

N° d'ordre : 795

50376

1979

128

50376

1979

128

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THESE

Présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du titre de Docteur de 3ème Cycle
OPTION BIOCHIMIE

par : SIMON SAULE

**LES VIRUS DES LEUCEMIES AIGUES AVIAIRES :
UN MODELE : LE VIRUS DE L'ERYTHROBLASTOSE.**



MEMBRES DU JURY :

Président : J. MONTREUIL
Examineur : J. KREMBEL
Examineur : C.J. SHERR
Rapporteur : D. STÉHELIN

Soutenue le : 7 NOVEMBRE 1979

Les travaux présentés dans cette thèse ont déjà fait l'objet
des publications suivantes :

1 - SAULE,S., ROUSSEL,M., PLUQUET,N. and STEHELIN,D. The genome of avian
defective leukemia viruses.

Proceeding of the 3rd FEBS Symp. on DNA. Pergamon Press LTD, 1979
(in press).

* 2 - ROUSSEL,M., SAULE,S., LAGROU,C., ROMMENS,C., BEUG,H., GRAF,T. and
STEHELIN,D.

DLV's : Three new types of viral oncogenes of cell origin specific
for hematopoïetic cell transformation. Nature, 1979 (in press).

3 - STEHELIN,D., SAULE,S., ROUSSEL,M., SERGEANT,A., LAGROU,C., ROMMENS,C.,
and RAES,M.B. Viral oncogenes in Defective Avian Leukemia Viruses:

I - Specific nucleotide sequences of cell origin correlate with
specific transformation. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol
Vol 44, 1979 (in press)

4 - - STEHELIN,D., SAULE,S., ROUSSEL,M., SERGEANT,A., PLUQUET,N.,
LAGROU,C., RAES,M.B. and ROMMENS,C.

Naturally occuring acute leukemias in avian species. Cold Spring Harbor
Conf. on Cell Proliferation. Vol 7, (1979) (in press).

* Cet article est le seul paru à ce jour (photocopie en annexe).

Ce travail a été réalisé à l'unité de Virologie U 102 INSERM (Directeur J.Samaille) et à l'Unité 186 d'Oncologie Moléculaire (Directeur D.Stéhelin).

Je tiens particulièrement à remercier Dominique Stéhelin pour la façon dont il a guidé ce travail et pour sa disponibilité constante.

Je remercie également Monsieur le Président et les Membres du Jury qui ont accepté de juger cette thèse.

Je tiens aussi à remercier Christian Lagrou, le maître incontesté de la culture cellulaire, ainsi que tous mes amis de l'unité pour leur aide et leur amitié précieuse.

Merci enfin à Nicole Devassine pour son excellent travail, et à Michèle pour tout le mal que lui a donné cette thèse.

INTRODUCTION

A) <u>Les Différentes Leucémies Aiguës Du Poulet</u>	2
B) <u>Les Virus Responsables</u>	3
I - <u>Purification</u>	3
II - <u>Incidence sur les cellules sanguines</u>	4
III - <u>Incidence sur les autres cellules</u>	6
1) <u>Transformation des fibroblastes</u>	7
2) <u>Transformation des cellules épithéliales</u>	9
C) <u>Données Biochimiques Concernant Les DLV</u>	9
I - <u>Leur homologie avec les ALV</u>	9
1) <u>Le génome des ALV/ASV</u>	10
2) <u>Transcription du génome des ALV/ASV</u>	10
3) <u>Les produits de la traduction</u>	11
a) le gène GAG	11
b) le gène POL	12
c) le gène ENV	13
d) le gène SRC	14
II - <u>Existe t-il des séquences DLV-spécifiques ?</u>	15
D) <u>But De Ce Travail</u>	16

MATERIEL ET METHODES

A) <u>Cellules Et Virus</u>	17
I - <u>Infection des cellules</u>	17
II - <u>Obtention de cellules non productrices</u>	18
B) <u>Préparation De L'ARN Viral</u>	19
C) <u>Préparation De Virus Purifié</u>	20
D) <u>Préparation D'ARN Cellulaire Total</u>	20
E) <u>Préparation D'ADN Cellulaire</u>	21
I - <u>Extraction</u>	21
II - <u>Traitement</u>	22
F) <u>Préparation De L'Amorce De Thymus De Veau</u>	22
G) <u>Préparation Des cDNA Viraux</u>	23
I - <u>Synthèse du cDNA</u>	23
II - <u>Extraction</u>	24
III - <u>Sélection en taille</u>	24
IV - <u>Sélection de cDNA spécifiques</u>	24
a) <u>chromatographie sur hydroxyapatite</u>	25
b) <u>précipitation du cDNA par le CTAB</u>	25
c) <u>traitement des hybrides par la nucléase S1</u>	26
<u>d'Aspergillus oryzae</u>	
H) <u>Hybridation Moléculaire</u>	27
I - <u>Définition</u>	27
II - <u>Formulation</u>	27
III - <u>Conditions de la réaction d'hybridation</u>	29
a) <u>conditions strictes</u>	31
b) <u>analyse des hybrides</u>	32
c) <u>conditions relâchées</u>	32

I) Mesure De La Température De Fusion Des Hybrides

33

J) Mesure De L'Activité Reverse Transcriptase Endogène

33

RÉSULTATS

I, II, III Parties

I - <u>Homologie ALV/DLV</u>	
1) <u>Obtention de cellules non productrices</u>	35
2) <u>Hybridation de l'ARN total de cellules non productrices</u> <u>avec les différents cDNA</u>	36
3) <u>Discussion des résultats</u>	37
4) <u>Conclusion</u>	40
II - <u>Selection d'un DNA ³H complémentaire des séquences AEV spécifiques</u> <u>cDNAaev</u>	
1) <u>Préparation du cDNAaev</u>	42
2) <u>Détermination de la complexité du cDNAaev</u>	44
3) <u>Conclusion - Discussion</u>	48
III - <u>Origine des séquences cDNAaev</u>	
1) <u>Spécificité des séquences cDNAaev</u>	49
2) <u>Hybridations du cDNAaev avec de l'ADN cellulaire</u>	49
3) <u>Mesure de la thermostabilité des séquences aev cellulaire</u>	50
4) <u>Transcription des séquences aev cellulaire</u>	52
5) <u>Conclusion - Discussion</u>	53
- <u>Conclusion générale</u>	54

ABREVIATIONS-SOLUTIONS

AcoNa	:	acetate de sodium
ADN	:	acide désoxyribonucléique
ARN	:	acide ribonucléique
C-TAB	:	N-Cétyl-N,N,N-Triméthyl- ammonium bromure
C MAV	:	CM2 associated virus
DEPC	:	diéthylpyrocarbonate
DMSO	:	diméthyl sulfoxyde
EtOH	:	éthanol 95 %
HAP	:	hydroxyapatite
RAV	:	Rous associated virus
SDS	:	dodécyl sulfate de sodium
STE	:	NaCl 0,1M, Tris HCl 0,02 M, EDTA 0,001M pH 7,4
TE	:	Tris-HCl 0,02M, EDTA, 0,01 M pH 7,4

- Tampon d'hybridation : NaCl 0,6 M, Tris HCl 0,05 M, EDTA 0,002 M (pH 7,4),

ADN 4 s de thymus de veau entraineur 500 µg/ml

- Tampon phosphate de sodium : solution stock (2M) à partir de laquelle sont préparés

les différents tampons utilisés. Proportions équimolaires de NaH_2PO_4 , 1 H_2O (1M) et Na_2HPO_4 (1 M).

- Liquide à scintillation : Ppo : 4 g, Popop : 0,05 g toluène qsp 1 L

- Tous les tampons sont traités par du DEPC à 0,1 % final (V-V).

RESUME

Les virus des leucémies aiguës aviaires (DLV) induisent chez l'animal des leucémies mortelles en quelques semaines. Elles sont de 3 types selon la cellule touchée : Erythroblastique, Myéloblastique, Myélocytique et s'accompagnent de tumeurs solides variées. Ces virus à ARN de type C défectifs pour la répllication sont toujours accompagnés d'un virus leucémogène (ALV) "helper" induisant des leucémies lymphoïdes lentes. Nous avons recherché en utilisant la technique d'hybridation moléculaire une homologie entre ALVs et DLVs. Celle-ci représente selon les virus 38 à 77 % de leur génome, laissant ainsi la place à des séquences spécifiques pouvant être responsables de leur pathologie. L'étude du virus de l'érythroblastose aviaire (seul virus connu affectant la lignée rouge du sang) nous a permis de mettre en évidence une séquence de 3700 nucléotides spécifique de ce virus et suffisante pour constituer un ou deux gènes. Cette séquence est d'origine cellulaire, et elle fait partie des gènes stables car on la retrouve également chez les mammifères et chez les poissons. La séquence AEV cellulaire est normalement transcrite à raison d'1 à 3 copies dans l'ARN de cellules aviaires saines, mais elle présente 4 % de bases mutées par rapport à la séquence AEV virale.

Nous pensons que cette séquence cellulaire est impliquée dans la régulation de l'érythropoïèse et que recombinaée avec le génome d'un ALV elle est responsable du pouvoir pathogène du virus ainsi créée, en échappant au contrôle cellulaire normal.

INTRODUCTION

Les différentes maladies prolifératives du tissu sanguin peuvent être séparées en deux classes différant selon l'acuité du phénomène transformant (1).

- Les maladies transformant les cellules différenciées sont de développement relativement lent, telles les leucémies chroniques de l'espèce humaine : leucémie lymphoïde chronique (à Lymphocytes B) et leucémie myéloïde chronique (à myélocytes).

- Les maladies qui affectent les cellules indifférenciées donnant naissance aux différentes lignées sanguines ont un développement très rapide d'où la dénomination de leucémies aiguës. Elles peuvent être lymphoblastique (forme la plus fréquente chez l'enfant), myéloblastique (forme la plus fréquente chez l'adulte) ou plus rarement promyélocytique, monocytique et érythroblastique. Ces formes sont très rapidement mortelles (1 à 11 mois), la survie n'excédant jamais quatre ans sous traitement. Les leucémies chroniques qui peuvent être stabilisées pendant une durée relativement longue (jusqu'à 15 ans) se terminent fréquemment sous forme de leucémie aiguë avec apparition de cellules blastiques dans le sang ; c'est le cas de la leucémie myéloïde chronique qui se transforme en leucémie myéloblastique, alors que la leucémie lymphoïde chronique se complique de tumeurs solides parmi lesquelles les réticulo-sarcomes ne sont pas rares.

Les mécanismes qui président à leur apparition sont très mal connus et il est utile de comprendre comment de telles maladies surviennent chez l'animal afin de disposer de modèles expérimentaux utilisables.

De ce point de vue, l'espèce aviaire est particulièrement intéressante, car bien que les oiseaux soient phylogénétiquement assez éloignés des mammifères, ils sont affectés de ces mêmes

types de maladies et les agents responsables sont là, fort bien connus.

Les leucémies lymphoïdes chroniques ou lentes, sont dues à un virus leucémogène (A.L.V), un rétrovirus à ARN de type C, dont on a isolé de nombreuses souches depuis le début du siècle (2). La cellule cible de ce virus est un Lymphocyte B qui reste alors bloqué au stade de producteur d'I g M (3). Ce type de leucémie se rapprocherait, dans l'espèce humaine, de la maladie de Waldenström, caractérisée par la prolifération maligne monoclonale de lymphocytes B sécrétant une I g M après maturation en plasmocytes. Rappelons que la leucémie lymphoïde chronique humaine présente plus particulièrement une sécrétion monoclonale d'I g G.

Les leucémies aiguës qui sont essentiellement de trois types dans l'espèce aviaire, peuvent également être provoquées par des rétrovirus (4). Cependant, cette classe de virions n'est étudiée que depuis peu.

C'est à cette classe de virus que nous nous sommes intéressés en essayant de les caractériser d'un point de vue biochimique et nous avons choisi pour mener une étude plus approfondie le virus de l'érythroblastose aviaire.

A) Les Différentes Leucémies Aiguës Du Poulet

L'érythroblastose est avec la myélocytomatose et la myéloblastose l'une des trois leucémies aiguës du poulet. La maladie se manifeste par une prolifération massive des érythroblastes qui ont perdu la faculté de se différencier en érythrocytes, et elle entraîne avec une efficacité de 100 % la mort de l'animal en quelques semaines. Cela contraste fortement avec les leucémies lymphoïdes lentes, qui nécessitent parfois plusieurs années avant de tuer l'animal.

La myéloblastose et la myélocytomatose sont des leucémies aiguës affectant toutes deux la lignée blanche. Elles sont également rapidement mortelles mais leur caractérisation cellulaire in vitro n'est pas aussi nette que celle de l'érythroblastose. Un rétrovirus responsable de la maladie a pu être isolé dans chaque cas.

B) Les Virus Responsables Des Leucémies Aiguës

Les différents virus des leucémies aiguës proviennent d'isolats différents et sont répertoriés dans le tableau suivant :

Virus	Maladie induite	Tumeurs associées	Lieu, Année de découverte
AEV	Erythroblastose	Sarcomes	Danemark 1933
MC29	Myélocytomatose	Carcinomes	Bulgarie 1964
CM2	Myélocytomatose	-	Allemagne 1964
OK10	myélocytomatose	Endothéliomes, Carcinomes, Sarcomes	Finlande 1975
MH2	Monocytose ?	Sarcomes, Carcinomes, Endothéliomes	Angleterre 1927
ALV	Myéloblastose	-	USA 1941
E26	Myéloblastose	?	Bulgarie 1962

I - Purification

L'isolement de ces souches et leur étude in vitro sur des cultures de cellules, notamment par les techniques de clonage a permis de mieux cerner leur biologie. Ainsi, il est apparu que toutes les souches isolées étaient en fait constituées de deux populations virales distinctes :

Un virus causant des leucémies lymphoïdes (ALV) généralement en excès.

Un virus induisant spécifiquement une leucémie aiguë et des tumeurs solides (DLV) (4,6,7,8,9). La présence constante d'un ALV aux côtés de ces virus permettait de penser que ces derniers sont défectifs pour la

réplication. Ce point a été prouvé par l'obtention de cellules (sanguines ou autres) transformées par un quelconque des DLV mais ne produisant aucune particule virale (cellules non productrices) (8, 10). Le virus contenu dans ces cellules peut à tout moment être produit si on surinfecte ces cellules par un ALV qui joue le rôle de "helper".

II - Incidence sur les cellules sanguines

Les études menées in vitro sur la transformation des cellules de moëlle osseuse riche en précurseurs des lignées hématopoïétiques ont permis de montrer qu'il était possible de classer les DLV en trois groupes différant par la nature de la cellule souche transformée. Il est en effet possible à l'aide de moyens immunologiques et biologiques de préciser sans ambiguïté l'origine de la cellule affectée. Par exemple, l'histone H5, spécifique des cellules de la lignée érythropoïétique, se retrouve dans les cellules de moëlle transformée par le virus de l'érythroblastose aviaire (AEV) alors que les cellules transformées par un autre DLV sont négatives pour ce critère. De même les érythroblastes transformés par AEV sont incapables de phagocyter les particules de latex, à l'inverse des cellules transformées par MC29. Ainsi, les cellules de moëlle osseuse infectées et transformées par le virus AEV expriment les marqueurs de la lignée érythropoïétique (11, 12), les cellules transformées par MC29, OK10, CM2, MH2 ressemblent à des macrophages et expriment les marqueurs de la lignée myéloïde, (4), les cellules transformées par AMV et E26 ressemblent à des myéloblastes et expriment les marqueurs de la lignée myéloïde, mais à un taux inférieur aux précédents. (12,13,15).

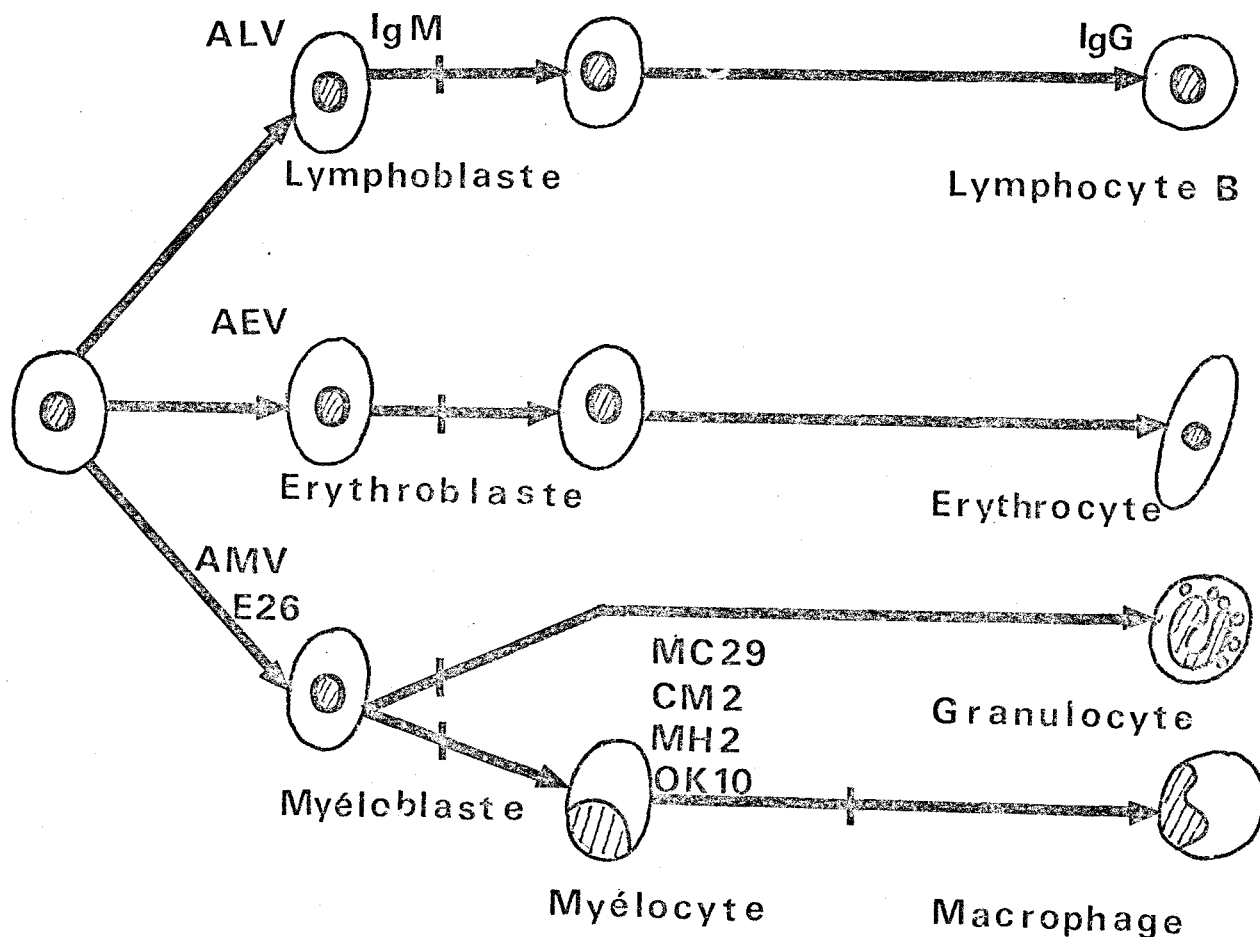
Paramètres de différenciation testés	Cellules de moelle transformées par		
	AEV	MC29	AMV
Hémoglobine (*)	+	-	-
Histone H5	+	-	-
Antigène érythrocytaire de surface	+	-	-
Capacité cellulaire à adhérer à un support	-	+	-
Formation de colonies sous l'action du "colonies stimulation factor" (CSF)	-	+	(+)
Capacité à phagocyter	-	+	(+)
Récepteurs du fragment FC des immunoglobulines	-	+	+
Macrophages/Granulocytes antigènes de surface	-	+	+

(*) La production d'hémoglobine peut être induite dans des érythroblastes transformés par AEV en exposant les cellules à de l'acide butyrique (12). Il apparaît clairement d'après cette étude, que la nature de la cellule souche dont la différenciation est bloquée après transformation, est étroitement liée au type du virus infectant.

Ce qui est remarquable, c'est que la spécificité de la cellule cible pour un DLV est indépendante du pouvoir infectieux du virus ; on aurait pu penser en effet qu'AEV ne transforme pas les cellules de la lignée myéloïde parce qu'il est incapable d'y pénétrer : cela n'est pas le cas, AEV infecte les macrophages, est normalement produit par ces cellules

(avec son helper) mais celles ci restent indemnes de toute transformation (T. Graf. Communication personnelle). Dans le cas des virus ALV et AMV il est impossible de faire une distinction entre les cellules de moëlle infectées in vitro et les cellules prélevées sur les animaux malades et cela quel que soit le critère considéré (4, 5, 11).

Il semble donc que le type de leucémie observé et la cellule cible du virus sont étroitement liés. On peut schématiser l'interaction des DLV avec les cellules sanguines de la façon suivante (4) :



CELLULES ; INDIFFERENCIÉES DIFFERENCIÉES

Le blocage de la différenciation étant figuré par des traits pleins

III - Incidence sur les autres cellules.

Les études menées in vitro concernant l'incidence des DLV sur des cellules de type défini ont permis de préciser le spectre tumoral de chaque

virus. Cette étude est très intéressante, car jusqu'à présent il n'existait chez le poulet qu'un type de rétrovirus non lytique capable de transformer d'autres cellules que celles du sang, les virus sarcomatogènes (ASV). Ces derniers sont en fait des ALV possédant un gène supplémentaire leur conférant ce pouvoir particulier. (15, 16, 17, 18). Or de récentes études d'hybridation moléculaire et l'analyse des cartes oligonucléotidiques des ARN viraux ont montré que les DLV en étaient dépourvus. (18, 19, 20).

1) Transformation des fibroblastes

Alors que la transformation des cellules sanguines était essentiellement définie par la prolifération des cellules immatures, la transformation des fibroblastes (qui aboutit in vivo à la formation de sarcomes) s'accompagne de désordres cellulaires provoquant une modification de la morphologie et de la physiologie de la cellule, facilement mise en évidence (21) :

Désordres observés	ASV	AEV	MC29	ALV
Formation de vésicules membranaires	+	+	+	-
Désorganisation des cables d'actine	++	+	++	-
Modification de la croissance cellulaire	+	+	++	-
Agglutinabilité par les lectines	+	+	+	-
Disparition de la LETS protéine	+	+	+	-
Transport accru des hexoses	+	+	-	-
Activité protéolytique	+	+	-	-
Formation de sarcomes in vivo	+	+	-	-

La formation des vésicules membranaires est visualisée à l'aide de la microscopie électronique à balayage. Elle rend compte des remaniements membranaires dus à la transformation (21). La désorganisation des cables d'actine responsable du changement de morphologie des cellules peut être observée par immunofluorescence (22) en utilisant des anticorps fluorescents réagissant contre les protéines d'actine.

La modification de la croissance cellulaire est de deux ordres : d'une part qualitative, (pousse en suspension, perte de l'inhibition de contact), d'autre part quantitative (temps de doublement réduit). Seules les cellules transformées par MC29 présentent cette dernière caractéristique (21). Elles se divisent deux fois plus vite que des cellules transformées par un ASV ou par AEV.

L'agglutinabilité par les lectines, la perte de l'inhibition de contact, la disparition de la LETS protéine (une glycoprotéine membranaire de haut poids moléculaire) (23, 24) traduisent l'importance des remaniements affectant les glycoprotéines de surface.

L'augmentation du transport des hexoses (mesurée à l'aide de 2 désoxyglucose radioactif), et une activité protéolytique accrue (25, 26) permettent de visualiser l'incidence de la transformation sur les fonctions métaboliques de la cellule, fonctions qui sont accrues dans la plupart des cas.

La formation de sarcomes in vivo souligne la corrélation existant entre les résultats obtenus in vivo et in vitro.

Les fibroblastes transformés par AEV expriment donc presque exactement les mêmes critères de transformation que les cellules transformées par un ASV. MC29 les transforme également (27) mais ce virus est incapable d'induire des sarcomes in vivo. CM2, (7) MH2 (28, 29) et OK10 (30, 31) transforment eux aussi les fibroblastes en culture.

Aucune altération morphologique des fibroblastes n'a pu être observée après infection de ceux-ci par les virus AMV ou E26 (4).

2) Transformation des cellules épithéliales.

De la même façon que les fibroblastes en culture, les cellules épithéliales peuvent être transformées par certains DLV. Ainsi, MC29, CM2, OK10, et MH2 transforment ces cellules in vitro (ce qui rend sans doute compte de leur capacité à induire des carcinomes in vivo), alors que les résultats obtenus avec AMV ne sont pas très clairs à ce sujet. (4).

Les principales caractéristiques oncogènes des DLV sont résumées sur le tableau suivant :

Virus	Cellule hematopoïétique transformée	Fibroblaste transformé	Cellule épithéliale transformée
AEV	Erythroblaste	+	?
MC29	Macrophage-like	+	+
CM2	"	+	+
OK10	"	+	+
MH2	"	+	+
AMV	Myéloblaste	-	(+)
E26	"	-	?

C) Les Données Biochimiques Concernant Les DLV

I - Leur homologie avec les ALV

Le fait que les DLV nécessitent toujours la présence d'un ALV helper et de récents résultats obtenus sur les protéines des virus défectifs (8, 10; 32), permettent de penser que ces virions sont pour une partie du moins de leur génome apparentés aux "helper". Nous allons rapidement résumer les caractéristiques des ALV/ASV qui ont fait l'objet d'études très approfondies par ailleurs.

1) Le génome des ALV/ASV.

Les ALV possèdent un ARN génomique monocaténaire constitué de deux sous-unités identiques polyadénylées de 8.200 nucléotides de long et de $2.9 \cdot 10^6$ daltons de poids moléculaire (33) (10000 nucléotides et $3.3 \cdot 10^6$ daltons pour ASV). Cet ARN est protégé par les protéines internes du virion (la capsid). Ces protéines ont un poids moléculaire variant de 27.000 à 12.000 et sont au nombre de 4 : la P19, P27, P12, P15, (35, 36). Cette nucléocapside est à son tour contenue dans une enveloppe d'origine cellulaire comportant à sa surface des glycoprotéines virales, les GP 85 et GP 35 (37).

Le génome d'un ASV, ainsi que l'a présenté Baltimore (38) est composé des gènes GAG, POL, ENV et SRC disposés de l'extrémité 5' phosphate vers l'extrémité 3' OH (39, 40). Entre le gène SRC et l'enchaînement polyadénylique 3' OH terminal, il existe une séquence de 800 nucléotides, dont la fonction est inconnue. Cette séquence nommée "C" pour partie commune, se maintient dans les mutants d'ASV spontanés ayant perdus le gène SRC, et se retrouve chez tous les ALV (41).

2) La transcription du génome des ALV/ASV

La traduction de ces gènes nécessite l'intermédiaire de différentes classes d'ARN messagers qui ont pu être mis en évidence par hybridation moléculaire dans les cellules infectées par des ALV ou des ASV. Les caractéristiques de ces différents ARN sont reportées dans le tableau suivant (42, 43, 44) :

Caractéristiques des ARN	A S V			A L V	
Constante de sédimentation (en Svedberg)	39	28	21	35	21
Poids moléculaire ($\times 10^6$ daltons)	3,3	1,8	1,2	2,6	1,2
Présence des gènes :					
GAG	+	-	-	+	-
POL	+	-	-	+	-
ENV	+	+	-	+	+
SRC	+	+	+	-	-
C	+	+	+	+	+
ARN messenger de :	GAG	ENV	SRC	GAG	ENV
	POL			POL	
ARN génomique	+	-	-	+	-

Tous ces ARN sont polyadénylés et contiennent l'extrémité 5' phosphate de l'ARN génomique (42, 43).

Les ARN 35 S et 39 S ont deux fonctions : d'une part, servir de messenger pour les gènes GAG et POL, d'autre part être encapsidés en tant qu'ARN génomique.

3) Les produits de la traduction du génome

a - le gène GAG :

Ce gène, qui contient environ 2300 nucléotides (45) dirige la synthèse d'un polypeptide de 76.000 daltons de poids moléculaire (Pr 76), qui est ensuite clivé en ses constituants, les protéines de la capsid. Ce clivage semble être réalisé par la P15 du virus (46, 47, 48). La purification de la Pr 76 et des protéines de la capsid permet de préparer, après injection à des lapins, des sérums riches en anticorps dirigés contre

ces antigènes. Un sérum dirigé contre la P27 s'appelera "serum anti P27". Il est ainsi possible d'immuno-précipiter une protéine contenant les déterminants antigéniques d'un quelconque produit du gène GAG. Si on applique cette technique pour rechercher dans des cellules non productrices de DLV une expression de ce gène, il existe toujours une immunoprécipitation d'un polypeptide de haut poids moléculaire, mais jamais celle d'un quelconque produit de clivage (10, 28, 32). Donc les DLV possèderaient une partie du gène GAG, mais celui-ci ne serait pas fonctionnel.

	ALV	AEV	MC29	CM2	MH2
Polypeptide immunoprécipité par un sérum anti Pr76 ($\times 10^3$ daltons)	76	75	110	90	100
Produit de clivage	+	-	-	-	-
Origine	Vogt P.K. 1975 (45)	Hay- man,m 1977 (31)	Bis- ter,k 1977 (8)	Hay- man,m en prép.	Hu,s 1979 (6)

b - le gène POL

C'est ce gène (2700 nucléotides (45)) qui fait l'originalité des rétrovirus. C'est lui qui permet la synthèse de l'ADN polymérase ARN dépendante découverte en 1970 par Temin (49). Cette synthèse nécessite l'intermédiaire d'un précurseur de 180.000 daltons de poids moléculaire (50) qui possède également les déterminants antigéniques du Pr76. La rétopolymérase est constituée de deux sous unités de 110.000 et 90.000 daltons (51, 52) et elle transcrit le génome ARN du virus en une réplique parfaite d'ADN. Cela permet à cet ADN génomique double brins de s'intégrer après circularisation dans les chromosomes de la cellule hôte d'où il dirige la synthèse ultérieure d'ARN génomiques et messagers viraux (53, 54).

Aucun produit possédant les déterminants antigéniques ou la fonction de la rétropolymérase n'a pu être mis en évidence dans les cellules non productrices des DLV.

c - le gène ENV (2400 nucléotides (45))

Le gène ENV dirige la synthèse de deux glycoprotéines virales, la GP85 et la GP35 (55). Il existe deux précurseurs successifs de ces glycoprotéines les Pr70 et Pr90. Seul le Pr90 semble glycosylé (43, 55). La présence de ces glycoprotéines à la surface de l'enveloppe virale permet la fixation du virion sur la membrane plasmique, étape essentielle avant la pénétration virale. Des virus dépourvus du gène ENV, (tels rd Bryan ASV) ne sont pas infectieux (56, 57). Ces glycoprotéines sont également responsables de la restriction d'hôte, qui fait que certaines cellules sont spontanément résistantes à l'infection pour un virus donné. Ces virus ont pu être classés en 7 groupes notés de A à G (58, 59, 60, 61) en fonction des récepteurs présents sur la surface cellulaire. L'absence des récepteurs de type A par exemple, rend la cellule résistante à l'infection par des virus du sous groupe A (cette cellule est alors nommée C/A). Il n'a jusqu'à présent pas été possible d'immunoprécipiter un quelconque produit du gène ENV dans les cellules non productrices des DLV, de même qu'il est impossible de restaurer le pouvoir infectieux de mutants dépourvus d'enveloppe tout au moins avec le produit des cellules non productrices de MC29 et MH2 (8, 62). Ceci implique que les DLV doivent posséder la même restriction d'hôte que leur helper.

Ces 3 gènes sont nécessaires et suffisants pour la répllication et le pouvoir infectieux de ces virus. La présence du gène supplémentaire SRC ne modifie pas ces fonctions.

d - le gène SRC

Le gène SRC est l'apanage exclusif des virus sarcomatogènes aviaires (18). Il permet l'initiation et le maintien de la transformation des fibroblastes en culture et représente la justification de la théorie provirale émise par Temin en 1971 (63) selon laquelle, la transformation cellulaire serait due à l'action d'un gène transformant viral introduit dans l'ADN de la cellule hôte après une infection exogène. Le produit de ce gène est une phosphoprotéine de 60 000 daltons de poids moléculaire (64, 65) et la même protéine a pu être obtenue dans des systèmes de transcription in vitro à partir d'ARN viral d'ASV (66, 67). Les études d'hybridation moléculaire, menées avec un ADN (³H) complémentaire du gène SRC (cDNA sarc) ont permis de préciser les points suivants :

- le gène SRC se trouve normalement dans l'ADN des cellules aviaires saines (68), ainsi que dans l'ADN de toutes les autres espèces testées (69, 70, 71) et la stabilité phylogénétique de ce gène est très comparable à celle des gènes ovalbumine et globine, qui sont parmi les gènes cellulaires les plus stables.

Cette même séquence est transcrite en ARN dans les cellules saines (71, 72, 73) et une protéine de 60.000 daltons de poids moléculaire, possédant les mêmes déterminants antigéniques que la P60 SRC y a été trouvée, (74), à un taux cependant 30 à 50 fois moindre que dans les cellules transformées par un ASV.

Tous ces résultats établissent que le gène SRC est en fait un gène cellulaire qui a très probablement été intégré dans le génome d'un ALV. Son pouvoir transformant et sa présence dans des cellules saines peuvent être expliqués par la théorie protovirale de Temin (1974) (75) qui suppose que des cellules saines possèdent des séquences nucléotidiques susceptibles d'acquérir un pouvoir transformant après mutation. La théorie oncogène de Hubner et Todaro (1969) (76) qui propose que des cellules saines possèdent

des gènes transformants inactifs semble infirmée, tout au moins pour le gène SRC, par la présence de la P60 SRC dans les cellules saines.

Il est intéressant de constater que de tous les gènes des ASV, seul le gène SRC est d'origine cellulaire. En effet, bien qu'il existe un génome d'ALV intégré dans l'ADN des cellules saines de poulet et appelé RAVO,

(1) celui-ci est rapidement perdu au cours de la phylogénèse,

la caille, espèce très proche du poulet en étant dépourvue (68, 77).

De récents résultats suggèrent même que le virus RAVO aurait été acquis très récemment par l'espèce Gallus (77), car certains poulets exotiques (G. Sonneratis ; G. Varius) en sont dépourvus, ce qui implique que RAVO n'a pas été transmis au poulet par son ancêtre.

II - Existe-t-il des séquences spécifiques au génome des DLV ?

Le fait que les DLV soient transformants tout en ne possédant pas le gène SRC permet de penser qu'ils peuvent avoir un gène oncogène différent de SRC. Deux faits permettent d'envisager cette hypothèse :

a) dans les cellules non productrices de DLV il existe un polypeptide de haut poids moléculaire partiellement apparenté au gène GAG. Quel est le gène responsable de la synthèse du reste du polypeptide ?

b) la taille du génome des virus MC29 et MH2 est de 5700 nucléotides (78, 79), donc beaucoup plus court que celui d'un ALV (8000 nucléotides), mais capable de recéler des séquences spécifiques, et il a pu être mis en évidence pour le virus MC29, à l'aide d'hybridation moléculaire, la présence d'un segment de 1600 nucléotides propres à ce virus (80). Ce segment est continu et adjacent aux séquences GAG (comme cela a pu être montré par l'analyse, en microscopie électronique, d'hybrides formés entre de l'ARN de MC29 et un ADN radioactif complémentaire de tout le génome d'un ALV (81).

D) But De Ce Travail

Nous avons tout d'abord essayé de quantifier l'homologie existant entre les DLV et les ALV en utilisant les techniques d'hybridation moléculaire en phase liquide. De l'ARN de cellules non productrices (afin d'avoir le génome du DLV sans celui du helper) est hybridé avec de l'ADN ³H complémentaire des différents gènes des ALV. Le pourcentage d'hybridation est mesuré soit en conditions strictes soit en conditions relâchées. Nous avons ainsi pu dresser une carte comparative entre le génome de chaque DLV et celui des ALV. Et donc de savoir si ces virus étaient ou non dépourvus des gènes ENV et POL. De même les résultats obtenus montrent sans ambiguïté qu'il est probable que tous ces virus possèdent des séquences propres, qui pourraient être associées à leur pouvoir cancérigène.

Afin de préciser ce dernier point, nous avons synthétisé et purifié un ADN ³H complémentaire des séquences spécifiques du virus de l'érythroblastose aviaire. La complexité (la taille) de cette séquence nucléotidique, sa spécificité et son origine sont étudiées dans les parties III et IV de ce travail. Il nous est ainsi possible de proposer un modèle expliquant la gènese des DLV à partir des ALV et de matériel cellulaire normal.

MATERIEL ET METHODES

.....

MATERIEL ET METHODES

A) Cellules Et Virus

Les cellules sont cultivées en milieu Dubelcco contenant 5 % (v/m) de bactotryptose (Difco), 2 g/l de Na H CO₃ (Merck), dans une étuve à 39°C et sous 5 % de CO₂. Le milieu de culture est enrichi par 10 % (v/v) de sérum de veau foetal (Gibco) pour les cellules non productrices (milieu riche) et par 5 % de sérum de veau nouveau né (Gibco) pour les autres. Dans tous les cas on ajoute de la glutamine (1 %, v/v) d'une solution aqueuse à 3 % (Merck), des antibiotiques (pénicilline Spécia 100 U/ml, streptomycine Spécia 50 µg/ml, gentamycine 8 µg/ml, et de la fungizone Squibb à 2,5 µg/ml).

La production de virus est assurée après infection de fibroblastes de poulet C/E de la race Brown-Leghorn mis en culture à partir d'embryons de 10-11 jours.

I - Infection des cellules

$5 \cdot 10^6$ cellules sont mises en contact dans une boîte de Petri en plastique (100 mm de diamètre, Corning) avec 0,1 particule virale infectieuse par cellule, dans 5 ml du milieu ci-dessus contenant en outre 2 µg/ml de polybrène (Aldrich) afin d'augmenter l'efficacité de l'infection (81). Les cellules infectées productrices, sont cultivées en rollers de plastique (Corning). Le milieu est appauvri en sérum après 5 jours (2 % de sérum de veau nouveau né, auxquels on ajoute 1 % de diméthyl sulfoxyde Merck pour les cellules transformées par un ASV). Le milieu recueilli toutes les 24 heures est conservé à - 70°C dans un congélateur Revco. La production de virus est mesurée par hybridation moléculaire de l'ARN viral extrait d'un volume connu de milieu de culture, avec un ADN ³²P complémentaire de tout le génome viral. L'expression du pourcentage d'hybridation en

fonction de la dilution de l'ARN viral permet de construire une courbe (Vot) dont il est possible de déduire la production virale (voir plus loin) (83).

II - Obtention de cellules non productrices :

Nous avons réalisé des cellules non productrices du virus MH2, celles-ci n'ayant pu nous être fournies.

De telles cellules sont obtenues après infection de fibroblastes de caille par un pseudotype viral contenant l'information génétique de MH2 et les protéines fonctionnelles de son helper (RAV3, sous groupe A).

Pratiquement, les cellules sont infectées par un mélange de virus MH2 (RAV3). Certaines cellules peuvent posséder soit le génome de RAV3, soit celui de MH2, soit ceux de MH2 et RAV3. Seule la cellule n'ayant intégré que le génome de MH2 sera non productrice. La sélection des cellules se fait en utilisant la propriété que possèdent les cellules transformées de pousser en agar (21). Les clones non producteurs sont ensuite discriminés à l'aide de tests biochimiques. L'infection de 10^7 fibroblastes de caille (possédant la restriction d'hôte pour les sous groupes B et D) est réalisée par 10 ml de milieu de culture de fibroblastes de poulet transformés par le virus MH2 (RAV3). Après 12 heures de contact avec le virus (il y a environ 1 particule virale infectieuse par cellule) les cellules sont trypsinées afin d'être dissociées, (trypsine 1 % Difco, EDTA 1 %) reprises dans 10 ml de milieu sans sérum, (pour éviter les agrégations cellulaires) comptées, (à l'aide d'un compteur de cellules Coulter) et incluses à raison de 10^3 cellules par boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre dans 5 ml de milieu riche additionné de : 0,3 % (M/v) d'agar noble (Difco), 0,07 % de biotine stérile, 0,7 % de Diméthyl sulfoxyde et 50 % de "milieu riche", surnageant de 48 h d'une culture saine de fibroblastes de caille. Ce mélange est versé avant solidification sur une couche solide constituée de ce milieu, contenant 0,6 % d'agar et

recouvrant une culture confluyente de fibroblastes de caille sains. Ces fibroblastes de caille diffusent des facteurs cellulaires destinés à faciliter la pousse des cellules isolées, dispersées dans l'agar.

Dans ces conditions les clones commencent à apparaître quelques jours plus tard, et ils sont prélevés le 14^{ème} jour .

Les clones qui apparaissent sous la couche d'agar comme des grappes arrondies contenant quelques centaines de cellules sont prélevés à l'aide d'une micropipette de 100 µl (Brandt) effilée à la flamme, et dissociés individuellement dans des cupules de 18 mm de diamètre contenant 300 µl de milieu de clonage dépourvu d'agar.

Les cellules une fois confluentes sont transférées après trypsination dans des boîtes de diamètre croissant, 30 mm, puis 60 mm et enfin 100 mm pour pouvoir être testées à l'aide des techniques biochimiques.

B) Préparation De L'ARN Viral

L'ARN viral génomique (70S) est préparé selon la technique de Quintrell et al (1974) (84). Le milieu de culture est clarifié par centrifugation (10 min, 10.000 g, + 4°C) puis soumis à une centrifugation de 19.000 rpm pendant 90 min à + 4°C en rotor 19 dans une ultracentrifugeuse Beckman L 3 50. Le culot viral est remis en suspension dans du tampon STE contenant 200 µg/ml de protéinase K (Boehringer). Le mélange est mis à incuber à 37°C et ajusté en SDS (1 % v.v final). Après une incubation de 10 min, l'ARN viral est extrait deux fois par du phénol (Merck) saturé en STE pH : 7,4. La phase aqueuse est ajustée en sel (AcONa, 0,2 M), additionnée de 200 µg/ml d'ARN de levure et précipitée par 2 volumes d'éthanol à 95° pendant 12 h à - 20°C. L'ARN est alors sédimenté (10.000 g, 10 min. + 4°C), rincé par un mélange STE/ EtOH 95° (1 :2) et repris dans

un volume minimum de STE. Ce mélange est déposé sur un gradient de saccharose 15-30 % dans du STE et soumis à une centrifugation (3,5 h à 40.000 rpm dans un rotor SW 41 à + 4°C .85). Le gradient est lu en densité optique à 260 nm sur un analyseur de gradient (Isco-UA5) et les fractions correspondant au pic d'ARN 70S sont réunies et précipitées comme ci-dessus.

C) Préparation De Virus Purifié

1 litre de surnageant des cellules non productrices d'OK10 est clarifié (10 min, 10.000 g, + 4°C en Sorvall) et précipité à l'aide de sulfate d'ammonium (RPE) 30 %. Le culot centrifugé (15 min à 10.000 g), resuspendu dans 100 ml de tampon STE est déposé sur 6 gradients discontinus composés de 5 ml de tartrate de potassium (Merck) et 15 ml de saccharose à 10 % dans du STE. La préparation est centrifugée (2 h à 22.000 rpm dans un rotor SW 27 Beckman L 3 50 à +4°C). La bande virale visible dans le gradient est collectée, diluée dans du STE, déposée sur un gradient 25-55 % de saccharose dans du STE, puis soumise à 12 h de centrifugation (à 22.000 rpm en SW 27 dans une L 3 50 Beckman à + 4°C). La concentration en protéines virales est mesurée par la méthode de Warburg (86). On obtient ainsi un mélange à 53 µg/ml de protéines virales OK10, les tests comparatifs pour rechercher la rétopolymérase endogène étant menés avec un mélange à 17 µg/ml de protéines virales de nd SR-E obtenu exactement dans les mêmes conditions.

D) Préparation D'ARN Cellulaire Total

L'ARN cellulaire est extrait soit de tissus soit de cellules en culture, selon une adaptation de la technique de Varmus et al (1973) (87). Tissus et embryons sont soumis à l'action d'un broyeur Ultra-Turrax (Ika Werk) 1 min sur position 7 dans du tampon STE contenant 100 µg/ml de protéinase K. Le broyat mis à incuber à 37°C est ajusté en SDS (1 %) et laissé au bain-marie 15 min. Le mélange est extrait deux fois par du

phénol saturé en STE, la phase aqueuse est ajustée en sel (AcONa 0,2 M) et l'ARN est précipité par 2 vol d'EtOH 95°. Avant de laisser précipiter 12 h à - 20°, l'ADN précipitant est éliminé par enroulement des brins autour d'une baguette de verre. La qualité de l'ARN obtenu est ensuite estimée à l'aide du profil des ARN ribosomiaux. Un aliquot des ARN sédimentés (10 min, 10.000 g, +4°C) rincés, (STE 1 : EtOH 95°:2) et repris dans du STE, est déposé sur un gradient 15-30 % de saccharose centrifugé 16 h à 35.000 rpm dans un rotor SW 41 à + 4°C. Le profil du gradient est obtenu à l'aide d'un analyseur de gradient Isco UA5. Cette méthode permet de détecter une dégradation éventuelle des ARN cellulaires.

E) Préparation D'ADN Cellulaire

I - Extraction

L'ADN est extrait, d'embryons de poulet, de tissus de différents vertébrés, et de cellules en culture, suspension d'érythroblastes 6C₂ transformés par AEV (RAV2). Les tissus ou embryons sont broyés (broyeur Ultra-Turrax, Ika Werl, 1 min position 7) dans du STE contenant 50 µg/ml de protéinase K à raison de 20 ml de tampon par embryon ou par 10 g de tissu. A l'homogénat est ajouté du SDS (1 %) et le mélange est mis à incuber de 2 à 12 h sous agitation magnétique douce à 37°C. La suspension est extraite 3 fois de suite avec du phénol saturé en STE (pH:8) et la phase aqueuse ajustée en sel, (AcO Na 0,2 M) est précipitée 12 h à - 20°C par 2 vol d'EtOH 95° les acides nucléiques sont sédimentés (10 min. à 10.000 g + 4°C), rincés, (STE : 1 v EtOH 95° : 2 v) et dissous dans du tampon TE (à raison de 2 mg/ml). L'ARN présent dans le milieu est digéré par la ribonucléase pancréatique bovine (Sigma, 100 µg/ml 1 h à 25°) préalablement chauffée 10 min à 100°C pour éliminer toutes les traces de désoxyribonucléase.

II - Traitement de l'ADN

L'ADN est alors réduit par des ultra-sons (microsonde, 10 min, 70 watts, Sonifier B-12, Branson sonic power Company) en fragments de 4-6 S de constante de sédimentation en gradient de saccharose. Le mélange est dénaturé par la soude (0,3 N, 12 h à 37°), neutralisé par HCl 3 N en présence de rouge de phénol, extrait une fois par un vol. de phénol STE (pH8), et la phase aqueuse est précipité directement par 2 vol. EtOH 95° 12 h à -20°C. La taille de l'ADN est contrôlée par la centrifugation d'un aliquot d'ADN dans un gradient de saccharose 5-20 % (dans du tampon NaCl 0,6 M, NaOH 0,3 N, EDTA 0,01 M pH 7,4 16 h 35.000 rpm en rotor SW 41 à 24°C). Le gradient est lu sur un analyseur de gradient et la taille du pic d'ADN est calculée à partir d'un marqueur ADN ³H 4 S inclus dans la charge.

F) Préparation D'Oligonucléotides De Thymus De Veau

L'ADN de thymus de veau est utilisé comme amorce dans la transcription d'un ARN par l'ADN-polymérase-ARN-dépendante d'AMV, selon la technique de Taylor et al (1976) (88). L'ADN est réduit en fragments de 2 à 40 nucléotides de long à l'aide de la désoxyribonucléase I (exempte de RNase, worthington), et les fragments de 8 à 12 nucléotides de long qui sont les plus efficaces (89) sont sélectionnés sur une colonne DEAE-Sephadex. 2,5 g d'ADN 4 S de thymus de veau (Sigma) sont dissous dans 100 ml de tampon Tris-HCl (0,02 M) MgCl₂ (0.01 M pH 7,4) contenant de la DNase I (50 µg/ml). Après 45 min.d'incubation (35°C) la DNase est dénaturée (10 min.100°C) et le mélange extrait par du phénol-STE. L'ADN est chargé sur une colonne DE52 (DEAE-cellulose-Watthman) équilibré par du tampon Tris HCl, pH 7.4 (0.005 M), EDTA (0,001 M), NaCl (0,1 M). Les morceaux de 8 à 12 nucléotides sont élués par le même tampon contenant 0,3 M NaCl. Après précipitation par 2 vol.d'EtOH - 20°C 12h, l'ADN est repris dans un tampon Tris-HCl pH 8, 1 (0.01 M) à une concentration de 10 mg/ml.

G) Préparation Des cDNA Viraux

Les DNA ^3H ou ^{32}P complémentaires des génomes viraux ou de fragments définis de ceux-ci sont préparés selon la technique de Taylor (88). L'ADN complémentaire (cDNA) est synthétisé dans une réaction exogène utilisant l'ADN-polymérase-ARN-dépendante du virus AMV, des fragments amorces d'ADN de thymus de veau, un ARN viral matrice (génomique ou fragmentaire), et un mélange réactionnel contenant les 4 nucléosides triphosphates dont l'un est marqué au ^3H ou au ^{32}P . La sélection de fragments spécifiques de cDNA se fait ensuite à l'aide de techniques d'hybridation moléculaire. Cette méthode permet d'obtenir de grandes quantités d'un cDNA qui est très représentatif de l'ARN matrice (10 fois plus que la réaction endogène (90)) car l'initiation de la transcription par l'amorce ADN a lieu tout le long du génome. Tous les gènes sont transcrits au même taux et avec le même rendement, ce qui n'est pas le cas de la réaction endogène dans laquelle s'accumule essentiellement un cDNA représentant la région 5' phosphate du génome viral (91). Cependant, l'inconvénient de cette méthode réside dans sa non-spécificité : n'importe quelle matrice ARN sera transcrite (88).

I - Synthèse du cDNA

Le mélange réactionnel de synthèse contient : Tris Hcl (pH : 8,1 ; 0,05 M) ; Dithiotreitol, (0,02 M) ; MgCl_2 (0,008 M) ; Kcl (0,05 M) ; ADN amorce de thymus de veau (2,5 mg/ml) ; actinomycine D (Rhône-Poulenc, 100 $\mu\text{g/ml}$) ; ARN 70 S (25 $\mu\text{g/ml}$) d'ATP, dCTP, dGTP non marqués, (210^{-4}M), dissous dans du Tris Hcl (pH 8,1 : 0,1 M PL Biochemicals, Inc). Le dTTP ^3H , ($1,510^{-4}\text{M}$; 60 Ci/mM, ICN) ou ^{32}P (210^{-6}M ; 350 Ci/mM NEN) est desséché au préalable dans le tube réactionnel l'AMV polymérase est utilisé à 280 U/ml (J.Beard, Life Sciences INC. St Petersburg, Florida). Une cinétique d'incorporation permet de suivre la réaction et de l'arrêter par de l'EDTA (0,05 M) après 45 minutes d'incubation à 40°C quand le plateau est atteint.

II - Extraction

L'AMV polymérase est digérée par de la protéinase K (100 µg/ml, SDS 1 %, 37°C, 1 h) et le cDNA est extrait par un volume de phénol STE (pH 8,1). La phase phénolique est réextraite par 1/2 volume de TE, les phases aqueuses sont rassemblées et traitées 5 min. aux ultra sons (micro sonde 70 watts), ajustées en sel, (AcONa 0,2 M) et précipitées 12 h à - 20°C par 2 vol d'EtOH 95°, en présence de 200 µg/ml d'ARN de levure entraineur.

III - Sélection en taille du cDNA

Le cDNA est centrifugé (10 min. à 10.000 g + 4° en Sorvall), le culot est repris dans 200µl d'un tampon dénaturant (0,9 M NaOH, 1 M NaCl, 0,01 M EDTA) traité 5 min à 60°C et chargé sur un gradient 5 - 20 % de saccharose dans le tampon dénaturant. Le gradient est centrifugé, (28 h à 37.000 rpm à 24°C dans un rotor SW 41 Beckman L 3 50) fractionné, et la taille du cDNA estimée à l'aide d'un marqueur 4 S ADN ³H centrifugé en parallèle. Les fractions correspondant à du cDNA 4 S ou plus, sont rassemblées, neutralisées par de l'HCl 3 N (indicateur rouge de phénol) et précipitées en présence d'ARN de levure entraineur (200 µg/ml) par 2 vol. d'EtOH (95°, 12 h, - 20°C). A ce stade, le cDNA représentant tout le génome viral (cDNArep ³H ou ³²P) est utilisable, ou alors peut-être sélectionné afin d'obtenir une région précise du génome.

IV - Sélection de cDNA spécifiques

Différents cDNA spécifiques sont préparés ainsi : les cDNAgag-pol, cDNAgag-pol.c, cDNAenv, cDNAsarc, cDNAaev.

Les cDNAgag-pol, gag-pol.c, env, et sarc sont sélectionnés à partir d'un cDNArep ³H préparé à l'aide d'un ARN 70 S matrice de virus nd PrC, (18, 71, 92).

Le cDNA simple brin ³H est hybridé avec un large excès d'ARN viral 70 S du mutant de délétion td PrC (cDNA/ARN : 1/3 ; Crt = 50 MxSxL⁻¹, en 1,2 M NaCl et a 60°C). Un fractionnement sur HAP permet de séparer de cDNA

non hybridé (simple brin) du cDNA hybridé (double brin)

a) Chromatographie sur hydroxyapatite (HAP)

Les hybrides sont chromatographiés sur hydroxyapatite selon la méthode adaptée de Fanshier et al (1971) (93). La colonne est préparée dans une pipette plastique de 5 ml bouchée à son extrémité inférieure par du coton de verre.

L'hydroxyapatite (1 g, Biorad HTP) en suspension dans du tampon phosphate de sodium (0,01 M, pH 7 et 1,5 M NaCl) est coulée dans une colonne maintenue à 50°C dans un bain-marie. Les hybrides sont adsorbés sur l'HAP dans le tampon phosphate (0,01 M + 1,5 M NaCl). L'élution du simple brin est effectuée par un gradient de phosphate de sodium (0,1 M à 0,2 M + 1,5 M NaCl à 50°C). Les fractions (1,5 ml) sont collectées sur un collecteur Isco. La mise en évidence de l'élution se fait par précipitation d'1 μ l de chaque fraction par 1 ml d'acide perchlorique en présence d'ADN entraîneur de tymus de veau (100 μ g par ml). La colonne est ensuite rincée par 10 ml de tampon phosphate 0,14 M sans NaCl, à 60°C afin de décrocher les hybrides instables, et les hybrides stables sont alors élués par un tampon phosphate 0,4 M sans NaCl et à 60°C. L'utilisation du NaCl 1,5 M et d'une température de 50°C pour éluer le cDNA simple brin sont destinées à stabiliser au maximum les hybrides et éviter ainsi une contamination du cDNA simple brin par du cDNA viral non spécifique.

b) Précipitation du cDNA par le cétyltriméthyl ammonium bromure (CTAB)

Ce type de précipitation est destiné à séparer les acides nucléiques des ions phosphates qui coprécipitent à l'éthanol (94). Le cDNA est spécifiquement précipité par le C-TAB (0,005 M, 10 min à 0°C) en présence de 100 μ g/ml d'ARN de levure entraîneur. La suspension obtenue est centrifugée (10 min 10.000 g à + 4°C), et le cDNA encore en suspension dans le surnageant est reprécipité dans le tube, dans les mêmes conditions.

Après sédimentation du nouveau précipitat, le culot est repris dans du NaCl (1M), ajusté à 0,3 M NaOH (12 h à 37°C) afin de dissocier les hybrides, et d'éliminer des traces éventuelles de ribonucléases. Le cdNA est précipité après neutralisation par l'HCl 3N et adjonction d'ARN de levure entraîneur, par 2 vol. d'EtOH 12 h à - 20°C.

c) traitement par la nucléase S1 d'aspergillus oryzae

Le cdNA simple brin, qui dans ce cas représente le gène SRC du virus nd PrC, est contaminé par du cdNA non viral (du à la non spécificité de la réaction exogène à l'AMV polymérase) ; afin de le repurifier, il est hybridé (0,6 M NaCl 68°C) avec un ARN 70 S nd PrC (cdNA/ARN : 1/2 ; Crt = 2 MxSxL⁻¹). On hybride ainsi uniquement les séquences qui ne sont pas répétées plus de deux fois. Le cdNA répétitif et non viral reste simple brin. Ce mélange est alors soumis à l'action de 10 µl de nucléase S1 d'aspergillus oryzae dans 5 ml de tampon (NaCl 0,3 M ; ZnCl₂ 0,003 M ; AcONa 0,03 M pH 4,5 ; ADN de thymus de veau 4 S simple brin, 10 µg/ml, 15 min. à 50°C). La réaction est arrêtée par de l'EDTA (0,01 M). Le mélange est alors additionné de 100 µg/ml de protéinase K, SDS (1 %) et digéré pendant 1 h à 37 °C. Le cdNA sous forme d'hybrides est extrait par un volume de phénol STE, et la phase aqueuse est ajustée en 0,3 M NaOH (12 h à 37°C) afin de dénaturer les hybrides. Après neutralisation et précipitation, le cdNA repris à la concentration désirée est prêt à l'emploi. Il est très important de ne pas dénaturer les hybrides en cours d'opération, sous peine de perdre très rapidement (moins de 5 min) la totalité du cdNA (95).

Le même type de sélection est ensuite entrepris après hybridation du cdNA débarassé de sarc avec l'ARN 70 S du virus rd Bryan, un mutant de délétion dans le gène ENV. Dans ce cas, le cdNA simple brin sera complémentaire du gène ENV, et on effectuera les mêmes sélections que pour le cdNASarc.

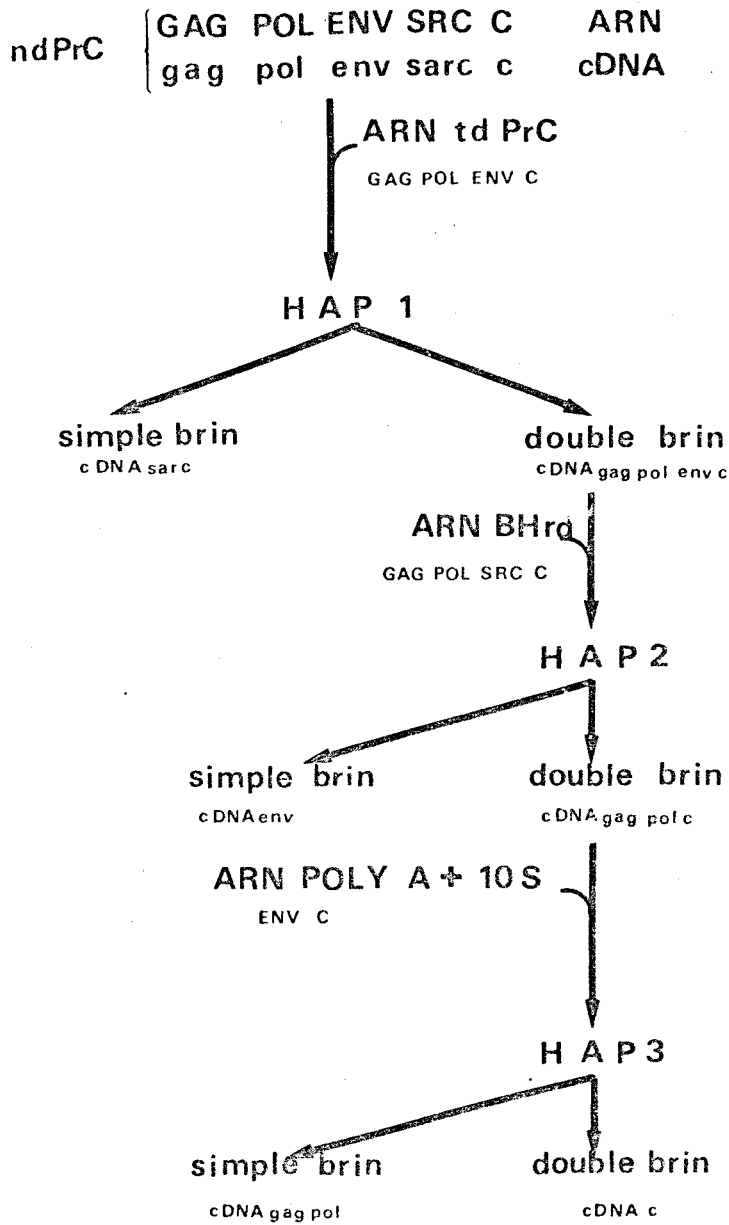


Figure A : Préparation des cDNA spécifiques des gènes d'un ASV.



Le cDNA correspondant au segment viral C est éliminé après hybridation du cDNA_{gag-pol-C} avec un ARN poly A + de 10-12 S, donc correspondant à la région C. Le cDNA simple brin correspond là, au cDNA_{gag-pol} (fig A).

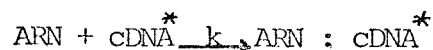
H) L'Hybridation Moléculaire En Phase Liquide

I - Définition

La réaction d'hybridation moléculaire consiste en un appariement par liaisons hydrogène de séquences nucléotidiques complémentaires. Il peut ainsi exister des hybrides ADN-ADN, ADN-ARN et ARN-ARN. Il est nécessaire cependant, de distinguer la réaction de réassociation, qui correspond à l'hybridation de deux brins d'ADN dissociés, (cinétique bimoléculaire du 2ème ordre) de la réaction d'hybridation de deux séquences présentant des analogies, mais d'origine différente, et dans laquelle l'une d'elles est en large excès par rapport à l'autre (cinétique de pseudo premier ordre).

II - Formulation de la réaction d'hybridation

Il est possible de suivre le pourcentage d'hybrides formés au cours du temps dans la réaction d'hybridation ou dans la réaction de réassociation. En effet, dans le cas d'une hybridation en excès de l'une des séquences (l'ARN) :



- . k (en litres par moles x secondes) représente la constante d'association.
- . c est la concentration en cDNA* simple brin (moles) à un moment t de la réaction.
- . c₀ est la concentration en cDNA* simple brin (moles) au temps t = t₀
- . Cr_t est la concentration en ARN (moles) à un temps t de la réaction
- . Cr est la concentration en ARN au temps t = t₀.

La quantité de cDNA ayant disparu dans un intervalle de temps dt est donnée par :

$$-\frac{dc}{dt} = k Cr c$$

Or, l'ARN étant en grand excès dans le milieu sa concentration ne change pas de façon appréciable au cours de la réaction. Aussi,

$$-\frac{dc}{dt} = kCr c \text{ et } \frac{dc}{c} = kCr dt$$

l'intégration de cette expression de $t = 0$ à $c = c_0$ nous donne :

$$\int_{c_0}^c \frac{dc}{c} = kCr \int_0^t dt \quad \text{Ln } \frac{c}{c_0} = -kCr t$$

donc, $\boxed{\frac{c}{c_0} = e^{-kCr t}}$ et $\frac{c}{c_0}$ représente la quantité d'hybrides cDNA-ARN formés à un moment t quelconque.

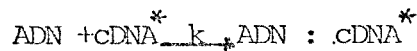
De cette expression on peut déduire que au temps de demi-réaction,

$$\frac{c}{c_0} = \frac{1}{2}, \text{ Ln } 2 = kCr t_{1/2}$$

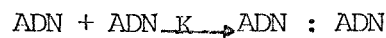
donc,

$$\boxed{Cr t_{1/2} = \frac{\text{Ln } 2}{k}}$$

Il est possible d'effectuer le même calcul, pour une réaction,



mais il existe également la réaction,



qui est concomitante de la réaction d'hybridation proprement dite.

. c est la concentration en cDNA* simple brin à un moment t de la réaction

. c_0 la concentration en cDNA* au temps $t = t_0$

. C la concentration en ADN simple brin au temps t

. C_0 la concentration en ADN au temps $t = t_0$

Les séquences ADN complémentaires du cDNA sont en très large excès par rapport à celui-ci, (condition nécessaire mais difficile à obtenir dans la pratique !) pour pouvoir affirmer que l'hybridation

proprement dite ne change pas la concentration en ADN. Aussi,

$$\frac{c}{c_0} = e^{-kCot} \quad \text{et} \quad Cot_{1/2} = \frac{\text{Ln}2}{k}$$

La réassociation des brins d'ADN s'exprime par :

$$\frac{dc}{dt} = K C^2 \quad (\text{réaction bimoléculaire d'ordre 2})$$

$$\frac{dc}{c^2} = K dt \quad \text{et en intégrant de } t = 0 \text{ à } C = C_0$$

$$\int_{c_0}^c \frac{dc}{c^2} = K \int_0^t dt \Rightarrow \frac{1}{c} - \frac{1}{C_0} = K t$$

donc, $\boxed{\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + K Cot}}$ au temps de demi-réaction

$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{2}$ $\boxed{Cot \ 1/2 = \frac{1}{K}}$

Cette réaction de réassociation concomitante de la réaction d'hybridation peut interférer et limiter cette dernière si elle est plus rapide qu'elle. Dans ce cas, la disparition du brin d'ADN pouvant hybrider avec le cDNA sera trop rapide, et le plateau atteint par la réaction d'hybridation sera artificiellement bas. Ceci peut se rencontrer lors d'hybridations de cDNA avec des séquences d'ADN très divergentes, très mutées. La réassociation l'emporte sur l'hybridation.

Il est possible de représenter graphiquement les cinétiques d'hybridation (fig B) (96).

Ainsi, deux constatations se dégagent de ces formules :

1°) c'est l'acide nucléique en excès qui permet de quantifier la réaction.

2°) le point de demi-réaction est une constante ne dépendant que des conditions réactionnelles choisies.

III - Conditions de la réaction d'hybridation

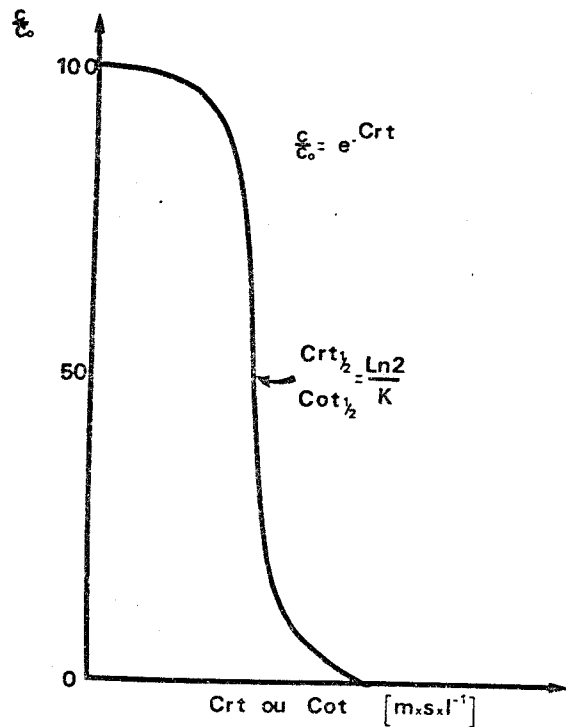


Figure B :
Cinétique de disparition du cDNA de pseudopremier ordre, en fonction du Cot ou du Crt

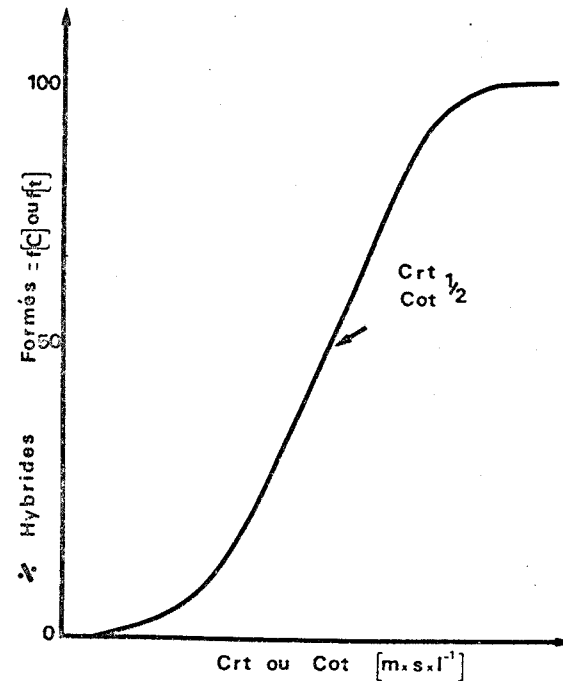


Figure C :
Expression du Crt ou du Cot en fonction du pourcentage d'hybrides formés au cours du temps pour une concentration fixée en acide nucléique. (la même courbe serait obtenue si le temps était fixé et la concentration en acide nucléique variable).



La formation des hybrides entre un cDNA et un acide nucléique quelconque dépend de nombreux facteurs (71) dont les plus importants sont :

- la température d'hybridation
- la force ionique du tampon d'hybridation
- la taille des acides nucléiques dans le milieu réactionnel.

- la température d'hybridation optimale doit favoriser au maximum la rencontre des fragments d'acides nucléiques, sans nuire à la stabilité des hybrides en formation. La température la plus efficace se situe 20° au dessous de la température de fusion des hybrides (90°).

- la force ionique joue sur la vitesse de la réaction d'hybridation et sur la spécificité des hybrides formés. Dans un milieu d'hybridation inférieur à 0,3 M en NaCl, la réaction est trop lente, et supérieure à 1,5 M elle n'est plus spécifique. Une concentration en 0,6 M NaCl fournit une vitesse d'hybridation satisfaisante et une spécificité stricte.

- la taille des acides nucléiques impliqués dans la réaction permet d'influer, sur la viscosité du milieu, la concentration des fragments de nucléotides, la vitesse d'hybridation et la stabilité des hybrides (97). La taille la plus favorable à la réaction correspond à une constante de sédimentation en gradient de saccharose de 4 S.

Une fois ces différents facteurs fixés, l'expression du Cot ou du Crt devient (fig C) :

$$\begin{array}{l} \text{Cot} \qquad \qquad \qquad \text{ADN} \\ \text{ou} = \frac{1}{8} \times \text{concentration en ou} \times \frac{t}{2} \\ \text{Crt} \qquad \qquad \qquad \text{ARN} \end{array}$$

- Cot (ADN), Crt (ARN), moles x sec x litre⁻¹
- acide nucléique en excès dans le milieu en µl/ml
- t en heures.

La formule de Crt peut également dans certains cas être utilisée

pour calculer la concentration en ARN viral d'un milieu de culture (donc, quantifier la production de virus). La mesure directe de la concentration en ARN étant impossible, il est nécessaire de modifier la formule du Crt en utilisant au lieu de la concentration (recherchée) en ARN viral, un facteur de concentration (F.C) correspondant au nombre de ml de milieu de culture dont on a extrait l'ARN viral intervenant dans la réaction. Si on remet en suspension l'ARN viral de 100 ml de milieu de culture dans 1 ml de milieu réactionnel, le facteur de concentration est FC = 100

Le vot est ainsi défini par :

$$\text{Vot} = \frac{1}{8} \times \text{FC} \times \frac{t}{2}$$

et le rapport du Crt et du vot permet de relier le facteur de concentration du milieu à la concentration en ARN

$$\frac{\text{Crt}}{\text{Vot}} = \frac{\text{concentration en ARN}}{\text{facteur de concentration}} = K \quad \text{et} \quad \frac{\text{concentration}}{\text{en ARN } \mu\text{g/ml}} = \text{FC} \times K$$

Dans le milieu de culture, le facteur de concentration FC = 1;

donc la concentration = K
en ARN $\mu\text{g/ml}$; pour avoir la concentration en ARN viral par litre de milieu,

$$\text{ARN} = 1000 \times K$$

$$\mu\text{g/Litre}$$

quelques ng de produit suffisent pour détecter une production de virus en conditions strictes d'hybridation.

Les hybridations sont réalisées en conditions strictes ou relâchées selon le problème abordé.

a) conditions strictes

2000 cpm de cdNA (et/ou) ^3H , ^{32}P , sont hybridés à 68°C en 0,6 M NaCl avec de l'ADN 4-6 S (dénaturé 10 min à 100°C) ou avec de l'ARN, dans des volumes variant de 3 μl (ARN viraux) à 200 μl (ADN) en fonction de la concentration désirée en acides nucléiques. Pour l'ADN, la concentration (10 mg/ml) est maintenue fixe pour chaque échantillon (afin d'être toujours en excès d'ADN par rapport aux séquences cdNA complémentaires)

et le temps d'incubation varie de 5 min. à 48 heures

Pour l'ARN, la concentration varie dans chaque échantillon d'un facteur 1:2 ou 1:4, selon les besoins. Dans ce cas, le temps est fixé entre 12 et 48 h en fonction du Crt maximum désiré. L'absence du phénomène de réassociation permet d'être toujours en excès de séquences d'ARN quelle que soit la dilution.

b) analyse des hybrides

Le pourcentage d'hybrides obtenu est défini comme étant la quantité de cDNA résistant à l'action de la nucléase S1 (98) rapportée à la quantité initiale de cDNA. Cette détermination se fait pratiquement de la façon suivante : le mélange d'hybridation est dissout dans 4 ml de tampon (AcONa pH : 4,5, 0,03 M, NaCl : 0,3 M, ZnCl₂ : 0.003 M, ADN de thymus de veau 4 S dénaturé 10 µg/ml) et répartis à raison de 1,9 ml dans deux tubes notés + et -S1. Le tube + S1 reçoit 2 µl d'enzyme S1 préparée selon la méthode de Sutton (99); chaque tube est précipité à froid par 1 ml d'acide perchlorique, filtré sur filtres G F/C wattman, rincé abondamment et séché 10 min à 60°C. Le filtre est ensuite compté en scintillation liquide, toluène ppo-popop, dans un compteur intertechnique SL 4000.

c) conditions relâchées :

La réalisation des hybrides se fait dans des conditions de force ionique plus élevées (1,2 M NaCl, 68°) afin de faciliter l'appariement de séquences mutées l'une par rapport à l'autre. L'analyse des hybrides se fait également en conditions "douces" pour stabiliser au maximum ces hybrides instables. Le mélange d'hybridation dissout dans du tampon phosphate (0,01 M, 1,5 M NaCl) est chargé à 50°C sur une colonne contenant 1 ml d'hydroxyapatite tassée ; l'élution du cDNA simple brin se fait à 50°C à l'aide d'un tampon phosphate (0,14 M, 1,5 M NaCl); L'élution du cDNA hybridé à lieu avec un tampon 0,4 M phosphate à 60°C. Le pourcentage d'hybridation se déduit ensuite facilement après précipitation et comptage des deux fractions de cDNA.

I) Mesure De La Température De Fusion Des Hybrides

La température de fusion des hybrides ADN-cDNA_{aev} et ADN-cDNA_{rep} est menée par la méthode à la nucléase S1.

2 mg d'ADN d'embryons de poulet ou d'érythroblastes 6C₂ sont dénaturés 10 min à 100°C et hybridés dans 200 µl de volume réactionnel avec 20.000 cpm de cDNA_{aev} ³H. Deux lots d'ADN d'embryons de poulet sont d'autre part dans les mêmes conditions, (68°C, 0,6 M NaCl, 48 h) hybridés avec 20.000 cpm de cDNA_{rep} ³²P.

L'hybridation terminée, les 2 mg d'ADN ayant hybridé avec le cDNA_{aev} ³H sont mélangés avec 2 mg d'ADN ayant hybridé avec le cDNA ³²P rep et ramenés à une concentration de 0,3 M NaCl par dilution dans 400 µl de tampon Tris Hcl (0,05 M), EDTA (0,002 M). 10 capillaires de 100 µl contenant 80 µl de ce mélange sont scellés, et chaque capillaire incubé 10 min à la température désirée. Leur contenu est ensuite repris dans 6 ml de tampon d'action de l'enzyme S1, répartis en deux tubes notés + et -S1, et le tube + S1 est additionné de 8 µl d'enzyme S1. L'analyse des hybrides se fait comme précédemment. L'ADN d'embryons de poulet qui a hybridé avec le cDNA ³²P est utilisé dans chaque expérience pour constituer un témoin interne contrôlant la dissociation. La courbe de dénaturation des hybrides cDNA rep ³²P-ADN RAVO permet de confirmer la reproductibilité de la fusion des hybrides.

J) Mesure De L'Activité Réverse Transcriptase Endogène

La détection d'une activité ADN-polymérase-APN-dépendante se fait sur les particules virales purifiées sur gradient de tartrate, l'expression de la polymérase étant permise par la lyse du virus à l'aide de Nonidep 40 (NP 40).

Ce détergent étant un inhibiteur très puissant de l'expression de la polymérase il est nécessaire d'en déterminer la concentration optimale en utilisant une gamme de dilution de NP40. La concentration utilisable varie selon les virus et selon la façon dont ils ont été préparés.

Le tampon d'action de la polymérase est le suivant : $MgCl_2$ (0,005 M) ; mercaptoéthanol (0,6 %) ; d'ATP, dCTP, dGTP froids, (3×10^{-5} M) ; Tris pH 8,1 (0,1 M), dTTP (3H) à 50 Ci/m moles (4×10^{-6} M)

Chaque échantillon contient 30 μl de ce mélange, 10 μl d'une solution de NP40 (dans du Tris pH 8,1 : 0,01 M) à une concentration finale variant selon les points de 0,05 à 0,4 % , et 10 μl d'une solution à 17 $\mu g/ml$ de protéines virales pour le virus nd Sr E et à 53 $\mu g/ml$ de protéines virales pour le virus OK10. Après 2 h d'incubation à 38°C, les tubes sont additionnés de 0,5 ml d'acide perchlorique, filtrés sur filtre G F/C wattman et comptés en scintillation liquide sur un compteur SL 4000.

RESULTATS 1ÈRE PARTIE

HOMOLOGIE ALV/DLV

.....
—————

1) Obtention de cellules non productrices de MH2

Toutes les études biologiques et biochimiques menées sur les DLV permettent de penser qu'ils sont apparentés à leur "helpers" ALV. Afin de préciser cette parentée (qui ne semble porter que sur le gène GAG) nous avons quantifié pour chacun des gènes d'ALV, l'homologie existant avec le génome de chaque DLV connu.

Cette homologie est détectée par hybridation moléculaire entre des cDNAs spécifiques de chaque gène d'ALV et l'ARN intra cellulaire total de cellules non productrices de DLV. Ceux-ci étant défectifs pour la réplication, l'ARN des cellules non productrices transformées par le DLV seul est l'unique moyen d'accéder au génome défectif. Les cellules non productrices d'AEV sont des fibroblastes de poulet, d'AMV et E26 des myéloblastes de poulet, et les cellules non productrices de MC29, CM2 et OK10 sont des fibroblastes de caille. Toutes ces cellules qui n'existent que depuis peu nous ont été fournies, et nous n'avons réalisé des cellules non productrices que pour le virus MH2. Nous avons utilisé des fibroblastes de caille, car ces cellules peuvent être conservées plus longtemps que celles de poulet, et on évite aussi la présence de virus endogène de type ALV .

Après infection des fibroblastes de caille par le virus MH2 accompagné de son "helper" RAV 3 nous avons obtenu 7 clones de cellules transformées se développant sous la couche d'agar. Afin de déterminer quels étaient les clones non producteurs, c'est à dire ceux dont la cellule initiale n'avait reçu qu'un pseudotype de MH2, nous les avons mis en culture sur boîte de Pétri. Malheureusement, un seul clone s'est développé de façon satisfaisante et à pu être conservé. Le milieu de culture de ces cellules s'est révélé exempt de virions détectables par hybridation moléculaire et l'ARN intra cellulaire total hybride partiellement avec un cDNA représentant le génome des ALV ou des parties de celui-ci. (fig 1 b).

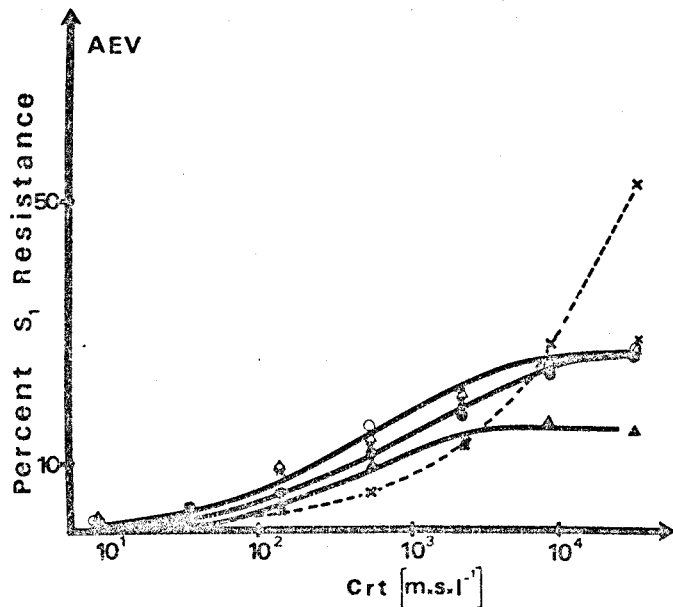


Figure 1 a : Cellules non productrices d'AEV : NP75 fibroblastes de poulet chf^- . Les hybridations sont réalisées dans 25 μ l pendant 38 h avec 0,368 mg d'ARN au point A. x---x cDNAsarc, x—x cDNAtd rep ; Δ — Δ cDNAenv, Δ — Δ cDNAtd rep ; \circ — \circ cDNAgag pol C, 0—0 cDNAtd rep.

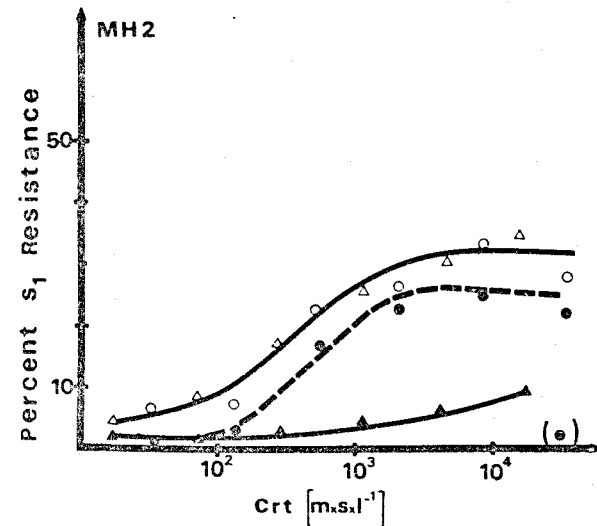


Figure 1 b : Cellules non productrices de MH₂ : QB 2 fibroblastes de caille. Les hybridations sont réalisées dans 7 μ l pendant 45 h avec 0,076 mg au point A. \circ --- \circ cDNA gag pol, \circ — \circ cDNAtd rep ; Δ — Δ cDNAenv, Δ — Δ cDNAtd rep.

Figure 1 : Cinétique d'hybridation de l'ARN des cellules non productrices des DLV avec différents cDNAs: l'ARN total des cellules non productrices est hybridé en 0,6M NaCl à 68°C avec 2000 cpm (0,03 ng) de cDNA³H (gag pol C, gag pol, env, sarc) et 2000 cpm (0,005 ng) de cDNAtd rep pour chaque point. L'ARN est dilué de 1 : 4 de façon à réaliser une cinétique, le temps d'hybridation reste constant. Le pourcentage d'hybrides est le pourcentage de résistance à l'action de la nucléase S1 d'Aspergillus oryzae. Le pourcentage de résistance intrinsèque à la S1 de chaque sonde est mesuré sur un échantillon hybridé sans ARN (1 à 3 % selon les cDNA). Toutes les cinétiques sont normalisées pour l'hybridation maximale des cDNAs avec un ARN viral ; cDNA ³H et ³²P : x 1, 176.



Ces cellules contiennent donc une information virale partielle exprimée au niveau de l'ARN cellulaire mais non encapsidée.

La production de virus est possible après surinfection des cellules par un ALV, RAV2 , et le virus recueilli transforme des fibroblastes sains avec les mêmes altérations morphologiques que le virus MH2 (RAV3) utilisé au départ.

2) Hybridation de l'ARN total des cellules non productrices avec les différents cDNA

Les résultats obtenus avec les différents cDNA en notre possession (cDNAtd rep, cDNAgag-pol, cDNAenv, cDNAsarc) et l'ARN total des cellules non productrices de chaque DLV sont représentés dans les figures 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f et 1g.

Dans les conditions réactionnelles choisies, (voir matériel et méthode) la cinétique d'hybridation est définie par la formule : $Crt (MxSxL^{-1}) = \frac{1}{8} \times \text{concentration } (\mu\text{g/ml d'ARN}) \times \frac{t}{2} \text{ (heures)}$. Le temps d'hybridation étant fixé, le Crt ne dépend plus que de la concentration en ARN dans le milieu, et à chacune des valeurs du Crt correspond un pourcentage d'hybride. Ce type de courbe permet d'obtenir deux résultats différents :

1°) le Crt obtenu pour 50 % d'hybridation (Crt 1/2) permet de calculer le nombre de copies d'ARN viral dans l'ARN cellulaire, ce qui renseigne sur le taux d'expression du génome viral. En effet, le nombre

de copie
$$N = \frac{\text{Crt 1/2 viral}}{\text{Crt 1/2 mesuré}} \times \frac{10^{-5}}{5 \cdot 10^{-12}}$$

$10^{-5} \mu\text{g}$: poids de l'ARN contenu dans 1 cellule

$5 \cdot 10^{-12} \mu\text{g}$: poids d'1 copie d'ARN viral.

Le rapport entre le Crt 1/2 viral (environ $210^{-2} MxSxL^{-1}$) et le Crt 1/2 mesuré quantifie le taux de dilution de l'ARN viral par l'ARN cellulaire. Dans ces conditions, un Crt 1/2 expérimental de $4 \cdot 10^4 MxSxL^{-1}$ correspond à 1 copie d'ARN viral par cellule. Cependant, l'incertitude

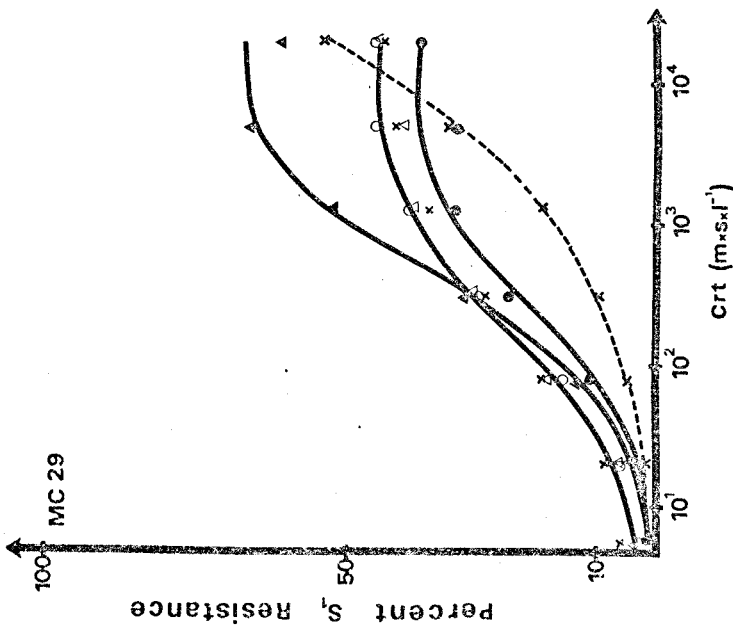


Figure 1 c : Cellules non productrices de MC29 : Q8 fibroblastes de caille. Les hybridations sont réalisées dans 20 μ l pendant 41 h avec 0,117 mg d'AFN au point A. x---x cDNAsarc, x---x cDNAtd rep ; Δ --- Δ cDNAenv, Δ --- Δ cDNAtd rep ; \bullet --- \bullet cDNAgag pol c ; \circ --- \circ cDNAtd rep.

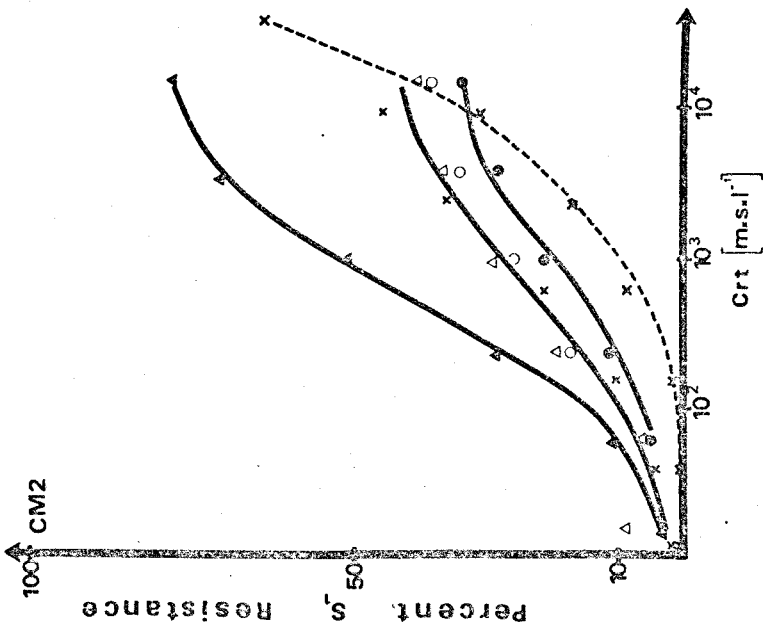


Figure 1 d : Cellules non productrices de CM2 : Q A 6. Fibroblastes de caille. Les hybridations sont réalisées dans 22 μ l pendant 52 h avec 0,384 mg d'AFN au point A. x---x cDNAsarc, x---x cDNAtd rep ; Δ --- Δ cDNAenv, cDNAtd rep ; \circ --- \circ cDNA gag pol c ; \bullet --- \bullet cDNAtd rep, \circ --- \circ .

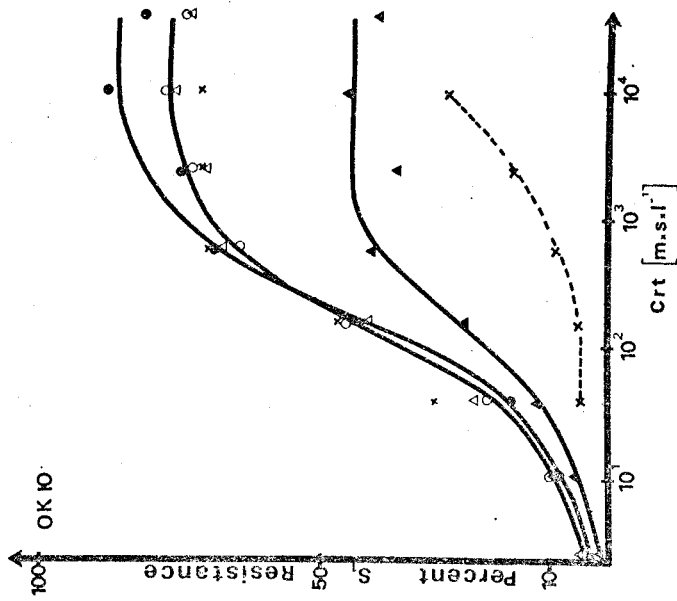


Figure 1 e : Cellules non productrices d'OK10 : Q B 5, fibroblastes de caille. Les hybridations sont réalisées dans 22 μ l pendant 42 h avec 0,3 mg d'AFN au point A. x---x cDNAsarc, x---x cDNAtd rep ; Δ --- Δ cDNAenv, Δ --- Δ cDNAtd rep ; \bullet --- \bullet cDNA gag pol c ; \circ --- \circ cDNAtd rep.

SHS
LILLE

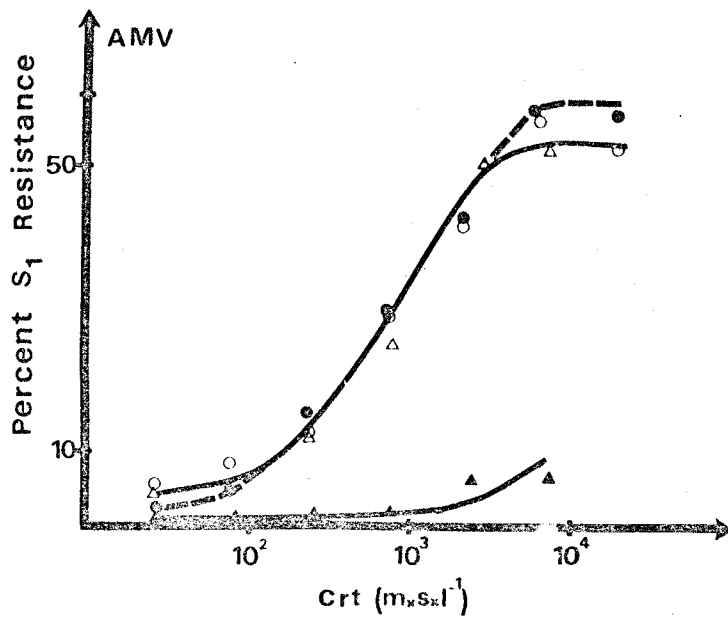


Figure 1 f : Cellules non productrices d'AMV : mélange de clones de myéloblastes de poulets. Les hybridations sont réalisées dans 7 μ l pendant 45 h avec 0,114 mg d'ARN au point A. ●-●-● cDNAgag pol, ○-○ cDNAtd rep ; ▲-▲ cDNAenv, △-△ cDNAtd rep.

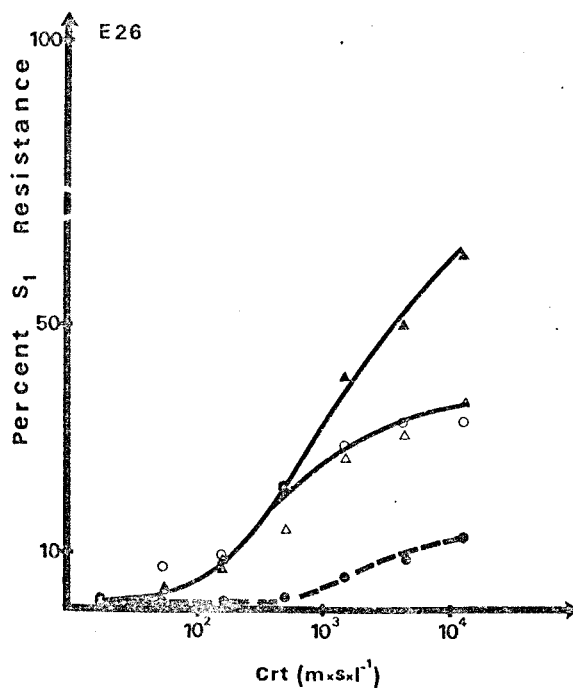


Figure 1 g : Cellules non productrices de E 26 : myéloblastes de caille. Les hybridations sont réalisées dans 7, μ l pendant 45 h avec 0,101 mg d'ARN au point A. ●-●-● cDNAgag pol, ○-○ cDNAtd rep ; ▲-▲ cDNAenv, △-△ cDNAtd rep.

existant sur la détermination de la masse de l'ARN intra-cellulaire (qui varie avec l'état physiologique de la cellule) fait que ce nombre n'est pas très rigoureux, et n'a qu'une valeur indicative.

2°) le plateau de la cinétique d'hybridation représente le pourcentage de cDNA que l'ARN viral protège de la digestion par la nucléase Si, c'est à dire l'homologie existant entre l'ARN et le cDNA . La valeur obtenue dans ces conditions révèle une homologie stricte, et tient compte des mutations pouvant exister entre les deux séquences (77). Une hybridation réalisée dans des conditions de salinité plus élevée et une analyse des hybrides faite par chromatographie des échantillons sur hydroxyapatite, permet de visualiser l'appariement des séquences qui ont partiellement divergé. Le tableau N° I résume les différents résultats obtenus.

3) Discussion des résultats

Tous les virus défectifs des leucémies aiguës étudiés sont apparentés aux ALV, de 2300 à 6300 nucléotides, le génome de ces derniers en contient 8200. Les DLV possèdent une information partielle de tous les gènes ce qui rend probablement compte de leur incapacité à se répliquer seuls, et confirme les observations biologiques rapportées par différents auteurs (4, 5, 6, 8, 10).

Dans cette optique cependant, le cas du virus OK10 apparaît comme très particulier. L'homologie stricte de 87 % détectée dans la région GAG-POL-C (5050 nucléotides sur les 5800 qui constituent ces gènes (45) permet de penser que l'ARN du virus OK10 est peut être encapsidé, le gène GAG (2300 nucléotides) pouvant être présent et fonctionnel. Dans ce cas, des particules physiques peuvent se former, et les cellules " non productrices" doivent émettre des nucléocapsides.

La recherche d'ARN viral dans le surnageant de culture de ces cellules par hybridation moléculaire s'est révélée positive, et la production

cellules	virus	origine	crt 1/2 viral	nbr. copies	% hybridation		cDNA (± 5%)	
					td rep	gag.pol.c	gag.pol	env
Fibroblastes NP 75 *	AEV	^B ROYER-POKORA	240	84	28 34 *	27	15	16 34 *
Fibroblastes QB 2 ●	MH2	^S SAULE	325	62	32 40 *		25	10 27 *
Fibroblastes Q 8 ●	MC29	^K BISTER	150	133	45 38 *	38	30	66 55 *
Fibroblastes QA 6 ●	CM2	^T GRAF	400	50	41	33	24	79
Fibroblastes QB5 ●	OK10	^H BEUG	140	143	77 90 *	87		45 66 *
Myeloblastes *	AMV	^T GRAF	550	36	50		59	3
Myeloblastes NP2 *	E 26	^T GRAF	500	40	36		13	60
	AEV + MC29				45			60
	AEV + E 26				37			59

● Caille ● Hybridations en conditions douces
* Poulet

Tableau I : Homologie ALV-DLV.

Les pourcentages d'hybridations reportés dans ce tableau sont relevés à un Crt de 210^4 MxSxL^{-1} . Les hybridations sont faites en conditions strictes (0,6 M NaCl, 68°, analyse des hybrides par la nucléase S1) ou en conditions douces (1,2 M NaCl, 68°C, analyse des hybrides en HAP à 50°C stabilisée en 1,5 M NaCl). L'ARN d'AMV provient d'un mélange de clones non producteurs.



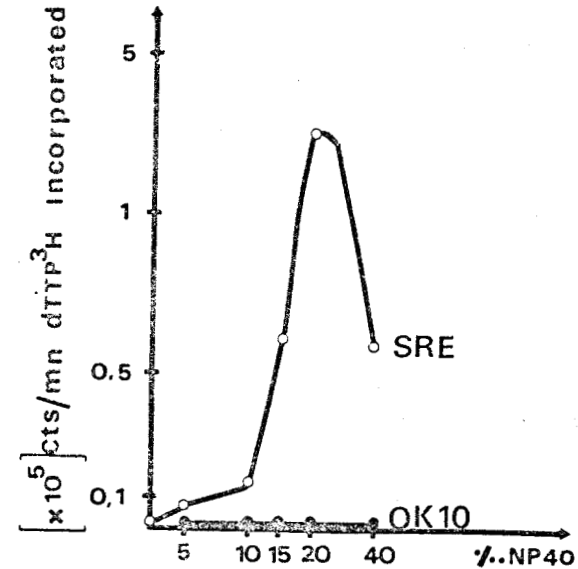
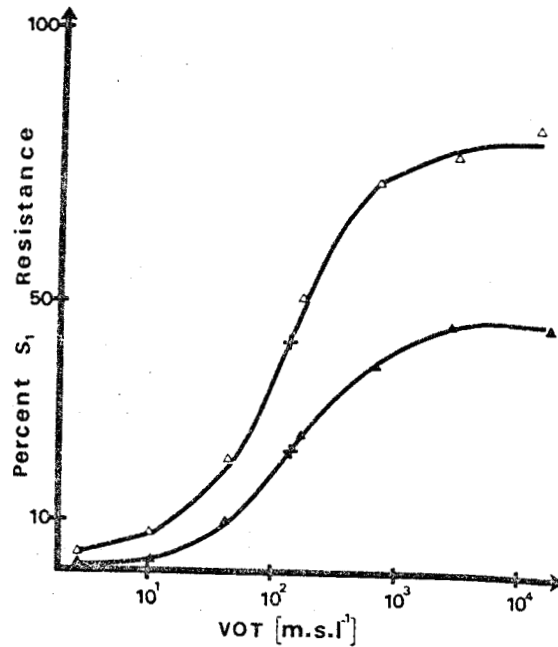


Figure 2 : le Virus OK 10

Figure 2 a : L'ARN viral d'1 litre de surnageant de cellules non productrices QB5 est repris dans 100 μ l de tampon d'hybridation (F.C = 10⁴). La cinétique d'hybridation (Vot) est faite à l'aide de dilutions (1:4) de cette solution, le point A n'étant pas dilué. Les hybridations sont réalisées dans 7, μ l en condition strictes (0,6 M NaCl, 68°C) pendant 23 h, avec 2000 cpm (0,03 ng) de cDNAenv (▲-▲) et 2000 cpm (0,05 ng) de cDNAtd rep (Δ-Δ).

Figure 2 b : Activité reverse transcriptase. Les virions d'un litre de surnageant de cellules Q B 5 sont purifiés sur gradient de tartrate de potassium et repris dans 300 μ l de STE/glycérol (50-50). 10 μ l de cette solution (0,053 μ g de protéines virales) sont incubés avec 30 μ l de mélange réactionnel contenant du dTTP ³H ainsi que des quantités variables pour chaque point de NP40. La radioactivité incorporée est mesurée après 2 h d'incubation à 37°C. ●-● OK 10; ○-○ SRE (0,017 μ g de protéines virales par point).

virale est d'environ $1,4 \cdot 10^9$ particules par litre (fig 2a). Le fait que les deux cdnas utilisés (cdNarep³²P et cdNAenv³H) possèdent les mêmes valeurs de $V_{0.1/2}$ et le plateau caractéristique de l'ARN intracellulaire des cellules non productrices, exclut la possibilité d'une surinfection de ces dernières par un ALV exogène lors du recueil du milieu. La recherche d'une activité ARN polymérase ADN dépendante associée à ces mêmes particules virales purifiées sur gradient de tartrate de potassium s'est révélée négative dans les conditions d'action de l'ARN-polymérase-ADN-dépendante des virus aviaires (fig 2 b).

L'analyse des résultats obtenus avec les sondes gag-pol et gag-pol -c et l'ARN total des différentes cellules non productrices permet de penser que tous les DLV, sauf OK10 et AMV, sont dépourvus des séquences POL. En effet, dans toutes ces cellules, un polypeptide de haut poids moléculaire contenant la P19 et la P27, (ou la P19 seule) à côté d'une séquence inconnue a été décrit (Hayman, M., communication personnelle, 6, 8, 31). Or, les pourcentages d'hybridation obtenus ne confirment ces résultats que si on suppose que toute l'hybridation observée n'est due qu'au seul gène GAG. Dans ce cas, de 650 à 1500 nucléotides de ce gène sont présents (AEV : 750 nucl \approx P19 ; E26 : 650 nucl \approx P19 ; MC29 : 1500 nucl \approx P19, P27 ; CM2 : 1200 nucl \approx P19, P27 ; MH2 : 1250 nucl \approx P19, P27). En ce qui concerne le virus AMV, nos résultats nous permettent de supposer la présence de toute la séquence du gène GAG, mais nous n'avons pu tester le sumageant des cellules non productrices, pour y rechercher des particules virales. Mais même si tout le gène GAG est présent (2300 nucléotides) il faut envisager la présence de 600 nucléotides du gène POL pour rendre compte des 2900 nucléotides détectées par la réaction d'hybridation réalisée en conditions strictes.

Le cdNAenv hybride également avec tous les DLV à l'exception d'AMV. Ce dernier point est intéressant car il laisse supposer que la présence d'une portion

du gène ENV n'est pas indispensable pour l'existence de ces virus.

La présence des séquences "C" dans ces virus est suggérée par le fait que les pourcentages d'hybridation avec une sonde gag-pol-C (fig 1 a, c, d) sont plus élevés qu'avec une sonde gag-pol (tableau I). Le rôle exact de cette séquence est toujours inconnu, mais son maintien, même chez les DLV, semble lui assigner un rôle important, tout comme pour le gène GAG. Ces séquences pourraient être indispensables pour la réplication du virus lors de la circularisation de l'ADN viral, avant l'intégration de celui-ci dans le génome de la cellule hôte, car il a été montré (100), que les "bouts collants" du DNA viral constitués par 21 bases complémentaires sont situés à l'extrémité 5' (GAG) et 3' (C) du génome.

Afin de savoir si ce sont toujours les mêmes séquences apparentées aux ALV qui sont présentes dans différents DLV ou bien des séquences variables selon le type de virus, nous avons mélangé l'ARN de cellules non productrices d'AEV et MC29 ou d'AEV et E26. L'hybridation réalisée entre ces mélanges et le cDNA_{td} rep ne permet pas d'obtenir plus d'hybrides qu'avec les ARN non mélangés, ce qui implique que les séquences apparentées aux ALV, présentes dans AEV, le sont également dans MC29 et E26. Ceci soulève le problème de l'origine de ces virus et de la nature du processus qui leur a donné naissance. Il est permis de penser que ces virions proviennent tous d'un ALV ancestral, selon des processus semblables qui font que certains fragments de séquences sont toujours conservés (tableau I)

Le problème se pose également de savoir si les faibles homologies détectées entre les différents cDNA et le génome des DLV sont dues à de multiples mutations existant entre les sondes et l'ARN complémentaire, ou bien s'il existe des délétions de portions de séquences dans ces génomes. Nous avons recommencé les hybridations et l'analyse des hybrides en conditions permettant de forcer l'appariement de séquences ponctuellement

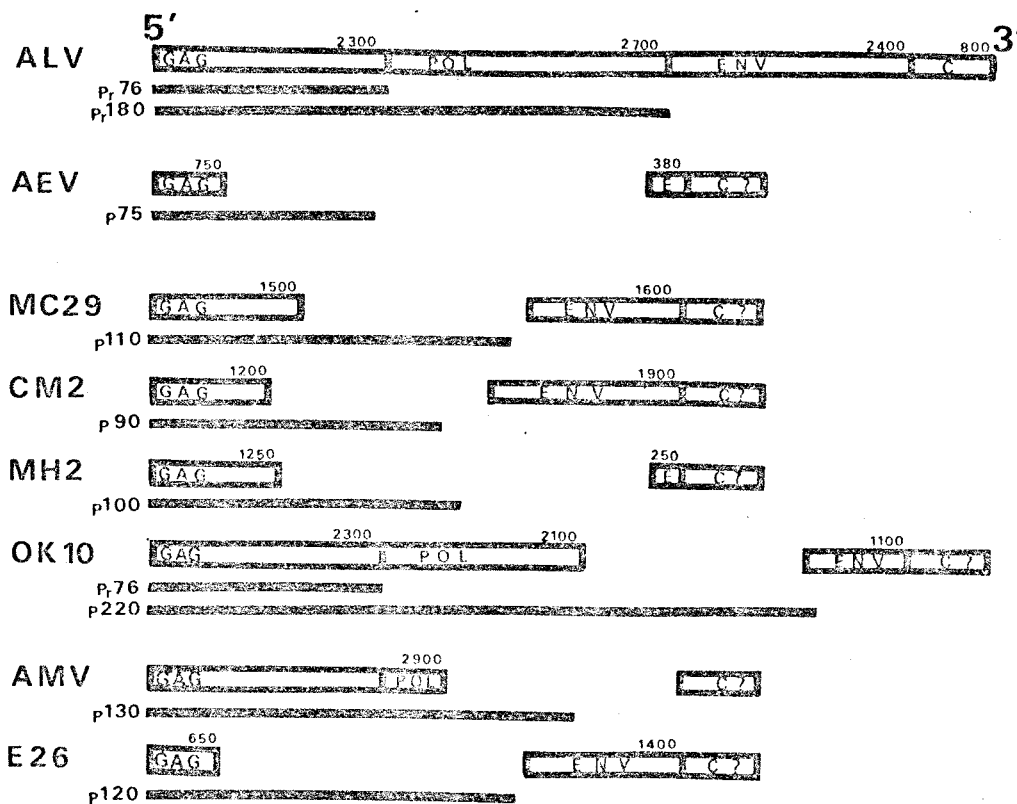


Figure 3 : Carte physique du génome des DLV.
Le pourcentage d'homologie avec les gènes d'ALV , déterminés en condition strictes sont reportés sur ce tableau.

mutées, conditions dites "relachées". Or, l'hybridation des ARN en haute force ionique, et l'analyse des hybrides par chromatographie sur hydroxyapatite n'augmente pas le pourcentage d'hybridation de façon très significative. (tableau I). Si le faible pourcentage d'homologie ALV-DLV observé en conditions strictes était dû à des mutations ponctuelles réparties le long du génome, le pourcentage d'hybridation observé en conditions relachées aurait dû croître considérablement. Il semble donc plutôt exister un phénomène de substitution-délétion au sein des DLV. La taille de leurs différents génomes, selon des résultats obtenus récemment, dans notre laboratoire, serait de 6000 nucléotides en moyenne (sauf pour OK10 qui ferait 8000 nucléotides). Compte tenu de l'homologie existant avec les ALV, chaque virus déficient des leucémies aigues doit posséder une séquence non apparentée à ceux-ci pour atteindre la taille observée.

Nous avons entrepris de synthétiser, sélectionner et étudier un cDNA complémentaire des séquences présentes dans l'ARN du virus de l'érythroblastose aviaire. Cette étude fait l'objet des deuxième et troisième parties.

Conclusion

Les DLV sont tous apparentés aux ALV ainsi que nous avons pu le mettre en évidence en étudiant l'ARN total des cellules non productrices .

L'homologie est variable en fonction des virus mais on peut essayer de dresser sommairement une carte génétique de ces virions (fig 3).

- la séquence spécifique de chacun des DLV doit être adjacente à la séquence conservée du gène GAG ainsi que le laisse supposer le polypeptide GAG-X toujours présent dans toutes ces cellules.

- Ni le gène POL, ni le gène ENV ne semblent requis pour l'existence de ces virions

- La séquences "C" par contre parait nécessaire, peut-être pour l'intégration du DNA viral dans le génome hôte.

- Dans tous les cas la séquence DLV spécifique semble suffire pour constituer 1, voire 2 gènes, et donc être impliquée dans le pouvoir transformant de ces virus (80).

RESULTATS 2ÈME PARTIE

SELECTION D'UN DNA COMPLEMENTAIRE DES SEQUENCES AEV SPECIFIQUE (cDNA^{AEV})

1) Préparation du cDNA_{AEV}

Les résultats obtenus par hybridation moléculaire sur l'homologie du virus de l'érythroblastose avec les ALV, ainsi que sur la taille de son génome nous ont conduit à rechercher la présence de séquences spécifiques à ce virus. Nous avons procédé pour cela de la façon suivante :

1°) Synthèse d'un cDNA représentant les génomes du virus AEV et de son "helper" ALV à partir d'ARN génomique d'AEV (RAV2) et d'AMV polymérase ;

2°) Elimination du cDNA de helper et du cDNA d'AEV apparenté aux ALV par hybridation moléculaire.

3°) Purification finale du cDNA_{AEV} spécifique à l'aide de la nucléase S1 d'*Aspergillus oryzae*.

La réaction de l'AMV polymérase effectuée en présence de dTTP (³H) (voir matériel et méthodes) nous a permis de synthétiser 32 µg de cDNA (³H) ayant une activité spécifique de 4810⁶ cpm/µg.

Une première sélection est effectuée pour ne conserver, après une sonnication du mélange, que les fragments de cDNA ayant une constante de sédimentation comprise entre 4 et 7 S (soit de 80~~0~~ à 120~~0~~ nucléotides), ceci afin de contrôler le facteur "taille des acides nucléiques" dans la réaction d'hybridation. Le cDNA ainsi traité représente 30 % du cDNA total de départ. Il est hybridé en conditions de haute salinité (1,2 M NaCl 60°C) avec 78 µg d'ARN 70 S de RAV2, soit 11 fois plus d'ARN que de cDNA, à un Crt 20 fois au plateau de la cinétique (Crt=25) et un Cot de 4 (ce qui permet d'hybrider les cDNA de polarités différentes s'il en existe ; ces cDNA pourraient provenir de la répllication d'un cDNA (-) par l'ARN polymérase ADN~~nd~~épendante. Le cDNA synthétisé serait alors de polarité (+)). L'hybridation (haute salinité, basse température) à pour but de forcer l'appariement

du cdNA représentant les régions homologues aux ALV présentes dans le génome d'AEV avec l'ARN de RAV2. La séparation du cdNA ayant hybridé de celui resté simple brin (et représentant la région AEV spécifique) se fait par chromatographie du mélange sur une colone d'hydroxyapatite en conditions très douces (1,5 M NaCl, 50° C) afin de préserver au maximum l'intégrité des hybrides formés avec l'ARN de RAV2 et éviter ainsi la contamination du cdNA simple brin. L'élution de celui-ci se fait à l'aide d'un gradient de phosphate de sodium (0.1 - 0,2 M), et le cdNA recueilli est testé pour trois critères :

1°) le pourcentage de résistance à la S1 (qui permet de déceler la présence de structures secondaires dans le cdNA, tels des "épingles à cheveux" par exemple)

2°) le pourcentage d'hybridation résiduelle avec un ARN 70 S de RAV2 (qui mesure le degré de contamination du cdNA_{aev} par du cdNA viral non spécifique).

3°) le pourcentage d'hybridation avec de l'ARN 70 S d'AEV (RAV2) qui indique le pourcentage de cdNA non viral encore présent, ou incapable d'hybrider. (voir Fig 4). Le cdNA recueilli après cette deuxième étape de purification ne présente pas de résistance intrinsèque à la S1, (moins de 2 %), n'hybride plus du tout avec de l'ARN 70 S de RAV2 (moins de 1 %), mais hybride seulement en moyenne à 50 % avec de l'ARN génomique d'AEV (RAV2), ce qui laisse supposer que près de la moitié du cdNA élué comme simple brin est le produit de la transcription d'un ARN non viral.

Un deuxième cycle de purification s'avère nécessaire afin d'obtenir un cdNA_{aev} débarrassé des séquences non virales.

Les 7 µg de cdNA obtenus à ce stade sont hybridés en conditions strictes (0.6 M NaCl, 68°) avec 33 µg d'ARN d'AEV (RAV2). Cela représente un excès de 2,3 fois en ARN génomique d'AEV pur, si l'on tient compte de la présence du helper (50 %) ainsi que l'ont révélé les courbes d'hybridation comparatives (voir plus loin). Les hybrides formés ne contiendront pas un

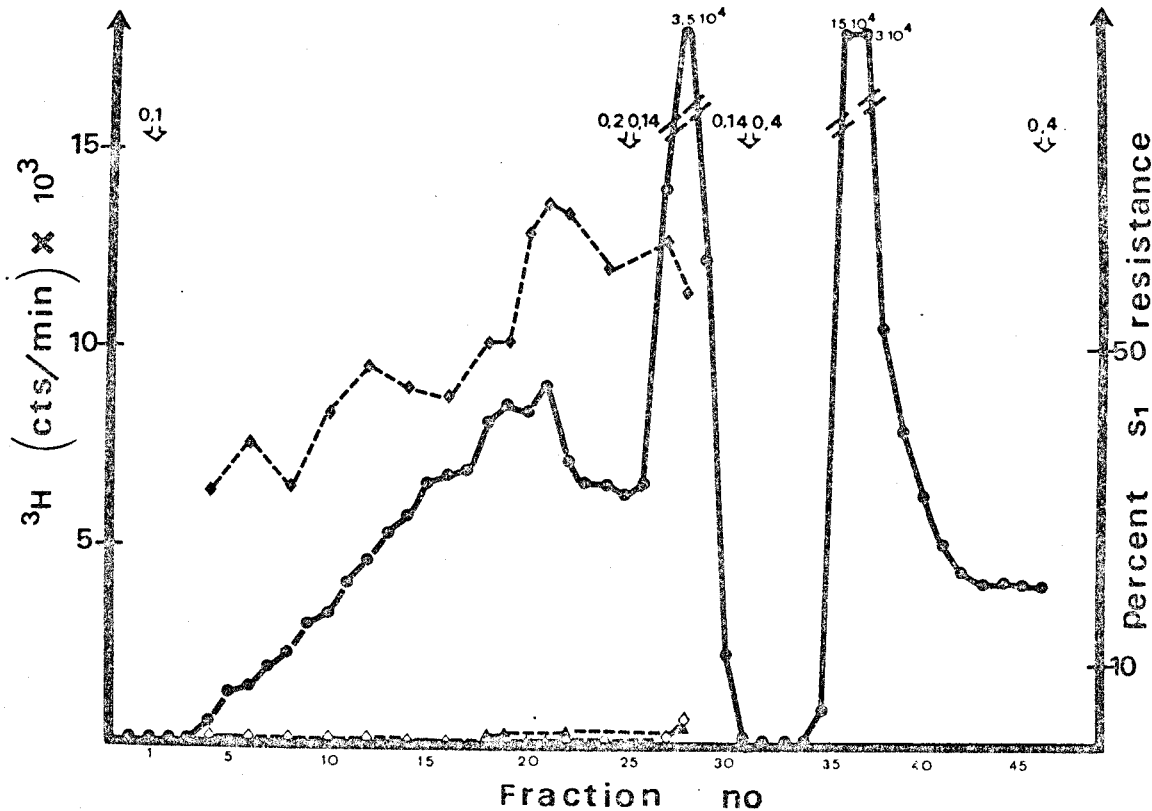


Figure 4 : Profil d'élution du cdNAeav rav2 sur une colonne HAP.

9 μg de cdNA $^3\text{Haeav}$ rav2, 4-7 s hybridés avec 78 μg d'ARN de RAV2 ($\text{Crt} = 25 \text{ MxSxL}^{-1}$) sont chargés sur 2 ml d'HAP tassé. L'élution du cdNA simple brin se fait à l'aide d'un gradient de phosphate de sodium (0,1 - 0,2 M) à 50°C et en présence de 1,5 M NaCl (●—●). Chaque fraction est testée après dilution convenable pour :

- la résistance intrinsèque à la S1 ◊---◊
- le pourcentage d'hybridation résiduelle avec l'ARN du helper ($\text{Crt} = 10 \text{ MxSxL}^{-1}$) ▲---▲
- le pourcentage d'hybridation avec l'ARN d'AEV (RAV2) ($\text{Crt} = 11 \text{ MxSxL}^{-1}$) ◆---◆

Les hybrides instables sont élués par du tampon phosphate 0,14 M à 60°C sans NaCl. Le cdNA ayant hybridé est élué par du tampon phosphate 0,4 M à 60°C.



cdNA répété plus de deux fois pour une même séquence, la quantité d'ARN d'AEV (RAV2) ne le permettant pas.

Le mélange est soumis à l'action de la nucléase S1 d'*Aspergillus oryzae* (voir matériel et méthode) afin de digérer tout le cdNA resté simple brin, le cdNA répétitif et non viral. Cette deuxième étape de purification permet de recueillir 3,5 µg de cdNA_{aeV} soit 10,9 % du cdNA de départ (tableau II). Une cinétique d'hybridation est réalisée avec de l'ARN d'AEV (RAV2) et de RAV2 (fig 5 a et 5 b). Le plateau d'hybridation s'est élevé jusqu'à 88 % avec l'ARN d'AEV, ce qui indique que la plupart du cdNA non spécifique a été digérée, et aucune hybridation n'est détectée avec l'ARN de RAV2, comme précédemment.

La sonde obtenue à ce stade de purification représente les séquences présentes dans le génome d'AEV et absentes de celui du helper. Ses caractéristiques sont satisfaisantes et nous avons essayé d'en connaître la complexité.

2) Détermination de la complexité du cdNA_{aeV}

La complexité d'un acide nucléique représente le nombre des nucléotides liés entre eux de façon non répétitive. Nous avons déterminé la complexité du cdNA en utilisant la technique d'hybridation moléculaire. Celle-ci permet de mesurer expérimentalement la complexité d'une séquence nucléotidique, à l'aide d'une courbe de Cot ou de Crt. La détermination du Cot ou du Crt aux conditions expérimentales choisies (0,6 M NaCl, 68°C) dépend, nous l'avons vu, de la concentration en acides nucléiques dans la réaction et du temps d'incubation. L'un de ces deux facteurs étant fixé, la variation de l'autre permet la construction de la courbe Cot ou Crt. Au temps de demi-réaction (pour 50 % d'hybridation) le Crt mesuré est une constante pour un acide nucléique donné. Ce point (Cot 1/2 ou Crt 1/2) ne dépend que de la complexité de l'acide nucléique en excès car plus sa complexité est élevée et plus la quantité de fragments identiques est faible

	TOTAL cDNA	4-7 S cDNA	cDNA _{aev} after HAP	cDNA _{aev} after S ₁ nuclease
WEIGHT ($\times 10^6$ g)	32	9,6	7	3,5
Cts/mn ($\times 10^9$)	1,6	0,48	0,35	0,176
% of TOTAL cDNA	100	30	21,8	11
% S ₁ Resistance				
with : AEV(RAV2)	-	67	50	88
RAV2		37	<3	<3
($\times 10^6$) RNA 70S :				
RAV2		78		
Crt	-	25	-	-
RNA/ cDNA		11		
RNA 70S :				
AEV(RAV2)			33	
Crt	-	-	4,5	-
RNA/ (AEV) cDNA			2,3	

Tableau II : Sélection du cDNA_{aev}

Ce tableau résume les différentes étapes de cette sélection ainsi que les rendements obtenus à chaque stade. L'hybridation avec l'ARN70S de RAV2 est réalisée en conditions relâchées (1,2 M NaCl 60°C) et la sélection du cDNA_{aev} se fait en conditions stabilisantes (1,5 M NaCl, HAP 50°C). L'hybridation ultérieure avec l'ARN d'AEV (RAV2) est réalisée en conditions strictes (0,5 M NaCl, 68°C) et la sélection des hybrides se fait par la nucléase S₁.



Figure 5 : Spécificité du cdNAeav

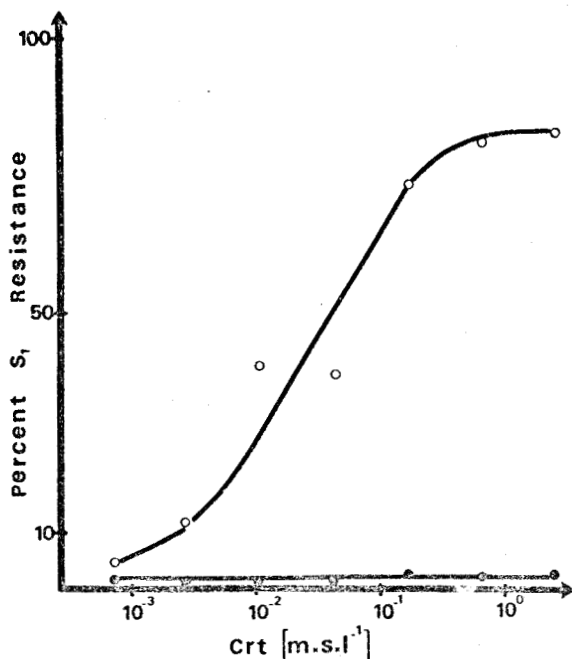


Figure 5 a : 2000 cpm de cdNAeav (0,04 ng ●—●) et 2000 cpm (0,005ng, ○—○) de cdNAtd rep sont hybridés en 0,6 M NaCl à 68°C avec des dilutions 1 :4 d'ARN de RAV2 (18 ng au point A) pendant 15 h et dans 8 µl. Le pourcentage d'hybridation est déterminé par la nucléase S1. Les hybridations sont normalisées à 100 % : (x 1,176 pour le ³²P x 1,135 pour le ³H)

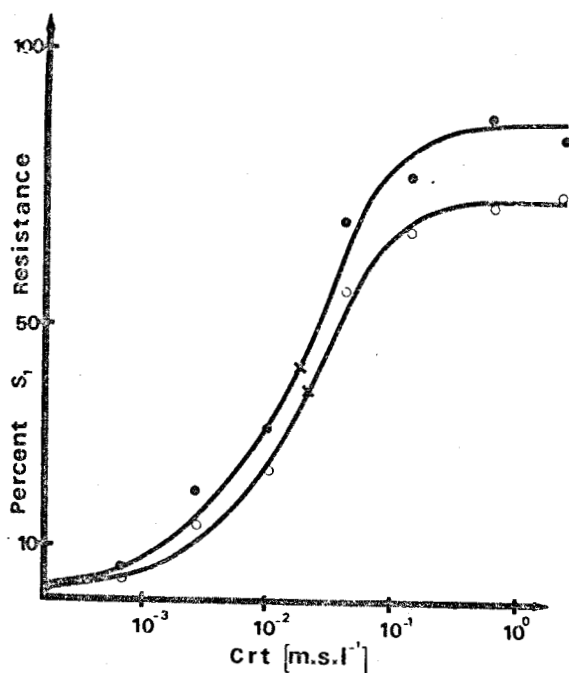


Figure 5 b : Dans les mêmes conditions, le cdNAeav (●—●) et le cdNAtd rep (○—○) sont hybridés avec de l'ARN d'AEV (RAV2) (24 ng au point A). Le rapport des Crt 1/2 mesurés pour cdNAeav et pour le helper est de 0,71. Les valeurs obtenues ne sont pas normalisées.



pour une concentration fixée. Ainsi, un acide nucléique de complexité 4 fois plus grande qu'un autre aura son C_{rt} 1/2, 4 fois plus grand : pour une même concentration en fragments, il y aura 4 fois moins de séquences semblables dans le milieu. Donc, il faudra l'hybrider 4 fois plus longtemps que l'autre avec un cDNA complémentaire pour atteindre le point de 1/2 réaction.

Nous avons pour cela adapté une méthode décrite par Young et al (1974) qui permet de ne pas tenir compte de l'hétérogénéité de l'ARN introduite dans le mélange réactionnel par la présence du helper (101).

Cette technique est très délicate à manipuler tant sur le plan théorique que technique. Aussi, l'exposé des résultats qui va suivre est encombré de détails techniques indispensables à la bonne compréhension de ces expériences. En effet, pour déterminer la complexité d'un cDNA, il faut absolument être en excès de cDNA dans la réaction, sous peine de mesurer la complexité de l'ARN ! C'est l'acide nucléique le plus abondant qui dirige la cinétique d'hybridation et la grande difficulté de cette méthode vient de l'imprécision existant dans la quantification de l'ARN utilisé dans la réaction. Afin de lever cette imprécision nous avons mesuré la quantité d'ARN existant dans le mélange à l'aide d'un cDNA ^{32}P représentant tout le génome viral et présent en quantité 100 fois moindre que le cDNA 3H étudié.

Dans ce cas, l'ARN du milieu est en excès pour le cDNA ^{32}P (on construit donc une courbe C_{rt} , qui permet une mesure précise de la concentration en ARN dans le milieu d'hybridation).

L'ARN étant en défaut par rapport au cDNA 3H , il est possible de construire simultanément une courbe C_{ot} dont le point de 1/2 réaction donnera le C_{ot} 1/2 du cDNA 3H . La complexité est reliée au C_{ot} 1/2 par une constante caractérisant les conditions d'hybridation : complexité = $K \times C_{ot}$ 1/2

Dans les conditions choisies d'hybridation, $K = 5,10^5$. Nous avons essayé de définir les limites de cette méthode et les conditions optimales

N° Courbe	ARN (ng) par point	ARN seq. spé.	cDNA (ng) par point	Crt $\frac{1}{2}$ [$\times 10^{-3}$]	Cot $\frac{1}{2}$ [$\times 10^{-3}$]	cDNA/ ARN seq. spé.
1	4	1	0,31	1,5	1,5	0,31
2 ^{>}	2,5	0,62	0,31	2,8	2,8	0,49
3 ^Z	0,88	0,22	0,37	7	4,5	2,7
4 ^E	0,29	0,07	0,31	9	4,5	4,3
AEV	0,5	0,3	0,92	25	7,5	3

Tableau III : Mesure de la complexité des cDNA.

Ce tableau donne toutes les caractéristiques des cinétiques effectuées en conditions strictes d'hybridation en vue de déterminer la complexité du cDNAenv et du cDNAaev.



d'utilisation, en l'appliquant à un cDNA ^3H de complexité connue par ailleurs (102). Les cinétiques d'hybridation réalisées avec une quantité fixée de cDNAenv ^3H (0,31 ng) et de cDNA (^{32}P) td rep ($2 \cdot 10^{-3}$ ng), mais des quantités variables d'ARN (de 4 à 0,29 ng pour chaque point, fig 6a tableau III) permettent d'obtenir les résultats suivants :

1°) il existe une corrélation entre la quantité d'ARN et le plateau atteint par le cDNAenv ; moins il y a d'ARN, plus la quantité de cDNAenv restant simple brin après hybridation augmente, donc plus le plateau d'hybridation diminue. Il faut cependant tenir compte, dans la détermination de la quantité d'ARN hybridable, du fait que le cDNAenv ne représente qu'un gène sur les 3 que possède le génome du virus td Pr B utilisé, et que ce gène ne représente que 25 % (45) des nucléotides totaux du virion. Les quantités d'ARN utilisables pour l'hybridation varient donc de 1 à 0,072 ng par point.

2°) c'est le rapport (cDNAenv) / (gène ENV) qui régit effectivement le type de courbe observé (fig 6 b). Si ce rapport est inférieur à 1, le Crt 1/2 apparent observé pour le cDNA ^{32}P et le Cot 1/2 observé pour le cDNA ^3H sont confondus. Cela vient du fait que l'ARN génomique est en excès pour les deux cDNAs : c'est une courbe Crt qui est construite dans les deux cas, ce qui explique la conjonction des deux points de demi-réaction. Quand ce rapport est supérieur à 1, le cDNAenv est en excès par rapport à l'ARN, et la courbe construite avec le ^3H est effectivement une courbe Cot. Dans ce cas, le Cot 1/2 observé reste invariable pour toutes les autres dilutions d'ARN. Pour le cDNAenv, le $\text{Cot } 1/2 = 4,5 \cdot 10^{-3} \text{ M} \times \text{S} \times \text{L}^{-1}$ soit 2200 nucléotides. Ceci est tout à fait compatible avec les valeurs obtenues par d'autres méthodes (102, 103). Il ressort de ces différents résultats que l'excès de cDNA ^3H est certain dès lors que le Crt 1/2 apparent (car lu sur une échelle de Cot) et Cot 1/2 mesuré sont dissociés, le Cot 1/2 étant atteint avant le Crt 1/2.

Figure 6 : Mesure de la complexité des cDNA

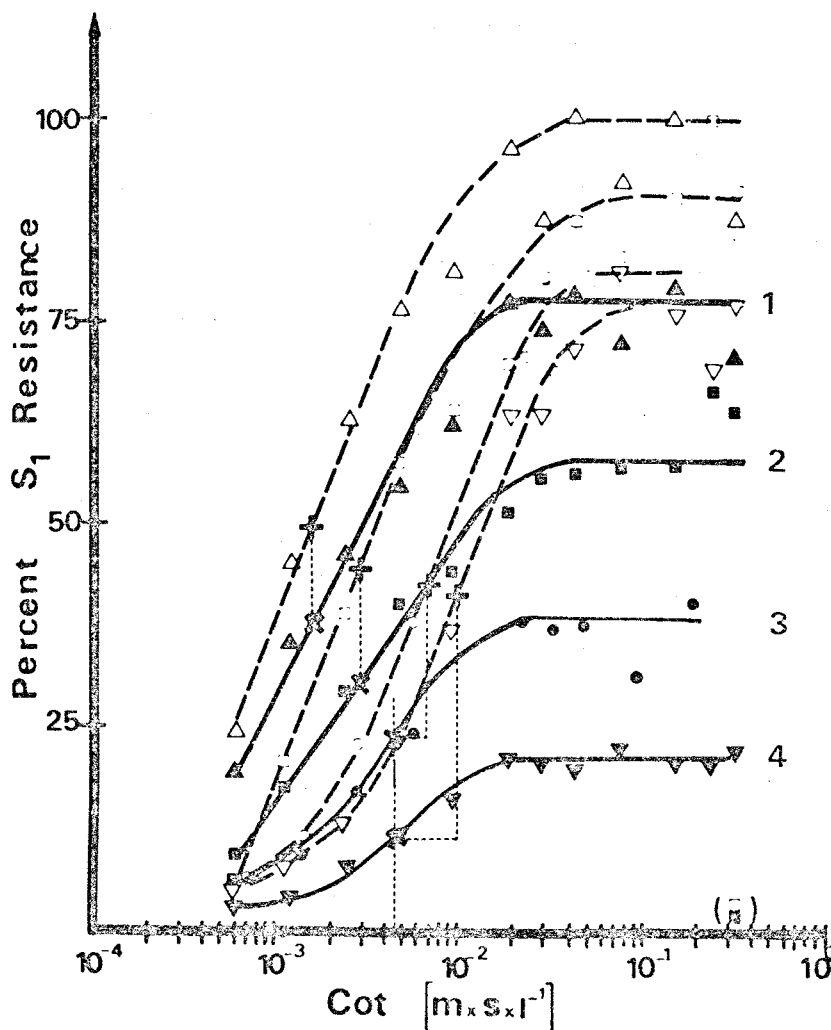


Fig. 6a : Compléxité du cDNAenv

Courbe 1 : 17.000 cpm (0,31 ng $\Delta-\Delta$) de cDNAenv sélectionnés à partir du cDNA_{nd} pr B et 0,005 ng (2000 cpm $\Delta--\Delta$) de cDNAt_d rep sont hybridés dans 2 μ l avec 4 ng d'ARN de td pr B pendant des temps variant de 225 sec à 32 h.

Courbe 2 : L'hybridation est réalisée dans les mêmes conditions que pour la courbe N° 1 à ceci près que 2 ng d'ARN sont utilisés par points, $\square-\square$ cDNAenv, $\square--\square$ cDNAt_d rep.

Courbe 3 : 0,37 ng de cDNAenv $\bullet-\bullet$ sont hybridés avec 1 ng d'ARN par point, et 0,005 ng de cDNAt_d rep $\circ--\circ$.

Courbe 4 : Mêmes conditions que ci-dessus avec 0,33 ng d'ARN par points $\blacktriangledown-\blacktriangledown$ cDNAenv $\blacktriangledown--\blacktriangledown$ cDNAt_d rep. L'analyse des hybrides se fait classiquement par la S₁.

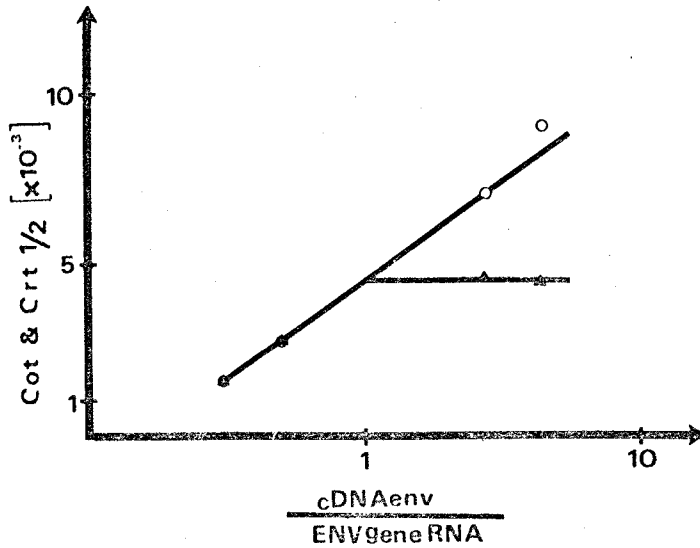


Figure 6 b : Variation des Cot 1/2 et Crt 1/2 apparents mesurés en fonction du rapport cDNAenv/ENV gène . Ce rapport est déterminé en estimant qu'ENV représente 25 % du génome de td pr B. O-O Crt 1/2, Δ-Δ Cot 1/2.

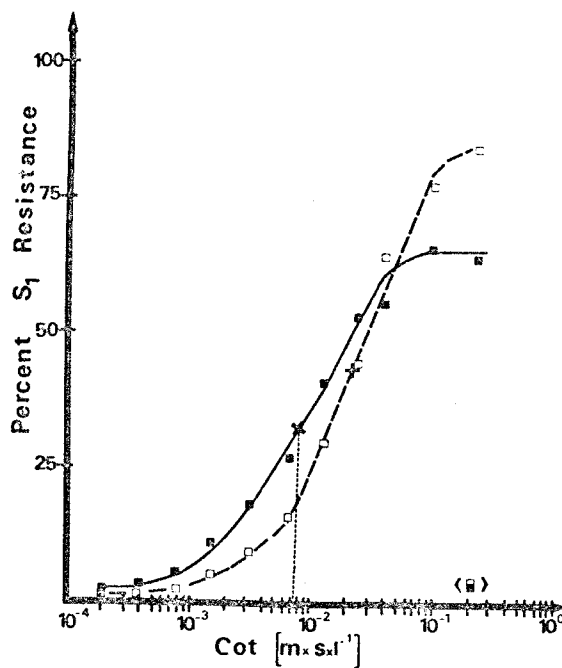


Figure 6 c : Compléxité du cDNAenv
 0,92 ng de cDNAenv (44.000 cpm) \blacksquare - \blacksquare et 0,05 ng (2000 cpm) de cDNAtd rep \square - \square , sont hybridés avec 0,8 ng d'ARN dans 10 μ l pendant des temps variant de 225" à 37 h. Le pourcentage d'hybridation est déterminé à l'aide de la nucléase S1.



(la complexité de cDNA ^3H est ici plus faible que celle de l'ARN viral).

La détermination de la complexité du cDNA_{AEV} est réalisée selon ces conditions : 0,92 ng de cDNA_{AEV} sont hybridés avec 0,5 ng d'ARN 70 S d'AEV (RAV2) en présence de 0,005 ng de cDNA ^{32}P td rep. Seuls 50 % de l'ARN appartiennent au génome d'AEV. En effet, la spécificité du cDNA_{AEV} permet de calculer le pourcentage d'ARN génomique d'AEV présent dans le mélange AEV (RAV2). Dans la figure 5a, le cDNA ^{32}P permet de visualiser l'ARN appartenant à RAV2 (la participation des séquences homologues à RAV2 présentes dans le génome d'AEV est négligeable, leur pourcentage d'hybridation étant trop faible).

Le rapport théorique des Crt 1/2 des deux ARN génomiques est de 0,75 (AEV possède 6.000 nucléotides son Crt 1/2 est de $0,012 \text{ MxSxL}^{-1}$ et RAV2 ayant 8200 nucléotides son Crt 1/2 est de $0,016 \text{ MxSxL}^{-1}$). Le rapport des Crt 1/2 mesuré dans la fig 5a étant de 0,71, nous en concluons qu'il y a dans le mélange d'ARN autant de molécules d'AEV que de RAV2.

La figure 6c représente la courbe de Cot du cDNA_{AEV} ^3H . Le Cot 1/2 mesuré selon la technique mise au point avec le cDNA_{env} est de $7,5 \cdot 10^{-3} \text{ MxSxL}^{-1}$, ce qui confère une complexité de 3700 nucléotides à la séquence AEV spécifique. Cette valeur ajoutée aux 2300 nucléotides homologues à RAV2 confirme remarquablement les mesures de taille du génome d'AEV obtenues au laboratoire (6000 ± 600 nucléotides).

Nous avons vérifié qu'il n'y avait pas d'erreur sur l'estimation de la quantité de cDNA ^3H introduite dans la réaction, (erreur qui pourrait venir d'une mauvaise estimation de l'activité spécifique du cDNA) en mesurant la complexité du cDNA ^3H représentant le génome de RAV2 et synthétisé lors de la transcription du mélange d'ARN d'AEV (RAV2) par l'AMV polymérase. La complexité obtenue ($0,016 \text{ MxSxL}^{-1}$) est tout à fait conforme à celle attendue pour un cDNA représentant le génome de RAV2, c'est à dire 8200 nucléotides.

3) Conclusions - Discussion

Nous avons sélectionné le cDNA_{AEV} à partir du mélange des cDNA ³H de départ en utilisant des conditions d'hybridation et de sélection aussi douces que possibles, pour éviter au maximum la contamination du cDNA_{AEV} par des séquences non spécifiques. Ceci nous a permis de débarrasser totalement le cDNA_{AEV} du bruit de fond habituellement observé pour d'autres cDNA par d'autres auteurs (80). Le cDNA obtenu dans ces conditions et traité par la nucléase S1 après une hybridation avec l'ARN 70S d'AEV (RAV2) est tout à fait spécifique d'AEV. Ce dernier cycle de purification accroît son pourcentage d'hybridation maximum de 40 %.

Nous avons également déterminé la complexité du cDNA_{AEV} en adaptant une méthode de calcul indépendante de l'hétérogénéité de l'ARN viral. La valeur de 3700 nucléotides (± 300) obtenue, permet de penser que la séquence spécifique du virus de l'érythroblastose aviaire est suffisante pour constituer un, voire deux gènes. Le cDNA_{AEV} est en moyenne deux fois plus grand que les cDNA spécifiques de fragments viraux décrits jusqu'ici et représentant un gène (80, 102, 18, 103). Le témoin interne cDNA_{ATd} rep ³²P introduit dans la réaction ainsi que la mesure indirecte de l'activité spécifique du cDNA, lèvent les ambiguïtés pouvant exister sur cette valeur.

Nos résultats ont été récemment confirmés par l'observation directe en microscopie électronique d'hybrides réalisés entre de l'ARN d'AEV et un cDNA long d'ALV (108). Il apparaît que la séquence AEV spécifique est adjacente au fragment du gène GAG et continue sur 3250 (± 300) nucléotides.

Dans une troisième partie nous avons recherché l'origine de cette séquence en testant sa présence dans d'autres virions y compris chez les autres DLV et, en considérant sa possible origine cellulaire.

RESULTATS III ÈME PARTIE

ORIGINE DES SEQUENCES cDNA^{AEV}

1) Spécificité des séquences contenues dans le cDNA_{AEV}

Une homologie entre différents ARN viraux et les séquences contenues dans le cDNA_{AEV} est recherchée par hybridation moléculaire en conditions strictes. Pour les virus compétents pour la réplication le Crt atteint est de 500 à 1000 fois le Crt 1/2. Pour les virus défectifs des leucémies aiguës nécessitant un helper pour se répliquer, le Crt atteint est suffisant pour détecter les particules défectives. (le rapport ALV helper/DLV est déterminé par des méthodes de titration biologiques, et il varie selon les virus de 1/1 à 10/1). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IV. Aucun des virus testés, (ASV, ALV, DLV) n'hybride avec le cDNA_{AEV} (0,005 ng de cDNA_{AEV} rep ³²P servent de témoin d'hybridation dans chaque échantillon). Ces résultats, attendus pour les ASV et ALV, sont très intéressants en ce qui concerne les DLV, car ils confirment l'aspect particulier de la biologie du virus de l'érythroblastose aviaire. Tous les DLV testés possédant une homologie avec les ALV, le problème de l'origine de ces séquences particulières se pose.

BUS
LILLE

2) Hybridation du cDNA_{AEV} avec de l'ADN cellulaire

Nous avons recherché par analogie avec le gène SRC (68,69,70,71) si les séquences présentes dans le cDNA_{AEV} le sont également dans l'ADN cellulaire normal. 0,02 ng de cDNA_{AEV} et 0,005 ng de cDNA ³²P td rep sont hybridés en conditions strictes avec 200 µg par point d'ADN cellulaire de poulet ou de caille pendant des temps variables (fig 7a et 7b). Les courbes ainsi obtenues montrent que l'ADN de cellules saines de poulet et de caille contiennent des informations apparentées aux séquences spécifiques d'AEV, à raison d'une à 3 copies par génome haploïde.

L'étude de l'évolution de ces séquences est menée en hybridant dans les mêmes conditions le cDNA_{AEV} avec 200 µg par point d'ADN d'espèces animales dont l'ancêtre est de plus en plus éloigné phylogénétiquement de

Tableau IV : Spécificité du cDNA_{AEV}.
 Tous les AMV viraux sont hybridés (0,6 M NaCl 68°C) à un crt 500 fois \geq au crt 1/2 de la cinétique d'hybridation avec 0,04 ng (2000cjm) de cDNA_{AEV} et 0,005 ng (2000 cjm) de cDNA_{rep}. Le pourcentage d'hybrides est déterminé par action de la nucléase S1 et toutes les valeurs sont normalisées à 100 % pour les deux cRNA.

	RNA	cDNA _{Rep}	cDNA _{AEV}
A	RAV 0	91	3
	RAV 1	79	4
	RAV 2	80	3
L	RAV 49	80	3
	RAV 50	86	3
V	B77 td	83	2
	PRB td	100	3
A	B77 nd	94	4
S	PRB nd	100	3
	CZ	86	4
V	BRY td	70	2
	AEV (RAV 2)	86	100 ⁸⁸
D	MC29 (RAV 2)	85	5
	MH2 (RAV 3)	85	6
L	OK10 (RAV 2)	100	3
	CM2 (CMV)	76	3
V	AMV	84	3
	E 26 (RAV 2)	89	4



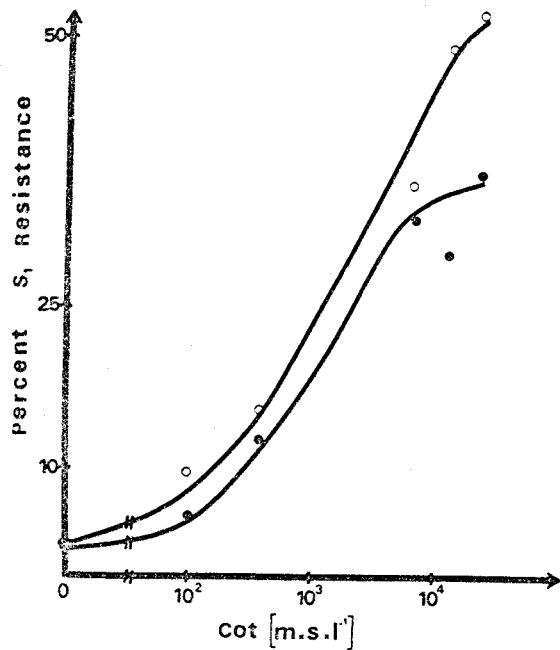


Figure 7 a : Cinétique d'hybridation du cdNAaev avec de l'ADN de poulet (●-● cdNAaev, ○-○ cdNAtd rep)

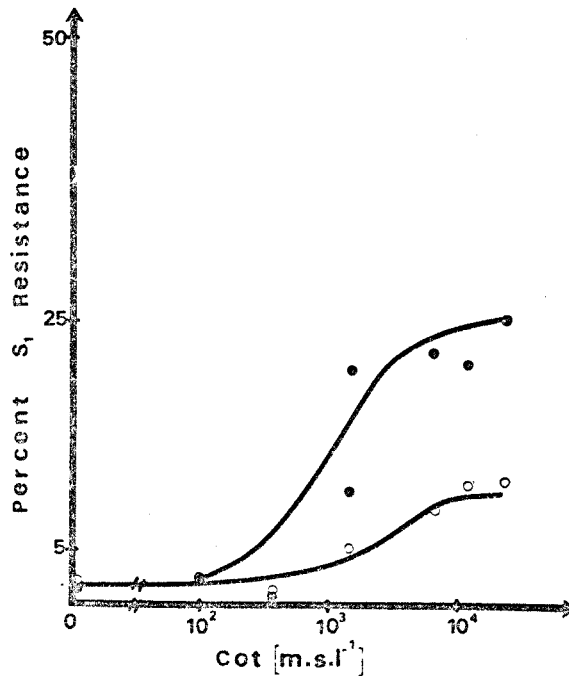


Figure 7 b : Cinétique d'hybridation du cdNAaev avec de l'ADN de caille. (●-● cdNAaev, ○-○ cdNAtd rep.)

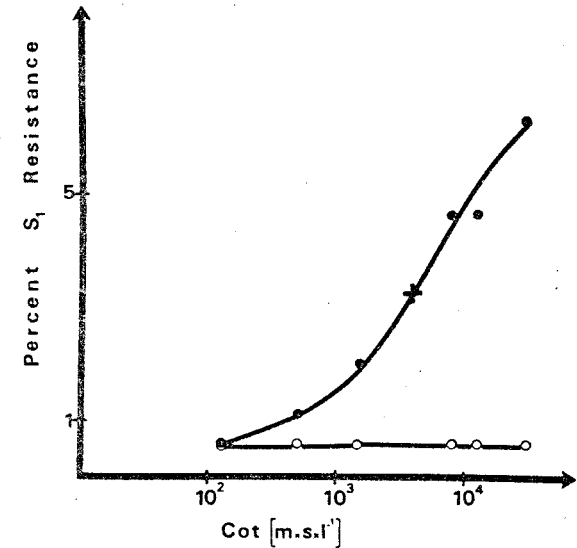


Figure 7 c : Cinétique d'hybridation du cdNAaev avec de l'ADN de saumon, pour cette cinétique, le bruit de fond de résistance résiduel des cdNA à la S1 (1 à 2 %) a été déduit de chaque points. cdNAaev, ●-● cdNAtd rep. ○-○

Figure 7: Hybridation du cdNAaev avec de l'ADN de vertébrés.

Cinétique d'hybridation du cdNAaev avec de l'ADN 4-6 S dénaturé de caille, de poulet et de saumon ; 200 µg d'ADN par points sont hybridés pendant des temps variant de 7' à 50 h. en 0,6 M NaCl à 68°C dans 25 µl avec 0,02 ng (1000 cpm) de cdNAaev et 0,005 ng (2000 cpm) de cdNAtd rep. Toutes les valeurs sont corrigées, pour 100 % d'hybridation des cdNA (cdNAaev x 1,136 ; cdNAtd rep x 1,176).



celui du poulet. Les pourcentages d'hybridation sont mesurés en conditions strictes et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau V. La cinétique d'hybridation réalisée entre du cDNA_{aev} et de l'ADN de saumon (fig 7c) montre que les faibles pourcentages d'hybridation obtenus pour des animaux ayant divergés du poulet il y a plus de 300 millions d'années, ne sont pas dus à une absorption non spécifique du cDNA_{aev} sur l'ADN étudié. Le cDNA_{aev} hybride avec une cinétique, contrairement au cDNA_{td} rep ³²P, et le Cot 1/2 de cette cinétique est de $3,5 \cdot 10^3 \text{ MxSxL}^{-1}$, caractéristique d'une séquence présente à raison d'1 à 2 copies par génome haploïde dans l'ADN séquence unique (104). La fig 8 résume les résultats obtenus avec les différents ADN pour les cDNA_{aev}, sarc, et td rep. La stabilité évolutive des séquences SRC semble un peu plus grande que celle des séquences AEV, mais il apparaît que les séquences présentes dans le cDNA_{aev} ont une origine cellulaire et font partie des gènes stables maintenus au cours de l'évolution.

3) Mesure de la thermostabilité des séquences AEV cellulaire

Il est intéressant de savoir si les séquences AEV présentes dans l'ADN des cellules saines de poulet et les séquences virales (présentes dans le cDNA) sont strictement identiques, ou présentent des mutations les unes par rapport aux autres. On peut ainsi savoir si ces séquences sont échangées entre la cellule et le virus au cours des réplifications successives, ou non, si elles ont été acquises par le virus ou par son ancêtre... Nous avons pour cela mesuré la différence de thermostabilité existant entre des hybrides AEV viral-AEV viral et AEV viral-AEV cellulaire.

La mesure de la stabilité d'un hybride à des températures croissantes permet de calculer le T_M, qui correspond à la température pour laquelle 50 % des hybrides sont dissociés. Plus cette valeur est élevée, plus les hybrides sont stables, et à 1 degré de variation du T_M correspond environ 1 % de paires de bases mutées. (105, 106). Le T_M des séquences

	POULET	CAILLE	CANARD	HOMO SAPIENS	SAUMON
val. réelle cDNAaev	39	25	17	7,5	6
val. corrigée	50	33	22	9,5	7,7
val. réelle cDNAtd rep	55	8	4	2	2
val. corrigée	55	8	4	2	2
val. réelle cDNAsarc	55	46	45	20	13
val. corrigée	55	46	45	20	13
Distance phylogén. [$\times 10^6$ années]	0	30 - 40	60 - 80	300	450

Tableau V : Evolution des séquences AEV dans l'ADN des vertébrés comparées à celle des séquences sarc. Les ADN 4-6 S dénaturés de différents vertébrés sont traités en conditions strictes d'hybridation (0,6 M NaCl, 68°C) et d'analyse (traitement par la S1). 0,02 ng de cDNAaev 3 H et 0,005 ng de cDNAtd rep sont hybridés avec 200 μ g d'ADN a un Cot plateau de 210^4 MxSL $^{-1}$ dans 25 μ l de volume réactionnel.

Toutes les valeurs sont corrigées pour 100 % d'hybridation des cdNA avec les AFN viraux homologues.

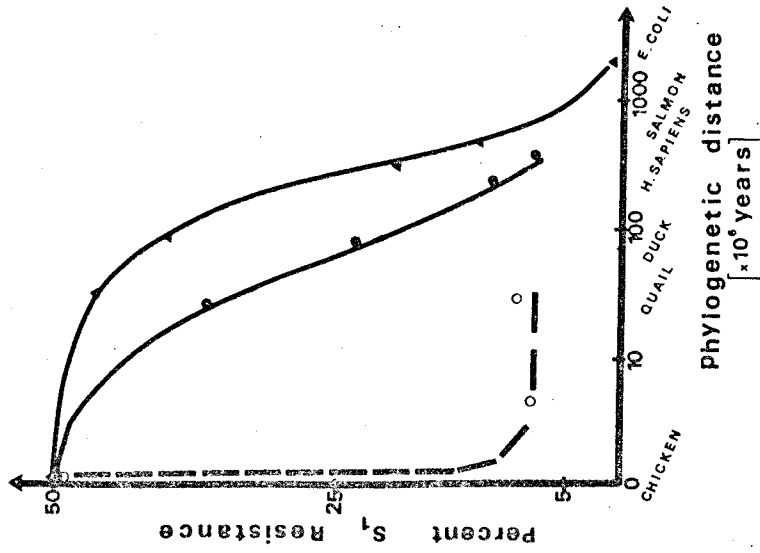


Figure 8 : Evolution des séquences AEV dans l'ADN de vertébrés comparées à celle des séquences sarc et td rep. Cette représentation permet de visualiser la grande stabilité des séquences sarc et AEV cellulaire. ●—● cDNAaev, ▲—▲ cDNAsarc, ○--○ cDNAtd rep.



purement virales est obtenu par la mesure de la thermostabilité d'hybrides réalisés entre de l'ADN d'érythroblastes transformés par AEV (RAV2) et le cDNA_{aev} (fig 9).

La différence de plateau obtenue au maximum d'hybridation observé pour ces deux ADN (65 % ADN érythroblaste, 35 % ADN normal) provient de l'intégration d'1 à 3 copies d'ADN proviral d'AEV dans le génome des érythroblastes infectés.

La différence de TM existant entre les séquences AEV cellulaire et AEV virale est de 3-4°C.

Il y a donc 3 à 4 % de paires de bases mutées entre les séquences virales et cellulaires, ce qui est très comparable aux résultats obtenus avec le cDNA_{sarc} (71). Il n'y a pas d'échange entre les séquences AEV spécifiques virales et cellulaires, mais il est curieux de constater que le même TM est obtenu pour des hybrides AEV cellulaire-cDNA_{aev} et les hybrides formés entre le cDNA ³²P td rep et le génome du virus RAV0 présent dans l'ADN des poulets non virémiques. Or, le cDNA ³²P td rep qui forme les hybrides testés avec RAV0, est synthétisé à partir de l'ARN génomique d'un ALV. On mesure ainsi le pourcentage de mutations survenues dans un génome viral à partir du moment où RAV0 s'est intégré dans l'ADN de l'hôte. En effet, de récents résultats ont montré que le virus RAV0 s'était intégré non pas chez l'ancêtre du poulet, comme on le pensait jusqu'ici, mais dans le poulet lui-même, donc très "récentement" (77). Comme cette variation est la même que celle qui affecte une séquence cellulaire acquise par un génome viral (en l'occurrence AEV), il est permis de penser que l'acquisition de ces séquences par un virus exogène et l'intégration de RAV0 dans le génome hôte sont à peu près contemporaines.

Afin de préciser si la totalité des séquences AEV spécifiques présentes dans le cDNA_{aev} se retrouvent dans l'ADN cellulaire, et si celles-ci sont transcrites normalement, nous avons recherché une hybridation entre l'ARN de cellules saines et notre sonde.

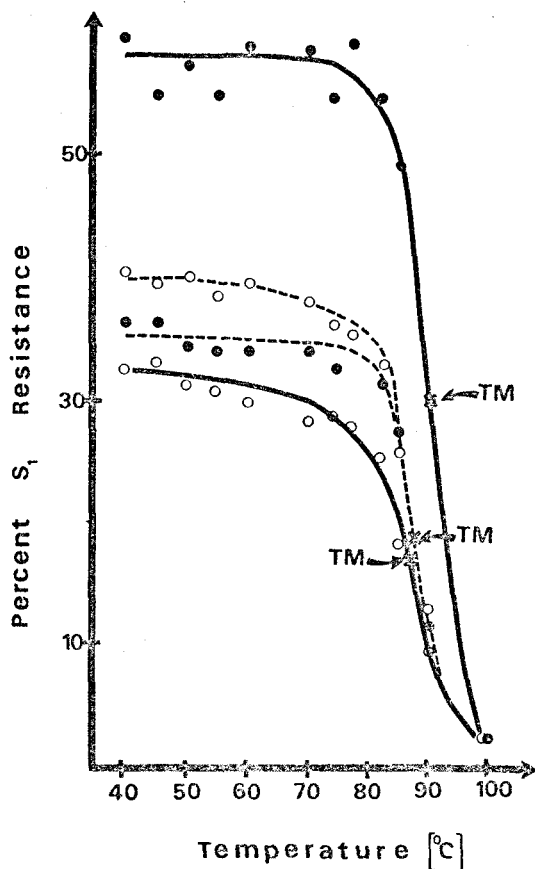


Figure 9 : Mesure de la thermostabilité des hybrides ADN-ADN:cdNA_{aev} - AEV viral, et cdNA_{aev} - AEV cellulaire.

L'ADN extrait d'embryons de poulets ou d'érythroblastes 6 C2, 4-6 S, dénaturé (2 mg) est hybridé à un Cot de 210^4 MxSxL^{-1} dans 200 μl , en conditions strictes (0,6 M NaCl; 68°C) avec 24000 cpm (0,5 ng) de cdNA_{aev}. Après 48 h d'hybridation, chaque lot d'ADN hybridé est mélangé avec 2 mg d'ADN de poulet ayant hybridé avec 0,05 ng de cdNA_{td} rep à un Cot de 210^4 MxSxL^{-1} , afin de posséder un témoin interne de dissociation. Le mélange est ramené à 0,3 M NaCl, repartis en microcapillaires de 80 μl scellés à la flamme et incubés pendant 10 min à la température de dissociation désirée. Le pourcentage de cdNA hybridé est déterminé par l'action de la nucléase S₁ d'*aspergillus orizae*. ○-○ cdNA_{aev}, ADN de poulet sain ●-● cdNA_{aev}, ADN d'érythroblastes 6 C2 ; ○-○ cdNA_{td} rep témoin interne de l'ADN de poulet, ●-● cdNA_{td} rep témoin interne de l'ADN d'érythroblastes 6 C 2.



4) Transcription des séquences AEV-cellulaires

La cinétique d'hybridation réalisée avec des concentrations décroissantes (1:4) d'ARN de fibroblastes de caille (0,77 mg au point A) et 0,02 ng de cDNA_{aev} (fig 10a) montre que les séquences homologues cellulaires sont transcrites dans l'ARN à raison d'1 à 2 copies par cellule. Toutes les séquences AEV spécifiques présentes dans le virus le sont également dans la cellule, et la différence du pourcentage d'hybridation maximale observée entre le cDNA_{aev} et l'ADN cellulaire d'une part (32 %) le cDNA_{aev} et l'ARN cellulaire d'autre part (90 %) peut s'expliquer par les 4 % de bases mutées existant entre les séquences AEV virales et cellulaires. En effet, lors de l'hybridation réalisée entre le cDNA_{aev} et l'ADN cellulaire il existe une réassociation des brins d'ADN de polarité différente qui est concomitante de la réaction d'hybridation et qui limite forcément celle-ci (71). Or, les brins AEV cellulaires (+) et (-) ne sont pas mutés l'un par rapport à l'autre. Le brin (+) qui hybride normalement avec le cDNA_{aev} (-), aura tendance à se réassocier préférentiellement avec le brin cellulaire de polarité opposée. Ce problème ne se pose évidemment pas avec les ARN, ce qui accroît le plateau d'hybridation.

Le tableau VI rapporte les résultats obtenus pour des ARN de différente provenance testés avec le cDNA_{aev} à 30 % d'hybridation. Ces séquences sont exprimées dans toutes les espèces aviaires et les différences de Crt obtenues pour 30 % d'hybridation semblent refléter plutôt des différences de qualité d'ARN que de transcription des séquences.

Les cellules infectées par AEV, soit accompagné de son helper RAV2, comme dans les érythroblastes (souche 6C₂), soit sans helper comme dans les cellules non productrices NP₇₅, expriment les séquences virales spécifiques à un taux 200 fois supérieur à l'expression de l'AEV endogène.

La figure 10b représente la cinétique d'hybridation réalisée entre du cDNA_{aev} (0,02 ng) et de l'ARN intracellulaire total des NP₇₅

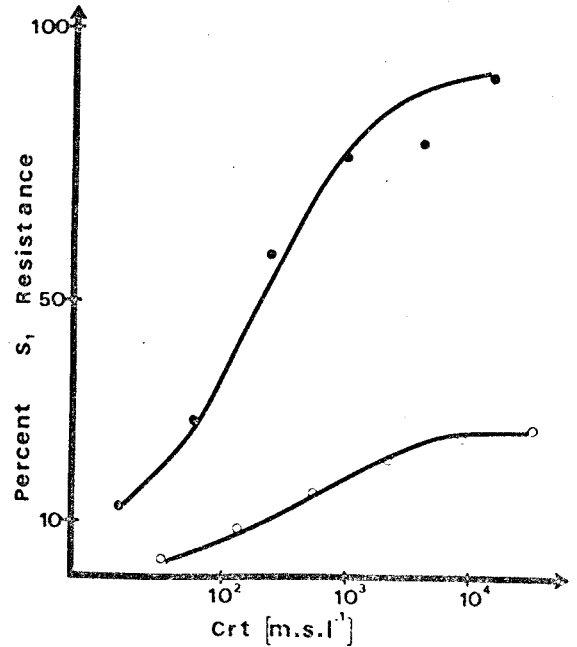
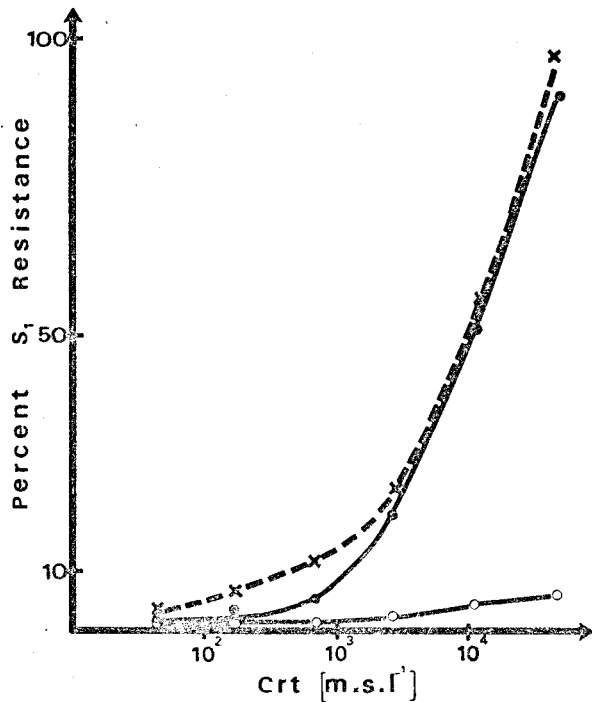


Figure 10 : Cinétique d'hybridation du cDNAaev avec de l'ARN cellulaire.

Figure 10 a : 0,02 ng (1000 cpm ●-●) de cDNAaev et 0,005 ng (2000 cpm ○-○) de cDNAtd rep sont hybridés dans 30 μ l en 0,6 M NaCl à 68°C avec des concentrations décroissantes d'ARN de caille (1 : 4, 0,77 ng au point A) pendant 43 h. Le pourcentage d'hybridation est déterminé par l'action de la nucléase S1. L'hybridation avec le cDNAsarc est réalisée dans ces mêmes conditions (x--x).

Figure 10 b : Cinétique d'hybridation du cDNAaev avec de l'ARN cellulaire total des cellules NP75 non productrices d'AEV; 0,02 ng de cDNAaev ●-● et 0,005 ng de cDNAtd rep ○-○ sont hybridés en conditions strictes dans 7 μ l pendant 25 h avec 0,075 ng d'ARN cellulaire total au point A. (dilution 1 : 4). L'analyse des hybrides est faite par la nucléase S1. Les pourcentages d'hybridations sont normalisés : cDNAaev x 1,136, cDNAtd rep x 1,17.

ARN	% HYBRIDATION		Crt
	cDNA _{aev}	cDNA _{rep}	
fibroblastes sains :			
POULET	30	60	10 100
CAILLE	30	2	8 500
FAISANT	30	5	12 000
PIGEON	30	2	45 000
cellules non productrices transformees par AEV :			
NP 75	30	7	85
cellules productrices :			
ERYTHROBLATES 6C2 AEV _(RAV2)	30	25	45

Tableau VI : Hybridation du cDNA_{aev} avec différents ARN aviaires :
 2000 cpm de cDNA_{aev} et 2000 cpm de cDNA_{td rep} sont hybridés en conditions strictes dans
 27, μ l, pendant 43 h avec des concentrations variables (1 : 4) d'ARN.
 Au point A : caille = 0,775 mg ; pigeon = 0,425 mg ; poulet = 0,525 mg
 faisant = 1,2 mg. Le Crt est lu pour 30 % d'hybridation afin de
 comparer les résultats obtenus.



(0,075 mg au point A). L'hybridation obtenue au plateau est totale, ce qui indique que toutes les séquences présentes dans le cDNA_{AEV} le sont aussi dans l'ARN cellulaire des NP 75. Ces cellules provenant d'un clone transformé par une seule particule du virus de l'érythroblastose aviaire, (5), ce résultat nous confirme que le cDNA_{AEV} ne contient pas un mélange de séquences d'origines différentes, mais bien celles du virus AEV.

5) Discussion - Conclusion

Les séquences présentes dans le cDNA_{AEV} sont spécifiques du virus de l'érythroblastose aviaire, et ne se retrouvent chez aucun autre virus ASV, ALV, ou DLV. Ces séquences hybrident totalement avec l'ARN des cellules NP 75 non productrices d'AEV, confirmant que le cDNA_{AEV} représente uniquement les séquences présentes dans ce virus. Ceci pose le problème de l'existence de séquences spécifiques différentes au sein des autres DLV. D. Sheiness (80) a montré que le virus MC29 possédait également une séquence spécifique de 1600 nucléotides de long, ce qui s'accorde bien avec l'espace laissé dans le génome de MC29 par les séquences communes avec les ALV.

Or, la pathologie de ces deux virions étant très différente (AEV affecte la lignée rouge, MC29 affecte la lignée blanche) il est tentant d'impliquer ces séquences spécifiques dans leur pouvoir transformant particulier.

Les séquences spécifiques d'AEV sont d'origine cellulaire et sont transcrites normalement à raison d'1 à 3 copies par génome haploïde. Elles possèdent 3 à 4 % de bases mutées par rapport aux séquences cellulaires de poulet, et la divergence phylogénétique des espèces rend compte des faibles pourcentages d'hybridation obtenus avec les ADN de différentes origines : plus l'animal testé est éloigné du poulet plus les séquences analysées ont muté et plus la réassociation l'emporte sur l'hybridation. Toutefois la cinétique d'hybridation obtenue avec l'ADN de saumon en conditions strictes d'hybridation et d'analyse permet d'éliminer l'hypothèse d'un

appariement non spécifique du cDNA_{aev}.

Conclusion générale

Les travaux que nous avons réalisés sur les virus défectifs des leucémies aiguës et plus particulièrement sur le virus de l'érythroblastose nous ont permis, de dresser la carte physique complète de ce virus (fig 11) et de préciser les points suivants :

1°) Les DLV sont apparentés aux ALV, de façon variable selon les virus, mais sont défectifs dans tous leurs gènes, ce qui rend compte de leur incapacité à se répliquer seuls (le virus OK10 est capable de s'encapsider, mais ne possède pas de polymérase active et les particules émises ne sont pas infectieuses).

Cette homologie pose le problème de leur pathologie complexe (leucémies aiguës et tumeurs solides variées) très différente de celle des ALV ou des ASV.

2°) tous les DLV possèdent une séquence supplémentaire, l'homologie existant avec les ALV est insuffisante pour constituer tout leur génome.

Cette séquence, tout au moins pour AEV et MC29 est totalement différente, et doit être adjacente à la séquence GAG de ces virions, ce qui permettrait d'expliquer la présence du polypeptide de structure GAG-X découvert dans les cellules non productrices de ces virus.

Le virus de l'érythroblastose aviaire possède une séquence spécifique de 3700 nucléotides, ce qui est suffisant pour constituer 1 ou 2 gènes.

3°) ces séquences (AEV) sont d'origine cellulaire (comme le gène SRC) et présentent 3 à 4 % de bases mutées avec leur homologue cellulaire, mais il est actuellement impossible de préciser le rôle de ces mutations.

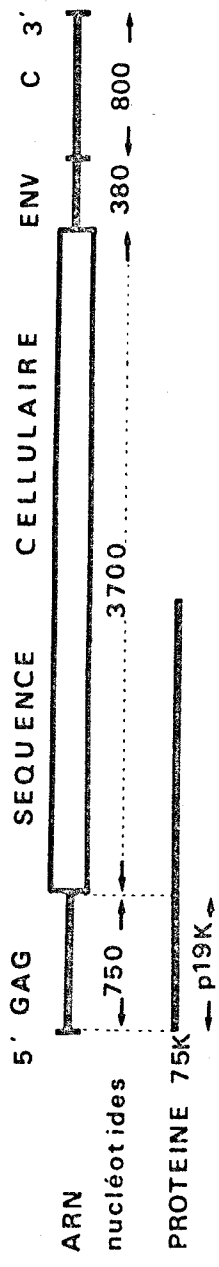


Figure 11 : Le génome du virus de l'erythroblastose aviaire. Carte physique du génome d'AEV déduite d'après les résultats d'hybridations en phase liquide.



La stabilité de ces séquences le long de la chaîne évolutive les désigne comme jouant un rôle important dans le fonctionnement cellulaire.

Or, AEV bloque la différenciation des érythroblastes infectés ; il se pourrait donc que ces séquences AEV cellulaires interviennent normalement dans la différenciation de la lignée érythropoïétique.

Cette hypothèse est étayée par l'obtention récente d'un mutant d'AEV (le ts 34) (107) qui est thermosensible pour le blocage de la différenciation des érythroblastes ; à température non permissive ceux ci se différencient en érythrocytes, ce qui implique un produit viral dans le blocage de la différenciation.

Il est intéressant de constater que tous les DLV agissent en bloquant la différenciation de leur cellule cible ; tous ces virions pourraient être nés par un même processus de recombinaison, soit au niveau de l'ADN, soit au niveau de l'ARN, entre le génome d'un ALV et des gènes cellulaires régulant la différenciation des diverses lignées hématopoïétiques ; introduits dans le système sanguin les produits de ces gènes induiraient spécifiquement des leucémies aiguës, introduits dans d'autres tissus (tissus conjonctif, épithélial...) ils provoqueraient des désordres cellulaires aboutissant à la transformation néoplasique de ceux ci.

Les différentes hypothèses formulées à la suite de ce travail nécessitent d'être approfondies, notamment en caractérisant les séquences spécifiques des autres DLV, et en étudiant leurs propriétés.

Le rôle des séquences AEV spécifiques doit être précisé en recherchant et en créant d'autres mutants d'AEV, ainsi qu'en examinant l'organisation des séquences AEV cellulaires au niveau de l'ADN normal.

De même, l'obtention d'une hybridation non négligeable et spécifique entre le cDNA_{aev} et l'ADN de mammifère nous incite

à tenter de rechercher un taux d'expression accru des séquences AEV cellulaires dans l'ARN des érythroblastes humains provenant de malades atteints de leucémie érythroblastique aigue.

Ces maladies très rares, s'apparentent en effet étroitement aux érythroblastoses aviaires dans l'expression de leur pathologie et, si les séquences AEV cellulaires sont responsables du blocage de la différenciation des érythroblastes en érythrocytes, il doit exister un taux d'expression accru de l'ARN messenger des séquences AEV cellulaires, détectable à l'aide de notre cDNA_{aev}.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Encyclopedie Medico chirurgicale : Sang, organes hematopoitiques .
Vol 2 (Paris)
- 2 - TOOZE, J. (1973). The molécular biology of tumor viruses.
Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, ed), pp 502-699
- 3 - COOPER, M.D., PURCHASE, H.G., BOCKMAN, D.E. and GATHINGS, W.E (1974).
J. Immunol. 113 : 1210-1222
- 4 - GRAF, T. and BEUG, H. (1978). Biochimica et Biophysica Acta. 516 : 269-299.
- 5 - GRAF, T., ROYER-POKORA, B., SCHUBERT, G.E. and BEUG, H. (1976).
Virology 71 : 423-433.
- 6 - ISHIZAKI, R., LANGLOIS, A.J., CHABOT, J. and BEARD, J.W. (1971).
J; Virol. 8 : 821-827.
- 7 - GRAF, T., ROYER-POKORA, B., MEYER-GLAUNER, W., CLAVIEZ, M., GOTZ, E. and BEUG, H.
(1977). Virology. 83 : 96-109.
- 8 - HU, S.S.F. and VOGT, P.K. (1979). Virology 92 : 278-284.
- 9 - MOSCOVICI, C., ALEXANDER, R.W., MOSCOVICI, M.G. and VOGT, P.K. (1977) in avian
RNA Tumor Viruses (BARLATI, S and DE GIULI, C ed).
Piccin editore Padua Italy. pp 45-56.
- 10 - BISTER, K., HAYMAN, M. and VOGT, P.K. (1977)
Virology 82 : 431-448.
- 11 - GRAF, T. (1975) Z - Naturforsch 30 c : 847-849.
- 12 - GRAF, T., BEUG, H., ROYER-POKORA, B., and MEYER-GLAUNER, W. (1978). in differentiation
of normal and neoplastic hematopoietic Cell (CLARCKSON B, MARKS PA). (in press).
- 13 - GAZZOLO, L., SAMARUT, J., MOSCOVICI, C., MOSCOVICI, M.G., and QUASH, G. (1977)
in avian RNA Tumor Viruses (Barlati, S. and DE GIULI, C. ed)
Piccin editore Padua, Italy pp 35-44.
- 14 - GAZZOLO, L., MOSCOVICI, C. and MOSCOVICI, M.G. (1979)
Cell 16 : 627-638
- 15 - MARTIN, G.S. (1970) Nature 227 : 1021-1023
- 16 - MARTIN, G.S., DUESBERG, P.H. (1972). Virology 47 : 494-497
- 17 - WYKE, J.A., BELL, J.G. and BEAMAND, J.A. (1975). Cold Spring Harbor Symposium
on quantitative Biology (Cold Spring Harbor ed). vol 39 pp 897-905.

- 18 - STEHELIN,D., GUNTAKA,R.V., VARMUS,H.E. and BISHOP,J.M. (1976a)
J.Mol.Biol. 101 : 349-365
- 19 - DUESBERG,P., BISTER,K. and VOGT,P.K. (1977)
Proc.Nat.Acad. Sci.(U.S.A.) 74 : 4320-4324
- 20 - STEHELIN,D. and GRAF,T. (1978) Cell 13 : 745-750.
- 21 - ROYER-POKORA,B., BEUG,H., CLAVIEZ,M., WINKHARDT,H.J., FRIIS,R.R. and GRAF,T.
(1978) Cell 13 : 751-760.
- 22 - EDELMAN,G.E. and YAHARA,J. (1976) Proc. Nat. Acad Sci (U.S.A.) 73 : 2047-2051.
- 23 - HYNES,R.O. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci (U.S.A.) 70 : 3170-3174
- 24 - VAHERI,A., KESKI-OJA,J., KANKIO,S., SAKSELA,O. VARTIO,T (1977) in Avian
RNA Tumor Viruses (S.BARLATI and D.De GIULI ed)
Piccin editore, Pavia, Italy pp 305-317.
- 25 - HATANAKA,M. (1974) Biochimica et Biophysica Acta 355 : 77-104
- 26 - FRIIS,R.R., SCHWARTZ,R.T. and SCHMIDT,M.F. (1977)
Med.Microbio. Immunol. 164 : 155-165.
- 27 - LANGLOIS,A.J., SANKARAN,S., HSIUNG,P.L. and BEARD,J.U. (1967)
J. Virol. 1 : 1082-1084.
- 28 - VOGT,P.K., BISTER,K., HU,S., MOSCOVICI,C. and DUESBERG, P. (1977) in Avian
RNA Tumors Viruses (BARLATI,S and DE GIULI,C. ed)
Piccin editore Pavia Italy. pp :
- 29 - PAYNE,L.N. and BIGGS,R. (1970) J. Gen. Virol. 7 : 177-185.
- 30 - OKER-BLOM,N., HORTLING,L., KALLIO,A., NURMIAHO,.and WESTERMARCK,H. (1978)
J. Gen. Virol. 40 : 623-634.
- 31 - OKER-BLOM,N., KALLIO,A. and HORTLING,L. (1975)
Intervirology. 5; 342-353.
- 32 - HAYMAN,M.J., BISTER,K., VOGT,P.K., ROYER-POKORA,B; and GRAF,T. (1977) in Avian
RNA Tumor Viruses (BARLATI,S and DE GIULI,C ed) Piccin editore Pavia Italy.
pp : 214-226
- 33 - KING,A.M.Q., and WELLS,R.D. (1976) J. Biol. Chem. 251 : 150-152.

- 34 - JUNGHANS, R.P., HU, S., KNIGHT, C.A. and DAVIDSON, N. (1977). Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 74 : 477-481.
- 35 - VOGT, P.K. (1977) The genetics of RNA Tumor viruses. In comprehensive Virology 9 : 341-455. Edited by Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner. New York : Plenum Press.
- 36 - BISHOP, J.M. (1978). Retroviruses. Annual Review of Biochemistry 47 : 35-88.
- 37 - WEISS, R.A. (1976) Receptors for RNA tumor viruses (Beers, R.F. and Nasset, E.G. ed. Miles international symposiums series N°9 pp 237-251.
- 38 - BALTIMORE, D. (1975) Cold Spring Harbor in quantitative Biology (Cold Spring Harbor Laboratory ed) vol 39 pp 1187-1200
- 39 - WANG, L.H., DUESBERG, P., MELON, P. and VOGT, P.K. (1976a). Proc. Nat. Acad. Sci (U.S.A.) 73 : 1073-1077.
- 40 - WANG, L.H., GALEHOUSE, D., MELON, P., DUESBERG, P., MASON, W.S and VOGT, P.K. (1976b). Proc. Nat. Acad. Sci (U.S.A.) 73 : 3952-3956.
- 41 - WANG, L.H., DUESBERG, P., BEEMAN, K. and VOGT, P.K. (1975). J. Virol. 16 : 1051-1070.
- 42 - HAYWARD, W.S. (1977). J. Virol. 24 : 47-63.
- 43 - BISHOP, J.M., WEISS, S.R., OPPERMANN, H., HACKETT, P. QUINTRELL, N., CHEN, L.S., LEVINTOW, L and VARMUS, H.E. (1977) in Avian RNA Tumor Viruses (BARLATI, S. and DE GIULI, C ed) Piccin Editore Pavia, Italy, pp 181-189.
- 44 - WEISS, S.R., VARMUS, H.E. and BISHOP, J.M. (1977) Cell 12 : 983-992.
- 45 - COFFIN, J.M. (1979) J. Gen. Virol. 42 : 1-26.
- 46 - VOGT, P.K., EISENMAN, R. and DIGGELMAN, H. (1975). J. Mol. Biol. 96 : 471-493.
- 47 - SHAPIRO, S.Z., STRAND, M. and AUGUST, J.T. (1976) J. Mol. Biol. 107 : 459-477.
- 48 - HELM, K.C.D. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci (U.S.A.) 74 : 911-915.
- 49 - TEMIN, H. and MITZUTANI, S (1970) Nature 226 : 1211-1213.
- 50 - OPPERMANN, H., BISHOP, J.M., VARMUS, H.E. and LEVINTOW, L. (1977) Cell 12 : 993-1005.

- 51 - FARAS,A.J., TAYLOR,J.M., McDONNELL,J.P., LEVINSON, W.E. and BISHOP,J.M. (1972)
Biochem. 11 : 2334-2342.
- 52 - DUESBERG,P., HELM,K. and CANAANI,E. (1971). Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 68 :
747-751.
- 53 - TEMIN,H.M. and BALTIMORE,D. (1972) Advances in virus research 17 : 129-185.
- 54 - VARMUS,H.E., HENSLEY,S., KUNG,H.J., OPPERMANN,H., SMITH,V.C., BISHOP,J.M. and
SHANK, P.K. (1978). J. Mol. Biol. 120 : 55-82.
- 55 - DIGGELMANN,H. and KLEMENTZ,R. (1977) in Avian RNA Tumor Viruses (BARLATI,S.
DE GIULI,C. ed) Piccin editore Pavia, Italy, pp 191-208.
- 56 - DUESBERG,P., KAWAI,S., WANG,L.H., VOGT,P.K., MURPHY,H.M., and HANAFUSA,H. (1975).
Proc. Nat. Acad. Sci (U.S.A.) 72 : 1569-1573.
- 57 - SCHEELE,C and HANAFUSA,H. (1971). Virology 45 : 401-410.
- 58 - HANAFUSA,H and HANAFUSA,T. (1968) Virology 34 : 630-636.
- 59 - DUFF,R.G. and VOGT,P.K. (1969). Virology 39 : 18-30
- 60 - HANAFUSA,T., HANAFUSA,H. and MIYAMOTO,T. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci (U.S.A.)
67 : 1797-1803
- 61 - FUJITA,D.J., CHEN,Y.C., FRIIS,R.R. and VOGT,P.K. (1974).
Virology. 60 : 558-571.
- 62 - BISTER,K. and VOGT,P.K. (1978). Virology. 88 : 213-221.
- 63 - TEMIN,H.M. (1971) Ann. Rev Microbiol. 25 : 609-648.
- 64 - BRUGGE,J.S. and ERIKSON,R.L. (1977) Nature 269 : 346-348.
- 65 - COLETT,M.S. and ERIKSON,R.L. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci (U.S.A.) 75 : 2021-2024.
- 66 - BEEMAN,K. and HUNTER,T (1978) J.Virol 28 : 551-566.
- 67 - ERIKSON,E., COLETT,M.S. and ERIKSON,R.L. (1978) Nature 274 : 919-921.
- 68 - STEHELIN,D., VARMUS,H.E., BISHOP,J.M. and VOGT,P.K. (1976b).
Nature 260 : 170-173.
- 69 - STEHELIN,D., ROUSSEL,M. and GARDES,M (1977) in Avian RNA Tumor Viruses
(BARLATI,S and DE GIULI,C ed). Piccin editore Pavia Italy pp : 134-144
- 70 - SPECTOR,D.H., VARMUS,H.E. and BISHOP,J.M. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci (U.S.A.)
75 : 4012-4106.

- 71 - ROUSSEL, M. Thèse de Doctorat de 3ème cycle. N° d'ordre : 675 USIL I. (1977).
- 72 - SPECTOR, D.H., SMITH, K., PADGETT, T., McCOMBE, P., ROULLAND-DUSSOIX, D., MOSCOVICI, C., VARMUS, H.E. and BISHOP, J.M. (1978a) Cell 13 : 371-379.
- 73 - SPECTOR, D.H., BAKER, B., VARMUS, H.E. and BISHOP, J.M. (1978b) Cell 13 : 381-386.
- 74 - COLETTI, M.S., BRUGGE, J.S. and ERIKSON, R.L. (1978) Cell 15 : 1363-1369.
- 75 - TEMIN, H.M. (1974) Cancer Res. 34 : 2835-2841.
- 76 - HUEBNER, R.J. and TODARO, G.J. (1969). Proc. Nat. Acad. Sci (U.S.A.) 64 : 1087-1094.
- 77 - FRISBY, D., WEISS, R., ROUSSEL, M and STEHELIN, D. (1979) Cell 17 : 623-634.
- 78 - DUESBERG, P., VOGT, P.K., BISTER, K., TOXLER, D. and SCOLNICK, E.M. (1977) in Avian RNA Tumor Viruses (BARLATI, S and DE GIULI, C ed) Piccin editore Pavia Italy pp : 95-111
- 79 - DUESBERG, P., BISTER, K. and VOGT, P.K. (1977). Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 74 : 4320-4324.
- 80 - SHEINESS, D., FANSHIER, L. and BISHOP, J.M. (1978). J. Virol. 28 : 600-610.
- 81 - HU, S.S.F., LAI, M.M.C. and VOGT, P.K. (1979). Proc. Nat. Acad. Sci (U.S.A.) 76 : 1265-1268.
- 82 - TOYOSHIMA, K. and VOGT, P.K. (1969) Virology 38 : 414-426.
- 83 - RUIGOLD, G., LASFARGUE, E.Y., BISHOP, J.M. and VARMUS, H.E. (1975) Virology 65 : 135
- 84 - QUINTRELL, N., VARMUS, H.E., BISHOP, J.M., NICHOLSON, M.O. and Mc ALLISTER, R.M. (1974). Virology 58 : 568-575
- 85 - BISHOP, J.M., LEVINSON, W.E., SULLIVAN, D., FANSHIER, L., QUINTRELL, N. and JACKSON, J. (1970b). Virology 42 : 927-937
- 86 - WARBURG, O. and CHRISTIAN, W. (1941) Biochem. Z. 310 : 384-390.
- 87 - VARMUS, H.E., QUINTRELL, N., NOVINSKI, R., MEDEIROS, E., SARKAR, N. and BISHOP, J.M. (1973) J. Mol. Biol 79 : 663-679.
- 88 - TAYLOR, J.M., ILLMENSEE, R. and SUMMERS, J. (1976) Biochim. Biophys Acta 442 : 324-330.

- 89 - GOULIAN, M., GOULIAN, S.H., CODD, E.E. and BLUMENFIELD, A.Z. (1973). *Biochemistry* 15 : 2893-2901.
- 90 - GARAPIN, A.C., VARMUS, H.E., FARAS, A.J., LEVINSON, W.E. and BISHOP, J.M. (1973) *Virology* 52 : 264-274.
- 91 - FRIEDRICH, R., LUNG, H.J., BAKER, B., VARMUS, H.E., GOODMAN, H.M. and BISHOP, J.M. (1977) *Virology* 79 : 198-215.
- 92 - TAL, J., FUJITA, D.J., KAWAI, S., VARMUS, H.E. and BISHOP, J.M. *J. Virol.* 21 (1978) 667-676.
- 93 - FANSHIER, L., GARAPIN, A.C., McDONNELL, J., FARAS, A., LEVINSON, W and BISHOP, J.M. (1971) *J. Virol* 7 : 77-86.
- 94 - REITZ, M.S.JR., ALPELL, J.W., TRAINOR, C.D. and GALLO, R.C. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49 : 30-38
- 95 - SUTTON, W.D. (1971). *Biochimica and Biophysica Acta* 240 : 522-531.
- 96 - HOOD, E.L., WILSON, H.J. and WOOD, B.W. (1975) *Molecular Biology of Eucaryotic Cells* (W.A. BENJAMINS, Inc) pp 55-62 and 192-200.
- 97 - WEJTMUR, J.G. and DAVIDSON, W. (1968) *J. Mol. Biol.* 31 : 349-370.
- 98 - LEONG, J.A., GARAPIN, A.C., JACKSON, N., FANSHIER, L., LEVINSON, W.E. and BISHOP, J.M. (1972) *J. Virol.* 9 : 891-902.
- 99 - SUTTON, W.D. (1971) *Biochimie Biophysique Acta* 240 : 522-531.
- 100 - STOLL, E., BILLETTER, M.A., PALMENBERG, A and WEISSMANN, C. (1977) *Cell* 12 : 57-72.
- 101 - YOUNG, B.D., HARRISON, P.R., GILMOUR, R.S., BIRMIE, G.D., ANNAHELL, S., HUMPHRIES, S. and PAUL, J. (1974) *J. Mol. Biol* 84 : 555-568.
- 102 - TAL, J., KUNG, H.J., VARMUS, H.E. and BISHOP, J.M. (1977) *J. Virol* 21 : 497-505
- 103 - HU, S.S.F., LAI, M.M.C. and VOGT, P.K. (1978) *J. Virol* 27 : 667-672.
- 104 - BRITTEN, R. and KOHN, D.E. (1968) *Science* 161 : 529-540
- 105 - MCCARTHY, B.J. and FARGUHAR, M.N. (1972) in *evolution of genetic systems*, (SMITH, M.N. ed) Garden and Breach, New York ppl-43

- 106 - BONNER, T.J., BRENNER, D.J., NEUFELD, B.R. and BRITTEN, R.J. (1973)
J. Mol. Biol 81 : 123-135.
- 107 - GRAF, T., ADE, N. and BEUG, H. (1978) Nature 257 : 496-498.
- 108 - LAI, M.M.C., HU, S.S.F. and VOGT, P.K. (1979) Virology 97 : 366-377.

Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation

M. Roussel, S. Saule, C. Lagrou, C. Rommens, H. Beug*, T. Graf* & D. Stehelin†

INSERM, Oncologie Moléculaire, Institut Pasteur de Lille, 15 rue C. Guérin F 59000 Lille, France

*Institut für Virusforschung, Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 280, D6900 Heidelberg, FRG

The RNAs of seven replication-defective leukaemia virus (DLV) strains contain three types of unique sequences, which correlate with the capacity of a given virus strain to transform erythroblasts, macrophage-like cells and myeloblasts, respectively. These sequences, termed erb, mac and myb, have their counterparts in the normal DNA of avian and mammalian species. Our results indicate that DLVs represent recombinants between a common 'vector' related to a chicken endogenous virus and one of three types of cellular gene possibly involved in haematopoietic differentiation.

ON the basis of their oncogenic properties, avian retroviruses are assigned to either of two major classes. Of many characterised natural field isolates, most (non-defective avian leukaemia viruses, or ALVs) are 'weakly oncogenic' and cause predominantly lymphatic leukaemia after a latency period of months to years following inoculation into susceptible strains of chickens. The ALVs most frequently occur as independent agents containing all the genetic information required for viral replication. In contrast, several avian retroviruses are highly oncogenic, causing disease after a latency period of days to weeks. These include the replication-competent avian sarcoma viruses (ASVs, or Rous sarcoma viruses) which readily induce sarcomas in susceptible birds and transform fibroblasts *in vitro*,

and also the replication-defective leukaemia viruses (DLVs) which require helper ALVs for propagation in cultured cells (for review, see ref. 1).

The seven available independent isolates of DLVs have been assigned to three subgroups based on the types of neoplasm they induce and on the differentiation phenotypes of haematopoietic cells they transform *in vitro*^{1,2}. (1) The avian erythroblastosis-type viruses (AEV strains R and ES4 are probably identical³) induce erythroblastosis *in vivo* and transform erythroblasts *in vitro*. (2) The avian myelocytomatosis-type viruses (MC29, CMII, OK10 and MH2) transform macrophage-like cells *in vitro* and some strains induce myelocytomatosis *in vivo*. (3) The avian myeloblastosis-type viruses (AMV and E26) induce myeloblastosis *in vivo* and transform myeloblasts *in vitro*. AEV can also induce sarcomas and transform fibroblasts *in vitro*, and MC29-type viruses can induce carcinomas and occasional sarcomas and transform epithelial cells and fibroblasts *in vitro*^{1,2}. In this report we have investigated whether the oncogenicity of these viruses could be related to the presence of specific nucleotide sequences in their genome. Such a relationship would imply that part or all of these specific sequences represent new viral oncogenes.

DLVs are related to non-defective avian leukaemia viruses

DLVs were originally isolated from chickens in association with their natural replication-competent helper viruses belonging to the ALV group. Attempts to complement DLVs with helpers unrelated to ALVs have failed⁴. A possible homology between certain genomic sequences of the DLVs and ALV genes⁵⁻⁷ was

† To whom correspondence should be addressed.

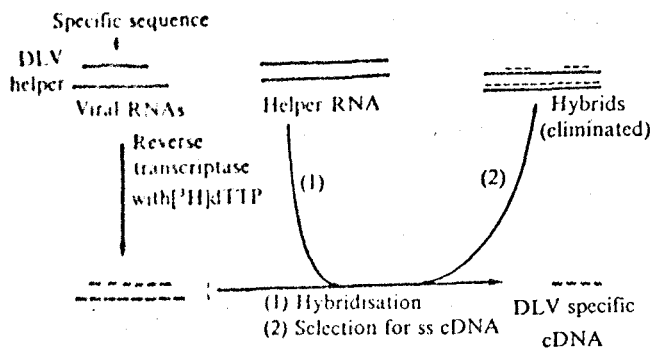


Fig. 1 Scheme for the preparation of DLV-specific cDNAs. Cloned AEV (RAV-2) and MC29 (RAV-2) pseudotypes, obtained by rescuing these viruses with RAV-2 from cloned non-producer fibroblasts, were propagated in chicken fibroblasts. Viral RNAs were extracted from the pelleted viruses, then transcribed into labelled cDNA using *in vitro* reverse transcription with purified AMV reverse transcriptase, ³H-dTTP and unlabelled dCTP, dGTP, dATP and calf thymus priming. In a negative selection step each cDNA mixture was hybridised to an excess of RNA extracted from RAV-2 grown separately. Single-stranded DLV-specific cDNAs were then isolated after fractionation on hydroxyapatite. AMV-specific cDNA was prepared in a similar way, but using RNA of AMV (helper) pseudotype obtained from the plasma of infected chickens, and a mixture of ALV helper RNAs extracted from RAV-1, RAV-2 and MAV-2 (0) viruses for the selection. Non-hybridisable radioactivity was eliminated from the cDNAs by a positive selection with homologous RNAs⁸ (not shown). Specific activities of the ³H-cDNAs were ~ 50 × 10⁶ c.p.m. per μg. Details of these experiments will be described elsewhere.

investigated by testing clones of avian cells containing the DLV provirus without its helper. Such cells, usually unable to produce virus⁶, still contain several RNA transcripts of the DLV provirus. We tested whole RNA of such nonproducer cells, using molecular hybridisation with labelled probes representing a homogeneous transcript of an ALV, td Pr-B (cDNArep), or of the *src* gene of ASVs (cDNAsarc)⁸. Table 1 indicates that all the DLV genomes tested contain ALV-related nucleotide sequences in different amounts (28–77%), but lack the *src* gene of ASV^{9,10}. However, the detected homology to ALV cannot account for the entire genetic content of the DLVs, which all contain 6,000–8,000 nucleotides in their 28–34S genome^{11,12}. Thus, these viruses may contain sets of nucleotide sequences unrelated to ALVs.

DLV-specific sequences

We looked for specific sequences by analysing the prototype strain of each of the three DLV subgroups, namely AEV, MC29 and AMV. Clone viral strains were obtained for AEV and MC29 by superinfection of nonproducer cells with the plaque-purified helper virus RAV-2. The rescued viruses were then tested for their oncogenic potential *in vitro* (using the bone marrow transformation assay²) and propagated in chicken erythroblasts (for AEV) or chicken fibroblasts (for MC29). AMV was obtained in high yields from the plasma of infected chickens.

The preparation of specific cDNAs of these viruses (Fig. 1) was similar to the selection of cDNA specific for the *src* gene of ASVs⁸. cDNAs of AEV, MC29 and AMV were selected so that they could still hybridise to their RNAs of origin, but not to the RNA of the helper viruses used to grow the viral stocks or any of the other ALVs tested. These specific cDNAs were denoted cDNA_{aev} for AEV, cDNA_{mc29} for MC29 (ref. 13) and cDNA_{amv} for AMV.

The distribution of viral nucleotide sequences related to these specific cDNAs was explored by hybridising them at plateau *C_t*

Table 1 DLV genomes in nonproducer cells are related to ALVs

DLV strain	Type of nonproducer cell	Annealing (% S ₁ resistance) with	
		cDNA _{rep}	cDNA _{sarc}
AEV	chicken fibroblast	28	<3
MC29	quail fibroblast	45	<3
CMII	quail fibroblast	41	<3
OK10	quail fibroblast	77	<3
MH2	quail fibroblast	32	<3
AMV	chicken myeloblast	50	<3
E26	chicken myeloblast	36	<3

Total RNA was extracted from the different avian nonproducer cells and hybridised in stringent conditions (25-μl aliquot containing 1–10 mg ml⁻¹ RNA, 0.6 M NaCl, 68 °C) with cDNAs (1,000 c.p.m. per point = 0.02 ng) to plateau *C_t* values (defined as 10 × the *C_t*_{1/2}). cDNA_{rep} and cDNA_{sarc} were prepared as described earlier³, but using calf thymus-primed polymerase reactions¹⁴. Hybrids were assayed by S₁ nuclease. No correction for the expression of endogenous RAV-O or cellular sarc was made as they gave values below 3% in each case.

values to several viral RNAs. The results (Table 2) allow several conclusions to be drawn. First, the cDNAs tested are specific for the DLVs used for their preparation. Second, they represent distinct sets of sequences, unrelated to each other by cross-hybridisation experiments, and third, cDNA_{mc29} shows extensive homology to RNA of CMII, OK10 and MH2, as does cDNA_{amv} to E26 RNA. As will be described elsewhere, the three cDNAs exhibited exactly the same specificity when tested with cellular RNAs extracted from nonproducer cells, further demonstrating that the probes indeed detect sequences specific for the three types of DLV.

To investigate the origin of the DLV-specific sequences, DNA extracted from normal avian cells was tested for its ability

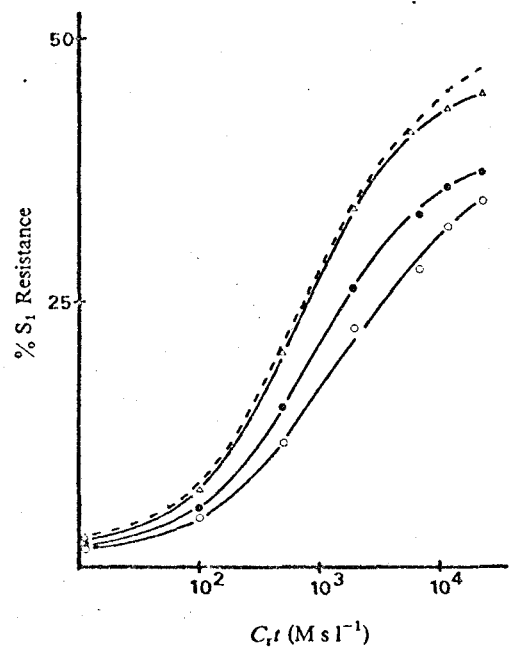


Fig. 2 DLV-specific sequences have their counterparts in normal chicken DNA. Aliquots of 11-day chicken embryo DNA (200 μg per point, sheared to 4–6S) were hybridised with the different specific cDNAs (1,000 c.p.m. per point = 0.02 ng) in stringent conditions (0.6 M NaCl, 68 °C) at increasing *C_t* values. Hybrids formed were tested for their resistance to S₁ endonuclease. ●—●, cDNA_{aev}; Δ—Δ, cDNA_{mc29}; ○—○, cDNA_{amv}; ----, cDNA_{sarc}. Similar results were obtained with normal quail embryo DNA (not shown).

Table 2 DLVs contain unique nucleotide sequences

RNA derived from	Annealing (% S ₁ resistance) with		
	cDNA _{aev}	cDNA _{mc29}	cDNA _{amv}
AEV	100	<3	<3
MC29	<3	100	<3
CMII	<3	96	<3
OK10	<3	91	<3
MH2	<3	66	<3
AMV	<3	<3	100
E26	<3	<3	68
ALV helpers (control)	<3	<3	<3

Viral 50-70S RNAs were extracted and hybridised to plateau C_{ot} values ($> 10 \text{ M s l}^{-1}$) in stringent conditions (0.6 M NaCl, 68 °C) with the specific cDNAs (1,000 c.p.m. per point = 0.02 ng). The hybrids formed were tested for S₁ nuclease resistance. Results obtained were standardised to the values of the homologous reaction. Maximum hybridisation of cDNA_{aev} with AEV RNA was 95%; that of cDNA_{mc29} with MC29 RNA 90% and that of cDNA_{amv} with AMV RNA 95%. The DLVs tested were cloned pseudotypes with RAV-1 or RAV-2 helper ALV, with the exception of AMV and E26, which were not cloned. The ALV helper RNAs tested as controls were obtained from RAV-1, RAV-2, RAV-49, RAV-50, MAV-2 (0). The numbers boxed indicate the important homologies.

to hybridise with cDNA_{aev}, cDNA_{mc29} and cDNA_{amv}. Figure 2 shows that all three types of sequences have their counterparts in normal cellular chicken DNA and, as judged from the $C_{ot}_{1/2}$ values, that they are present in the non-repetitive DNA at one or two copies each per haploid genome. The low plateau values observed in Fig. 2 are due to the competition of DNA reassociation with the DNA-cDNA hybridisation reaction; transcription analyses (see below) show that most or all of the specific sequences are present in normal chicken DNA. Results obtained with molecular hybridisation in liquid phase in stringent conditions show that the bulk of the non-repetitive chicken DNA sequences have been lost relatively rapidly during evolution: labelled chicken unique sequence DNA barely anneals (Fig. 3) to the DNA of species from another genus. For example, quail and chicken, which probably evolved from a common ancestor some 20-40 Myr ago, have DNAs that share less than 25% homology when cross-hybridised (Fig. 3). Similarly, ALV-related 'virogene' sequences have recently been shown to be absent in some species of the Galliformes¹⁴. In contrast, cellular sequences related to cDNA_{aev}, cDNA_{mc29} and cDNA_{amv} have been highly conserved throughout the phylogeny of the higher vertebrates. As also shown in Fig. 3, their 'evolutionary half lives' are comparable to those of known stable genes such as globin or ovalbumin. The latter values resemble those obtained earlier for the transforming gene *src* of ASVs¹⁵⁻¹⁷ and agree with the results recently described for MC29 by Sheiness *et al.*¹⁸.

As normal cells contained nucleotide sequences related to highly transforming viruses, we studied the rate of transcription of such sequences. Total RNA extracted from normal chicken (or quail) fibroblasts was hybridised to the different specific cDNAs. Figure 4 shows that these sequences are all transcribed at a low level (a few copies per cell), as previously found for the expression of "cellular *src*" (refs 16, 19). Cellular sequences related to cDNA_{aev} are transcribed at two or three copies per cell; cellular sequences related to cDNA_{mc29} are reproducibly expressed at a higher level (5-10 copies per cell), as Sheiness *et al.*¹⁸ found. In contrast, cellular sequences related to cDNA_{amv} are transcribed at lower levels in fibroblasts (one copy per cell). As can be seen in Fig. 4, all these cellular sequences reach plateau hybridisation values close to 100%, and must therefore be essentially fully represented in normal cellular nucleic acids.

Three new oncogenes

Our results show that all seven defective leukaemia viruses studied contain part or all of one out of three different sets of specific nucleotide sequences complementary to cDNA_{aev}, cDNA_{mc29} or cDNA_{amv}, which have their counterpart in normal cells of higher vertebrates. None of these sequences is related to the transforming gene *src* of ASVs. Although it is not understood how recombinants between ALV sequences and cellularly derived sequences can acquire oncogenic capacity, several indications favour the hypothesis that three specific transforming genes, termed *erb*, *mac* and *myb*, are detected by cDNA_{aev}, cDNA_{mc29} and cDNA_{amv}, respectively. (1) There is a strict correlation between the presence of *erb*, *mac* or *myb* sequences in a given virus and its selective capacity to generate transformed erythroblasts, macrophage-like cells or myeloblasts^{1,2,20}. (2) The properties of these sequences and their origin are reminiscent of results obtained earlier for the transforming gene *src* of ASVs¹⁵: size, cellular origin and phylogenetic stability^{16,17}. (3) As indicated by heteroduplex mapping studies with MC29 (ref. 21), these sequences do not appear as bits of sequences randomly distributed throughout the viral RNA, but rather as continuous stretches located inside the viral genome. (4) Temperature-sensitive mutants have recently been isolated from AEV, indicating that a virus-coded protein must be synthesised to maintain the undifferentiated state of transformed erythroblasts²². (5) All DLVs tested contain the 5' region of the ALV genome (partial *gag* gene¹²). In the strains studied so far (MC29 and MH2) this region was located adjacent to the DLV-specific sequence^{21,23}. In addition, cells non-productively transformed by AEV, MC29, CMII and MH2 express novel polyproteins of molecular weight 75,000 (ref. 3), 110,000 (refs 6, 7), 90,000 (ref. 7) and 100,000 (ref. 4), respec-

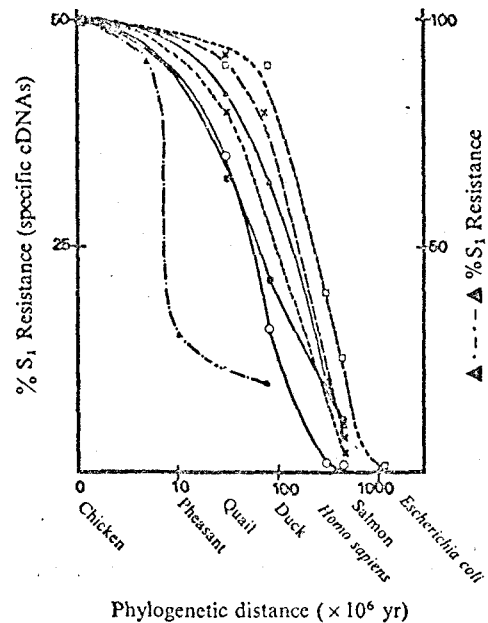


Fig. 3 Stability of cellular DLV-related specific sequences during evolution. Aliquots of DNA extracted from different species having diverged increasingly long ago with speciation were hybridised in the specific conditions described in Fig. 2. The values obtained were standardised arbitrarily, for comparison purposes, to 50% for the chicken, which was also taken as the origin of the scale indicating phylogenetic distance. ○—○, cDNA_{aev}; △—△, cDNA_{mc29}; ○—○, cDNA_{amv}; □—□, cDNAsarc. Also shown (▲—▲) are results obtained with ³H-labelled chicken unique sequence DNA¹⁴ (1,000 c.p.m. per point = 20 ng) in similar conditions (standardised to 100% for homologous reassociation) and with cDNAs representing genes known to be conserved throughout the evolution of vertebrates; ×—×, cDNA_{glo} (ref. 16) for globin; ×—×, cDNA_{ova} (ref. 16) for ovalbumin.

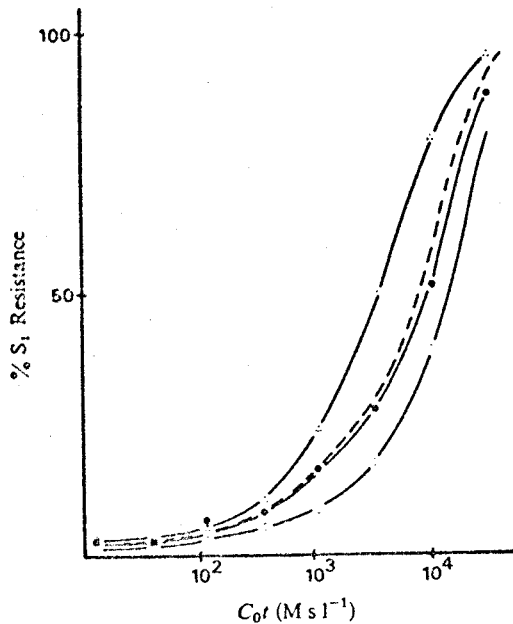


Fig. 4 Transcription of the cellular DLV-related specific sequences in normal fibroblasts. Total RNA was extracted from normal chicken embryo fibroblasts and hybridised at increasing C_{ot} values (varying RNA concentration up to 10 mg ml^{-1}) in stringent conditions (0.6 M NaCl , 68°C), to the specific cDNAs ($1,000 \text{ c.p.m. per point} = 0.02 \text{ ng}$). Hybrids were scored for their S_1 endonuclease resistance. Symbols are as in Fig. 2.

tively, with the structure: partial *gag-x* or *y*, where *x* or *y* represent polypeptide moieties which are antigenically unrelated to known ALV proteins, and presumably correspond to part or all of the specific *erb* or *mac* nucleotide sequences. That these polypeptides could be involved in the transformation process is indicated by the finding that the type of tryptic peptide pattern exhibited by the non-*gag* portion of the polyprotein of a given DLV closely correlates with the transformation specificity of the virus (M. J. Hayman, personal communication, and ref. 24). In their general structure and ability to code for *gag*-related polypeptides, avian DLVs resemble replication-defective mammalian retroviruses capable of inducing leukaemias or sarcomas with a short period of latency, such as the Abelson²⁵ murine virus and feline sarcoma virus^{25,27}.

Avian DLVs behave like recombinants between an ALV-related vector virus of low oncogenicity and unknown origin¹⁴ and an evolutionarily stable set of nucleotide sequences of cellular origin. In this regard they also closely resemble ASVs (for review, see ref. 11). The mechanism of such a recombination remains to be elucidated, but could be related to the jumping polymerase hypothesis proposed recently by Coffin²⁸. How frequently such a recombination occurs is not known, although about 30 DLV-like and 1–3 ASV-like independent isolates have

been reported². However, a transduction of cellular sequences would not necessarily lead to such severe effects as the generation of a highly oncogenic virus and may therefore be much more frequent than anticipated. Indeed, we have recently found in an ASV stock a new virus of unknown oncogenicity containing apparently unknown cellular genetic material (N. Pluquet and D.S., unpublished).

That only a partial homology was observed between the specific sequences of MC29 and MH2 as well as between the specific sequences of AMV and E26 (Table 2) can be explained in three ways—these viruses acquired cellular genes which already differed in their sequences; they acquired the same gene and the observed differences reflect a divergence introduced by passage of the virus; a second recombination event occurred in MH2 and E26. The finding that there are only one or two copies per haploid genome of these genes present in cellular DNA is consistent with the second possibility. The observation that there is a somewhat lower degree of homology of cDNA_{amv} to cellular DNA than that of the other types of specific cDNA tested (Fig. 2) might reflect the long passage history of AMV and would also agree with the second of the above interpretations. But hybridisation experiments between cDNA_{mc29} and MH2 RNA carried out in non-stringent conditions do not show the significant increase of annealing which the second interpretation would predict (M.R., S.S. and D.S., unpublished) and thus leave that question unanswered.

The role of DLVs in leukaemic transformation could be explained by a generalisation of the 'differentiation block' hypothesis^{22,24}: the oncogenes of DLVs are homologous to normal cellular genes ('cellular *erb*, *mac* or *myb*') coding for lineage-specific haematopoietic differentiation proteins; the transforming proteins act by competitively inhibiting the corresponding cellular proteins^{2,17}, thus leading to a block of differentiation and subsequent leukaemogenesis. This hypothesis would predict that RNA sequences corresponding to the cellular *erb*, *mac* and *myb* genes are preferentially expressed in normal erythroblasts, macrophages and myeloblasts, respectively. Spontaneous leukaemogenesis may then simply result from a malfunction of such genes. Indeed, several different genes may be able to induce the same type of leukaemia. In this respect, it would be interesting to know whether there are viruses causing the same type of leukaemia but containing different cell-related oncogenes. Such viruses would also be useful for elucidating why the DLVs also induce sarcomas or carcinomas, an additional specificity for non-haematopoietic tissues difficult to explain by the differentiation block theory.

We thank Drs B. Royer Pokora and K. Bister for providing cells, N. Oker-Blom and L. Gazzolo for OK10 and MH2 viruses, M. Bellard and A. Therwarth for cDNAs of globin and ovalbumin, M. B. Raes for technical assistance, N. Devassine for typing, Drs C. Sherr, R. Marusyk and M. Hayman for helpful corrections and discussions. AMV polymerase, PR-C ASV and chicken plasma were provided through the NCI (Office of Resources and Logistics). This work was supported by INSERM (ASR-1-018 and CRL 77.5.054.2), CNRS (AI, ERA 225), DGRST (77.7.1879) and the Pasteur Institute of Lille.

Received 4 June; accepted 22 August 1979.

- Graf, T. & Beug, H. *Biochim. biophys. Acta* **516**, 269–299 (1978).
- Beug, H. V., Kirchbach, A., Doederlein, G., Conscience, J. F. & Graf, T. *Cell* **18**, 375–390 (1979).
- Hayman, M. J., Royer-Pokora, B. & Graf, T. *Virology* **92**, 31–45 (1979).
- Hu, S. S. F., Moscovici, C. & Vogt, P. K. *Virology* **89**, 162–178 (1978).
- Hu, S. S. F. & Vogt, P. K. *Virology* **92**, 278–284 (1979).
- Bister, K., Hayman, M. J. & Vogt, P. K. *Virology* **82**, 431–448 (1977).
- Hayman, M. J., Kitchener, G. & Graf, T. *Virology* (in the press).
- Stehelin, D., Guntaka, R. V., Varmus, H. E. & Bishop, J. M. *J. molec. Biol.* **101**, 349–365 (1976).
- Stehelin, D. & Graf, T. *Cell* **13**, 745–750 (1978).
- Ducberg, P. H., Vogt, P. K., Bister, K., Troxler, D. & Scolnick, E. M. in *Avian RNA Tumor Viruses* 95–111 (Piccin, Padua, 1978).
- Bishop, J. M. *A. Rev. Biochem.* **47**, 35–88 (1978).
- Stehelin, D. *et al. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* **44** (in the press).
- Shenness, D., Fansher, I. & Bishop, J. M. *J. Virol.* **28**, 600–610 (1978).
- Frosby, D. P., Weiss, R. A., Roussel, M. & Stehelin, D. *Cell* **17**, 623–634 (1979).
- Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M. & Vogt, P. K. *Nature* **260**, 170–173 (1976).

- Stehelin, D., Roussel, M. & Gardes, M. in *Avian RNA Tumor Viruses*, 134–144 (Piccin, Padua, 1978).
- Spector, D. H., Varmus, H. E. & Bishop, J. M. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 4102–4106 (1978).
- Sheiniss, D. & Bishop, J. M. *J. Virol.* **31**, 514–521 (1979).
- Spector, D. H. *et al. Cell* **13**, 371–379 (1978).
- Gazzolo, L., Moscovici, C., Moscovici, M. G. & Samarut, J. *Cell* **16**, 627–638 (1979).
- Hu, S. S. F., Lai, M. M. C. & Vogt, P. K. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 1265–1268 (1979).
- Graf, T., Ade, N. & Beug, H. *Nature* **257**, 496–501 (1978).
- Mellon, P. *et al. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 5874–5878 (1978).
- Graf, T., Beug, H., V. Kirchbach, A. & Hayman, M. J. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* **44** (in the press).
- Witte, O. N., Rosenberg, N., Paskind, M., Shidds, A. & Baltimore, D. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 2488–2492 (1978).
- Stephenson, J. R., Khan, A. S., Sliiski, A. H. & Essex, M. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5608–5612 (1977).
- Sherr, C. J., Sen, A., Todaro, G. J., Sliiski, A. & Essex, M. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 1505–1507 (1978).
- Coffin, J. M. *J. gen. Virol.* **42**, 1–26 (1979).