré.

B - PRESENTATION DU GROUPE DES RETROVIRUS AVIAIRES

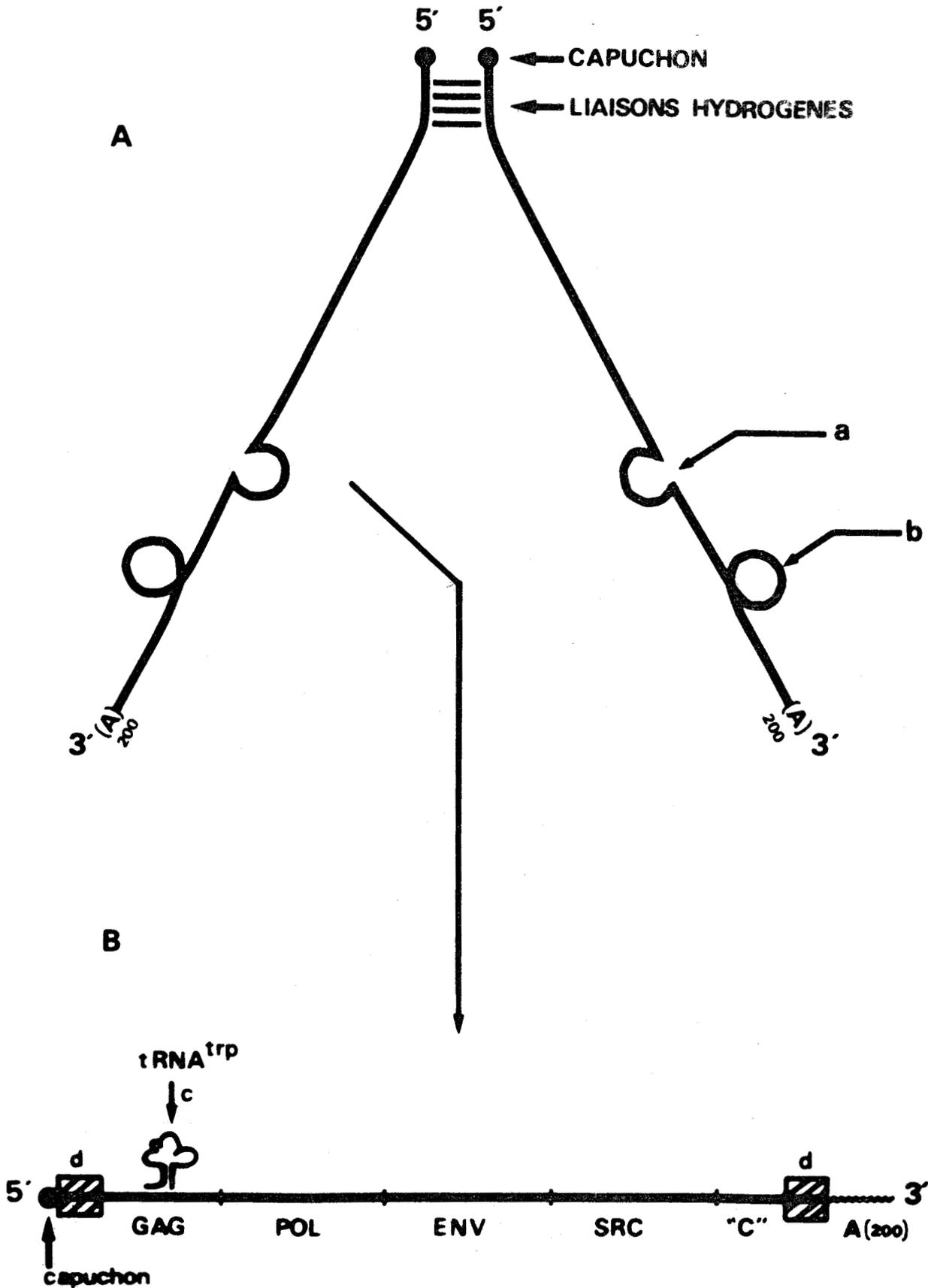
Les Rétrovirus aviaires sont conventionnellement divisés en deux groupes : les virus sarcomatogènes aviaires (ASV) qui induisent des fibrosarcomes in vivo et transforment les fibroblastes in vitro ; les virus des leucoses aviaires (ALV) qui induisent généralement des néoplasmes hématologiques chez l'animal, mais ni sarcomes ni transformation de fibroblastes (Tooze, 1973).

1° - Morphologie et maturation du virus

Les Rétrovirus aviaires, comme la plupart des Rétrovirus, ont été définis par microscopie électronique comme des particules de type C en accord avec certaines caractéristiques de leur maturation morphologique et de la structure des particules matures. Les virus, bourgeonnants à la surface de la cellule hôte, possèdent une enveloppe externe composée d'une membrane plasmique cellulaire recouverte de glycoprotéines virales responsables de leur spécificité de type (voir §3° ci-après). Le génome viral à ARN est entouré d'une capsidie de structure icosaédrique, puis d'une membrane, le tout formant le nucléoïde central du virus.

2° - Le génome viral (Fig. 1)

Le génome des virus ASV est polyploïde. Il se compose de deux molécules identiques d'ARN simple brin de poids moléculaire $3,3 \cdot 10^6$ daltons, soit 10000 nucléotides, de coefficient de sédimentation en gradient de saccharose de 38S (Junghans et al., 1977 ; Weiss et al., 1977). Ces deux sous-unités semblent liées entre elles dans la région 5' terminale par des ponts d'hydrogène entre des séquences nucléotidiques complémentaires (Beemon et al., 1976 ; Bender et Davidson, 1976), mais on ne connaît pas encore la nature exacte de cette liaison, ni sa fonction. Il semblerait qu'elle permette une meilleure transcription du génome viral en ADN par la rétopolymérase ou qu'elle facilite les recombinaisons génétiques. Chacune de ces deux sous-unités possède à son extrémité 3' une séquence



- FIGURE 1 -
REPRESENTATION du GENOME à ARN d'un ASV

- A - Etude par microscopie électronique selon Kung et al., (1976).
(a) structure spécifique aux ASLV ; (b) boucle présente dans tous les Rétrovirus étudiés.
- B - Carte génétique de l'ARN 35S viral. (c) amorce de la rétro polymérase ; (d) séquences identiques aux deux extrémités.



polyadénylée d'environ 200 nucléotides de long (Bender et Davidson, 1976 ; King et Wells, 1976), et à son extrémité 5' un "capuchon" de structure connue 5'm⁷Gppp^mGpCp (Furnichi et al., 1975) identique chez tous les Rétrovirus étudiés, et dont la fonction est encore inconnue. Par ailleurs, on a pu mettre en évidence une dizaine d'adénosines méthylées en position 6, réparties dans tout le génome (Rose et al., 1976).

De plus, un ARN de transfert tRNA^{trp} provenant de la cellule hôte est lié au génome des ASV placé à 101 nucléotides de l'extrémité 5' du génome (Taylor et Illemensee, 1975). Ce tRNA sert d'amorce à l'initiation de la synthèse d'ADN par la rétropolymérase in vitro (Dahlberg et al., 1974 ; Harada et al., 1975). La sous-unité possède d'autre part une séquence nucléotidique redondante de 21 nucléotides de long à chaque extrémité, cette séquence variant légèrement suivant la souche virale considérée. Cette séquence redondante pourrait jouer un rôle essentiel dans la réplication virale (Schwartz et al., 1977).

La cartographie génétique du génome des ASV a permis d'identifier 4 gènes codant pour les fonctions virales :

- le gène gag, codant pour les protéines de structure du nucléoïde viral,
- le gène pol, codant pour la rétropolymérase,
- le gène env, codant pour les glycoprotéines d'enveloppe,
- le gène src, responsable de la transformation néoplasique de la cellule hôte.

Les trois premiers gènes gag, pol et env sont nécessaires à la réplication des virus infectieux et sont communs à tous les Rétrovirus aviaires. Par contre, le gène src n'est pas requis pour la réplication virale. En effet, les mutants viraux contenant une délétion dans la région src sont défectifs pour la transformation (td ASV), mais se répliquent normalement, et possèdent un pouvoir leucémogène (Biggs et al., 1973). Enfin, toutes les souches virales possèdent une séquence d'environ 1000 nucléotides localisée

à l'extrémité 3' du génome, nommée "c" (pour région commune) (Tal et al., 1977), dont la fonction est inconnue. Toutefois, la persistance et la conservation de cette séquence dans toutes les souches, même celles ne contenant pas la région sarc voisine de l'extrémité 3', implique celle-ci comme un constituant essentiel du génome viral.

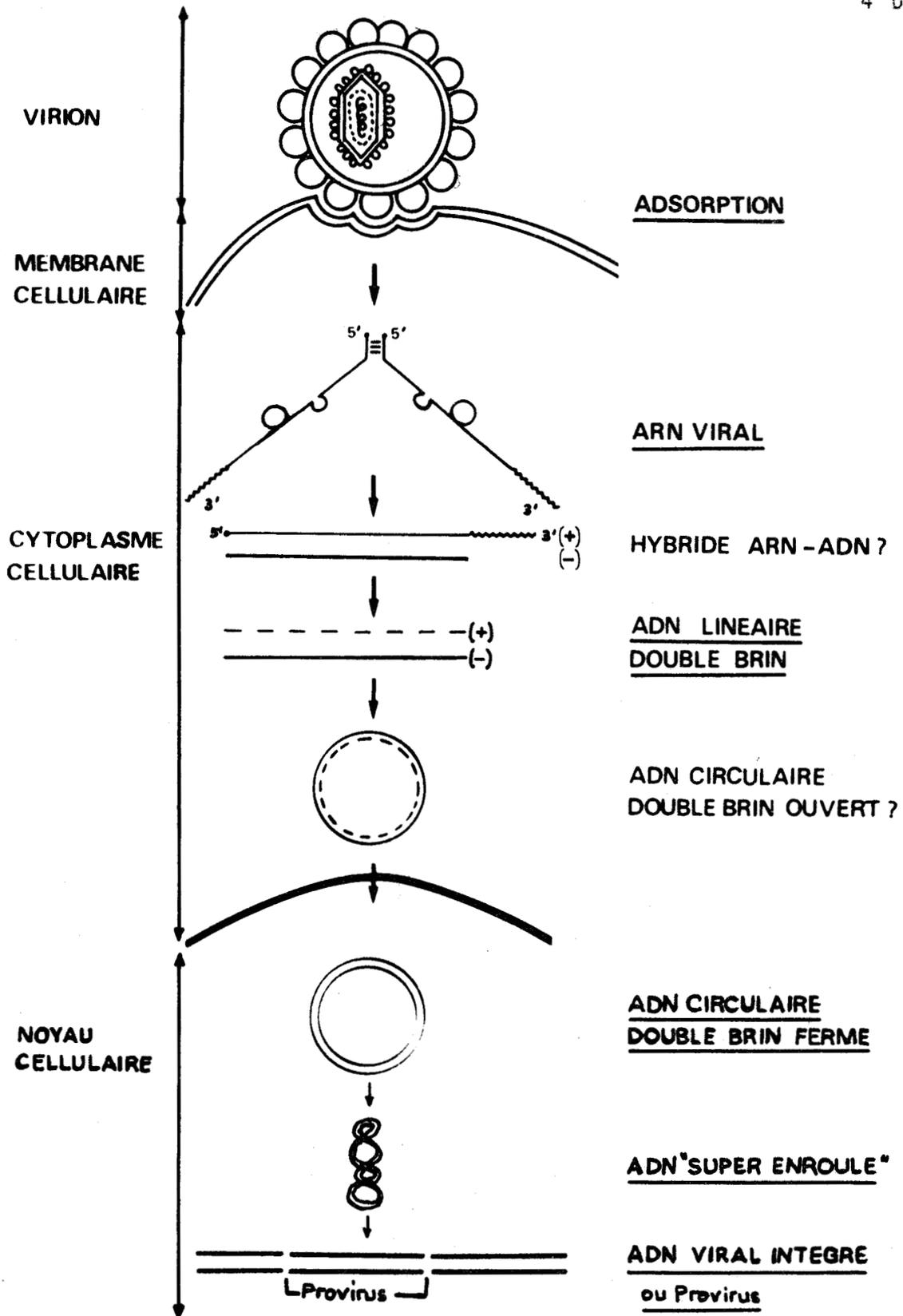
3° - Autres acides nucléiques dans le virion

Certaines préparations de virions contiennent de petites quantités d'ARN ribosomal de haut poids moléculaire (Bishop et al., 1970a), des petits ARNs de constante de sédimentation 7S, 5S et une variété de tRNA cellulaires. Il faut noter que, si quelques tRNA sont liés au génome viral, la majorité de ces ARNs peut être considérée comme contaminants. On détecte également un peu d'ADN apparemment complémentaire au génome viral qui peut servir d'amorce à l'initiation de la synthèse d'ADN viral (Darlix et al., 1977). On ne connaît cependant pas la signification biologique de ces observations.

4° - La réplication des Rétrovirus aviaires

a) adsorption et pénétration du virus

L'adsorption et la pénétration des virus dans une cellule hôte, facilitées par les glycoprotéines de l'enveloppe virale, ne peuvent avoir lieu que si le virus reconnaît des sites cellulaires spécifiques (voir Fig. 2). En effet, les cellules de poulet semblent porteuses de récepteurs différents réagissant spécifiquement avec les glycoprotéines situées sur l'enveloppe de différents virus. Ces glycoprotéines ont permis de classer les Rétrovirus aviaires en sous-groupe antigéniques A, B, C, D, (Duff et Vogt, 1969) E, (Hanafusa et al. 1970) F, (Hanafusa et Hanafusa, 1968) G, (Fujita et al, 1974). Les cellules de poulet ne sont toutefois pas les seules cellules permissives pour la réplication des ASV ; ainsi, les ASV peuvent se répliquer dans les cellules de caille, canard, faisan, dinde (Tooze, 1973). Les cellules de mammifères sont, elles, considérées comme non permissives (Svoboda et Hlozanec, 1970). Les virus porteurs d'une mutation dans le gène env (ex : la souche Bryan)



- FIGURE 2 -

SCHEMA de l'INFECTION et de l'INTEGRATION d'un ASV



ne peuvent infecter une cellule (Duesberg et al., 1975) ; l'infection peut alors être obtenue par une pénétration spécifique induite par le virus de Sendai, inactivé par les rayons ultraviolets (Weiss, 1969).

b) synthèse d'ADN viral et intégration

La synthèse d'ADN viral à partir du génome ARN parental semble avoir lieu immédiatement après infection. Cette transcription d'ADN viral dans les cellules infectées, réalisée par la rétopolymérase, mise en évidence par Temin et Mizutani (1970), semble s'effectuer en plusieurs étapes dans le cytoplasme de la cellule (voir Fig. 2). Des expériences de microscopie électronique, montrant que le génome des virions migrerait rapidement dans le noyau, 10 à 60 min. après l'infection (Dales et Hanafusa, 1972), laissaient penser que la synthèse d'ADN viral s'effectuait dans le noyau. Cependant, la plupart des résultats biochimiques ont montré que la synthèse d'ADN viral s'effectuait dans le cytoplasme de la cellule jusqu'à 12 à 24 h. après l'infection (Varmus et al., 1974 a).

Les mécanismes de synthèse de l'ADN viral sont encore mal connus. En effet, l'ADN viral étant peu abondant dans les cellules infectées, il est impossible d'utiliser des précurseurs radioactifs pour ce type d'études. Aussi, a-t-il fallu utiliser les techniques d'hybridation moléculaire qui ont permis d'analyser les produits de synthèse les plus stables.

In vitro, l'ADN viral est synthétisé en un brin continu de polarité négative (-) à partir de la matrice d'ARN 38S virale, après initiation par une amorce tRNA située à l'extrémité 5' de la même sous-unité ou d'une sous-unité différente. Le mécanisme de transfert des extrémités 5' à 3' semble se faire grâce à la présence de séquences redondantes situées aux deux extrémités du génome viral.

In vivo, l'ADN (-) synthétisé sert à son tour de matrice pour la synthèse d'ADN viral (+). Très probablement, cette

synthèse, apparamment discontinue, s'effectue à partir de plusieurs sites d'initiation (Varmus et al., 1978), bien qu'aucun d'entre eux ou qu'aucune terminaison du brin (+) n'ait encore été identifiée.

Cet taux de synthèse de l'ADN viral est exceptionnellement lent (0.5 nucléotides/sec., Varmus et al., 1978) ce qui corrobore les résultats trouvés pour la synthèse in vitro par la rétopolymérase purifiée du virus de la myéloblastose aviaire .

Le premier intermédiaire de la synthèse d'ADN pourrait être un hybride ARN (matrice) - ADN (-) ; mais les produits les plus abondants sont des molécules linéaires double-brin (Varmus et al., 1978) qui contiennent des brins (-), continus, représentant la longueur d'une sous-unité entière de génome viral, et des brins (+) interrompus 5 à 10 fois à intervalles réguliers (Varmus et Shank, 1976 ; Varmus et al., 1976).

Des expériences de "chasse" indiquent que ces hybrides linéaires sont les précurseurs putatifs de la formation d'hybrides circulaires fermés (Shank et Varmus, 1977). Ceux-ci apparaissent dans le noyau 5 à 12 heures après infection (Guntaka et al., 1976). La circularisation a probablement lieu dans le noyau. On n'a pas réussi à détecter de molécules circulaires dans le cytoplasme.

Les formes d'hybrides linéaires et circulaires sont toutes deux infectieuses (Guntaka et al., 1976 ; Smotkin et al., 1975 ; Fritsch et Temin, 1977) ; mais l'efficacité de l'infection des formes linéaires semble plus grande que celle des formes circulaires (Smotkin et al., 1975 ; Fritsch et Temin, 1977).

Enfin, bien qu'aucun résultat à l'heure actuelle ne le démontre, l'ADN double-brin circulaire semble s'intégrer dans le génome cellulaire sous une forme superhélicoïdale ; La preuve de l'intégration a été apportée par les expériences

de transfection (Hill et Hillova, 1971 ; 1972 ; Hillova et al., 1976). Certains résultats indiquent que l'intégration est nécessaire à la répllication virale (Guntaka et al., 1977). Le mécanisme ainsi que les sites d'intégration des ASV dans le génome cellulaire ne sont pas encore connus ; on sait cependant qu'une synthèse d'ADN cellulaire est requise (Varmus et al., 1977).

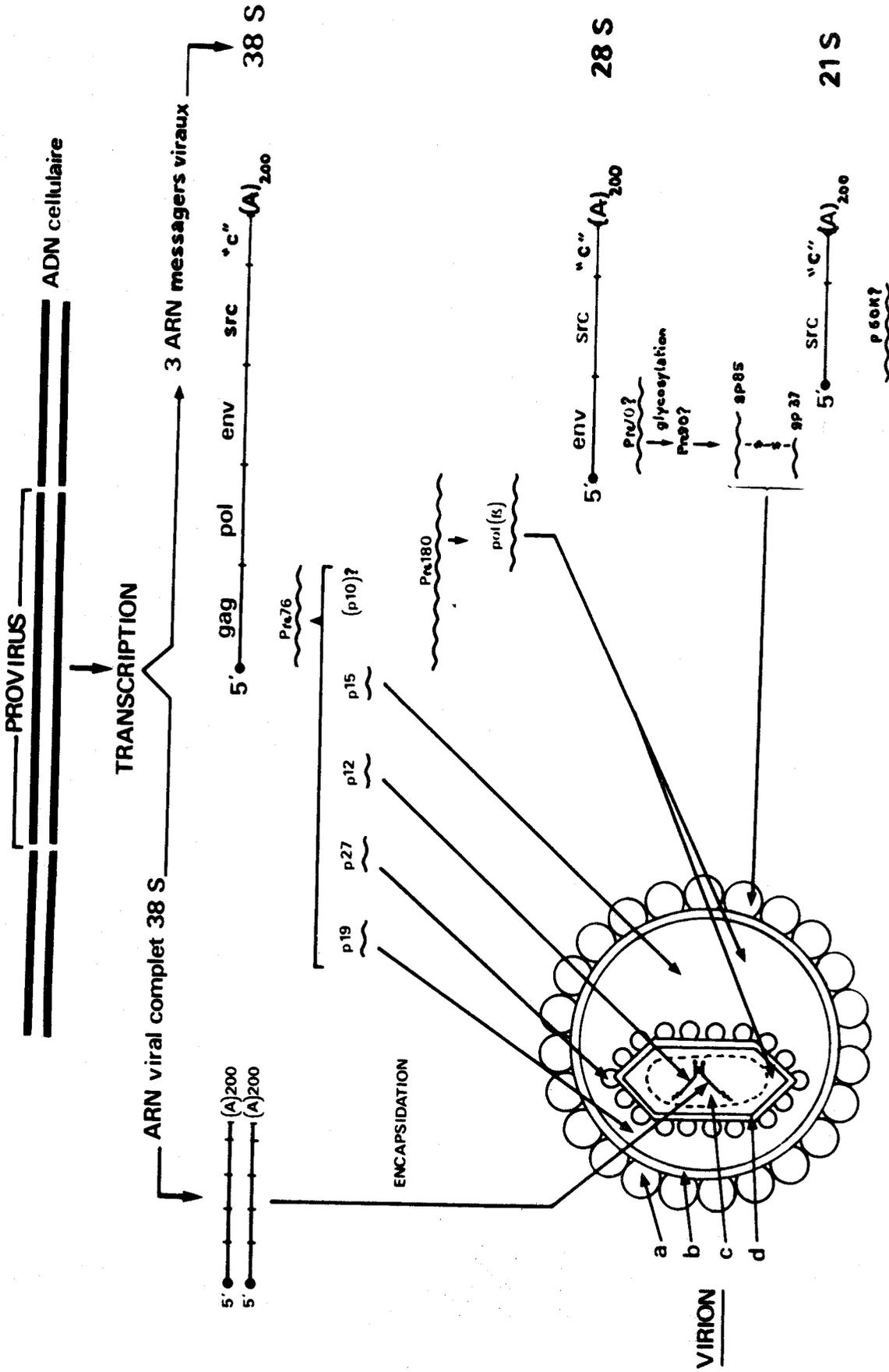
c) synthèse d'ARN viral (Fig. 3)

La transcription d'ARN viral a lieu dans le noyau des cellules infectées (Parsons et al., 1973) et utilise probablement l'ARN polymérase II cellulaire (Rymo et al., 1974 ; Jacquet et al., 1974). La principale matrice est probablement l'ADN proviral bien que de l'ADN viral non intégré subsiste dans les cellules pendant plusieurs jours après l'infection (Hill et al., 1977). La localisation du ou des promoteurs de la synthèse d'ARN viral n'a pas encore été déterminée.

Dans les cellules permissives infectées par les ASV, on a mis en évidence trois classes d'ARNs cytoplasmiques de polarités identiques à celles du génome viral (Weiss et al., 1977 ; Hayward, 1977 ; Fig. 3).

- l'espèce la plus représentée, de poids moléculaire $3,3 \times 10^6$ daltons (soit 10 000 nucléotides), de coefficient de sédimentation 38S, représente la totalité du génome viral ;
- la deuxième espèce a un poids moléculaire de $1,8 \times 10^6$ daltons (soit 5 400 nucléotides), un coefficient de sédimentation de 28 S et contient les gènes env, src, et "c" ;
- l'espèce la plus petite, de poids moléculaire, $1,2 \times 10^6$ daltons (soit 3 600 nucléotides), de coefficient de sédimentation 21S, contient les gènes src et "c".

Ces trois espèces, polyadénylées (Weiss et al., 1977 ; Hayward, 1977) servent de messagers à la synthèse des protéines virales. De plus, une partie de la population des ARNs 38S représente le pool d'ARN viral qui sera encapsidé pour former le virion.



- FIGURE 3 -

TRANSCRIPTION et TRADUCTION de l'ARN VIRAL

- (a) spicule ; (b) enveloppe cellulaire ; (c) nucléoprotéines contenant l'ARN viral ;
- (d) capside ; (—) ADN ; (—) ARN ; (wavy) protéines.



Dans les cellules productrices de virus défectifs dans la région src (ALV, td ASV) ou dans la région env (mutants défectifs pour la répliation), on n'a pu mettre en évidence que deux classes d'ARNs cytoplasmiques viraux. L'une des espèces représente la taille du génome viral entier (35S), l'autre a un coefficient de sédimentation de 21S et contient les gènes env et "c" dans le cas des virus défectifs dans src, ou src et "c" dans le cas des virus défectifs dans env (Weiss et al., 1977 ; Hayward, 1977).

Ces ARNs viraux cytoplasmiques contiennent tous les 10 nucléotides de l'extrémité 5' du génome viral. Ce phénomène de "splicing" qui vient d'être découvert est inexplicable (Weiss et al., 1977).

d) traduction

Les mécanismes de traduction des ARNs messagers viraux en protéines virales, résumés dans la Fig.3, ont été étudiés pour les ASV, mais il semble qu'ils puissent être appliqués aux autres Rétrovirus.

- le gène gag est transcrit à partir d'une molécule d'ARN messager 38S en une polyprotéine précurseur de 76 000 daltons (Pre 76) qui est ensuite clivée pour donner les polypeptides constitutifs de la capsidie (Vogt et al., 1975 ; Shaprio et al., 1976). Le précurseur Pre 76 contient, dans cet ordre, les protéines p19, p27, p12 et p15 (ces deux derniers polypeptides pourraient être dans l'ordre inverse).

. la protéine p19 située dans le virion entre la capsidie et l'enveloppe et également trouvée liée à la région double-brin de l'ARN viral, constitue la phosphoprotéine majeure du virion. Elle pourrait jouer un rôle important dans le processus de répliation. En effet, elle possède une grande affinité, spécifique, pour l'ARN viral.

. la protéine p27, présente en quantité importante dans le virion, est la protéine de capsidie du virus. Elle confère au virus sa spécificité antigénique de groupe (gs).

. la protéine p12, le principal constituant polypeptidique

du complexe ribonucléoprotéique, est une protéine très basique, phosphorylée, liée à l'ARN viral simple brin. Son rôle protecteur est probablement essentiel à l'assemblage du noyau viral. Contrairement à la protéine p19, qui s'attache spécifiquement à l'ARN viral, la protéine p12 possède une affinité aspécifique et se fixe même sur des ARNs de virus murins.

. la protéine p15, localisée entre la capsid et l'enveloppe, semble être responsable du clivage du précurseur géant Pre 76 en protéines de structure (Helm, 1977).

. une protéine de structure p10, mal caractérisée, a pu être mise en évidence à la surface externe du virion par des expériences de dansylation du virion entier.

- le gène pol, est apparemment traduit à partir de l'ARN messager 38S en une protéine précurseur de 180 000 daltons (Pre 180) (Opperman et al., 1977). Bien que cette protéine (Pre 180) contienne les déterminants antigéniques des protéines gag et pol (Opperman et al., 1977), elle ne semble pas être le précurseur des produits du gène gag. Ce précurseur, Pre 180, pourrait provenir d'une non-lecture occasionnelle du codon ambre terminateur du gène gag. Enfin, Pre 180 est le précurseur de la rétopolymérase caractéristique des Rétrovirus. Cette enzyme semble située soit entre la capsid et l'enveloppe, soit proche du génome viral et se compose de deux sous-unités de masses moléculaires 110 000 et 90 000 daltons (Faras et al., 1972 ; Duesberg et al., 1971). Leur phosphorylation semble stimuler son activité enzymatique.
- le premier produit de traduction du gène env est probablement une protéine de 70 000 daltons (Pre 70) traduite à partir de la molécule d'ARN messager 28S. Cette protéine est ensuite glycosylée pour donner un précurseur de 90 000 daltons (Pre 90) (Moelling et Hayami, 1977 ; England et al., 1977). Pre 90 est ensuite clivé et glycosylé, peut-être simultanément, pour donner deux glycoprotéines gp85 et gp 37. Ce clivage pourrait être coordonné

à la migration des glycoprotéines à la surface des cellules infectées (Witte et al., 1977).

Ces deux glycoprotéines sont liées entre elles par un pont disulfure. Elles forment les spicules qui saillent de l'enveloppe virale (Weiss, 1976). Elles sont nécessaires à l'adsorption du virus sur la cellule hôte et responsables de la restriction d'hôte. Chaque virus possède une spécificité d'hôte c'est-à-dire que les glycoprotéines d'enveloppe reconnaissent ou non des sites spécifiques présents à la surface de la cellule. Différents sous-groupes (notés ABCDE) ont été définis selon la capacité du virus à infecter une cellule donnée ; ainsi une cellule de poulet, espèce C (pour chicken) qui ne permet pas à un virus de sous-groupe E de pénétrer sera notée C/E. Il est possible que le clivage de ce précurseur soit nécessaire à l'activation de la fonction biologique de ces spicules comme cela a été récemment décrit pour d'autres enveloppes de virus animaux (Sheid, 1976).

- la molécule d'ARN messager 21S présente dans les cellules infectées par les ASV, semble être l'ARN messager à partir duquel est traduite la protéine transformante. Des résultats récents (Brugge et Erikson, 1977) semblent montrer qu'il existe effectivement une protéine de 60 000 daltons (p60) qui serait la protéine transformante.

C - LES VIRUS ENDOGENES

Parmi les virus endogènes aviaires, on a mis en évidence un virus appelé RAV-O, présent uniquement dans l'ADN des cellules normales de poulet. Ce génome endogène RAV-O peut être induit dans certaines lignées congéniques de poulets telles que les lignées 7 et 15 (Crittenden et al., 1974) ou par l'action d'agents mutagènes. Chez des poulets non sélectionnés, on constate en général une expression non coordonnée d'une partie des séquences virales endogènes. Ainsi, des cellules permettant l'expression du gène env sont appelées chf+ (chick helper factor) et sont capables de compléter un mutant d'ASV possédant une délétion du gène env.

Le virus RAV-O induit est parfaitement toléré par les cellules, et n'est ni leucémogène, ni sarcomatogène (Motta et al., 1975). Il convient d'observer que ce virus endogène n'existe plus à l'état de provirus lorsqu'on s'adresse à d'autres espèces aviaires comme le faisan ou le canard. Ces séquences endogènes RAV-O ont été récemment localisées dans les macrochromosomes des cellules normales de poulet (Padgett et al., 1977).

On ne sait pas si ces virus endogènes ont été produits par le génome cellulaire ou s'ils ont été transmis à un moment de l'évolution de façon horizontale d'une espèce à l'autre, puis maintenus ensuite par transmission génétique dans l'espèce considérée.

D - LE GENE SRC

Plusieurs théories ont été avancées en vue d'expliquer le processus de la transformation. Elles partent toutes du principe que les cellules cancéreuses possèdent des gènes transformants ; cependant, les mécanismes de la transformation décrits sont différents de l'une à l'autre en fonction de la présence et de l'activité de ces gènes dans les cellules saines.

Dans la théorie provirale (Temin, 1971), la transformation serait due à des gènes transformants introduits dans l'ADN de la cellule hôte après infection virale exogène.

D'autres auteurs, Huebner et Todaro (1969) ont proposé la théorie oncogène : ils considèrent que les cellules saines possèdent dans leur ADN des gènes potentiellement cancérogènes, mais inactifs. Leur activation entraînerait la carcinogénèse.

En outre, une théorie plus récente, la théorie protovirale (Temin, 1974) suppose que les cellules saines possèdent des séquences nucléotidiques non transformantes qui n'acquerraient un pouvoir transformant qu'après mutation.

La théorie provirale a inspiré de nombreux travaux, mais dans les cellules transformées, ce n'est que récemment que la présence de gènes viraux transformants a pu être démontrée.

Depuis quelques années, plusieurs expériences ont tenté de démontrer que les ASV étaient porteurs d'un gène responsable de la transformation de la cellule hôte. Martin (1970), le premier, isola des mutants d'ASV thermosensibles pour le maintien de l'état transformé, mais non thermosensibles pour la réplication virale. Puis, Vogt (1971) et ensuite Martin et Duesberg (1972) ont observé une ségrégation spontanée de virus non transformants qui se sont avérés être des mutants de délétion des ASV ayant perdu environ 20% du génome viral (Lai et al., 1973 a).

L'analyse génétique des mutants thermosensibles par des expériences de complémentation a permis d'impliquer un gène et un seul dans la transformation (Wyke et al., 1975). Ainsi, les ASV semblent porteurs d'un gène essentiel pour l'initiation et le maintien de la transformation des fibroblastes, mais non, requis pour la réplication. Ce gène a été dénommé "src" (pour sarcomatogène).

Ensuite, Stéhelin et al. (1976a) ont préparé une sonde ADN radioactive (cDNA sarc) complémentaire des séquences nucléotidiques sarc, représentant tout ou partie du gène viral transformant, en éliminant toutes les séquences non sarc par sélection contre les mutants de délétion td ASV. Le génome des ASV contenant environ 10 000 nucléotides, la complexité du cDNA sarc (d'environ 1 600 nucléotides) est suffisante pour représenter un cistron complet.

La sonde cDNA sarc a été utilisée dans des réactions d'hybridation moléculaire pour rechercher la présence de séquences nucléotidiques homologues, d'une part dans le génome d'un grand nombre de virus provoquant des sarcomes ou des leucoses chez l'animal et d'autre part dans l'ADN des espèces aviaires comme d'autres espèces de vertébrés.

Il s'est avéré que toutes les souches virales sarcomatogènes aviaires testées possèdent des séquences nucléotidiques très semblables à celles du cDNA sarc. Par contre, aucun génome viral appartenant aux virus de leucoses aviaires n'hybrident avec cette

sonde. Enfin, aucune hybridation entre le cDNA sarc et, soit l'ADN de virus sarcomatogènes et leucémogènes de mammifères (les virus sarcomatogènes murins, le virus de la tumeur mammaire de la souris, le virus sarcomatogène félin), soit le génome des virus à ADN (le virus simien SV40, le virus de l'herpès:herpès simplex-1, l'adénovirus 5) n'a été détectée.

En conclusion, seuls les ASV contiennent des séquences nucléotidiques hybridant avec la sonde cDNA sarc.

E - LES SEQUENCES SARC CELLULAIRES

En testant les ADNs extraits de plusieurs espèces aviaires non infectées (poulet, caille, canard et émeu), Stehelin et al., (1976b) ont mis en évidence la présence de séquences nucléotidiques apparentées au cDNA sarc dans tous ces ADNs. Celles-ci ont été notées sarc pour éviter toute ambiguïté avec le gène src viral. L'analyse des cinétiques d'hybridation entre la sonde cDNA sarc et l'ADN de poulet a montré que les séquences sarc cellulaires étaient présentes dans l'ADN non répétitif du génome cellulaire des poulets à raison d'une à deux copies par génome haploïde.

Par ailleurs, la mesure de la thermostabilité des hybrides formés entre la sonde cDNA sarc et l'ADN proviral d'une part, et entre la sonde cDNA sarc et les ADNs aviaires d'autre part, apportait la preuve que les séquences sarc virales avaient divergé par rapport aux séquences nucléotidiques présentes dans l'ADN de poulet et que les séquences sarc cellulaires évoluaient en fonction de la distance phylogénétique, par rapport au poulet, des autres espèces aviaires testées .

Très récemment, d'autres auteurs ont montré que la transcription des séquences sarc ne semblaient pas coordonnée à l'expression dans la cellule des deux gènes env et gag du virus RAV-O (Spector et al., 1977). Ces résultats, en accord avec ceux de Padgett et al. (1977), indiquent que les séquences sarc ne sont pas liées génétiquement au génome du virus endogène RAV-O.

F - PRESENTATION DE NOS TRAVAUX

Nous avons repris les expériences d'hybridation entre la sonde cDNA sarc et l'ADN de plusieurs espèces aviaires dans le cadre d'un essai de standardisation des conditions d'hybridation.

Il était en effet nécessaire de contrôler les différents facteurs permettant d'obtenir la meilleure sensibilité de détection des séquences sarc avant d'aborder l'étude d'autres classes de vertébrés.

Nous avons ainsi pu préciser d'une part la taille optimale que doit avoir l'ADN, les conditions d'incubation (force ionique), et, d'autre part, la méthode d'analyse des hybrides la plus appropriée. Nous avons appliqué ces conditions d'hybridation à l'étude de l'ADN de vertébrés, des mammifères aux poissons.

La présence des séquences sarc cellulaires dans l'ADN des espèces aviaires pose le problème de leur fonction dans la physiologie de la cellule. De telles séquences sont-elles transcrites dans les cellules normales ? possèdent-elles des propriétés oncogènes propres ? et peuvent-elles être induites sous l'action d'agents cancérigènes extérieurs (carcinogènes chimiques, radiations, etc..) ainsi que l'ont proposé Huebner et Todaro dans la formulation de leur hypothèse oncogène ?

Cette hypothèse a été testée en abordant l'étude de la transcription en ARN des séquences sarc cellulaires dans des cellules saines ainsi que dans des cellules ou tumeurs induites par des agents oncogènes autres que les ASV.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

PROVENANCE DU MATERIELADNs

- Oiseau :
- embryons de poulet C/E de 10-11 jours de la race Brown Leghorn provenant de l'élevage de l'Institut Gustave Roussy à Villejuif (94).
 - embryons de caille japonaise provenant du Laboratoire de Génétique factorielle, INRA, Jouy en Josas - Dr Perramon.
 - foie de dinde acheté en épicerie fine.
 - foie de canard provenant d'une ferme.
 - foie d'un émeu provenant du zoo de Sacramento, Californie (USA).
- Humain :
- placenta humain de la clinique d'accouchements, Pavillon Olivier, Lille (59).
- Singe :
- foie et rate de babouin du centre de primatologie de Villejuif(94)
- Rongeur :
- foie et rate de souris Balb/C provenant de l'Institut Pasteur de Lille (59).
- Reptile :
- foie, rate et tissus d'une couleuvre d'espèce zaménis de Montpellier achetée dans le commerce.
- Batracien:
- tissus extraits de cuisses de grenouille congelées, de Hongrie, achetées dans le commerce.
 - foie, rate et tissus de pleurodèles provenant de l'élevage de l'UER de Biologie Animale de l'Université de Sciences de Lille I-B. Boilly et M. Durchon.
- Bactérie :
- Escherichia Coli K12 (C600) provenant du Laboratoire de Virologie U 102 de l'INSERM (Lille)-Dr J. Delafonteyne.

ARNs

- tumeurs spontanées de poulet - H. Temin, Wisconsin (USA).
- fibroblastes d'embryons de caille et tumeurs induits par le méthylcholanthrène (MCA) - C. Moscovici, Gainesville, Floride (USA).
- tumeurs de poulet induites par le diméthylbenzanthracène (DMBA) - S. Lerman, New York University Medical Center (USA).
- fibroblastes d'embryons de poulet transformés par le virus de l'érythroblastose aviaire (AEV), érythroblastes de poulet induits par le même virus (AEV) ; fibroblastes d'embryons de poulet transformés par le virus de la myélocytomatose aviaire (MC29)- T. Graf Tubingen (RFA).
- fibroblastes d'embryons de canard transformés par un pseudotype d'un virus sarcomatogène murin ; Harvey MSV (NZB) - J. Levy, San Francisco, Californie (USA).
- carcinomes de poulet induits par le virus MC29 - A. Langlois et D. Bolognesi, Durham, Caroline du Nord (USA).
- cellules de moelle induites par le virus de la réticuloendothéliose aviaire (REV) - R. Franklin, (USA).

cDNAs

- [³H] cDNA globine d'activité spécifique 80 x 10⁶ cpm/μg - A. Therwath et K. Scherrer, IBM, Paris.
- [³H] cDNA ovalbumine d'activité spécifique 60 x 10⁶ cpm/μg - M. Bellard et C. Chambon, Fac. Med., Strasbourg.

ABREVIATIONS - SOLUTIONSAbréviations

AcONa	: acétate de sodium (Merck).
ADN	: acide déoxyribonucléique.
ARN	: acide ribonucléique.
C-TAB	: N-Cétyl-N,N,N-Triméthyl-ammonium Bromure (Merck).
DEPC	: diéthylpyrocarbonate (Merck).
DMSO	: diméthylsulfoxyde (Carlo-Erba ou Merck).
EtOH 95°	: éthanol 95° (Prolabo).
HAP	: hydroxyapatite (Biorad-HTP).
SDS	: dodécyl sulfate de sodium (Labosi ou Merck).
STE	: NaCl 0.1 M, Tris-HCl 0.02 M, EDTA 0.001 M, pH 7,4 (Produits Merck).
TE	: Tris-HCl 0.02 M, EDTA 0.01 M, pH 7,4 (Produits Merck).

Solutions

- Tampon d'hybridation : NaCl 0.6 M, Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.002 M (pH 7,4),
ADN 4S de thymus de veau entraîneur (500 µg/ml).
- Solution de phénol-chloroforme : phénol (2 vol.) saturé par du tampon STE,
ajusté à pH 7,4 avec NaOH, chloroforme (1 vol.) - (produits Merck).
- Tampon phosphate de sodium : solution stock (2 M) à partir de laquelle sont
préparés les différents tampons utilisés. Proportions équimoléculaires :
- . NaH₂PO₄, 1 H₂O (1 M), dihydrogénophosphate de sodium monosodique,
 - . Na₂HPO₄, (1 M) hydrogénophosphate de sodium disodique, pH 7
(produits Merck).
- Liquide à scintillation : PPO (5g), POPOP (0.3g), Toluène (qsp 1 l.)
(Produits H. et W.)

- (1) Les proportions indiquées se comprennent toujours en volumes pour les liquides, et en masse pour les solides.
- (2) Sans spécification contraire, les solutions sont toujours effectuées dans l'eau.

A - CELLULES ET VIRUS

Les cellules sont préparées à partir d'embryons de poulet C/E de 10-11 jours de la race Brown Leghorn. Les fibroblastes sont cultivés à 39°, dans une étuve sous atmosphère contenant du CO₂ (5%), en milieu M 199 (Gibco) supplémenté par : du sérum de veau (5%), du sérum de poulet (1% , Gibco) inactivé (30 min., 50°), du bactotryptose phosphate broth (5%), du diméthylsulfoxyde (1%, Merck), de la glutamine (1% en vol. d'une solution aqueuse à 3%, Merck), deux antibiotiques:pénicilline (100 UI/ml, Specia) et streptomycine (50 µg/ml, Specia), et de la fungizone (2,5 µg/ml, Squibb).

Les fibroblastes sont infectés au deuxième passage à une multiplicité d'infection de 0.1, passés deux fois de suite, puis cultivés en rollers plastiques (Corning ou Stérilin). A confluence des cellules, le milieu est appauvri en sérum (2% au lieu de 5%) de façon à ralentir la croissance cellulaire, ce qui ne modifie pas le taux de la production virale. On peut ainsi maintenir les cultures cellulaires pendant 3 à 6 mois. Le milieu renouvelé toutes les 24 h. est conservé à - 70° dans un congélateur (Revco).

B - TITRAGE DU VIRUS

Le titrage des virus transformants (nd) présents dans un milieu de culture est effectué selon la technique classique mise au point par Vogt (1969). Elle consiste à titrer le virus par comptage des foyers de cellules transformées, chaque foyer provenant de l'infection d'une particule virale (FFU = Focus Forming Unit). Des cultures secondaires de fibroblastes de poulet, préparées en boîtes de Pétri plastiques (60 mm de diamètre, Corning) à raison de 2.5 - 3 x 10⁶ cellules par boîte, sont infectées par 0.1 ml de la dilution appropriée du surnageant à tester. Les dilutions du virus sont faites dans le milieu M 199 sans sérum, contenant du Polybrène (2 µg/ml, Aldrich) afin d'accroître l'efficacité de l'infection (Toyoshima et Vogt, 1969). Après 2 h. à 39°, du milieu M 199 supplémenté (5ml) est ajouté sur les boîtes. Après 18 h. de contact à 39°, le milieu est retiré et les cellules recouvertes par du milieu (5 ml/boîte) contenant : de l'agar (0.5%, Special Noble, Difco), du sérum de veau (5%, Gibco), du sérum de poulet (1%, Gibco) et du bactotryptose phosphate broth (5%, Difco). Les foyers peuvent être comptés après incubation (10 à 15 jours, 39°).

C - PREPARATION D'ARN 70S VIRAL

L'ARN 70S viral est préparé selon la technique décrite par Quintrell et al. (1974). Le milieu de culture (8 - 10 l.) de cellules infectées est concentré (10 fois) dans un concentrateur (Amicon) après élimination des débris cellulaires par centrifugation (10000 rpm, 10 min., + 4°). Le virus est ensuite sédimenté (19000 rpm, 90 min., + 4°, rotor 19 ou 27000 rpm, 30 min., + 4°, rotor SW27, centrifugeuse Spinco-Beckman). Le culot de virus est remis en suspension dans le tampon d'extraction STE contenant du SDS (1%) et de la protéinase K (100 µg/ml, Boehringer). Après incubation (1 h., 37°), l'ARN viral est extrait deux fois de suite par un mélange phénol-chloroforme (produits Merck) dans la proportion de 2:1. La phase aqueuse contenant l'ARN

viral est ajustée en sel (AcONa, 0.2 M) puis l'ARN est précipité à froid (EtOH 95° 2 vol., ARN de levure 200 µg/ml, 12 h. -20° ou 2 h. -70°). L'ARN viral est alors sédimenté (10000 g, 10 min., + 4°), rincé par un mélange STE-EtOH 95° (1:2) puis repris dans un tampon STE. L'ARN 70S est séparé des autres constituants de faible poids moléculaire, selon la technique décrite par Bishop et al. (1970b), par centrifugation de sédimentation en gradient de saccharose 15-30% dans du STE (3,5 h., 40000 rpm, rotor SW41, + 4°, centrifugeuse Spinco-Beckman). Les fractions correspondantes au pic d'ARN 70S sont réunies et précipitées. L'ARN viral est alors repris dans du tampon STE à une concentration finale de 1mg/ml.

D - PREPARATION D'ARN CELLULAIRE TOTAL

L'ARN cellulaire total a été extrait de tissus, embryons et cellules selon une adaptation de la technique décrite par Varmus et al. (1973). Tissus et embryons sont lacérés puis broyés (Broyeur Ultra-Turrax, Ika Werk ; 1 min. position 7) dans du tampon STE contenant du SDS (0.5%) et de la pronase (500 µg/ml, Calbiochem). La protéinase K (50-100 µg/ml, Boehringer) en présence de SDS (1%) est utilisée actuellement de préférence à la pronase. Après incubation (1-2 h., 37°), et ajustement en SDS (1%) pour l'extraction utilisant la pronase, la suspension est extraite trois fois de suite à température ambiante par un volume égal de phénol-chloroforme (2:1). La phase aqueuse contenant l'ARN est ajustée en sel (AcONa 0.2 M) et l'ARN total est précipité à froid (EtOH 95° 2 vol., 12 h., - 20°). Puis l'ARN cellulaire total est sédimenté (10000 g, 10 min., + 4°), rincé par un mélange STE-EtOH 95° (1:2) repris dans du tampon STE à une concentration finale de 10 à 20 mg/ml. Chaque préparation d'ARN cellulaire extrait dans ces conditions est contrôlée pour deux critères. Le premier critère concerne la taille des ARNs ; un aliquot est testé par centrifugation de sédimentation en gradient de saccharose 15-30% dans du STE (16 h., 35 rpm, rotor SW41, + 4°, centrifugeuse Spinco-Beckman). Le gradient est lu en densité optique à 260 nm par un analyseur de gradient (ISCO-UA5). Le profil obtenu visualise les ARNs ribosomiaux et nous permet de détecter une dégradation éventuelle des ARNs par la ribonucléase. Le deuxième critère concerne la pureté de l'ARN cellulaire. En effet, l'ARN cellulaire total extrait dans ces conditions contient toujours 10 à 20% d'ADN cellulaire. La quantité d'ADN contaminant est déterminée par le test à la diphénylamine décrit par Seibert (1940). Tous les tampons utilisés sont traités au DEPC (0.1%) et autoclavés de façon à éliminer toutes traces de ribonucléase.

E - ISOLEMENT DE L'ARN POLYADENYLE (POLY A+)

L'ARN cellulaire total est purifié comme il l'a été décrit précédemment. 500 mg d'oligo-dT-cellulose (T.3 grade, Collaborative Research, Inc.) sont remis en suspension dans un tampon KCl 0.5 M, Tris-HCl 0.01 M (pH 7,6) et chargé sur une colonne (0,9 x 10 cm). Après équilibrage, l'ARN total (5 mg à 500 µg/ml) est déposé sur la colonne. Les ARNs non polyadénylés (poly A-) comprenant les ARNs ribosomiaux (rARN) et 10 à 20% des ARNs messagers viraux sont exclus de la colonne. L'ARN poly A- est recueilli, ras-

semblé et recyclé. L'ARN messager poly A+ fixé sur l'oligo -dT- cellulose est élué par un tampon Tris-HCl 0.01 M (pH 7,6). L'élué est suivie en densité optique à 260 nm à l'aide d'un analyseur de gradient (Isco-Model UA5). Les fractions correspondant à l'ARN poly A+ sont rassemblées et ajustées en sel (AcONa 0.2 M). L'ARN poly A+ est alors précipité à froid (EtOH 95°, 3 vol., - 20°) en présence d'ARN de levure entraîneur 200 µg/ml. La colonne peut être utilisée plusieurs fois de suite.

F - PREPARATION D'ADN CELLULAIRE

1° - Extraction

L'ADN a été extrait soit d'embryons de poulet, soit de différents tissus de vertébrés. Tissus et embryons sont broyés (Broyeur Ultra-Turrax, Ika Werk, 1 min. position 7) dans un tampon NaCl 0.1 M, Tris-HCl 0.02 M, EDTA 0.01 M (pH 8), et de la protéinase K (50 µg/ml), à raison de 20 ml/embryon ou 10 g de tissus. A l'homogénat est ajouté du SDS (1%), juste avant incubation sous agitation magnétique (2 h. à 12 h., 37°). La suspension est alors extraite (24°) trois fois de suite par un volume égal de phénol (Merck) saturé par du STE et ajusté à pH 8. La phase aqueuse contenant les acides nucléiques, est ajustée en sel (AcONa 0.2 M), puis les acides nucléiques ARN et ADN sont précipités à froid (EtOH 95° 2 vol., 12 h. - 20°). Les acides nucléiques sont sédimentés (10000g, 10 min., + 4°), rincés par un mélange STE-EtOH 95° (1:2), puis dissous dans du tampon TE (1/2 à 2/3 du volume initial). L'ARN présent dans la préparation est digéré par la ribonucléase pancréatique bovine (100 µg/ml, 1 h., 25°). La RNase est préalablement incubée (10 min., 100°) afin d'éliminer toute trace de déoxyribonucléase. Puis l'ADN est extrait deux fois de suite par un volume égal de phénol saturé par du STE, ajusté à pH 8. Après ajustement en sel de la phase aqueuse (AcONa 0.2 M), l'ADN est précipité à froid (EtOH 2 vol., 12 h., - 20°). Les ADNs de sperme de saumon et de thymus de veau (Sigma) ont été traités de la même façon.

2° - Réduction de l'ADN en fragments de taille 4-6S

L'ADN sédimenté (10000 g, 10 min., + 4°) est dissous dans du tampon TE à une concentration finale de 1-2 mg/ml et réduit par les ultrasons (microsonde, 10 min., 70 Watts, Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company) en fragments de 75 à 200 nucléotides de long correspondant à une constante de sédimentation de 4 à 6S en gradient de saccharose. L'ADN dénaturé par un traitement alcalin (NaOH 0.3 N, 12 h., 37°) puis neutralisé par HCl, est précipité à froid (EtOH 95° 2 vol., 12 h., - 20°). L'action des ultrasons peut être remplacée par un traitement alcalin à chaud (NaOH 0.3 N, 20 min., 100°C) suivi d'une neutralisation par HCl. Après sédimentation (10000 g, 10 min., + 4°), l'ADN est repris dans du tampon TE à une concentration finale comprise entre 10 et 15 mg/ml. La taille de l'ADN ainsi préparé est testée par centrifugation de sédimentation en gradient alcalin de saccharose 5-20% dans un tampon NaCl 0.6 M, NaOH 0.3 N, EDTA 0.01 M, pH 7,4 (16 h., 35000 rpm, rotor SW41, + 24°, centrifugeuse Spinco-Beckman). Le gradient est lu en densité optique à 260 nm à l'aide d'un analyseur de gradient (Isco-Model UA5). La taille de l'ADN est calculée à partir d'un marqueur 4S d'ADN [³H].

G - PREPARATION D'ADN CELLULAIRE MARQUE SEQUENCE UNIQUE

De l'ADN séquence unique [^3H] a été préparé à partir de fibroblastes d'embryons de poulet cultivés en présence de [^3H] Méthyl-Thymidine (NEN) (25 $\mu\text{Ci/ml}$ - 2 x 24 h.). L'ADN marqué est extrait, dénaturé et réassocié (Cot = 200, 0.6 M NaCl, 68°). L'ADN séquence unique qui ne s'est pas réassocié est isolé sur une colonne d'hydroxyapatite (tampon phosphate de sodium 0.14 M, 60°). L'activité spécifique de l'ADN [^3H] ainsi obtenu est de 20000 cpm/ μg .

H - PREPARATION DE L'AMORCE ADN DE THYMUS DE VEAU

L'ADN de thymus de veau utilisé comme amorce de transcription d'un ARN viral par l'ADN polymérase - ARN dépendante d'AMV a été préparé selon la technique décrite par Taylor et al. (1976). L'ADN est tout d'abord réduit en fragments de 2 à 40 nucléotides de long par action de la déoxyribo-nucléase I (DNase I, exempte de RNase, Worthington) ; de l'ADN de thymus de veau (250 mg, Sigma) est dissous dans un tampon Tris-HCl 0.02 M, MgCl₂ 0.01 M (pH 7,4) contenant de la DNase I (200 $\mu\text{g/ml}$). Après incubation (30 min., 24°), la DNase est dénaturée (10 min. 100°). L'ADN ainsi digéré peut être utilisé directement comme amorce. Toutefois, une purification supplémentaire de ce produit sur une colonne de DEAE - Séphadex permet de sélectionner des morceaux de 8 à 12 nucléotides de long. En effet, Goulian et al. (1973) ont montré que ces morceaux permettaient une transcription plus efficace de l'ARN viral. Après extraction, les différentes tailles d'ADN sont séparées sur une colonne de DEAE-Séphadex (vol. tot. 25 ml, A-25 Pharmacia) équilibrée dans un tampon Tris-HCl 0.005 M (pH 7,4). Des morceaux de 8 à 12 nucléotides de long sont élués par le même tampon contenant du sel (NaCl 0.3 M). Après précipitation à froid (AcONa 0.2 M, EtOH 95° 2 vol., - 20°), l'ADN est repris dans un tampon Tris-HCl 0.01 M (pH 8,1) à une concentration finale de 10 mg/ml.

I - PREPARATION DE SONDES cDNA VIRALES

Les sondes ADN virales radioactives ont été préparées selon la technique décrite par Goulian et al (1973) et mise au point plus récemment par Taylor et al. (1976). Cette technique consiste à synthétiser une sonde ADN complémentaire (notée cDNA) par une réaction exogène mettant en jeu : un ARN 70S ou 35S viral, la rétopolymérase, purifiée à partir du virus de la myéloblastose aviaire (polymérase d'AMV), en présence d'une amorce ADN de thymus de veau. Cette réaction présente des avantages considérables par rapport à la préparation de cDNA par la réaction de transcriptase inverse endogène décrite par Garapin et al. (1973). En effet, elle permet d'obtenir une copie fidèle, représentative du génome viral car l'initiation de la transcription par l'amorce ADN a lieu tout au long du génome. Ainsi, tous les gènes sont transcrits au même taux et ceci avec un rendement de la réaction de 10 à 20 fois supérieur à celui de la réaction endogène. Ainsi, on synthétise 0.5 à 1 μg de cDNA viral / μg d'ARN viral. Cette méthode présente cependant un inconvénient car l'AMV polymérase transcrit dans ces conditions n'importe quelle matrice d'ARN contaminant présente.

1° - Synthèse in vitro

Nous avons préparé les sondes cDNA radioactives suivantes :
 $[^3\text{H}]$ cDNA nd PrC représentative du virus nd PrC ; $[^{32}\text{P}]$ cDNA td B77 représentative du virus td B77. Le mélange réactionnel contient : $[^3\text{H}]$ dTTP (2×10^{-6} M, 86.4 Ci/mmole, NEN) ou $[^{32}\text{P}]$ dTTP (2×10^{-6} M, 341.9 Ci/mmole, NEN) ; Tris-HCl 0.05 M (pH 8,1) ; dithiotréitol 0.002 M ; MgCl_2 0.008 M ; Actinomycine D (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rhône Poulenc) ; KCl 0.05 M ; dATP, dCTP, dGTP non marqués (10^{-4} M), dissous dans du Tris-HCl 0.1 M, pH 8,1 (PL Biochemicals, Inc.) ; ADN de thymus de veau amorce (2 mg/ml, Sigma) ; ARN 70 S viral (2 mg/ml) ; AMV polymérase (5% du vol. réactionnel total, J. Beard, Life Sciences Inc., St Petersburg, Florida). La réaction d'incorporation est arrêtée par l'EDTA 0.05 M après incubation (1h. 40°).

2° - Purification

a) extraction

Après digestion de l'AMV polymérase par un traitement enzymatique (protéinase K 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, SDS 1%, 1 h., 37°), le cDNA est extrait deux fois de suite par un mélange phénol-chloroforme (2:1) à température ambiante. La phase aqueuse est ajustée en sel (AcONa 0.2 M) puis, le cDNA synthétisé et l'ADN de thymus de veau en excès, sont précipités à froid (EtOH 95° 2 vol., ARN de levure entraîneur 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12 h. - 20° ou 3 h. à 70°).

b) Traitement à la RNase A

Suit alors le traitement à la ribonucléase pancréatique bovine (RNase A) (bouillie 10 min., 100°) permettant la digestion de l'ARN viral 70 S. Les acides nucléiques sont sédimentés (10000 g, 10 min., + 4°), rincés par un mélange STE-EtOH 95° (1:2), dissous dans du tampon STE contenant de la RNase A 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Boehringer), et incubés (1 h., 37°).

3° - Séparation sur colonne de Séphadex G50

Le cDNA viral radioactif est séparé de l'ADN amorce en grand excès par passage sur une colonne de Séphadex (G50 Fine, Pharmacia, 1,4 x 58 cm) équilibrée dans un tampon Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.25 M, EDTA 0.01 M, SDS 0.5%, (pH 7,4). Le cDNA marqué est exclu en front de colonne alors que l'ADN de thymus de veau de petite taille est élué plus tard.

4° - Chromatographie sur hydroxyapatite

Le cDNA est alors fractionné sur HAP selon la technique décrite par Fanshier et al. (1971). Une colonne est préparée dans une pipette plastique jetable (5 ml) bouchée à son extrémité inférieure par du coton de verre (1 cm). De l'hydroxyapatite (lg, Biorad HTP) en solution dans un tampon phosphate de sodium (0.01 M, pH 7) est coulé dans la colonne maintenue dans un bain-marie régulé à 60°. Le cDNA est adsorbé sur l'HAP dans un tampon phosphate de sodium (0.01 M) et rincé avec ce même tampon de façon à éliminer le SDS présent. Le cDNA simple brin est alors élué par un tampon phosphate de sodium (0.14 M) et les fractions collectées (collecteur Isco, 1,9 ml/fraction ; débit approximatif 0.5 ml/min.). La visualisation de l'élué est obtenue par précipitation d'un aliquot de chaque fraction (acide perchlorique dilué, 1 ml), en présence d'ADN de thymus de veau (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Le cDNA double brin est ensuite élué par un tampon phosphate de sodium (0.4 M).

5° - Précipitation des acides nucléiques par le Cétyltriméthylammonium Bromure (C-TAB)

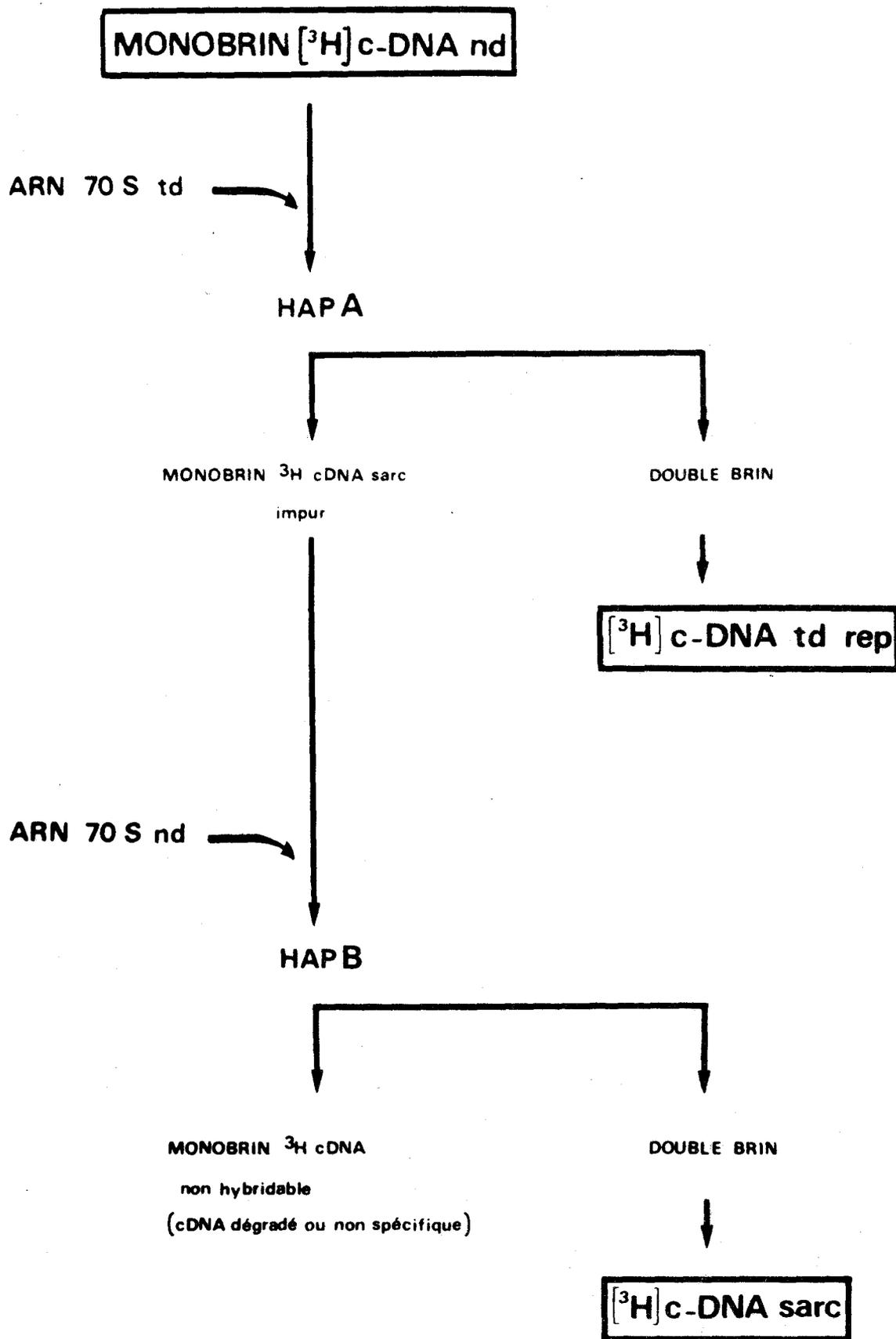
Le cDNA est ensuite séparé des ions phosphates par précipitation au cétyltriméthylammonium bromure selon une adaptation de la technique décrite par Reitz et al. (1972). Le cDNA viral est précipité (10 min., 0°) spécifiquement par du C-TAB (0.005 M) en présence d'ARN de levure entraîneur (100 µg/ml). La suspension est alors centrifugée (10 min., 10000 g, + 4°). Les traces de cDNA radio-actif présentes en solution sont précipitées par addition d'ARN de levure (100 µg/ml) dans le même tube, sans remettre en suspension le culot. Après centrifugation (10 min., 10000 g, + 4°), le culot est dissous dans du NaCl (1 M) et toute trace de RNase est éliminée par traitement alcalin (NaOH 0.3 M, 12 h., 37°). Après neutralisation par HCl, le cDNA monobrin est sédimenté (10 min., 10000 g, + 4°) et dissous dans du tampon d'hybridation contenant de l'ADN de thymus de veau entraîneur (1 mg/ml) et de l'ARN de levure entraîneur (500 µg/ml).

Les grandes quantités d'entraîneur permettent d'éviter l'attachement de la sonde cDNA au plastique ou au verre. Toutes les sondes ainsi préparées sont conservées à froid (- 20°). Leur activité spécifique est la suivante : $[^{32}\text{P}]$ cDNA td B77 = 100×10^6 cpm/µg de cDNA au jour de sa préparation ; $[^3\text{H}]$ cDNA nd PrC = 20×10^6 cpm/µg de cDNA.

J - PREPARATION DE SONDES SPECIFIQUES

Deux sondes ont été sélectionnées à partir d'une sonde $[^3\text{H}]$ cDNA simple brin transcrite du génome du virus nd PrC. La stratégie adoptée, représentée sur la figure 4, a été modifiée selon la technique décrite par Stehelin et al. (1976a). Une utilisation contrôlée de l'hybridation nous a permis de sélectionner, d'une part, une sonde $[^3\text{H}]$ cDNA td rep représentative du génome td PrC, d'autre part, une sonde $[^3\text{H}]$ cDNA sarc, spécifique des séquences associées à la transformation des fibroblastes par les ASV. La sonde cDNA sarc représente une copie uniforme correspondant à 16% du génome nd PrC soit approximativement à la taille de la délétion des mutants td- Duesberg et Vogt (1970), Lai et al. (1973b), Duesberg et Vogt (1973), Neiman et al. (1974)-.

Brièvement, la sonde simple brin $[^3\text{H}]$ cDNA nd PrC est hybridée avec un large excès d'ARN viral 70S du mutant de délétion td PrC (rapport cDNA : RNA = 1 : 2,5 ; Crt = 50 M x sec. x 1^{-1}). Un fractionnement sur HAP permet de séparer le cDNA non hybridé (simple brin) de l'hybride (cDNA - RNA). Le cDNA récupéré des hybrides représente une copie fidèle du génome td ($[^3\text{H}]$ cDNA td rep). Le cDNA monobrin contient encore des impuretés non virus spécifiques. Il est à nouveau hybridé mais cette fois avec un ARN 70S nd PrC (rapport cDNA : RNA = 4 : 1 ; Crt = 2 M x sec. x 1^{-1}) de façon à ne sélectionner que les séquences virales. Les hybrides sont purifiés par chromatographie sur HAP et le cDNA sarc est séparé de l'ARN viral par traitement alcalin. Chacune des sondes obtenues est alors testée par hybridation contre différents ARN viraux de façon à vérifier que chaque sonde est bien représentative de la partie du génome pour laquelle elle a été sélectionnée. L'activité spécifique des deux sondes $[^3\text{H}]$ cDNA td rep et $[^3\text{H}]$ cDNA sarc est de 20×10^6 cpm/µg de cDNA.



- FIGURE 4 -
PREPARATION de SONDES SPECIFIQUES

K - HYBRIDATION MOLECULAIRE

Les réactions d'hybridation ont été réalisées dans des conditions strictes (0.6 M NaCl, 68°).

1° - ADN-cDNA

Les ADNs cellulaires de taille 4-6S, préalablement dénaturés (10 min. 100°) sont hybridés ($Cot = 2 \times 10^4 M \times sec. \times l^{-1}$) avec les sondes suivantes : [³H] cDNA sarc ; [³H] cDNA td rep ; deux sondes spécifiques des gènes globine et ovalbumine [³H] cDNA glo, [³H] cDNA ova, [³²P] cDNA td B77. Chaque échantillon hybridé dans un volume réactionnel de 200 µl en tampon d'hybridation contient : une sonde [³H] cDNA (1000cpm), sonde [³²P] cDNA (1000 cpm) et de l'ADN cellulaire (8 mg/ml).

2° - ARN-cDNA

Les ARNs cellulaires sont hybridés (90 h., 68°) dans du tampon d'hybridation en présence de sonde [³H] cDNA sarc (1000 cpm/éch.) et de sonde [³²P] cDNA td B77 (1000 cpm/éch.) à un Crt de $10^2 - 4.10^4 M \times sec. \times l^{-1}$ en faisant varier la concentration d'ARN cellulaire.

3° - Analyse des hybrides

Les hybrides sont analysés par digestion à la nucléase S1 d'*Aspergillus Orizae* selon la technique décrite par Leong et al. (1972). Les hybrides ADN cell.-cDNA sont dissous dans 6 ml de tampon AcONa 0.03 N, NaCl 0.3 N, ZnCl₂ 0.006 N (pH 4,5) contenant de l'ADN de thymus de veau 4S monobrin (10 µg/ml) - Chaque échantillon est ensuite séparé en deux tubes (3 ml/tube), notés (+ S1) et (- S1). Au tube (+ S1) est ajouté de l'enzyme S1 (2 µl/ml) préparée selon la technique de Sutton (1971). Après incubation (2 h., 50°), chaque tube est séparé en deux, précipité (1 ml d'acide perchlorique dilué, 0°), filtré sur filtres de verre (GF/C Whatman) et rincé abondamment (50-100 ml HCl 10%, Prolabo). Chaque filtre, séché (10 min. 60°) est compté en scintillation liquide (20 min.) dans des fioles contenant un mélange toluène-PPO-POPOP (10 ml, Hopkin et Williams) dans un compteur Intertechnique (SL 4000). Les hybrides ARN-cDNA sont analysés selon la même technique excepté le fait que chaque échantillon est dissous dans 2 ml de tampon "S1" contenant une concentration de ZnCl₂ réduite de moitié.

L - MESURE DE LA TEMPERATURE DE FUSION DES HYBRIDES SUR HYDROXYAPATITE

La température de fusion des hybrides ADN-cDNA sarc est réalisée en ajustant chaque échantillon à une concentration de tampon phosphate de sodium 0.14 M. Chaque échantillon est alors chargé sur une colonne d'hydroxyapatite (3 ml colonne tassée, 56°C, pipette plastique de 5 ml) maintenue dans un bain-marie dont la température est régulée (Thermomix Braun). Dans ces conditions, les hybrides stables se fixent aux cristaux d'hydroxyapatite alors que l'ADN simple brin est élué. Les colonnes sont alors rincées par du tampon phosphate de sodium 0.14 M (0.5 ml/min.) en augmentant la température (+ 4°, toutes les 10 min.). Des fractions (4 ml) sont collectées, précipitées par 1 ml d'acide perchlorique et la radioactivité acido-précipitable analysée.

R E S U L T A T S

RESULTATS - PREMIERE PARTIE

A - DEFINITION DES CONDITIONS OPTIMALES

Nous avons utilisé la technique de l'hybridation moléculaire afin de détecter les séquences, complémentaires des différentes sondes testées, dans l'ADN de vertébrés.

Il était nécessaire de définir quelles étaient les conditions optimales d'hybridation permettant de détecter au moins une copie par cellule (voir Appendice Technique sur l'Hybridation Moléculaire). Les conditions ont été testées en utilisant de l'ADN de thymus de veau, que nous prendrons ici comme illustration.

1° - Les ADNs

Comme nous l'avons décrit (voir Appendice Technique sur l'Hybridation Moléculaire), les ADNs doivent être de pureté convenable et de taille homogène 4-6S.

Toutes les expériences ont été faites avec des ADNs traités aux ultrasons. Le choix de ce traitement a été dicté par le fait que le traitement à la soude à chaud dépurine les bases de l'ADN et par là-même rend les hybrides instables.

En effet, on observe une diminution d'environ 20% de l'hybridation entre les sondes cDNA sarc ou cDNA td et l'ADN de poulet traité aux alcalis par rapport à celle obtenue avec un ADN de poulet traité aux ultrasons.

Ainsi, lorsqu'on désire examiner des séquences possédant un certain degré de mutation par rapport à celle d'une sonde spécifique donnée, il convient d'utiliser des fragments intacts d'ADN.

De plus, nous avons essayé d'optimiser la formation d'hybrides en utilisant de grandes quantités d'ADN, augmentant ainsi l'excès de séquences spécifiques de l'ADN à tester par rapport à la sonde.

2° - La force ionique et la température

Les réactions d'hybridation ont été effectuées dans les conditions dites "strictes" de force ionique et de température (0.6 M NaCl, 68°), dans lesquelles seules des séquences spécifiques sont susceptibles de s'apparier.

En pratique, de telles conditions exclueront la formation d'hybrides comportant plus de 20% environ de bases mutées dans un brin par rapport à l'autre.

3° - Les sondes cDNA

Dans nos expériences, l'ADN extrait de tissus de vertébrés a été hybridé avec deux types de sondes : une sonde [³H] cDNA sarc afin de détecter des séquences apparentées au gène responsable du maintien et de la transformation de fibroblastes infectés par les virus nd ASV ; et une sonde [³²P] cDNA td représentative du génome td des ASV pour rechercher dans ces ADNs la présence éventuelle de séquences homologues au génome du virus endogène RAV-O.

La détection d'une séquence nucléotidique, présente à raison d'une copie seulement par génome haploïde, nécessite l'utilisation de sondes d'activités spécifiques élevées ($\approx 20 \times 10^6$ cpm/ μ g). Cependant, dans l'exemple choisi (fig. 5), deux sondes représentatives du génome td des ASV, d'activité spécifique différente, ont été testées en plus de la sonde cDNA sarc : la sonde [³²P] cDNA td ($\approx 100 \times 10^6$ cpm/ μ g) et la sonde [³H] cDNA td ($\approx 20 \times 10^6$ cpm/ μ g). Les résultats obtenus indiquent que entre ces deux valeurs de l'activité spécifique de la sonde td utilisée, les pourcentages d'hybridation obtenus ne varient pas.

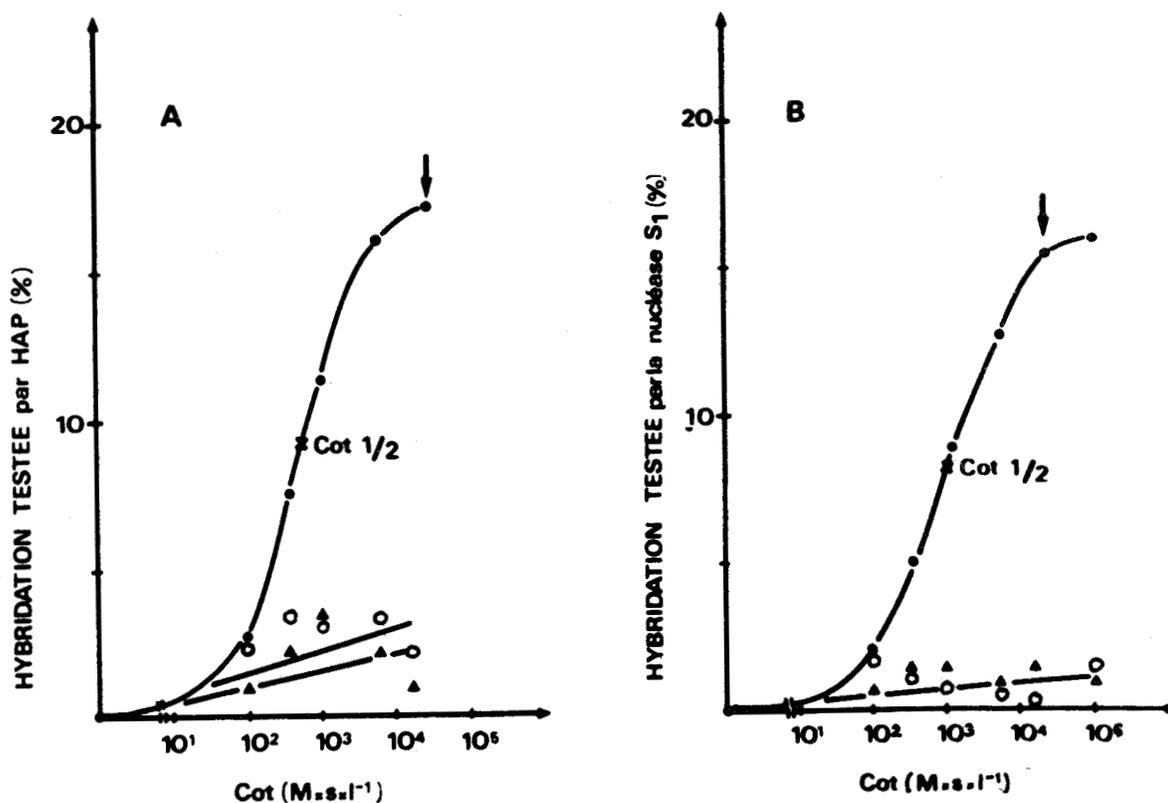
Les réactions d'hybridation ont donc été réalisées en présence de la sonde cDNA sarc et de la sonde [³²P] cDNA td, utilisée comme contrôle.

4° - L'analyse des hybrides

Les hybrides cDNA-ADN peuvent être analysés (voir Matériel et Méthodes), soit par digestion à la nucléase S1, soit par chromatographie sur hydroxyapatite (HAP).

a) Résultats

De l'ADN de thymus de veau a été hybridé dans des condi-



- FIGURE 5 -

CINETIQUES d'HYBRIDATION ENTRE l'ADN de THYMUS DE VEAU et
la SONDE cDNA SARC

L'ADN de thymus de veau, 4-6S, dénaturé (1,6 mg/point) est hybridé avec les sondes [³H] cDNA sarc (●—●) et [³²P] cDNA td (○—○) ; [³H] cDNA td rep (▲—▲) et [³²P] cDNA td (1000 cpm/point) à concentration fixe d'ADN (8 mg/ml) pendant des durées variables, à 68° C, dans un volume réactionnel de 200 µl, en 0.6 M NaCl. Les résultats des deux expériences, menées en parallèle, ont été portés sur le même graphe.

A - Analyse des hybrides par chromatographie sur hydroxyapatite (HAP), à 50°, en tampon phosphate de sodium contenant 0.6 M NaCl.

B - Analyse des hybrides par digestion à la nucléase S1 à 50°.



tions strictes avec les sondes [^3H] cDNA sarc et [^{32}P] cDNA td ou [^3H] cDNA td rep et [^{32}P] cDNA td. Les hybrides obtenus ont été testés soit par HAP à 50°, en présence de 0.6 M NaCl pour stabiliser les hybrides, soit par la nucléase S1 à 50°.

La figure (5) montre les cinétiques d'hybridation obtenues dans les deux cas cités. On remarque que :

- seule la sonde cDNA sarc réagit avec l'ADN de thymus de veau, les deux autres sondes donnant des pourcentages d'hybridation compris entre 0.5 et 3% correspondant au bruit de fond.
- le Cot 1/2 obtenu dans les deux cas pour les séquences sarc ne varie pas. Cette valeur de Cot indique que les séquences sarc cellulaires présentes dans l'ADN de thymus de veau appartiennent à l'ADN séquence unique.
- le pourcentage d'hybridation obtenu pour une valeur de Cot de 2×10^4 n'augmente pas de façon significative lorsque les hybrides sont testés par hydroxyapatite. On aurait pu penser que l'HAP retenant les hybrides instables, le pourcentage d'hybridation obtenu serait plus élevé ; or, il n'en est rien. Toutefois, les bruits de fond obtenus avec les sondes [^{32}P] cDNA td et [^3H] cDNA td rep sont sensiblement plus élevés dans le cas de l'HAP. Ceci est dû probablement à une rétention non spécifique de l'ADN par les cristaux d'hydroxyapatite.

b) Conclusion

Ces résultats nous permettent de définir les conditions d'analyse des hybrides et de valeur de Cot à utiliser pour nos études comparatives. L'analyse des hybrides sera effectuée par la digestion à la nucléase S1, cette technique étant la plus spécifique et la plus facile à réaliser d'un point de vue technique.

D'autre part, le début du plateau d'hybridation est atteint à une valeur de Cot de 20000. En effet, la figure (5B)

montre qu'à un Cot plus élevé (100 000), l'augmentation du pourcentage d'hybridation n'est que de 1%, ce qui est négligeable et justifie le terme de "plateau". Des valeurs élevées de Cot sont difficiles à atteindre expérimentalement en raison de la viscosité considérable des solutions d'ADN aux concentrations élevées. C'est par conséquent une valeur du Cot de 20 000 que nous avons choisie pour nos expériences.

5° - Analyse thermique de la stabilité des hybrides

Une autre méthode permet également de mesurer la stabilité des hybrides. Comme cela a été décrit dans Matériel et Méthodes, elle consiste à traiter un hybride, formé dans les conditions déjà décrites, à des températures croissantes et à analyser pour chaque température le pourcentage d'hybrides dissociés. On peut donc construire une courbe représentant le pourcentage d'hybrides dissociés en fonction de la température.

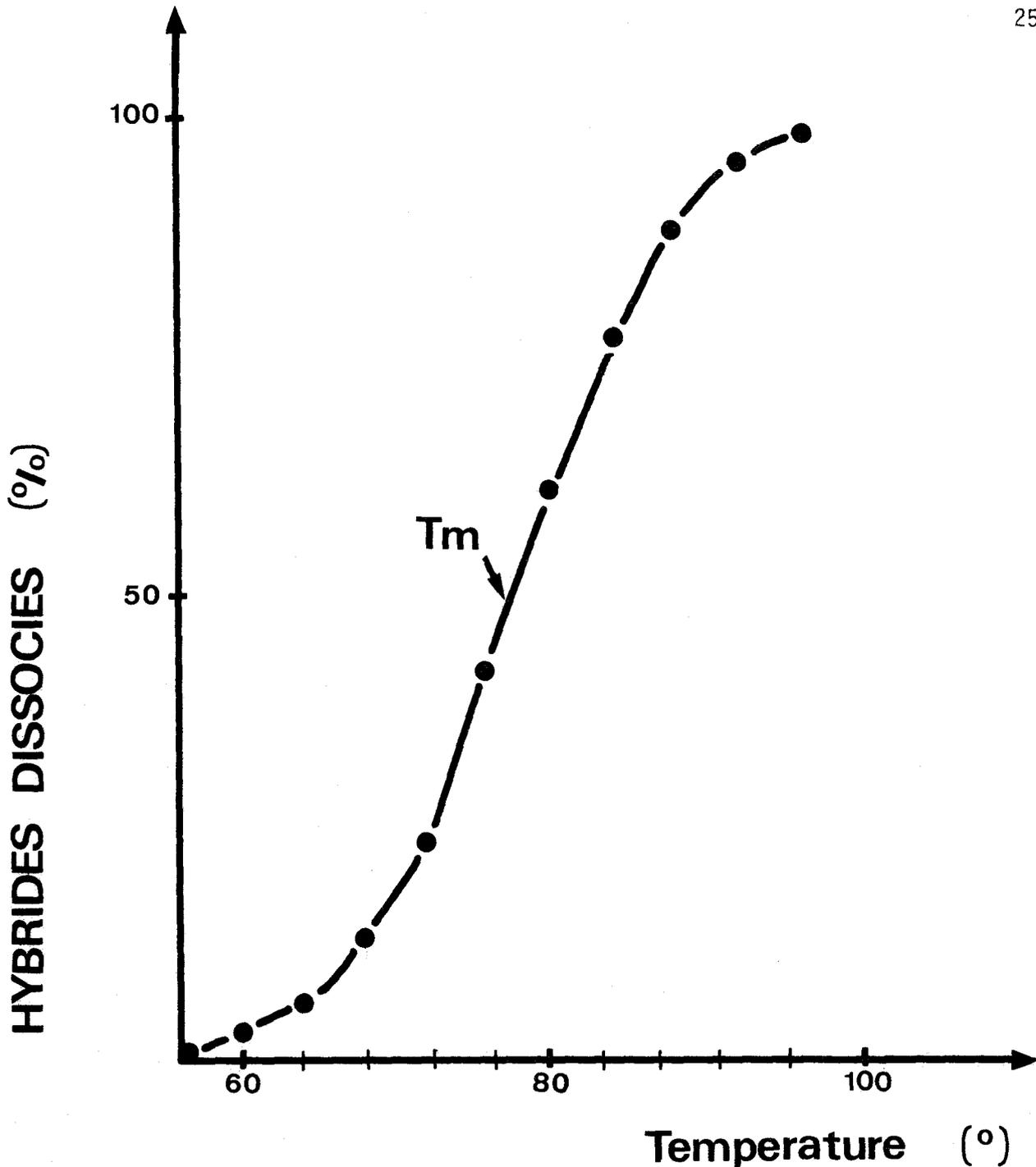
La figure (6) montre une telle courbe réalisée entre l'ADN de poulet et la sonde cDNA sarc. Le point d'inflexion de la courbe représente la valeur correspondant à 50% des hybrides déstabilisés. Cette valeur, appelée "Tm", caractérise la stabilité de l'hybride considéré. Ainsi, un hybride comportant un certain pourcentage de mutation d'un brin par rapport à l'autre verra sa stabilité thermique diminuer.

B - EVOLUTION DES SEQUENCES SARC CELLULAIRES DANS L'ADN DES ESPECES AVAIRES

L'évolution des séquences sarc cellulaires a été testée selon deux méthodes : par l'analyse des pourcentages d'hybridation maximale, et par la mesure de la thermostabilité des hybrides formés (Tm).

1° - Analyse du pourcentage d'hybridation

Les résultats des hybridations réalisées entre les sondes [³H] cDNA sarc, [³²P] cDNA td et l'ADN extrait de plusieurs

- FIGURE 6 -COURBE DE T_m

de l'HYBRIDE ADN CELLULAIRE de POULET-cDNAsarc

L'ADN extrait d'embryons de Poulet, 4-6S, dénaturé (0.5 mg) est hybridé avec la sonde [³H] cDNA sarc (0.25ng, 5000 cpm), dans un volume réactionnel de 100µl, à un Cot de 32000, à 68°, en 0.6 M NaCl. L'échantillon est adsorbé sur hydroxyapatite en tampon phosphate de sodium 0.12 M, à 56°. Après chaque accroissement de la température (+4°, toutes les 10 min.), la colonne est rincée avec le tampon phosphate de sodium 0.12 M. Les fractions (4 ml) sont collectées et leur radioactivité acido-précipitable analysée. (la flèche indique la valeur du T_m obtenue = 77°).

espèces aviaires à un Cot plateau de 20 000, sont réunis dans le tableau I. Pour chacun des ADNs testés, sont notées: d'une part les valeurs obtenues expérimentalement, d'autre part, les valeurs standardisées par rapport au pourcentage d'hybridation obtenu avec l'ADN de poulet pris comme base 100%. Dans ces expériences d'hybridation cDNA-ADN, on n'obtient jamais un pourcentage supérieur à 50-60%. En effet, il existe une compétition entre l'hybridation des sondes cDNA de polarité négative (-) et leurs séquences nucléotidiques complémentaires présentes dans les brins (+) de l'ADN, et la réassociation des brins (+) et (-) de cet ADN. Ainsi, la quantité d'ADN au Cot plateau devient limitante par rapport aux molécules des sondes présentes dans la réaction (voir Appendice Technique sur l'Hybridation Moléculaire).

Les virus qui ont servi à isoler les sondes ont comme hôte naturel le poulet. Aussi avons nous pris ce dernier comme espèce de référence, ou point 0 de la distance phylogénétique, dans nos mesures d'évolution.

Les résultats concernant le provirus XC méritent quelques explications. Notre intention, en faisant ces expériences, était d'obtenir un hybride parfaitement homologue entre la sonde et l'ADN viral. Or, des cellules infectées contiennent en plus des séquences virales endogènes, 1 à 3 génomes viraux intégrés. La sonde hybridera donc avec l'une et l'autre de ces séquences.

Par contre, il existe une lignée cellulaire de rat transformée par le virus nd PrC contenant 15 à 25 copies d'ADN proviral par génome haploïde. Un hybride formé entre nos sondes et un tel ADN aura ainsi des séquences parfaitement appariées. Notons que, dans une telle expérience, le nombre élevé de séquences virales dans l'ADN cellulaire est responsable des pourcentages élevés d'hybridation obtenus (70%).

Dans le tableau I, la comparaison des valeurs corrigées

EVOLUTION DES SEQUENCES SARC DANS L'ADN DES ESPECES AVIAIRES

DISTANCE PHYLOGENETIQUE par rapport au POULET (années x 10 ⁶)	ORIGINE DES ADNs	HYBRIDES RESISTANTS à S ₁ (%) Cot = 2.10 ⁴ M x sec x I ⁻¹			
		[³² P] cDNA td valeurs réelles	valeurs corrigées *	[³ H] cDNA sarc valeurs réelles	valeurs corrigées *
/	PROVIRUS (XC)	72		70	
0	POULET	56	<u>100</u>	52	<u>100</u>
35-40	CAILLE	9	16	46	88
40	DINDE	< 2	< 2	48	92
80	CANARD	< 2	< 2	45	86
100	EMEUE	< 2	< 2	38	73



- TABLEAU I -

EVOLUTION des SEQUENCES SARC dans l'ADN des ESPECES AVIAIRES

Les ADNs dénaturés, 4-6S, (1.6 mg), (1.6 mg) sont hybridés avec les sondes [³H] cDNA sarc (1000 cpm, 0.05ng) et [³²P] cDNA td (1000 cpm, 0.005 ng) à un Cot de 2 x 10⁴ M x sec. x I⁻¹ dans des conditions strictes (0.6 M NaCl, 68° C). Les hybrides ont été testés par digestion à la nucléase S₁. Les valeurs, situées à gauche de chacune des colonnes du tableau, représentent les valeurs réelles obtenues. L'astérisque *, correspond aux valeurs corrigées à 100% par rapport au poulet (CK). L'estimation de la distance phylogénétique déduite de l'étude des fossiles et des différences antigéniques des protéines (Praeger et al., 1974) nous a été donnée par le Professeur Allan Wilson.

à 100% par rapport au poulet indique que si la sonde cDNA td hybride à 100% avec l'ADN de poulet, elle n'hybride peu ou pas avec les ADNs de caille, de dinde, de canard ou d'émeu. Par contre, les pourcentages d'hybridation obtenus entre la sonde cDNA sarc, restent élevés. Ainsi, même chez l'émeu considéré comme une des espèces aviaires primitives ayant survécu, on obtient encore 73% d'hybridation avec le cDNA sarc.

Ces résultats montrent que le génome du virus endogène RAV-O, détecté par la sonde cDNA td, est rapidement perdu au cours de l'évolution des espèces aviaires, alors que les séquences sarc sont non seulement présentes dans l'ADN de tous les oiseaux testés, mais encore semblent extrêmement bien conservées.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Stéhelin et al. (1976b).

2° - Mesure de Tm

La mesure de la thermosensibilité des hybrides est une autre méthode d'approche permettant de déterminer le pourcentage de mutation de séquences complémentaires : 0,7 à 1,6 degré de variation du Tm correspond à 1% de paires de bases mutées. (Mc Carthy et al., 1972 ; Bonner et al., 1973).

Nous avons utilisé cette technique pour étudier, d'une part l'homologie entre les séquences virales cDNA sarc et les séquences sarc présentes dans l'ADN des différentes espèces aviaires et, d'autre part, l'évolution de l'ADN séquence unique de ces mêmes espèces par rapport à l'ADN séquence unique du poulet. Il était intéressant de savoir si les séquences sarc cellulaires évoluaient de la même façon que les séquences représentées dans le génome de ces espèces.

Comme on peut le voir dans la partie gauche du tableau II, la valeur de Tm la plus élevée (Tm = 81°) a été obtenue lorsque l'on hybride la sonde cDNA sarc virale à l'ADN

EVOLUTION DES SEQUENCES SARC DANS L'ADN DES ESPECES AVIAIRES
(MESURE de T_m)

DISTANCE PHYLOGENETIQUE par rapport au POULET (années x 10 ⁶)	ORIGINE DES ADNs	VALEURS DE T _m					
		cDNA sarc			ADN sequ.un.POULET		
		% Hyb	T _m (°)	Δ T _m /P	% Hyb	T _m (°)	Δ T _m /P
/	PROVIRUS (XC)	70	81	+4			
0	POULET	<u>100</u>	77	<u>0</u>	<u>100</u>	81	<u>0</u>
35-40	CAILLE	88	74	-3	47	74	-7
40	DINDE	92	72	-5	nt	nt	nt
80	CANARD	86	71	-6	19	70	-11
100	EMEU	73	70	-7	11	69	-12

- TABLEAU II -

EVOLUTION des SEQUENCES SARC dans l'ADN des ESPECES AVIAIRES (Mesure T_m)

Les ADNs dénaturés, 4-6S, (0.5 mg) sont hybridés avec la sonde [³H] cDNA sarc (0.25 ng, 5000 cpm) ou [³H]ADN séquence unique de poulet (CK) (0.05 ng, 1000 cpm) à un Cot de 3,2 x 10⁴ M x sec. x l⁻¹ dans des conditions strictes (0.6 M NaCl, 68°). Les mesures de thermostabilité des hybrides (T_m) a été faite, en adsorbant les hybrides sur HAP, en tampon 0.12 M phosphate de sodium, à 56°, en accroissant la température de 4° toutes les 10 min..

Un standard interne [³²P] cDNA td (0.005 ng, 1000 cpm) ajouté à chaque échantillon, a un T_m constant de 81° ± 1°.



de cellules XC. Cette valeur indique que les séquences nucléotidiques du cDNA sarc et de l'ADN XC sont strictement complémentaires : la sonde cDNA sarc représentant une copie fidèle du gène src présent dans les séquences virales intégrées dans les cellules de rat.

En revanche, on remarque que la valeur de T_m des hybrides cDNA sarc - ADN de poulet est nettement plus faible ($T_m = 77^\circ$). Ceci indique que les séquences nucléotidiques virales ont apparemment divergé par rapport aux séquences sarc cellulaires présentes dans l'ADN normal de poulet.

Enfin, la stabilité des hybrides formés entre le cDNA sarc et les ADNs extraits des autres espèces aviaires décroît rapidement en accord avec la distance phylogénétique des espèces ($T_m = 74^\circ - 70^\circ$). Ainsi, l'émeu qui se serait individualisé il y a 100 millions d'années possède des séquences sarc dont les bases nucléotidiques ont muté de 7% environ par rapport à celles présentes dans l'ADN de référence.

L'évolution des séquences sarc a été ensuite testée par rapport à celle de l'ADN séquence unique. En effet, le génome des eucaryotes se compose de séquences répétitives et de séquences non répétées ou uniques. L'ADN séquence unique représente la plus grande partie du génome ; chaque séquence nucléotidique étant présente à raison d'une copie par génome haploïde (Britten et Kohne, 1968). L'utilisation de l'ADN séquence unique est donc appropriée pour déterminer l'évolution d'espèces appartenant à une même classe, les espèces ayant divergé à des moments différents au cours de l'évolution phylogénétique.

Notons que les oiseaux semblent évoluer génétiquement moins rapidement que les mammifères (Praeger et al., 1974).

D'autre part, la comparaison des variations de T_m (ΔT_m) des hybrides entre les ADNs d'espèces aviaires et soit la sonde cDNA sarc, soit l'ADN unique séquence tritié de poulet, montre que les séquences sarc cellulaires sont plus stables que la moyenne des ADNs séquence unique.

Les deux techniques de mesure de l'évolution des séquences d'une part, par comparaison des pourcentages d'hybridation à un Cot plateau, et d'autre part par mesure de thermostabilité des hybrides entre la sonde cDNA sarc et les ADNs de différentes espèces aviaires, nous donnent des résultats concordants.

Si la mesure de T_m permet de détecter de faibles variations entre les bases, on constate que le T_m décroît plus vite que le pourcentage d'hybridation.

C - MESURE DE L'EVOLUTION DES SEQUENCES SARC CELLULAIRES DANS L'ADN DE VERTEBRES

La grande conservation des séquences nucléotidiques apparentées au cDNA sarc dans l'ADN des espèces aviaires nous a amené à rechercher leur présence dans l'ADN d'autres vertébrés, de l'homme aux poissons. Les résultats des hybridations sont rassemblés dans le tableau III. Toutes les hybridations sont réalisées au Cot plateau de 20 000 dans des conditions strictes.

La première série d'expériences consiste à hybrider les ADNs extraits de tissus fibroblastiques (muscles) ou épithéliaux (foie et rate) de vertébrés appartenants à des classes différentes avec les deux sondes virales cDNA sarc et cDNA td.

La sonde cDNA td, comme l'on s'y attendait, n'hybride avec aucun des ADNs testés, l'ADN de poulet étant pris comme témoin positif dans chacune des hybridations réalisées.

Par contre, tous les ADNs de vertébrés possèdent des séquences nucléotidiques apparentées à celles de la sonde cDNA sarc. Lorsqu'on analyse les pourcentages d'hybridation normalisés à 100% par rapport à l'ADN de poulet, on remarque que les pourcentages restent relativement constants pour une classe donnée ; ainsi, pour l'ADN de mammifères, on a $38 \pm 2\%$ d'hybridation avec la sonde cDNA sarc aussi bien pour l'ADN humain que pour les ADNs de babouin, veau ou souris. Une exception à cette règle, cependant, est le faible pourcentage obtenu avec l'ADN de pleurodèles. Nous n'avons pas d'explications pour ce résultat.

D'autre part, mammifères et reptiles réagissent de la même façon, ce qui est en accord avec la distance phylogénétique de ces deux classes par rapport au poulet (Fig.7).

EVOLUTION DES SEQUENCES SARC DANS L'ADN DES VERTEBRES

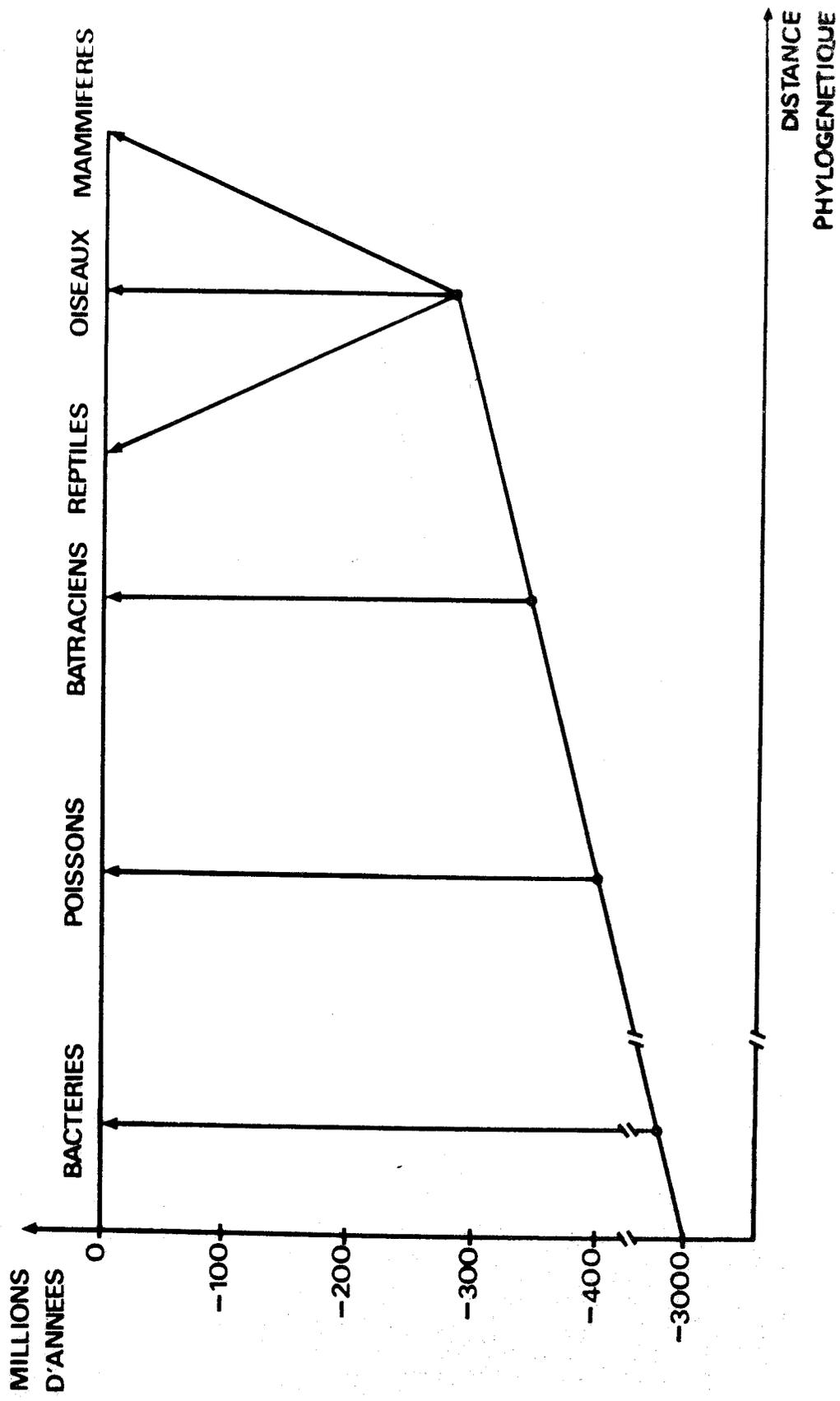
DISTANCE PHYLOGENETIQUE (années x 10 ⁶)	ORIGINE DES ADNs	HYBRIDES RESISTANTS à S ₁ (%) Cot 2.10 ⁴ M x s x l ⁻¹								
		cDNA td		cDNA sarc		cDNA glo		cDNA ova		
		●	●	●	●	●	●	●	●	
0	OISEAUX	Poulet	55	<u>100</u>	52	<u>100</u>	68	<u>100</u>	68	<u>100</u>
-300	MAMMIFERES	Homme	<2	<2	20	38				
		Babouin	<2	<2	20	38				
		Souris	<2	<2	19	36				
		Veau	<2	<2	21	40			5	7
	REPTILES	Couleuvre	<2	<2	20	38				
	AMPHIBIENS	Grenouille	<2	<2	14	26			8,4	11
		Pleurodèle	<2	<2	8	15	8	11	5,5	8
-400	POISSONS	Colin	<2	<2	14	27	4,5	6	6	9
		Saumon	<2	<2	13	25	5,5	8	4	6
-3000	BACTERIES	E. Coli	<2	<2	<1	<2				

- TABLEAU III -

EVOLUTION des SEQUENCES SARC dans l'ADN DES VERTEBRES

Les ADNs, 4-6S, dénaturés (1.6 mg) sont hybridés, avec la sonde [³H] cDNA sarc ou, avec les sondes spécifiques des gènes globine et ovalbumine du poulet à un Cot = 2.10⁴ M x sec. x l⁻¹, dans un volume réactionnel total de 200 µl, en 0,6 M NaCl, à 68°. Les hybrides ont été testés par digestion à la nucléase S₁. L'astérisque * représente les valeurs corrigées (POULET = 100%). Les valeurs situées à gauche de chacune des colonnes du tableau représentent les valeurs réelles obtenues.





- FIGURE 7 -
SCHEMA de l'EVOLUTION DES VERTEBRES



Ensuite, les pourcentages décroissent au fur et à mesure que l'on s'adresse à des classes ayant divergé plus tôt dans l'évolution et l'on ne détecte aucune hybridation avec l'ADN de bactéries E. Coli qui a été pris comme témoin négatif dans ces expériences.

Comme nous l'avons montré pour les ADNs aviaires, il existe une corrélation étroite entre la divergence phylogénétique des vertébrés et le pourcentage d'hybridation obtenu au Cot plateau. La stabilité évolutive des séquences sarc cellulaires présentes dans l'ADN des vertébrés, évaluée par mesure du Tm des hybrides cDNA sarc-ADN cellulaire, ne nous a pas donné de résultats interprétables. La mesure du Tm devient en effet extrêmement imprécise lorsqu'on mesure la stabilité de séquences qui ont subi un grand nombre de mutations par rapport au cDNA sarc. Les hybrides sont instables et, par ailleurs, le pourcentage d'hybridation obtenu devient trop faible pour permettre des mesures de Tm avec une précision significative.

Devant la grande conservation des séquences sarc, il était intéressant de comparer leur stabilité à celle de gènes cellulaires connus pour leur grande stabilité au cours de l'évolution, tels que les gènes globine et ovalbumine.

Différents ADNs de vertébrés ont été hybridés, soit avec une sonde représentant une copie fidèle du gène globine du poulet [³H] cDNA glo, soit avec la sonde complémentaire du gène ovalbumine du poulet [³H] cDNA ova, en présence de l'étalon interne [³²P] cDNA td. Les résultats de ces expériences réunis dans les colonnes 3 et 4 du tableau III montrent que les séquences sarc cellulaires sont aussi bien, sinon mieux conservées que ne le sont ces gènes.

D - CONCLUSION

Les résultats des hybridations entre la sonde cDNA sarc et l'ADN d'une grande diversité d'organismes confirment que les séquences apparentées au gène viral transformant sont non seulement présentes dans l'ADN de tous les oiseaux testés, mais encore, dans l'ADN des autres classes de vertébrés, des mammifères aux poissons.

Cette grande conservation des séquences sarc au cours de l'évolution phylogénétique permet de penser qu'elles étaient présentes chez l'ancêtre commun des vertébrés, il y a 400 millions d'années. De plus, la grande stabilité de ces séquences et le fait qu'elles semblent évoluer moins vite que la masse des gènes cellulaires amènent à penser qu'elles doivent jouer un rôle important dans le métabolisme de la cellule, bien que leur rôle soit encore inconnu.

Par contre, le fait que l'on ne détecte plus les séquences du provirus RAV-O dans l'ADN des espèces autres que les poulets (Varmus et al. 1974b; Tereba et al. 1975) semble apporter la preuve que RAV-O a, ou bien a évolué très rapidement, ou bien a été introduit dans la lignée germinale des poulets après leur individualisation.

RESULTATS - DEUXIEME PARTIE

A - INTRODUCTION

La présence, dans l'ADN de tous les vertébrés testés, de séquences apparentées au gène src viral des ASV et leur remarquable conservation au cours de l'évolution suggèrent que ces séquences doivent jouer un rôle important dans le métabolisme de la cellule.

D'autre part, le fait que les séquences sarc virales aient divergé par rapport aux séquences sarc cellulaires présentes dans l'ADN de poulet, conduit à se demander si ces séquences cellulaires sont transformantes mais réprimées dans des cellules normales comme l'ont proposé Huebner et Todaro dans la théorie oncogène, ou bien si elles doivent subir une mutation pour devenir transformantes (théorie protovirale).

Afin d'explorer ces points, nous avons cherché à savoir si les séquences sarc cellulaires étaient transcrites en ARN dans les cellules normales. D'autre part, nous avons étudié quelle pouvait être l'action de différents agents oncogènes autres que les ASV sur le taux de transcription de ces séquences.

B - CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les études de transcription en ARN des séquences sarc cellulaires ont été réalisées en utilisant les réactions classiques d'hybridation moléculaire. L'ARN a été extrait à partir de cellules ou de tissus selon les techniques décrites dans Matériel et Méthodes.

Les hybridations ARN-cDNA sont aisées à réaliser dans la mesure où l'on peut atteindre des valeurs de Crt élevées ($7 \cdot 10^4$ M x sec. x l^{-1}) sans se heurter aux problèmes rencontrés avec l'ADN. En effet, d'une part l'ARN peut être utilisé à une concentration allant jusqu'à 15-20 mg/ml et, d'autre part, toutes les molécules étant de même polarité, les sondes détecteront toutes les séquences homologues présentes, l'effet de compétition rencontré avec les ADNs n'existant plus ici. L'ARN total a donc été hybridé avec la sonde cDNA sarc radioactive dans des conditions "strictes" d'hybridation (0.6 M NaCl, 68°).

C - ETUDE DE LA TRANSCRIPTION DES SEQUENCES SARC CELLULAIRES

1° - Transcription des séquences sarc cellulaires dans des fibroblastes d'embryons de poulet non infectés et infectés par les ASV.

La cinétique d'hybridation obtenue entre la sonde cDNA sarc et l'ARN cellulaire total, extrait de fibroblastes d'embryons de poulet non infectés, est visualisée sur la figure 8 (▼—▼). Le pourcentage d'hybridation obtenu et la valeur du Crt 1/2 ($1,5 \times 10^4 \text{ M} \times \text{sec.} \times \text{l}^{-1}$) indiquent que les séquences sarc cellulaires sont transcrites en ARN dans leur totalité à raison d'une à deux copies par cellule.

Lorsqu'on infecte des fibroblastes de poulet par un virus non transformant (td PrC), on n'observe pas de stimulation de la transcription des séquences sarc cellulaires (fig. 8, ●—●). Ce résultat confirme que ce virus ayant perdu des séquences sarc, les séquences exprimées en ARN sont les séquences sarc cellulaires présentes dans l'ADN de fibroblastes normaux.

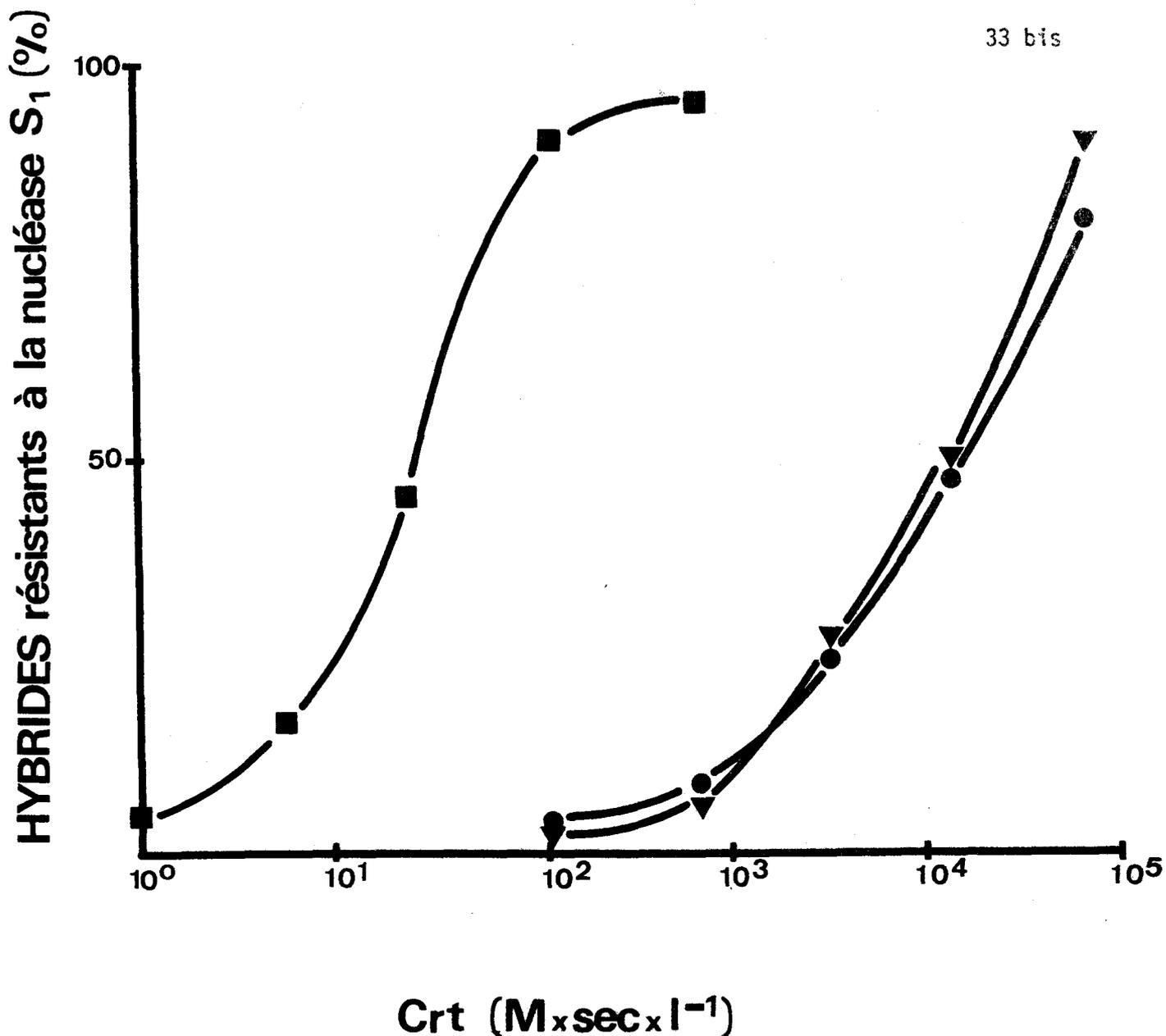
Enfin, à titre de comparaison, dans des fibroblastes infectés et transformés par le virus sarcomatogène aviaire nd PrC, on dénombre environ 800 copies d'ARN sarc (fig. 8, ■—■).

2° - Les séquences sarc cellulaires et la transformation

Nous avons regardé si des agents oncogènes de nature différente, mais autres que les ASV, étaient susceptibles de stimuler la transcription des séquences sarc cellulaires, dans les cellules qu'ils transforment.

Plusieurs classes d'agents oncogènes ont été testées ainsi que plusieurs types de cellules ou tissus transformés que nous décrivons ci-dessous :

- des tumeurs spontanées de poulet - De telles tumeurs apparaissent occasionnellement dans les élevages de poulets, et ne semblent pas être attribuées à un facteur causal précis.



- FIGURE 8 -

CINETIQUES d'HYBRIDATION ENTRE cDNA SARC et l'ARN CELLULAIRE TOTAL de FIBROBLASTES d'EMBRYONS DE POULET INFECTES et NON INFECTES

L'ARN cellulaire total a été extrait, selon la technique décrite dans Matériel et Méthodes, à partir de fibroblastes d'embryons de poulet : non infectés (▼—▼) ; infectés par le mutant de délétion td PrC ASV (●—●), infectés et transformés par le virus nd PrC (■—■). Des dilutions d'ARN (1:5) sont préparées à partir de solutions d'ARN concentrées (15 mg/ml, sauf pour l'ARN extrait de fibroblastes infectés par nd PrC pour lequel la concentration est 100 fois moins élevée). Les solutions sont incubées dans un volume total de 25 µl, en présence de [³H] cDNA sarc (2000 cpm), 80 h., 68°, dans les conditions strictes décrites dans Matériel et Méthodes (0.6 M, NaCl). Les hybrides sont analysés par digestion à la nucléase S1. Le Crt 1/2 = 2,5.10⁴ M x sec. x l⁻¹ définit la valeur correspondant à 1 copie/cellule.

- des tumeurs induites par des carcinogènes chimiques -
Chez le poulet, nous avons testé des tumeurs produites par le diméthylbenzanthracène (DMBA) ou chez la caille par le méthylcholanthrène (MCA). Des lignées continues de cellules peuvent être cultivées à partir de ces dernières (Moscovici et al., 1977), et ont également été testées.
- des fibroblastes d'embryons d'espèces aviaires infectés par des virus sarcomatogènes autres que les ASV -
Il existe des Rétrovirus aviaires capables d'induire des sarcomes (virus de l'érythroblastose aviaire ou AEV) ou des carcinomes et autres tumeurs (virus de la myélocytomatose aviaire ou MC 29). Ces virus ne contiennent pas les séquences sarc caractérisées chez les ASV (Stéhelin et Graf, soumis à publication). On pouvait imaginer que de tels virus étaient capables d'induire la transcription des séquences sarc cellulaires, entraînant ainsi la transformation de la cellule cible.

D'une manière homologue, nous avons testé si un virus sarcomatogène murin (Harvey - MSV), qui ne possède pas non plus le gène src des ASV était susceptible de stimuler la transcription des séquences sarc cellulaires. Une telle expérience est difficile à réaliser car ce virus n'est pas capable d'infecter les cellules aviaires. Cette barrière peut cependant être levée en fabriquant un pseudotype comportant le génome MSV dans une enveloppe de virus xénotropique New Zealand Balb (NZB). Un tel pseudotype MSV (NZB) fourni par le Dr. J. Levy (San Francisco, U. S. A.), transforme efficacement des fibroblastes de canard, et nous a permis de réaliser cette expérience.
- des cellules ou tissus différenciés particuliers -
L'objet de cette étude était de savoir si les séquences sarc cellulaires étaient impliquées dans le processus de transformation par des virus différents des ASV, mais seulement dans des cellules possédant un état de diffé-

renciation défini, autre que fibroblastique. Ainsi nous avons testé les cellules constituant les cibles privilégiées de certains virus : une lignée de cellules épithéliales provenant d'un carcinome induit chez le poulet par le virus MC 29 (Langlois et al., 1974) ; des érythroblastes du poulet, clônés, transformés par le virus AEV (Graf et al., 1974) ; des cellules de moelle de poulet, transformées par le virus de la réticuloendothéliose aviaire (Franklin et al., 1974).

Les ARNs totaux, extraits de tout ce matériel biologique, ont été hybridés séparément avec la sonde cDNA sarc et pour chacun d'eux, des courbes cinétiques obtenues. Ces résultats figurent sur le tableau IV où ont été notés d'une part les valeurs de Crt 1/2 trouvées expérimentalement, ainsi que le nombre de copies par cellule d'ARN sarc cellulaire correspondant, calculé à partir du Crt 1/2 caractéristique d'une copie par cellule, soit $2,5 \cdot 10^4 \times M \times \text{sec.} \times 1^{-1}$ (voir Appendice Technique sur l'Hybridation Moléculaire).

Le tableau IV montre que dans toutes ces expériences, le taux de transcription des séquences sarc cellulaires reste inchangé par rapport à celui des cellules normales de poulet (aux erreurs expérimentales près).

D - CONCLUSION

Nous n'avons pu détecter aucune stimulation de la transcription des séquences sarc cellulaires dans des cellules transformées par des agents oncogènes divers, autre que les ASV. Ces séquences ne sont donc pas impliquées dans le processus néoplasique selon le mécanisme suggéré par l'hypothèse oncogène de Huebner et Todaro ; cette hypothèse pourrait se voir vérifiée pour d'autres gènes cellulaires. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure une modification qualitative plutôt que quantitative des séquences sarc cellulaires dans les cellules transformées par les agents oncogènes étudiés.

TRANSCRIPTION DES SEQUENCES
SARC CELLULAIRES

Source de L'ARN	Crt 1/2 (x 10 ³)	ARN sarc (copies/cellules)
<u>Contrôles</u>		
Fibroblastes d'embryons de Poulet		
. non infectés	15	1.6
. infectés par td PrC ASV	15	1.6
. infectés par nd PrC ASV	0.03	830
1. <u>Sarcomes spontanés</u> (Poulet)	25	1.0
2. <u>Cellules induites par des Carcinogènes Chimiques</u>		
MCA - fibroblastes d'embryons (caille)	10	2.5
MCA - tumeurs induites (caille)	14	1.8
MCA - tumeurs induites dans le foie (caille)	18	1.4
DMBA - tumeur induite (poulet)	23	1.1
3. <u>Fibroblastes d'Embryons Transformés par des Virus autres que les ASV</u>		
. infectés par AEV (poulet)	14	1.8
. infectés par MC29 (poulet)	20	1.3
. infectés par Ha-MSV (NZB) (canard)	20	1.3
4. <u>Tissus différenciés</u>		
Carcinomes induits par MC29 (poulet)	11	2.3
Erythroblastes induits par AEV (poulet)	18	1.4
Cellules de moelle induites par REV (poulet)	23	1.1

- TABLEAU IV -

L'ARN cellulaire total extrait de différentes cellules et tissus (voir Matériel et Méthodes) est hybridé avec la sonde [³H] cDNA sarc dans des conditions strictes (0.6 M NaCl, 68°). Les hybrides sont testés par digestion à la nucléase S1. Le nombre de copies/cellule d'ARN sarc a été calculé à partir des valeurs de Crt 1/2. (1 copie/cellule, Crt 1/2 = 2,5 x 10⁴ M x sec. x l⁻¹).



MCA, méthylcholanthrène ; DMBA, diméthylbenzanthracène ; REV, virus de la réticuloendothéliose aviaire ; Ha-MSV, virus sarcomatogène murin de Harvey ; NZB, souris de la souche New Zealand Balb.

DISCUSSION - CONCLUSIONS

A l'aide d'une sonde spécifique (cDNA sarc) du gène transformant (src) des virus sarcomatogènes aviaires (ASV) et en utilisant les techniques de l'hybridation moléculaire en milieu liquide, nous avons confirmé et étendu les observations de Stéhelin et al. (1976b).

Les cellules normales de poulet, hôte naturel des ASV, contiennent en leur ADN des séquences presque identiques à celles du gène src viral. Ces séquences, dites sarc cellulaires, sont présentes dans toutes les espèces aviaires testées, et des mesures de taux de mutation montrent que leur divergence suit l'évolution phylogénétique de ces espèces.

Présence des séquences sarc cellulaires chez tous les vertébrés

Après avoir optimisé les conditions expérimentales de détection des séquences sarc cellulaires, nous avons montré leur présence dans les ADNs de tous les vertébrés testés, des mammifères (homme inclus) aux poissons.

La stabilité de ces séquences au cours de l'évolution phylogénétique, pendant plus de 400 millions d'années, est comparable à celle des gènes cellulaires essentiels, tels ceux de la globine ou de l'ovalbumine. On a suggéré l'hypothèse que les gènes codant pour des fonctions cellulaires importantes seraient probablement mieux conservés que les autres au cours de l'évolution. Dans cette perspective, les séquences sarc cellulaires représenteraient un gène essentiel pour la cellule, dont la fonction reste toutefois encore inconnue. Ce gène pourrait être un signal normal remplissant un rôle identique au gène src viral, qui induit précisément la division cellulaire.

Origine du gène src viral

Nous rappelons ici les hypothèses formulées par Stéhelin et al. (1976b) et Padgett et al. (1977) concernant la genèse des virus sarcomatogènes aviaires. Leur génome peut être considéré comme formé de deux parties distinctes : une unité répliquative et une unité liée à la transformation sarcomatogène.

• L'unité répliquative aurait pour origine des séquences nucléotidi-

ques dérivées du virus endogène RAV-O du poulet. Ces séquences ne sont détectables que chez le poulet. Elles pourraient provenir d'une infection récente (quelques millions d'années), d'un ancêtre de celui-ci par un virus d'origine inconnue. Cette information se serait alors maintenue dans l'ADN de poulet sous la forme de provirus non pathogène. Plus probablement, ces séquences ont pour origine des gènes normaux du poulet qui auraient évolué rapidement dans cette espèce, par mutations et réarrangement chromosomiques, pour acquérir l'information génétique suffisante leur permettant de constituer une entité capable de se répliquer en marge du cycle normal de la cellule, ainsi que l'a proposé Temin (1974) dans son hypothèse protovirale.

.L'unité liée à la transformation sarcomatogène aurait quant à elle une histoire très différente. Elle serait constituée par les séquences nucléotidiques sarc cellulaires, constituant normal d'une stabilité remarquable au cours de l'évolution, puisque nous la détectons encore dans des espèces ayant divergé, il y a quelque 400 millions d'années.

Les virus sarcomatogènes aviaires se seraient alors constitués par recombinaison entre l'unité répliquative de type RAV-O du poulet, et les séquences sarc cellulaires du poulet ou d'une espèce très voisine de celui-ci (Padgett et al., 1977). Une telle recombinaison pourrait avoir eu lieu, ou bien au niveau de l'ADN cellulaire (par "crossing-over" simple ou double), ou bien après encapsidation d'ARNs provenant de ces deux modules, ou bien encore par intégration accidentelle d'une unité répliquative de type RAV-O adjacente aux séquences sarc cellulaires du poulet.

Il est probable qu'une telle recombinaison s'effectue très rarement dans la nature ; ce phénomène en effet n'a jamais pu être reproduit en laboratoire, malgré les nombreuses tentatives effectuées ; d'autre part, les virus sarcomatogènes aviaires ont une tendance marquée à perdre spontanément le gène src au cours de leur répliquation, le mécanisme de cette délétion n'étant pas connu . Enfin, il existe une divergence notable (environ 4% des bases) entre le gène src viral et les séquences sarc cellulaires

du poulet : il n'y a donc pas d'échange entre ces deux séquences au cours de la réplication du virus.

Les séquences sarc cellulaires et la transformation

L'existence d'une telle divergence entre le gène src viral et son ancêtre présumé -les séquences sarc cellulaires- soulève un problème important. En effet, on a vu que le gène src viral conférait aux virus leur puissant pouvoir oncogène. Ce pouvoir pourrait être dû à la mutation que l'on a mise en évidence, de 4% des bases ; dans ce cas, ce gène ne serait devenu cancérigène qu'après sa transduction par le virus et sa mutation au cours des cycles de réplication répétés de celui-ci.

Mais il se pourrait également que les séquences sarc cellulaires constituent en elles-mêmes un gène cancérigène ; ce gène serait alors sous contrôle rigoureux de la cellule et pourrait être la cible d'agents oncogènes (carcinogènes chimiques, etc..) qui induiraient la transformation cellulaire en perturbant le mécanisme de contrôle transcriptionnel de ce gène -hypothèse oncogène de Huebner et Todaro (1969)-.

Par ailleurs, le gène sarc cellulaire pourrait avoir une fonction normale dans la physiologie de la cellule, mais des mutations accidentelles, ou provoquées par des agents oncogènes, détourneraient le produit de ce gène de sa fonction, et provoqueraient ainsi la transformation de la cellule ; dans cette hypothèse, dite de mutation -analogue à l'hypothèse protovirale de Temin, (1974)-, il n'y aurait pas modification du taux de transcription des séquences sarc cellulaires, mais de leur nature même.

Nous avons dans ces conditions testé ces différentes propositions en analysant le taux de transcription des séquences sarc cellulaires dans des cellules normales ou induites par différents agents oncogènes. Dans tous les cas étudiés, nous trouvons que l'ARN sarc cellulaire est transcrit à raison de 1-3 copies/cellule.

Ce résultat est important, car il indique que l'hypothèse oncogène de Huebner et Todaro n'est pas vérifiée pour les séquences sarc cellulaires.

Toutefois, nos résultats n'infirmement pas la validité de cette théorie pour d'autres gènes cellulaires.

N'ayant pas réussi à stimuler la transcription des séquences sarc cellulaires, il nous est impossible de savoir si elles sont impliquées dans des processus de transformation selon un mécanisme de mutation ou non. De telles études nécessiteraient une analyse biochimique de ces séquences dans les cellules normales et transformées par des agents oncogènes, analyse qui se heurte actuellement à d'importants problèmes technologiques. Nous ne pouvons pas, dans ces conditions, impliquer les séquences sarc cellulaires dans l'un quelconque des processus néoplasiques étudiés.

Il n'en reste pas moins vrai que le remarquable contrôle cellulaire de la transcription de ces séquences constitue un argument supplémentaire en faveur du rôle important qu'elles doivent tenir dans la physiologie de la cellule.

Nos travaux permettent de constater que les Rétrovirus constituent d'excellents moyens d'étude de fonctions cellulaires, dans la mesure où ils rendent possible la mobilisation de séquences sarc cellulaires données, puis leur réintégration dans le génome cellulaire à des sites probablement différents, mais spécifiques.

CONCLUSION

Notre méthode d'approche peut-elle être généralisée pour permettre ainsi d'isoler d'autres gènes cellulaires et étudier leur implication possible dans des processus de réplication, de transformation ou de différenciation cellulaire ?

Quelles sont les implications de nos recherches sur les cancers humains ?

Nous avons démontré que les chromosomes humains contiennent une information génétique très proche de celle responsable du pouvoir cancérigène des virus sarcomatogènes aviaires.

Avec les méthodes utilisées, nous n'avons pu jusqu'à présent impliquer cette information cellulaire dans le processus de cancérisation.

D'autres travaux montreront si des cellules normales contiennent d'autres gènes potentiellement cancérigènes qui seraient activés par des agents oncogènes présents dans notre environnement naturel.

APPENDICE TECHNIQUE

SUR

L'HYBRIDATION MOLECULAIRE

A - INTRODUCTION

Nous avons cru utile de résumer ici brièvement quelques notions pragmatiques concernant l'hybridation moléculaire en phase liquide. Cet appendice ne prétend en aucun cas être exhaustif, mais est destiné à familiariser le lecteur avec les nombreux types de problèmes que cette technique permet d'aborder : nature et complexité d'un acide nucléique, détection spécifique et quantification d'une séquence donnée dans un mélange complexe contenant des dizaines de milliers d'acides nucléiques différents, étude de transcription d'ARN viraux ou cellulaires, ou étude de l'évolution phylogénétique de séquences nucléotidiques données.

B - DEFINITION DE L'HYBRIDATION MOLECULAIRE EN MILIEU LIQUIDE

La réaction d'hybridation moléculaire consiste en un appariement de séquences nucléotidiques complémentaires. On peut ainsi obtenir des hybrides ADN-ADN, ADN-ARN et ARN-ARN.

La réaction de réassociation correspond à l'appariement des deux brins d'ADN dénaturé. Par contre, l'hybridation moléculaire proprement dite est réalisée entre deux séquences homologues d'origine différente dont l'une est en général en excès par rapport à l'autre.

Plusieurs facteurs influent sur la cinétique de l'hybridation ; certains dépendent des acides nucléiques (nature, taille, viscosité, pureté, concentration), d'autres des conditions de la réaction (pH, force ionique, polarité du solvant, température, durée d'hybridation).

Par un choix judicieux des conditions expérimentales de la réaction, il est possible de ramener la cinétique d'hybridation à une fonction ne dépendant plus que de deux variables aisément contrôlables, en pratique : la concentration des acides nucléiques en présence et la durée de la réaction. Nous décrivons ici brièvement les conditions expérimentales requises permettant une telle simplification.

C - FACTEURS IMPLIQUES DANS LA REACTION D'HYBRIDATION

1° - Composition des acides nucléiques

Les acides nucléiques ADN et ARN sont caractérisés par leur richesse en bases (G + C). La quantité en bases (G + C) est en relation avec la stabilité des hybrides : celle-ci sera d'autant plus grande que le pourcentage en bases (G + C) sera plus élevé. Toutefois, en pratique, ce facteur influence peu sur la cinétique d'hybridation dans les conditions de température choisie.

2° - Taille des acides nucléiques

La cinétique d'appariement de deux séquences nucléotidiques complémentaires dépend de deux facteurs : la probabilité de collision, étape lente que l'on cherche à contrôler, dépend de la concentration en séquences nucléotidiques susceptibles d'appariement ; la vitesse de formation de l'hybride, après initiation, est une étape rapide, indépendante de la longueur des molécules.

Il convient donc de favoriser l'étape de collision en réduisant les acides nucléiques à la taille minimale encore susceptibles de former des hybrides stables.

En pratique, les molécules d'ADN cellulaire sont réduites en fragments de constante de sédimentation 4-6S, soit 75 à 200 nucléotides de long, et dénaturés avant hybridation. Cette taille correspond à celle des sondes cDNA virales utilisées.

Les coupures dans l'ADN peuvent être faites selon deux techniques différentes :

- la première consiste à traiter l'ADN par la soude à chaud (0.3 N NaOH, 20 min., 100°). Par ce procédé, on obtient un ADN peu homogène, scindé au hasard, qui, de plus, a subi une dépurination par suite du traitement alcalin. D'autre part, un traitement alcalin à chaud trop prolongé rend l'ADN de trop petite taille (\sim 1S soit environ 10 nucléotides de long et moins) pour former des hybrides stables. La stabilisation des hybrides dépendant du nombre de bases appariées, dans les conditions d'hybridation choisies, 50 bases appariées au moins sont nécessaires pour obtenir un hybride stable.
- la deuxième technique de fragmentation utilise un traitement aux ultrasons (Sonifier Branson, 10 min., position 7 = 70 Watts) et permet d'obtenir un ADN de taille homogène 4 à 6S avec une bonne reproductibilité. C'est cette dernière que nous avons choisie pour nos expériences.

Les molécules d'ARN peuvent être utilisées directement dans les réactions d'hybridation. En effet, d'une part elles subissent un clivage thermique réduisant leur taille et d'autre part, à la température choisie dans les réactions d'hybridation, l'affinité de formation de l'hybride est suffisante pour relâcher la structure secondaire propre de l'ARN.

3° - Pureté des acides nucléiques

Les acides nucléiques, ARNs comme ADNs doivent être aussi purs que possible car la présence de protéines ou encore de certains ions divalents influe sur la stabilité ou la structure des hybrides en rendant les courbes ininterprétables.

Une déprotéinisation satisfaisante est obtenue lorsque le rapport des densités optiques à 260 nm et à 280 nm atteint une valeur de 1.8 à 2.0. Enfin, les acides nucléiques préparés par les méthodes classiques ne comportent en général plus d'ions divalents gênants.

4° - Viscosité

La viscosité dépend de la concentration, de la taille des acides nucléiques et de la température d'hybridation utilisée.

Si la viscosité est trop grande par suite d'une concentration en acides nucléiques trop élevée, d'une part on ne pourra techniquement contrôler les concentrations utilisées et, d'autre part, la mobilité et la probabilité de collision entre les molécules seront diminuées.

Les acides nucléiques seront donc utilisés à une concentration maximale de l'ordre de 8 à 12 mg/ml pour l'ADN et 10 à 20 mg/ml pour l'ARN.

5° - Température d'hybridation

La température optimale d'hybridation se situe environ 20° en dessous de la température de fusion (T_m) de l'hybride considéré. La cinétique d'hybridation n'est guère affectée par un écart de quelques degrés de part et d'autre de cette valeur.

Dans la nature, les acides nucléiques cellulaires ont un T_m variant entre 80° et 90° dans les conditions choisies.

Les réactions d'hybridation seront donc effectuées à 68° dans nos conditions standard.

6° - Force ionique

La vitesse et la spécificité de la réaction d'hybridation augmente avec la concentration en ions sodium $[Na^+]$ présents dans la réaction.

Pour chaque concentration en NaCl, on peut définir un facteur de correction permettant une normalisation adéquate de ce paramètre.

Néanmoins, la concentration ionique ne doit pas être choisie arbitrairement car elle conditionne la spécificité des hybrides formés. Ainsi, en dessous d'une concentration en ions $[Na^+]$ de 1 M, seules des séquences réellement complémentaires seront appariées.

Lorsque la concentration en NaCl est comprise entre 1 M et 1.5 M, on forcera les séquences partiellement complémentaires à s'apparier.

Enfin, la réaction d'hybridation deviendra aspécifique pour un concentration en $[Na^+]$ supérieure à 1.5 M. Nous choisirons une concentration en $[Na^+]$ de 0.6 M représentant un compromis entre une vitesse de réaction satisfaisante et une bonne spécificité de l'hybridation (conditions "strictes").

7° - Polarité du solvant

Les réactions d'hybridation sont généralement faites en tampons aqueux. Cependant, on peut utiliser des milieux organiques (ex : formamide, 50%) qui abaissent le T_m des hybrides et permettent de travailler à des températures de l'ordre de 40°, protégeant ainsi l'ARN d'une dégradation thermique rapide à 68°. Notons que dans ce cas, la réaction d'hybridation est plus lente.

8° - pH du solvant

Le pH optimum de la réaction est de 7 à 7.5, et varie peu de part et d'autre de ces valeurs.

9° - Concentration en acides nucléiques et durée d'hybridation

Les conditions précises étant définies pour chacun des facteurs précités, la réaction d'hybridation s'exprimera en fonction de deux paramètres : la durée d'hybridation et la concentration en acides nucléiques.

D - FORMULE GENERALE DE LA REACTION D'HYBRIDATION

$$\frac{C_{rt}}{C_{ot}} = 0.025 \times a \times \text{conc.} \times \frac{t}{2}$$

avec : C_{rt} ou C_{ot} : exprimé en moles x secondes par litre ($M \times \text{sec.} \times l^{-1}$)

Le C_{rt} correspond aux ARNs alors que le C_{ot} correspond aux ADNs.

0.025 : facteur de correction calculé en fonction des unités choisies.

a : facteur de correction calculé en fonction de la concentration en ions sodium $[Na^+]$.

conc. : exprimé en $\mu\text{g/ml}$ - c'est la concentration de l'acide nucléique qui conduit la réaction.

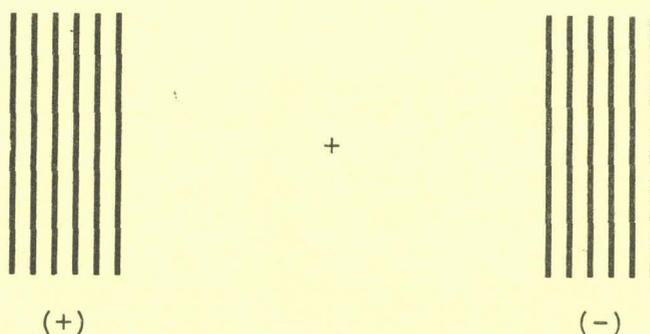
t : temps d'hybridation exprimé en heure.

Cette formule est générale quel que soit l'acide nucléique considéré et le type d'hybridation que l'on réalise. En pratique, on choisira de faire varier, soit la concentration, soit le temps, pour étudier la cinétique d'hybridation.

Pour illustrer cette formule, nous prendrons deux exemples :

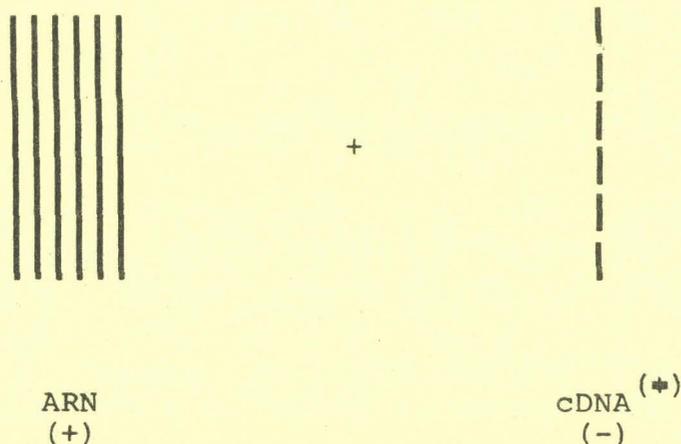
1er exemple : Réaction de réassociation d'un ADN cellulaire.

Dans cette réaction de 2^{me} ordre, on fera varier la durée d'hybridation, le facteur "conc", dans la formule, étant ici la concentration totale de l'acide nucléique étudié.



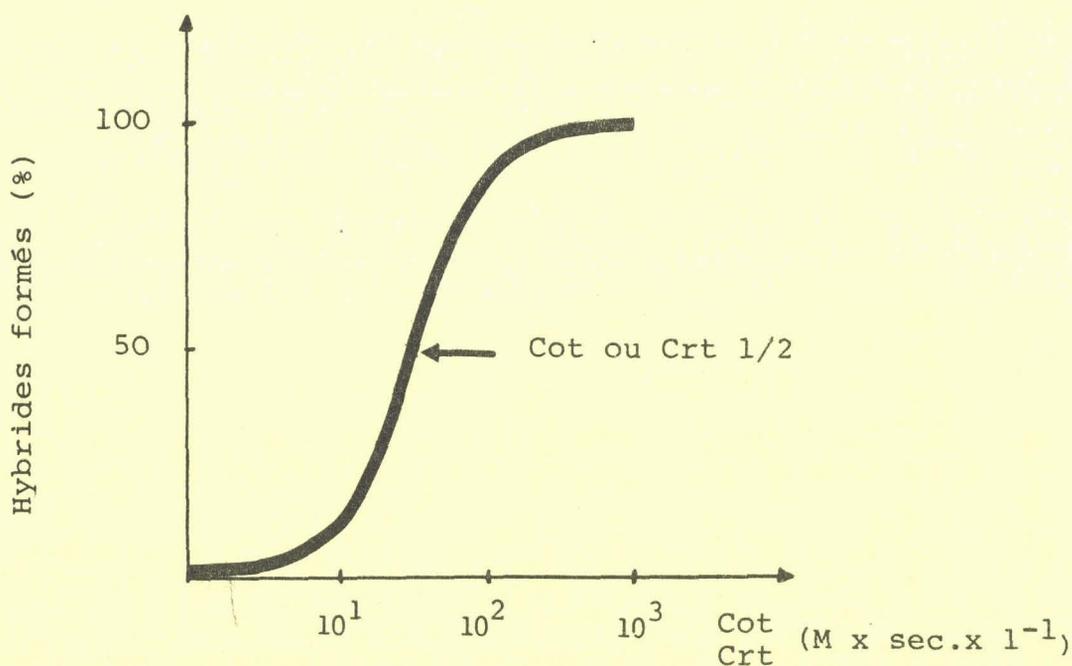
2^{me} exemple : Hybridation entre un ARN viral et une sonde cDNA complémentaire radioactive (cDNA*)

Dans ce cas, l'ARN viral est en vaste excès par rapport à la sonde. Une telle réaction sera de pseudo-premier ordre (la concentration en ARN disponible en fin de réaction n'ayant pas sensiblement varié par rapport à la concentration initiale).



E - REPRESENTATION GRAPHIQUE D'UNE COURBE D'HYBRIDATION

Les représentations graphiques sont effectuées sur papier semi-logarithmique où on représentera en abscisse la valeur du Cot ou Crt et en ordonnée le pourcentage d'hybrides obtenu en chaque point.



F - COMPLEXITE ET Cot ou Crt 1/2

Le Cot ou Crt 1/2 défini expérimentalement est une caractéristique de l'acide nucléique testé : il représente sa complexité en nucléotides.

La complexité est le nombre de bases qui s'apparient de façon unique. Ainsi, un hybride réalisé entre du poly A et du poly T aura une complexité de 1 et un Cot 1/2 expérimental de $2 \times 10^{-6} M \times sec. \times l^{-1}$; un hybride entre du poly AT et du poly TA aura une complexité de 2 et ainsi de suite.

La complexité d'un acide nucléique est alors obtenue en divisant la valeur du Cot 1/2 ou Crt 1/2 par le Cot 1/2 d'un acide nucléique de complexité 1, soit 2×10^{-6} .

Ainsi, pour les ADNs suivants :

- . E. Coli, Cot 1/2 = $8 M \times sec. \times l^{-1}$; complexité = 4×10^6 paires de bases
- . Poulet, Cot 1/2 = $1000 M \times sec. \times l^{-1}$; complexité = 5×10^8 paires de bases
- . Souris, Cot 1/2 = $3000 M \times sec. \times l^{-1}$; complexité = 15×10^8 paires de bases
- . ASV, Crt 1/2 = $2 \times 10^{-2} M \times sec. \times l^{-1}$; complexité = 10000 nucléotides

G - PREPARATION DE SONDAS

En général, la réaction d'hybridation est réalisée entre un acide nucléique radioactif appelé sonde cDNA et un acide nucléique non marqué en excès. Les sondes radioactives (simple brin ou double brin) peuvent être préparées soit in vivo, soit in vitro par différentes techniques :

1° - par marquage de matériel biologique in vivo

La préparation d'ARN viral radioactif [^{32}P] ou d'ADN cellulaire marqué [^3H] ou [^{14}C] peut être faite en marquant les cellules par addition au milieu de culture respectivement de [^{32}P] libre ou de [^3H] ou [^{14}C] thymidine.

La sonde [^{32}P] ARN viral peut être utilisée pour déterminer un nombre de copies, la complexité des sondes cDNA ou, pour détecter les brins (-) dans l'ADN proviral.

L'ADN cellulaire [^3H] pourra être utilisé pour étudier la cinétique de réassociation de ce même ADN cellulaire.

2° - par synthèse enzymatique in vitro

a) Les cDNAs radioactifs sont généralement préparés en utilisant la rétopolymérase, soit par réaction endogène mise au point par Garapin et al. (1973) en utilisant les virus purifiés d'ASV, soit par la technique mise au point récemment par Taylor (1977), utilisant la rétopolymérase d'AMV pour transcrire un ARN purifié dans une réaction exogène.

b) Les cRNAs radioactifs sont préparés par l'utilisation de la polymérase d'E. Coli ou la polymérase de $\text{Q}\beta$. La rétopolymérase de $\text{Q}\beta$ synthétise des cRNAs double brin à partir des Rétrovirus.

Dans les deux cas, on synthétise des sondes marquées [^3H] ou [^{32}P] qui peuvent être utilisées comme sondes spécifiques permettant soit d'étudier les différentes étapes de l'infection et de la transcription, la complexité d'un génome viral ARN, soit de détecter les brins (+) d'un ADN proviral.

c) Les sondes peuvent être aussi préparées par marquage in vitro des acides nucléiques purifiés aussi bien ARN qu'ADN par iodation en utilisant [^{125}I], par marquage au [^{32}P] de sondes spécifiques par la terminale transférase, ou par marquage des extrémités 5' des ARNs par l'ATP [γ - ^{32}P] et la polynucléotide kinase (extraite de E. Coli, infectées par le phage T4).

On peut synthétiser des sondes radioactives d'activité spécifique et de stabilité différentes suivant l'isotope radioactif utilisé.

A titre d'exemple, pour les cDNAs :

Radioisotope utilisé	[³ H]	[³² P]	[¹²⁵ I]
Activité spécifique des cDNAs	~20x10 ⁶ cpm/μg	~100x10 ⁶ cpm/μg	~200x10 ⁶ cpm/μg
Stabilité des cDNAs	1 an et plus	1 à 2 mois	~ 1 à 3 sem.

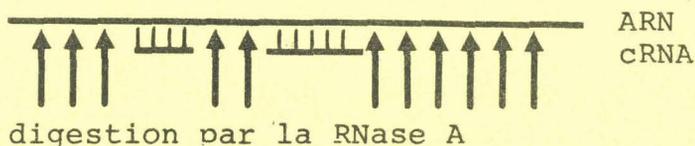
H - ANALYSE DES HYBRIDES

Les techniques permettant l'analyse des hybrides varient suivant la nature des sondes utilisées dans les réactions d'hybridation.

1° - Si la sonde est un crNA ou un ARN marqué

Les hybrides crNA-ARN ou crNA-ADN sont testés par digestion à la ribonucléase pancréatique bovine (RNase A) en haute concentration saline (0,3 N citrate de sodium).

Seules les séquences simple brin, non hybridées, seront digérées.



2° - Si la sonde est un cDNA ou un ADN radioactif

Les hybrides peuvent être analysés de deux façons différentes.

a) digestion à la nucléase S1

L'enzyme S1 d'*Aspergillus Orizae* est une endonucléase spécifique des ADNs simple brin. Son activité optimale est obtenue à 50°, (pH 4,5), en présence d'ions [Zn²⁺] et d'une matrice ADN simple brin de 4 à 6S.

La plupart des préparations d'enzyme S1 présente une forte activité ribonucléasique mais les hybrides ADN-ADN, aussi bien que ADN-ARN ne sont pas digérés et peuvent être retenus sur filtres après précipitation à l'acide perchlorique.

D'autre part, l'enzyme S1 est inhibé progressivement par une concentration en ions $[Na^+]$ supérieure à 0.6 M NaCl.

b) analyse des hybrides par chromatographie sur hydroxyapatite (HAP)

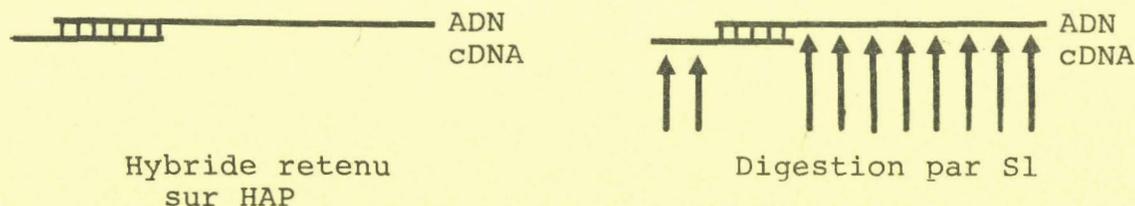
L'hydroxyapatite (complexe de phosphate de calcium) peut fixer ou non les acides nucléiques suivant la molarité du tampon phosphate de sodium utilisé. Par exemple, à 50° - 60° avec un tampon phosphate de sodium de molarité 10 mM, tous les acides nucléiques sont fixés sur l'HAP ; à une concentration de 0.14 M, les acides nucléiques simple brin seuls sont élués ; à une concentration de 0.4 M, l'ADN double brin, les hybrides ADN-ARN et les ARN (à cause de leur structure secondaire) sont élués.

Cette méthode est utilisée de préférence pour séparer la sonde cDNA monobrin du cDNA double brin.

Ces deux méthodes HAP et S1 ne sont pas équivalentes. La méthode utilisant l'enzyme S1 est plus stricte ("stringent") et plus spécifique que la méthode utilisant l'HAP.



En effet, un hybride ADN partiellement double brin sera retenu entièrement sur HAP alors que l'enzyme S1 digèrera toutes les parties instables de l'hybride.

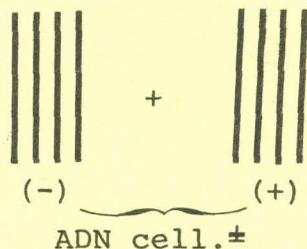


I - EXEMPLES DE REACTIONS D'HYBRIDATION

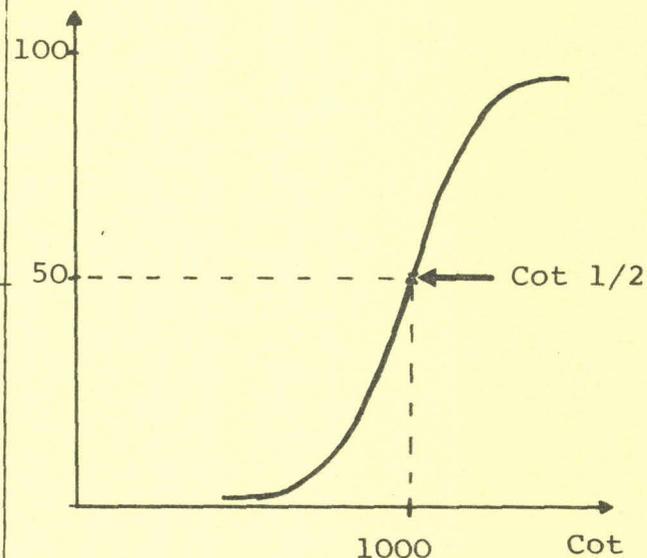
Nous décrivons ici quelques exemples d'application de l'hybridation moléculaire en phase liquide. Pour chacun, nous indiquons le problème posé, la nature et les proportions d'acides nucléiques en présence, et le type de courbe obtenu.

Etude de la complexité d'un ADN -
Réaction de réassociation

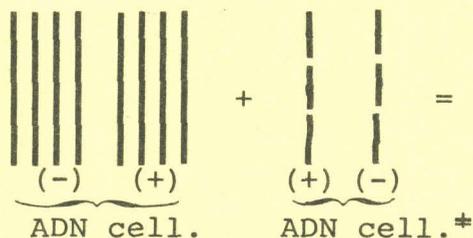
a) Réassociation de brins (+) et (-) d'ADN cellulaire radioactif (*).



Hybrides (%)



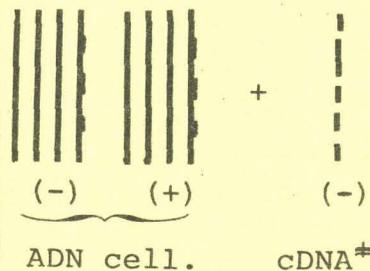
b) Réassociation entre un ADN simple brin cellulaire (+) et (-) et un ADN (*) séquence unique de la même espèce



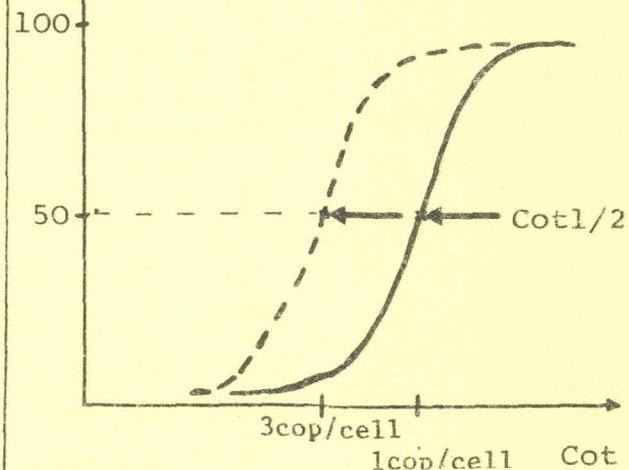
2 . H Y B R I D E S c D N A - A D N

Détermination du nombre de copies de séquences représentées par la sonde radioactive cDNA (*) dans un ADN cellulaire (si la sonde représente une petite partie des séquences).

Le nombre de copies dans l'ADN cellulaire est une valeur statistique, les cellules n'étant pas synchronisées. Les mesures de Cot pour être comparables nécessitent la référence à un étalon interne (ADN radioactif de la même espèce) qui donnera le Cot 1/2 représentant 1 copie/cellule.



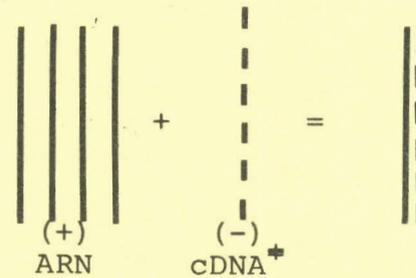
Hybrides (%)



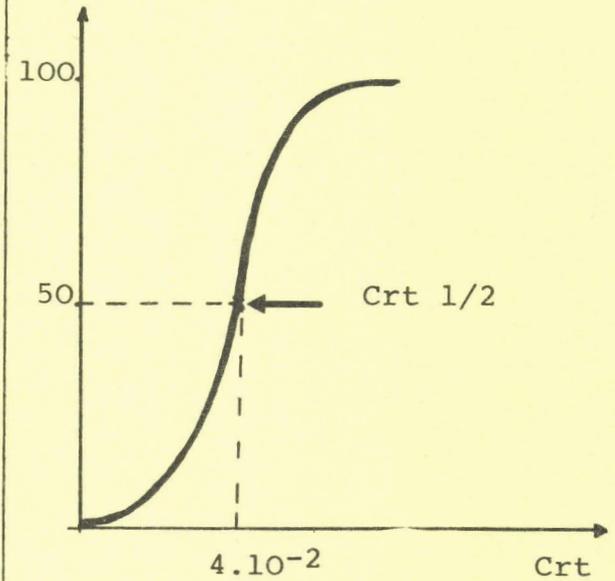
a) Calcul de la complexité d'un ARN viral

Sont en présence :

ARN viral et cDNA* viral



Hybrides (%)



b) Détermination du pourcentage d'ARN viral dans l'ARN total de cellules infectées

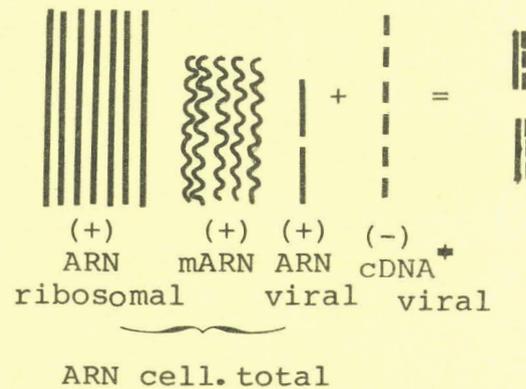
Sont en présence: ARN cell. inf. (excès) et cDNA* viral

Le pourcentage d'ARN viral dans l'ARN total de cellules infectées est défini par la formule suivante :

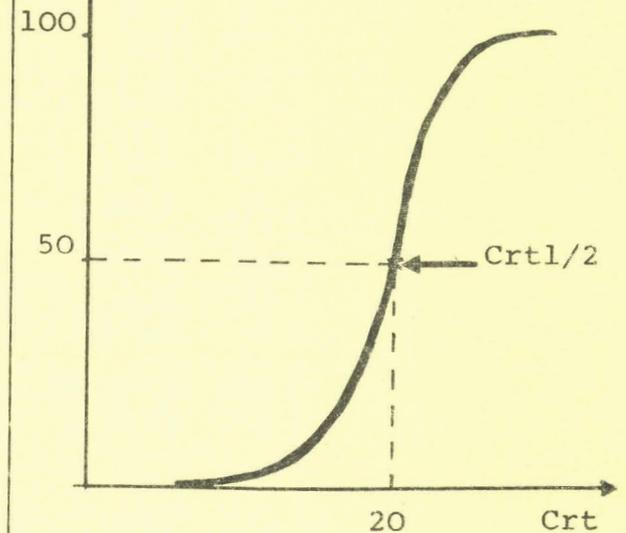
$$\% = \frac{\text{Crt } 1/2 \text{ ARN viral}}{\text{Crt } 1/2 \text{ expérimental}} \times 100$$

soit, dans notre exemple :

$$\% \text{ ARN viral} = \frac{2 \cdot 10^{-2}}{20} \times 100 = 0.1\%$$



Hybrides (%)



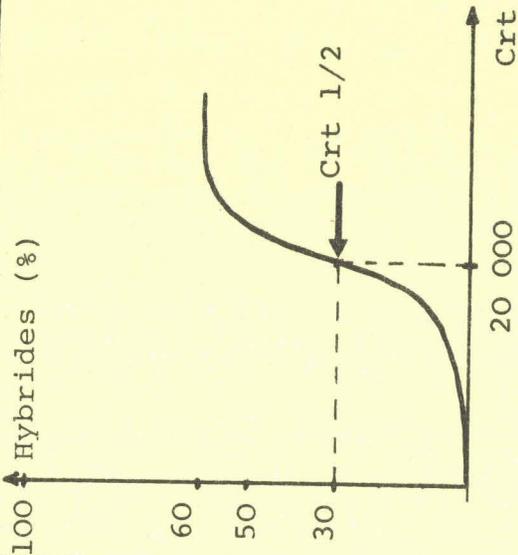
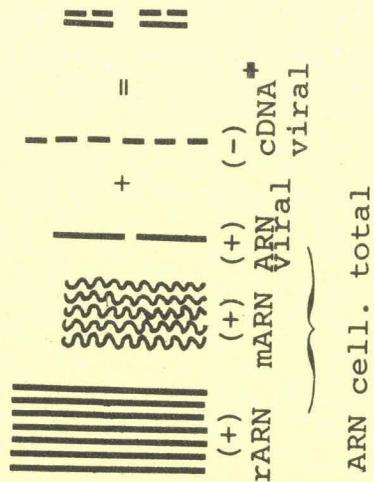
3. H Y B R I D E S cDNA - ARN

c) Calcul du nombre de copies d'ARN viral dans l'ARN cellulaire total

$$\text{Nbre de copies} = \frac{\text{Crt1/2 ARN viral} \times \text{masse d'ARN/cellule}}{\text{Crt1/2 ARN cell.} \times \text{masse d'1 mol.d'ARNviral}}$$

1 copie correspond à un Crt1/2 = 2.10^4

Dans l'exemple représenté sur le schéma, il y a transcription partielle en ARN du génome viral. Le plateau est atteint à 60% d'hybridation. Dans le cas d'une transcription totale, la courbe atteindrait le plateau à 100% avec la même valeur du Crt 1/2



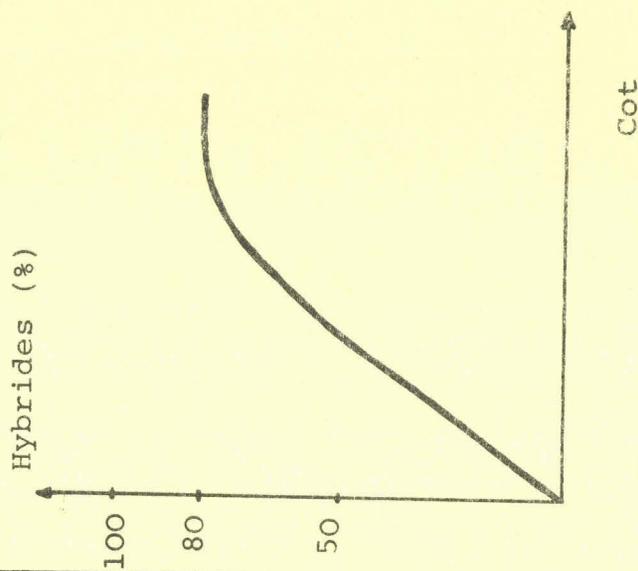
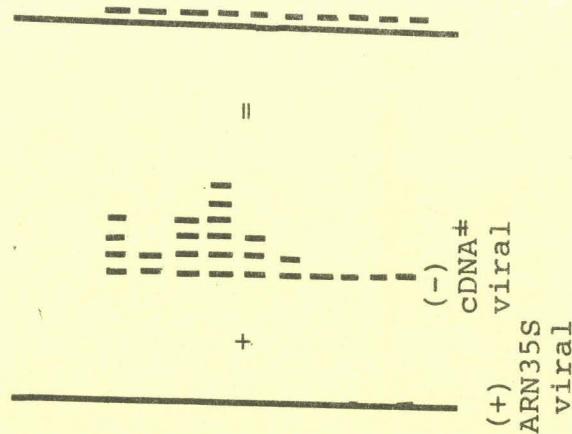
4. H Y B R I D E S cDNA - ARN* viral

Complexité et représentativité d'une sonde cDNA virale.
On sature un ARN* viral par excès de cDNA viral.

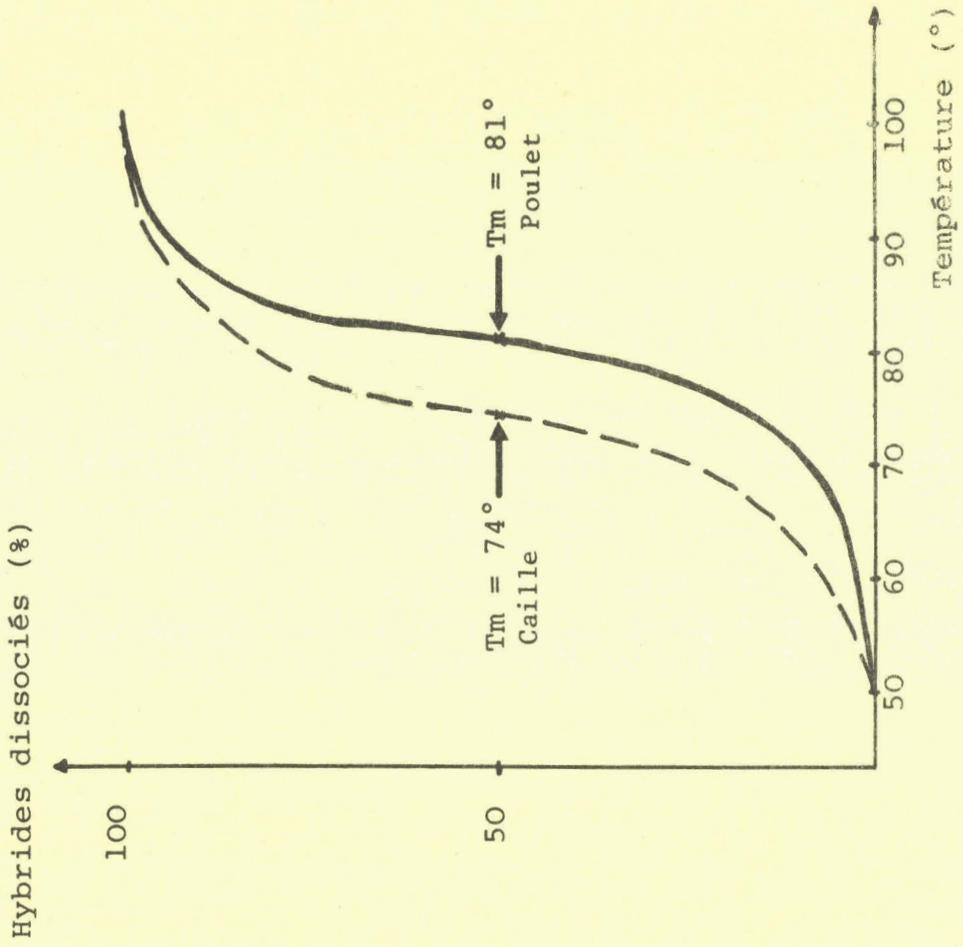
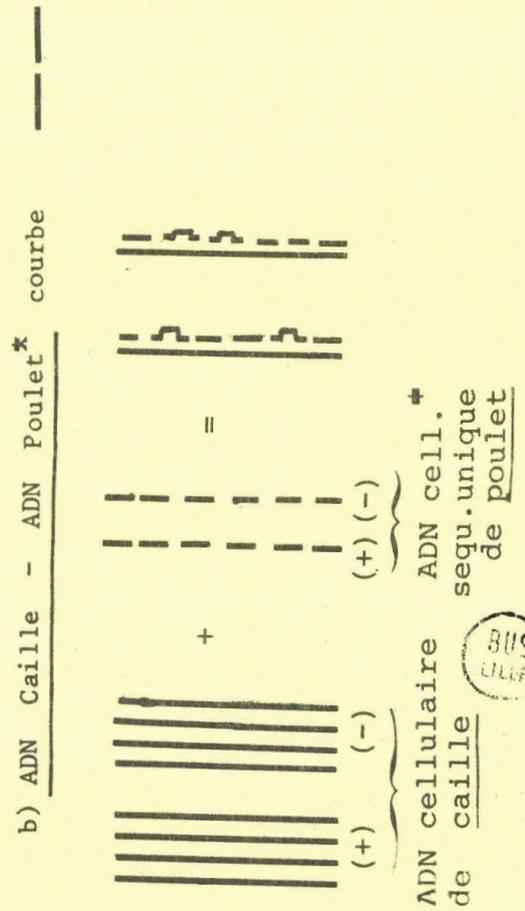
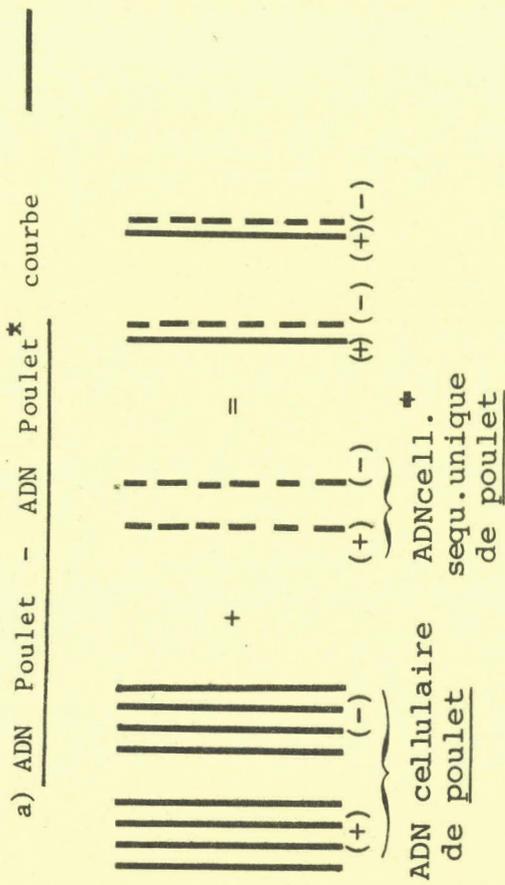
L'ARN viral est utilisé comme sonde et c'est la concentration de sonde cDNA qui variera. La complexité du cDNA sera fournie par la valeur plateau de saturation.

Dans l'exemple représenté sur la courbe, la sonde cDNA ne représente que 80% de l'ARN viral. La représentativité d'une sonde dépendra du rapport $\frac{\text{cDNA}}{\text{ARN viral}}$

pour lequel le plateau est obtenu. Ainsi, un rapport de 1 à 5 correspond à une sonde de bonne représentativité.



5. EXPERIENCES de Tm et EVOLUTION



BUS
LILLE

Et pour en savoir plus :

1° - sur les facteurs intervenant dans la réaction d'hybridation

- Sedimentation Studies of the Size and Shape of DNA.
Studier, F. W. (1965). J. Mol. Biol. 11, 373-390.
- Effects of Microscopic and Macroscopic Viscosity on the Rate of Renaturation of DNA.
Chang, C-T, Hain, T. C. Hutton, J. R. et Wetmur, J. G. (1974). Biopolymers, 13, 1847-1858.
- Temperature Dependence of RNA-DNA Hybridization Kinetics.
Straus, N. A. et Bonner, T. I. (1972). Biochim. Biophys. Acta, 277, 87-95.

2° - sur les acides nucléiques

- Repeated Sequences in DNA.
Britten, R. J. et Kohne, D. E. (1968). Science, 161, 529-540.
- Analysis of Repeating DNA Sequences by Reassociation.
Britten, R. J., Graham, D. E. et Neufeld, B. R. (1974). Meth. in Enz. vol 29, Part E, 363-406.
- The Determination of RNA Homogeneity by Molecular Hybridization.
Bishop, J. O. and Smith, G. P. (1974). Cell, 3, 341-346.

3° - sur l'hybridation intrinsèque

- DNA - RNA Hybridization.
Bishop, J. O. (1972) in Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 5th. symposium, pp 247-276.
- Molecular Hybridization of Ribonucleic Acid with a large excess of Deoxyribonucleic Acid.
Bishop, J. O. (1971). Biochem. J. 126, 171-185.
- Hybridization of Ribonucleic Acid with Unique Sequences of Mouse Deoxyribonucleic Acid.
Grouse, L., Chilton, M-D et Mc Carthy, B. J. (1972). Biochemistry, 11, 798-805.
- Studies on Nucleic Acid Reassociation Kinetics : Retarded rate of Hybridization of RNA with excess DNA.
Galau, G. A., Smith, M. J., Britten, R. J. et Davidson, E. H. (1977). Proc. Nat. Acad. Sci. (U. S. A.), 74, 2306-2310.
- Quantification of Simian Virus 40 Sequences in African grey Monkey, Mouse, and Virus Transformed Cell Genomes.
Gelb, L. D., Kohne, D. E. et Martin, M. A. (1971). J. Mol. Biol. 57, 129-145.

- Use of DNA - DNA annealing to detect New Virus-Specific DNA sequences in Chicken Embryo Fibroblasts after Infection by Avian Sarcoma Viruses.
Varmus, H. E., Heasley, S. et Bishop, J. M. (1974). J. Virol. 14, 895-903.

- 4° - sur l'analyse des hybrides
 - Thermal Elution Chromatography and the Resolution of Nucleic Acids on Hydroxyapatite.
Martinson, H. G. et Wagenaar, E. B. (1974). Analytical Biochemistry, 61, 144-154.
 - Hydroxyapatite Chromatography of Short Double-Helical DNA.
Wilson, D. A. et Thomas, C. A. (1973). Biochim. Biophys. Acta, 331, 333-340.

- 5° - sur les sondes virales
 - Purification of DNA Complementary to Nucleotide Sequences Required for Neoplastic Transformation of Fibroblasts by Avian Sarcoma Viruses.
Stehelin, D., Guntaka, R. V., Varmus, H. E. et Bishop, J. M. (1976). J. Mol. Biol. 101, 349-365.
 - Iodination of DNA. Studies of the Reaction and Iodination of Papovavirus DNA.
Anderson, D. M. et Folk, W. R. (1976). Biochemistry, 15, 1022-1030.

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

BIBLIOGRAPHIE

	pages
Beemon, K. L., Faras, A. J., Haase, A. T., Duesberg, P. H. et Maisel, J. E. (1976). <i>J. Virol.</i> <u>17</u> , 525-537.	2
Bender, W. et Davidson, N. (1976). <i>Cell</i> , <u>7</u> , 595-607.	2,3
Biggs, P. M., Milne, B. S., Graf, T. et Bauer, H. (1973). <i>J. Gen. Virol.</i> <u>18</u> , 399-403.	3
Bishop, J. M., Levinson, W. E., Quintrell, N., Sullivan, D., Fanshier, L. et Jackson, J. (1970a) <i>Virology</i> , <u>42</u> , 182-195.	4
Bishop, J. M., Levinson, W. E., Sullivan, D., Fanshier, L., Quintrell, N. et Jackson, J. (1970b) <i>Virology</i> , <u>42</u> , 927-937.	16
Bonner, T. J., Brenner, D. J., Neufeld, B. R. et Britten, R. J. (1973). <i>J. Mol. Biol.</i> <u>81</u> , 123-135.	27
Britten, R. J. et Kohne, D. E. (1968). <i>Science</i> , <u>161</u> , 529-540.	28
Brugge, J. S. et Erikson, R. L. (1977). <i>Nature</i> , <u>269</u> , 346-348.	10
Crittenden, L. B., Smith, E. J., Weiss, R. A. et Sarma, P. S. (1974). <i>Virology</i> , <u>57</u> , 128-138.	10
Dahlberg, J. E., Sawyer, R. C., Taylor, J. M., Faras, A. J., Levinson, W. E., Goodman, H. M. et Bishop, J. M. (1974). <i>J. Virol.</i> <u>13</u> , 1126-1133.	3
Dales, S. et Hanafusa, H. (1972). <i>Virology</i> , <u>50</u> , 440-458.	5
Darlix, J. L., Bromley, P. A. et Spahr, P. F. (1977). <i>J. Virol.</i> <u>22</u> , 118-129.	4
Duesberg, P. H. et Vogt, P. K. (1970). <i>Proc. Nat. Acad. Sci. (U. S. A.)</i> , <u>67</u> , 1673-1680.	20
Duesberg, P. H., Helm, K. et Canaani, E. (1971). <i>Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)</i> , <u>68</u> , 747-751.	9
Duesberg, P. H. et Vogt, P. K. (1973). <i>Virology</i> , <u>54</u> , 207-219.	20
Duesberg, P. H., Kawai, S., Wang, L. H., Vogt, P. K., Murphy, H. M. et Hanafusa, H. (1975). <i>Proc. Nat. Acad. Sci., (U. S. A.)</i> , <u>72</u> , 1569-1573.	5

	pages
Duff, R. G. et Vogt, P. K. (1969). <i>Virology</i> , <u>39</u> , 18-30.	4
Ellerman, V. et Bang, O. (1908). <i>Centralbl. Bakteriolog. Abt. 1 (Orig.)</i> <u>46</u> , 595.	1
England, J. M., Bolognesi, D. P., Dietzschold, B. et Halpren, M. S. (1977). <i>J. Virol.</i> <u>21</u> , 810-814.	9
Fanshier, L., Garapin, A. C., Mc Donnell, J., Faras, A., Levinson, W. et Bishop, J. M. (1971). <i>J. Virol.</i> <u>7</u> , 77-86.	19
Faras, A. J., Taylor, J. M., Mc Donnell, J. P., Levinson, W. E. et Bishop, J. M. (1972). <i>Biochem.</i> <u>11</u> , 2334-2342.	9
Franklin, R. V., Maldonado, R. L. et Bose, H. R. (1974). <i>Intervirology</i> , <u>3</u> , 343-352.	35
Fritsch, E. et Temin, H. M. (1977). <i>J. Virol.</i> <u>21</u> , 119-130.	6
Fujita, D. J., Chen, Y. C., Friis, R. R. et Vogt, P. K. (1974). <i>Virology</i> , <u>60</u> , 558-571.	4
Furnichi, Y., Shatkin, A. J. Stavnezer, E. et Bishop, J. M. (1975). <i>Nature</i> , <u>257</u> , 618-620.	3
Garapin, A. C., Varmus, H. E., Faras, A. J., Levinson, W. E. et Bishop, J. M. (1973). <i>Virology</i> , <u>52</u> , 264-274.	18,47
Goulian, M., Goulian, S. H., Codd, E. E. et Blumenfield, A. Z. (1973). <i>Biochemistry</i> , <u>15</u> , 2893-2901.	18
Graf, T., Royer-Pokora, B. et Beug, H. (1976). 5 th ICN-UCLA Symp. on Molec. Biol. (C. F. Fox et W. S. Robinson, ed.) Academic Press, San Francisco.	35
Guntaka, R. R., Richards, O. C., Shank, P. R., Kung, H-J, Davidson, N., Fritsch, E., Bishop, J. M. et Varmus, H. E. (1976). <i>J. Mol. Biol.</i> <u>106</u> , 337-357.	6
Guntaka, R. R., Mahy, B. W. J., Bishop, J. M. et Varmus, H. E. (1977). <i>Nature</i> , <u>253</u> , 507-511.	7
Hanafusa, H. et Hanafusa, T. (1968). <i>Virology</i> , <u>34</u> , 630-636.	4
Hanafusa, T., Hanafusa, H. et Miyamoto, T. (1970). <i>Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)</i> , <u>67</u> , 1797-1803.	4

	pages
Harada, F., Sawyer, R. C. et Dahlberg, J. E. (1975). J. Biol. Chem. <u>250</u> , 3487-3497.	3
Hayward, W. S. (1977). J. Virol. (sous presse)	7,8
Helm, K. C. D. (1977). Proc. Nat. Acad. Sci., (U. S. A.) <u>74</u> , 911-915.	9
Hill, M. et Hillova, J. (1971). C. R. Acad. Sci. <u>272</u> , 3094-3097.	7
Hill, M. et Hillova, J. (1972). Nature (London), New Biol. <u>237</u> , 35-39.	7
Hillova, J., Hill, M. et Kaléline, M. (1976). Virology, <u>74</u> , 540-543.	7
Hill, M., Stedman, N., Mariage, R., Goubin, G., Hillova, J. et Roussel M. (1977). Proceeding of the RTV Meeting in Pavia (Piccin, ed.) Padova (Italy).	7
Huebner, R. J. et Todaro, G. J. (1969). Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), <u>64</u> , 1087-1094.	11,38
Jacquet, M., Groner, Y., Monroy, G. et Hurwitz, J. (1974). Proc. Nat. Acad. Sci., (U. S. A.) <u>71</u> , 3045-3049.	7
Junghans, R. P., Hu, S., Knight, C. A. et Davidson, N. (1977). Proc. Nat. Acad. Sci., (U. S. A.) <u>74</u> , 477-481.	2
King, A. M. Q. et Wells, R. D. (1976). J. Biol. Chem. <u>251</u> , 150-152.	2 bis
Kung, H-J., Hu, S., Bender, W., Bailey, J.M. et Davidson, N. (1976). Cell, <u>7</u> , 609-620.	2 bis
Lai, M. M. C., Duesberg, P. H., Horst, J. et Vogt, P. K. (1973a). Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), <u>70</u> , 2266-2270.	12
Lai, M. M. C., Duesberg, P. H., Horst, J. et Vogt, P. K. (1973b). Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A. <u>70</u> , 3493-3497.	20
Langlois, A. J., Lapis, K., Ishizaki, R., Beard, J. W. et Bolognesi, D. P. (1974). Cancer Res. <u>34</u> , 1457-1464.	35
Leong, J. A., Garapin, A. C., Jackson, N., Fanshier, L., Levinson, W. E. et Bishop, J. M. (1972). J. Virol. <u>9</u> , 891-902.	21
Mc Carthy, B. J. et Farguhar, M. N. (1972). in Evolu- tion of Genetic Systems, (Smith, M. N. ed.) Gordon and Breach, New York, pp 1-43.	27

	pages
Martin, G. S. (1970). <i>Nature (Lond.)</i> , <u>227</u> , 1021-1023.	12
Martin, G. S. et Duesberg, P. H. (1972). <i>Virology</i> , <u>47</u> , 494-497.	12
Moelling, K. et Hayami, M. (1977). <i>J. Virol.</i> <u>22</u> , 598-607.	9
Moscovici, C., Moscovici, M. G., Jimenez, H., Lai, M.M.C., Hayman, M. J. et Vogt, P. K. (1977). <i>Cell.</i> , <u>11</u> , 95-103.	34
Motta, J. V., Crittenden, L. B., Purchase, H. G., Stone, H. A., Okasaki, W. et Witter, L. (1975). <i>J. Nat. Canc. Inst.</i> <u>55</u> , 685-689.	11
Neiman, P. E., Wright, S. E., Mc Millin, C. et Mc Donnel, D. (1974). <i>J. Virol.</i> <u>13</u> , 837-846.	20
Oppermann, H., Bishop, J. M., Varmus, H. E. et Levintow, L. (1977). <i>Cell</i> , (sous presse).	9
Padgett, T. G., Stubblefield, E. et Varmus, H. E. (1977). <i>Cell</i> , <u>10</u> , 649-657.	11,13,36,37
Parsons, J. T., Coffin, J. M., Haroz, R. K., Bromley, P. A. et Weissman, C. (1973). <i>J.</i> <i>Virol.</i> <u>11</u> , 761-774.	7
Praeger, E. M., Brush, A. H., Nolan, R. A., Nakaniski, M. et Wilson, A. C. (1974). <i>J.</i> <i>Molec. Evol.</i> <u>3</u> , 243.	26 bis,28
Quintrell, N., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Nicholson, M. O. et Mc Allister, R. M. (1974). <i>Virology</i> , <u>58</u> , 568-575.	15
Reitz, M. S. Jr, Abrell, J. W., Trainor, C. D. et Gallo, R. C. (1972). <i>Biochem. Biophys. Res.</i> <i>Commun.</i> <u>49</u> , 30-38.	20
Rose, J. K., Haseltine, W. A. et Baltimore, D. (1976). <i>J. Virol.</i> <u>20</u> , 324-329.	3
Rymo, L., Parsons, J. T., Coffin, J. M. et Weissman, C. (1974). <i>Proc. Nat. Acad. Sci., (U. S. A.)</i> , <u>71</u> , 2782-2786.	7
Scheid, A. (1976). In <i>Animal Virology (Baltimore,</i> <i>D., Huang, A. et Fox, C. F., ed.)</i> , pp. 457-470, New York Academic Press.	10
Schwartz, D. E., Zamecnik, P. C. et Weith, H. L. (1977). <i>Proc. Nat. Acad. Sci., (U. S. A.)</i> , <u>74</u> , 994-998.	3

	pages
Seibert, F. B. (1940). <i>J. Biol. Chem.</i> <u>133</u> , 593.	16
Shank, P. R. et Varmus, H. E. (1977). <i>J. Virol.</i> (sous presse).	6
Shaprio, S. Z., Strand, M. et August, J. T. (1976). <i>J. Mol. Biol.</i> <u>107</u> , 459-477.	8
Smotkin, D., Gianni, A. M., Rozenblatt, S. et Weinberg, R. A. (1975). <i>Proc. Nat. Acad.</i> <i>Sci.</i> , (U. S. A.), <u>72</u> , 4910-4913.	6
Spector, D. H., Varmus, H. E. et Bishop, J. M. (1977) <i>Biochemistry</i> , (sous presse).	13
Stéhelin, D., Guntaka, R. V., Varmus, H. E. et Bishop, J. M. (1976a). <i>J. Mol. Biol.</i> <u>101</u> , 349-365.	12,20
Stéhelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M. et Vogt, P. K. (1976b). <i>Nature (Lond.)</i> , <u>260</u> , 170-173.	13,27,36
Sutton, W. D. (1971). <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , <u>240</u> , 522-531.	21
Svoboda, J. et Hlozanec, H. (1970). <i>Advanc. Cancer</i> <i>Res.</i> <u>13</u> , 217-269.	4
Tal, J., Kung, H-J., Varmus, H. E. et Bishop, J.M. (1977). <i>Virology</i> , <u>79</u> , 183-187.	4
Taylor, J. M. et Illmensee, R. (1975). <i>J. Virol.</i> <u>16</u> , 553-558.	3
Taylor, J. M., Illmensee, R. et Summers, J. (1976). <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , <u>442</u> , 324-330.	18
Taylor, J. M. (1977). <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , <u>473</u> , 457.	47
Temin, H. M. et Mizutani, S. (1970). <i>Nature</i> (Lond.) , <u>226</u> , 1211-1213.	5
Temin, H. M. (1971). <i>Ann. Rev. Microbiol.</i> <u>25</u> , 609-648.	11
Temin, H. M. (1974). <i>Cancer Res.</i> <u>34</u> , 2835-2841.	11,37,38
Tereba, A., Skoog, L. et Vogt, P. K. (1975). <i>Virology</i> , <u>65</u> , 524.	31
Tooze, J. (1973). <i>The Molecular Biology of Tumor Viruses.</i> 2,4 Cold Spring Harbor Laboratory. (Cold Spring Harbor, ed.), pp. 502-699.	

	pages
Toyoshima, K. et Vogt, P. K. (1969). <i>Virology</i> , <u>38</u> , 414-426.	15
Varmus, H. E., Quintrell, N., Nowinski, R., Medeiros, E., Sarkar, N. et Bishop, J. M. (1973). <i>J. Mol. Biol.</i> <u>79</u> , 663-679.	16
Varmus, H. E., Guntaka, R. R., Fan, W., Heasley, S. et Bishop, J. M. (1974a). <i>Proc. Nat. Acad. Sci. (U. S. A.)</i> <u>71</u> , 3874-3878.	5
Varmus, H. E., Heasley, S. et Bishop, J. M. (1974b) <i>J. Virol.</i> <u>14</u> , 895.	31
Varmus, H. E. et Shank, P. R. (1976). <i>J. Virol.</i> <u>18</u> , 567-573.	6
Varmus, H. E., Heasley, S., Linn, J. et Wheeler, K. (1976). <i>J. Virol.</i> <u>18</u> , 574-585.	6
Varmus, H. E., Padgett, T., Heasley, S., Simon, G. et Bishop, J. M. (1977). <i>Cell.</i> , <u>11</u> , 307-319.	7
Varmus, H. E., Heasley, S., Kung, H-J., Opperman, H., Smith, V. C., Bishop, J. M. et Shank, P. R. (1978). <i>J. Mol. Biol.</i> (sous presse).	6
Vogt, P. K. (1969). In <i>Fundamental Techniques in Virology</i> (Hasel, K. et Salzman, N. P. ed.), pp. 198-211. Academic Press, New York.	15
Vogt, P. K. (1971). <i>Virology</i> , <u>46</u> , 939-946.	12
Vogt, V. M., Eisenman, R. et Diggelman, H. (1975). <i>J. Mol. Biol.</i> <u>96</u> , 471-493.	8
Weiss, R. A. (1969). <i>J. Gen. Virol.</i> <u>5</u> , 511-528.	5
Weiss, R. A. (1976). <i>Receptors for RNA Tumor Viruses.</i> (Beers, R. F. et Nasset, E. G. ed.) Miles International Symposium Series, N° 9, pp.237-251.	10
Weiss, S. R., Varmus, H. E. et Bishop, J. M. (1977). <i>Cell</i> , (sous presse).	2,7,8
Witte, O. N., Tsukamoto-Adey, A. et Weissman, I. L. (1977). <i>Virology</i> , <u>76</u> , 539-553.	10
Wyke, J. A., Bell, J. G. et Beamand, J. A. (1975). <i>Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology</i> <u>39</u> , 897-905.	12