

N° d'ordre : 547

50376  
1982  
79

50376  
1982  
79

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

THESE

présentée à l'UNIVERSITE de LILLE I

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

option BIOCHIMIE

par

Martine ROUSSEL

**ORIGINE DES VIROGENES ET ONCOGENES  
DES VIRUS DES LEUCEMIES AIGUES AVIAIRES**



soutenue le 13 mai 1982

devant la commission d'examen

MM. J. MONTREUIL

J. KREMBEL

L. GAZZOLO

A. BURNY

D. STEHELIN

SCD LILLE 1



D 030 288738 8

Toute ma reconnaissance va au Docteur Dominique Stéhélin grâce à qui ce travail a été possible : je lui exprime ici ma gratitude pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et s'être toujours montré un directeur patient et amical.

Mes remerciements vont tout particulièrement à Christian Lagrou qui a eu la patience de m'initier à cet art qu'est la culture cellulaire, et à Dominique Leprince et Simon Saule qui m'ont exprimé leur amitié pendant les années passées à travailler au laboratoire.

J'exprime ma sincère reconnaissance à toutes les personnes du laboratoire, et en particulier à Marie-Berthe Raes et Corinne Rommens.

Je suis reconnaissante à Monsieur le Professeur Jean Montreuil d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, ainsi qu'à Messieurs J. Krembel, L. Gazzolo et A. Burny qui ont bien voulu assumer les rôles de rapporteur et examinateurs.

Cette thèse est en partie le résultat de l'effort de plusieurs collaborateurs étrangers avec lesquels j'ai eu un immense plaisir à travailler, les Docteurs Hartmut Beug, David Frisby, Thomas Graf et Michael Hayman.

Mes remerciements vont aussi aux Docteurs Martine Boccara et Hélène Richard-Foy qui ont eu la gentillesse de m'aider à écrire cette thèse pendant mon séjour aux Etats-Unis.

Je voudrais spécialement remercier le Docteur Armand Tavitian qui m'a guidée au cours de la rédaction de ce mémoire.

J'aimerais aussi tout particulièrement remercier le Docteur Michel Boiron qui a été un ami très proche tout au cours de ma carrière scientifique.

Merci à ma mère et à ma soeur, Nicole, qui ont contribué à la réalisation finale de cette thèse.

And Thanks to Chuck, who believes in me as a scientist.

"Pathogenicity is not the rule. Indeed, it occurs so infrequently and involves such a relatively small number of species, considering the huge population of bacteria on earth, that it has a freakish aspect. Disease usually results from inconclusive negotiations for symbiosis, an overstepping of the line by one side or the other, a biologic misinterpretation of borders."

Louis THOMAS

" You know....everybody is ignorant, only on different subjects."

Will ROGERS

PUBLICATIONS : MARTINE ROUSSEL

ANNEE 1981

- 1 - SAULE, S., ROUSSEL, M., LAGROU, C. and STEHELIN, D. (1981)  
Characterization of the oncogene (erb) of Avian Erythroblastosis Virus and it's cellular progenitor.  
J. Virol. 38, 409-419.
- 2 - D. STEHELIN, S. SAULE, D. LEPRINCE, M. ROUSSEL, A. SERGEANT and M. BOCCARA (1982)  
Avian Retroviral Oncogenes and their Cellular Equivalentents. In "Genes and Tumor Genes", (E. Winnacker and H.H. Schoene eds.) Raven Press. New York chap.10  
pp. 87-92.

ANNEE 1980

- 1 - STEHELIN, D., SAULE, S., ROUSSEL, M. and PLUQUET, N. (1980)  
Structure of avian defective leukaemia virus genomes. In "DNA-Recombinations, Interactions and Repair" (S. Zadrazil and J. Sponar eds) Pergamon Press, Oxford and New york, 63 pp. 419-423.
- 2 - FRISBY, D., Mac-CORMICK, R., PENNIES, S., ROUSSEL, M., STEHELIN, D. and WEISS, R. (1980)  
Origin of the endogenous avian retrovirus RAV-0. In "DNA Recombinations, Interactions and Repair" (S. Zadrazil and J. Sponar eds.) Pergamon Press, Oxford and New York, 63 pp. 425-434.
- 3 - STEHELIN, D., SAULE, S., ROUSSEL, M., PLUQUET, N., BOCCARA, M., SERGEANT, A. et LEPRINCE, D. (1980)  
Origine des gènes transformants des rétrovirus aviaires des leucémies aiguës  
C.R. Soc. Biol. 359-369.
- 4 - STEHELIN, D., SAULE, S., ROUSSEL, M., SERGEANT, A., LAGROU, C., ROMMENS, C. and RAES, M.B. (1980)  
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. 44, 1215-1223.

- 5 - STEHELIN, D., ROUSSEL, M. and PLUQUET, N. (1980)  
Genetic content and possible origin of defective avian leukemia retroviruses  
Cold Spring Harbor Conf. on Cell Proliferation 7, 577-585
- 6 - HAYMAN, M.J., RAMSAY, G., KITCHENER, G., GRAF, T., BEUG, H., ROUSSEL, M.,  
SAULE, S. and STEHELIN, D. (1980)  
Cell transformation by avian defective leukemia viruses. Proceedings of the  
Royal Society, UK B 210, 397-409.

#### ANNEE 1979

- 1 - ROUSSEL, M., STEHELIN, D., FRISBY, D. and WEISS, R. (1979)  
The distribution of Endogenous Chicken Retrovirus Sequences in the DNA of  
Galliform Birds. Cell 17, 623-634.
- 2 - ROUSSEL, M., SAULE, S., LAGROU, C., ROMMENS, C., BEUG, H., GRAF, T., and  
STEHELIN, D. (1979)  
DLV<sub>5</sub> : Three new types of viral oncogenes of cell origin specific for  
haematopoietic cell transformation. Nature 281, 452-455.

#### ANNEE 1978

- 1 - STEHELIN, D., ROUSSEL, M. and GARDES, M. (1978)  
The Transforming Gene of Avian Sarcoma Viruses in "Avian RNA Tumor Viruses"  
(S. Barlati and C. de Giuli, eds) Piccin Medical Books, Padova, pp. 134-144.
- 2 - HILL, M., STEDMAN, N., MARIAGE, R., GOUBIN, G., HILLOVA, J. and ROUSSEL, M. (1978)  
Unintegrated Viral DNA in RAV-infected Chicken Cells, in "Avian RNA Tumor  
Viruses" (S. Barlati and C. de Giuli, eds) Medical Books, Padova, pp. 155-177.

TABLE des MATIERES

## I - INTRODUCTION

## A - GENERALITES

1

## B - STRUCTURE des RETROVIRUS

- I. Morphologie des particules virales 2
- II. Composition biochimique 2
- III. Structure du génome viral 3

## C - REPLICATION des VIRUS NON DEFECTIFS

- I. Adsorption et pénétration du virus 5
- II. Synthèse d'ADN viral 5
  - a. Synthèse d'ADN viral linéaire 6
  - b. Circularisation de l'ADN linéaire 8
  - c. Intégration de l'ADN viral 9
- III. Transcription de l'ADN proviral 10
- IV. Traduction de l'ARN messager 11
- V. Assemblage des particules virales 12

## D - POTENTIEL ONCOGENE des VIRUS NON DEFECTIFS

- I. Cellules cibles 13
- II. Défense de l'hôte 14

## E - LES VIRUS ENDOGENES

- I. Les gènes viraux à l'état latent 15
- II. Polymorphisme des loci viraux 17
- III. Transmission des virogènes endogènes 17

## F - LES RETROVIRUS : VECTEURS de GENES CELLULAIRES

- I. Virogènes et oncogènes 19
- II. Le virus sarcomatogène aviaire de Rous (RSV) 20
- III. Les virus sarcomatogènes défectifs pour la réplication 22
- IV. Les virus défectifs des leucémies aiguës 23

## II - RESULTATS

A - PREMIERE PARTIE : ORIGINE et REPARTITION des SEQUENCES  
HOMOLOGUES au VIRUS ENDOGENE RAV-0  
chez les ESPECES de GALLIFORMES

|   |    |
|---|----|
| I. Expression des gènes viraux endogènes chez<br>plusieurs espèces de Galliformes | 25 |
| II. Présence de RAV-0 et Phylogénie des espèces<br>de Galliformes                 | 26 |
| III. Etudes par dénaturation thermique  | 27 |
| IV. Recherche de séquences homologues à RAV-0<br>en conditions non strictes       | 27 |
| V. Détection des séquences RAV-0 par la<br>méthode de Southern                    | 27 |
| VI. Conclusion  | 28 |

B - DEUXIEME PARTIE : MISE en EVIDENCE de TROIS NOUVEAUX  
ONCOGENES chez les VIRUS DEFECTIFS  
des LEUCEMIES AIGUES AVIAIRES

|  |    |
|--|----|
| I. Les DLVs sont apparentés aux ALVs   | 29 |
| II. Les DLVs possèdent des séquences spécifiques                             | 30 |
| III. Taille du génome des DLVs   | 31 |
| IV. Structure du génome des DLVs   | 32 |
| V. Les séquences spécifiques ont une origine cellulaire                      | 32 |
| VI. Les séquences spécifiques sont transcrites dans les<br>cellules normales | 33 |
| VII. Conclusion  | 33 |

## III - DISCUSSION

|                     |    |
|---------------------|----|
| A - PREMIERE PARTIE | 34 |
|---------------------|----|

|                     |    |
|---------------------|----|
| B - DEUXIEME PARTIE | 38 |
|---------------------|----|

|                    |    |
|--------------------|----|
| IV - BIBLIOGRAPHIE | 43 |
|--------------------|----|



Article I

"The distribution of endogenous chicken retrovirus sequences in the DNA of Galliform birds does not coincide with avian phylogenetic relationships"

Article II

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

Article III

"Three new types of viral oncogenes in defective avian leukemia viruses.

I. Specific nucleotide sequences of cellular origin correlate with specific transformation"

Article IV

"The genomes of avian myeloblastosis viruses, AMV and E26 : insertion of related, specific gene sequences at different loci"

N.B. Les "Matériels et Méthodes" n'ont pas été repris en détail dans le texte mais sont décrits amplement dans les articles cités en "Appendix"

INTRODUCTION

## A - GENERALITES

L'isolement du premier virus tumorigène à partir d'un sarcome spontané du poulet par Peyton Rous (1911) marque le début des recherches sur les rétrovirus ou retroviridae. Deux ans auparavant, Ellerman et Bang (1909) rapportaient les résultats d'une transmission réussie de leucémie par injection à des animaux sains d'un filtrat de cellules leucémiques. Ces deux découvertes apportaient la preuve que ces virus étaient responsables de ces affections malignes. Depuis, de nombreux autres rétrovirus ont été isolés chez les oiseaux (Fujinami et Inamoto, 1914) puis chez la souris, le rat, et bien d'autres espèces (Bittner, 1936; Bittner, 1942; Gross, 1951; Friend, 1957; Moloney, 1960; Harvey, 1964; Kirsten et Mayer, 1967; et voir revue par Gross, 1970). Tout comme d'autres agents carcinogènes d'origine chimique ou physique, les rétrovirus sont responsables de tumeurs variées dans de très nombreuses espèces animales. Agents oncogènes extrêmement puissants, les rétrovirus peuvent provoquer des tumeurs solides telles que des sarcomes ou des carcinomes ainsi que de nombreux types de leucémies.

Les retroviridae ont un génôme à ARN diploïde et possèdent la particularité de dépendre d'un intermédiaire ADN pour l'établissement de l'infection et pour leur propagation. Cet ADN, qui s'intègre à l'état double brin dans les chromosomes de l'hôte, est synthétisé à partir du génome viral ARN par une ADN polymérase ARN dépendante appelée polymérase inverse ou rétopolymérase (voir revue par Temin et Baltimore, 1972; Verma, 1977) d'où le nom de rétrovirus.

La famille des rétrovirus se divise en trois groupes comprenant :

(1) les oncovirus représentant la plus grande partie des rétrovirus qui feront l'objet de ce présent mémoire,

(2) les lentivirus ou virus des affections lentes, lytiques en culture de tissu tel que le virus visna du mouton.

(3) les spumavirus parmi lesquels l'on peut classer certains virus de primates. Les spumavirus ne sont pas oncogènes chez l'animal mais forment des syncytiums caractéristiques en culture ("foamy virus").

Les rétrovirus ont fait l'objet de beaucoup d'études ces dix dernières années, car ils représentent un outil de choix pour l'étude des mécanismes de

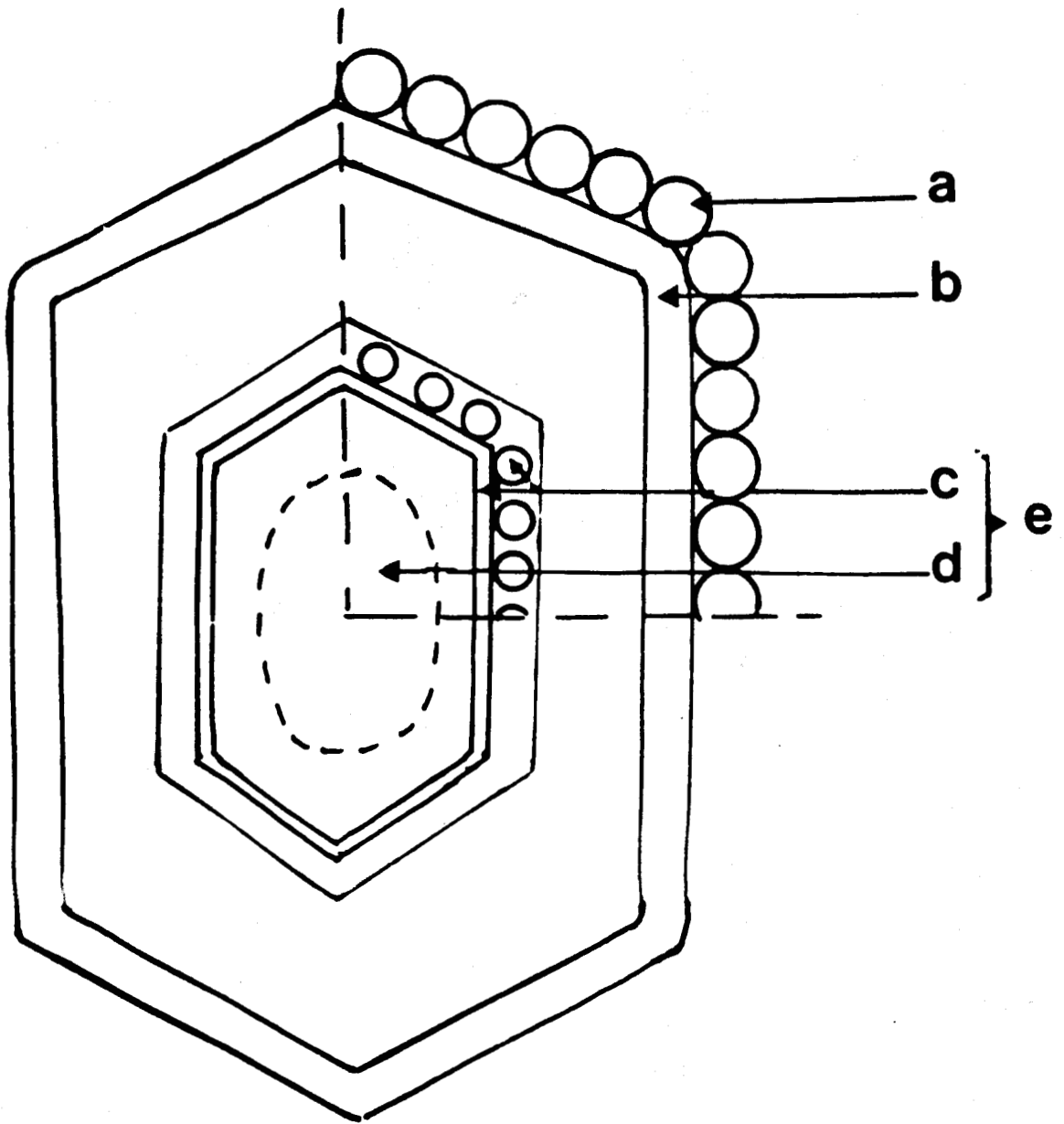


FIGURE 1 : Particule mature de type C.

Schéma d'après des photos de microscopie électronique (d'après Tooze, 1973).  
a - spicules; b - enveloppe d'origine cellulaire; c - nucléocapside ;  
d - nucléoprotéines et noyau; c + d = e, le nucléoïde.



transformation de la cellule. Le virus introduit dans la cellule hôte une information génétique relativement restreinte et il devient de plus en plus évident que le ou les produits codés par le génome viral sont responsables de l'initiation et du maintien de la transformation.

Ainsi, les recherches sur les rétrovirus devraient conduire à une meilleure compréhension des étapes-clés de la formation des leucémies et sarcomes.

## B - STRUCTURE des RETROVIRUS

### I. Morphologie des particules virales.

Au cours de ces vingt dernières années, la structure des rétrovirus a été mise en évidence par les études de microscopie électronique utilisant les coupes fines de cellules (Bernhard, 1960; Chopra et Mason, 1970; Dalton et al, 1974; Todaro et al, 1978), la coloration négative de particules intactes, ou plus récemment, la coloration négative suivie de cryodécapage (Nermut et al, 1972). Le virion possède une structure à peu près sphérique de 80 à 100 millimicrons de diamètre (Sharp et al, 1952; Bernhard, 1960).

Il est composé d'un nucléoïde contenant le génome et est entouré d'une enveloppe lipo-protéique provenant de la membrane externe de la cellule-hôte. L'enveloppe est recouverte à la surface de spicules formées de glycoprotéines responsables de l'infectivité du virus (Tooze, 1973)

(voir Figure 1).

Les oncovirus ont été classés en plusieurs catégories, les particules de type A, B, C, et D en fonction de leur structure et des modalités de leur maturation (Bernhard, 1960; Dalton et al, 1974). Les particules de type C, les plus répandues dans la nature, seront les seules particules traitées dans le mémoire. Elles se forment à la surface des cellules par bourgeonnement de la membrane plasmique. Les nucléoïdes viraux d'abord incomplets se condensent sous la membrane plasmique, puis acquièrent leur forme icosahédrique mature au cours du bourgeonnement. Ainsi, seules les particules libérées dans le milieu possèdent un nucléoïde complet.

### II. Composition biochimique

Tous les rétrovirus ont des propriétés physicochimiques et biochimiques semblables (voir Tooze, 1973). Les particules virales possèdent une densité en gradient isopycnique de saccharose de 1,16 g/ml. Il sont composés d'environ

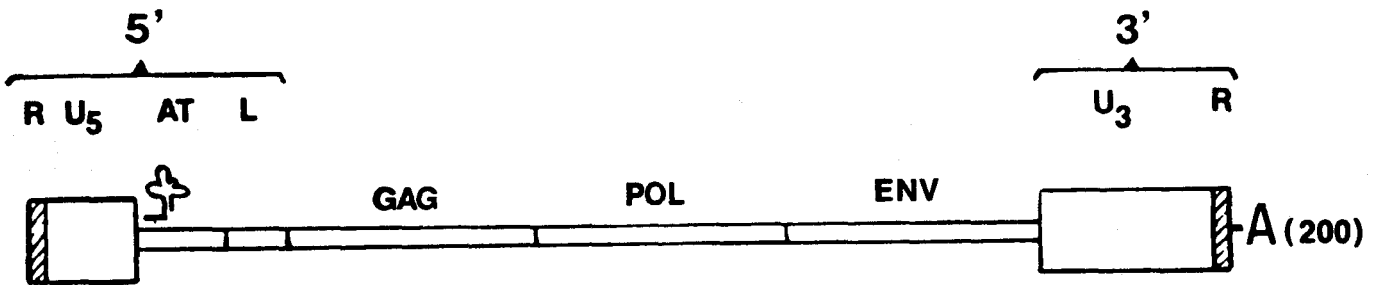


FIGURE 2 : Structure du génome viral

R - sêquence rêpêtitive

U<sub>5</sub> - sêquence unique 5'

AT - site d'attachement du tRNA amorce

L - sêquence "leader"

U<sub>3</sub> - sêquence unique 3'

A<sub>200</sub> - poly A de ~ 200 rêsiduals adênosine

62% de protéines, 30% de lipides, 6% d'hexoses, et d'environ 1% d'ARN (Dalton et al, 1974). Les protéines virales sont représentées par :

(1) Les glycoprotéines d'enveloppe situées à la surface du virion, responsables de l'interaction virus-hôte et essentielles à l'infection.

(2) Les protéines non glycosylées internes donnant au virus sa spécificité antigénique de groupe et formant le noyau de la particule.

(3) La retropolymérase nécessaire à la synthèse d'ADN à partir du génome ARN (voir plus loin).

Les ARNs viraux extraits de virions purifiés comportent une espèce majeure représentant le génome viral (coefficient de sédimentation 70S), de petits ARNs 4-7S, et une faible quantité d'ARN ribosomique 18S et 28S (voir revue par Duesberg, 1970). Le génome viral se caractérise par un complexe d'ARN correspondant à un poids moléculaire de  $8 - 10 \times 10^6$  daltons. Ce complexe est formé de deux sous-unités identiques de 30S-40S, polyadénylées, de poids moléculaire  $3 - 4 \times 10^6$  daltons (Duesberg et al, 1974; Weissman et al, 1974; Baluda et al, 1974), liées entre elles à leur extrémité 5' (Bender et Davidson, 1976).

### III - Structure du génome viral

Le génome viral (voir Figure 2) est composé de trois gènes de structure (voir Baltimore, 1975; et voir revues par Beemon, 1978; et Coffin, 1979) dont l'ordre de lecture de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' est :

5' gag - pol - env - 3'.

Le gène gag code pour les protéines de structure du noyau, le gène pol pour la rétopolymérase, et le gène env pour les glycoprotéines d'enveloppe. Ces trois gènes représentent l'unité répllicative du virus. Chaque sous-unité, en plus des gènes viraux, possède un certain nombre d'éléments de régulation qui semblent indispensables à la réplication et à l'intégration du virus (voir plus loin). Ces éléments régulateurs, localisés aux extrémités 5' et 3' du génome viral, sont les suivants :

(1) L'extrémité 5' du génome peut être divisée en quatre régions fonctionnelles précédant le gène gag qui sont de 5' vers 3' : une séquence répétitive (R), une séquence unique (U5), un site d'attachement de l'ARN de transfert, tRNA (AT), et une séquence "leader" (L). La séquence répétitive

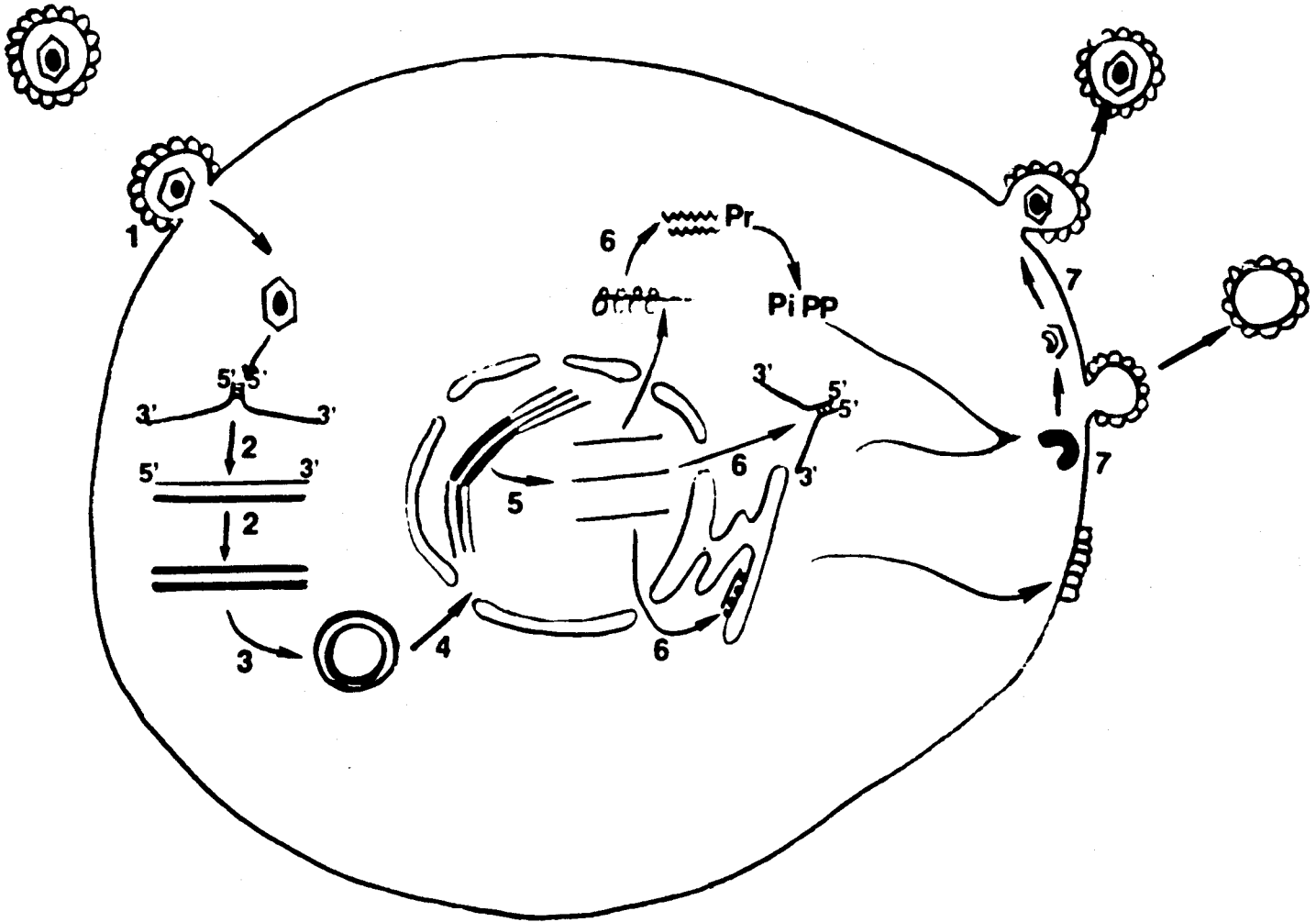


FIGURE 3 : Cycle répliatif des rétrovirus

- 1 - Adsorption et pénétration du virus
- 2 - synthèse d'ADN viral linéaire
- 3 - circularisation de l'ADN viral
- 4 - intégration dans l'ADN de l'hôte
- 5 - transcription de l'ADN proviral
- 6 - traduction de l'ARN messenger
- 7 - assemblage des particules virales.



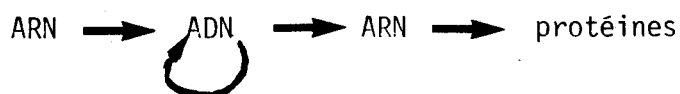
R, d'une longueur estimée à 17 - 21 nucléotides chez les virus aviaires et à 60 - 71 nucléotides chez les virus murins, se retrouve également répétée du côté 3' (Haseltine et al, 1976; Haseltine et al 1977; Schwartz et al, 1977; Coffin et al, 1978). La séquence R possède comme la plupart des ARN messagers d'eucaryotes un groupement méthylé ou "cap" (pour capuchon) de structure  $m^7 5' Gppp 5' Gm$  (Furuichi et al, 1975). La séquence U5, estimée à 101 - 145 nucléotides, est située entre la séquence R et le site d'attachement du tRNA (Van Beveren et al, 1980; Dhar et al, 1980; Ju et Skalka, 1980). La synthèse d'ADN proviral est initiée au niveau du tRNA amorce qui est lié au site AT de 16 - 18 nucléotides de long. Ce tRNA est spécifique pour une espèce virale donnée (par exemple tRNA<sub>pro</sub> pour les virus murins et tRNA<sub>trp</sub> pour les virus aviaires) (Dahlberg et al, 1974; Peters et al, 1977). Du côté 3' du site AT se trouve une séquence (L) d'environ 400 - 1000 nucléotides qui possède les signaux nécessaires à l'épissure de l'ARN.

(2) L'extrémité 3' commence à la fin du gène viral env. Cette région inclut la séquence unique (U3) qui possède les éléments impliqués dans la promotion de la transcription de l'ARN viral à partir de l'ADN proviral. L'ARN viral possède également une séquence poly A de 200-500 résidus ajoutée après maturation de l'ARN en ARN messager (Green et Cartas 1972; Bender et Davidson, 1976). Schématiquement, le génome viral peut être représenté ainsi :

5' - pm<sup>7</sup><sub>G</sub> - R - U5 - AT - L - gag - pol - env - U3 - poly A - 3'

### C - REPLICATION des VIRUS NON DEFECTIFS

Les rétrovirus s'associent de façon stable à la cellule, l'utilisent pour se multiplier et produire constamment des virions sans pour autant tuer les cellules qu'ils infectent (voir revue par Coffin, 1979). La réplication virale peut se schématiser ainsi :



La première étape est réalisée par la rétropolymérase codée et portée par le virion. L'ADN viral synthétisé s'intègre de façon covalente à l'ADN de la cellule hôte à l'état de provirus. La transcription en ARN viral est effectuée par les enzymes de la cellule hôte, responsables de l'expression des gènes cellulaires. Le cycle répliatif peut être ainsi séparé en deux phases principales (voir Figure 3) :

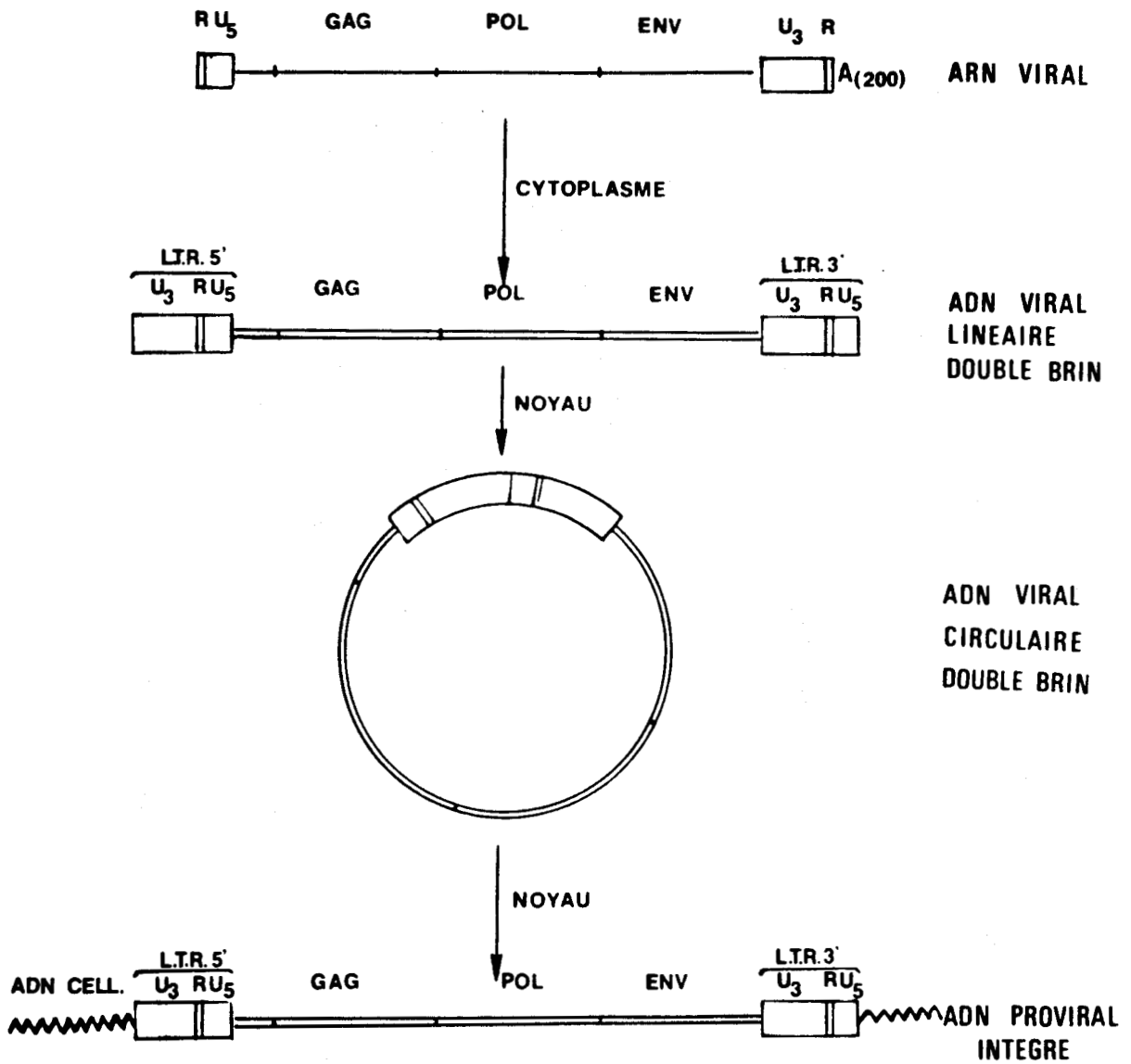


FIGURE 4 : Etapes de la synthèse d'ADN viral



(1) Adsorption et pénétration dans la cellule hôte (étape 1),  
synthèse d'une copie double brin d'ADN viral à partir de l'ARN viral (étape 2),  
intégration du provirus (étape 3), et

(2) transcription de l'information génétique virale (étape 4),  
synthèse des polypeptides viraux (étape 5), et formation des particules virales  
(étape 6).

## I - Adsorption et pénétration du virus

L'attachement du virion à la cellule est la première étape du cycle d'infection.  
La reconnaissance virus-cellule a lieu entre les glycoprotéines d'enveloppe  
à la surface des virions et les récepteurs membranaires cellulaires.

Lorsque les cellules ne possèdent pas le récepteur spécifique, la cellule ne  
peut pas être infectée (voir Tooze, 1973). Bien que la nature biochimique des  
récepteurs soit mal connue, les techniques génétiques d'hybridation de cellules  
somatiques ont permis d'identifier et de localiser sur différents chromosomes  
de l'hôte les gènes codant pour ces molécules (Gazdar et al, 1974; Gazdar et al,  
1977; Oie et al, 1978). La présence ou l'absence de récepteurs pour différents  
virus représente un caractère génotypique spécifique à chaque espèce et à chaque  
souche, suggérant que de tels récepteurs viraux pourraient jouer d'autres rôles  
dans la cellule.

## II - Synthèse d'ADN viral

L'adsorption et la pénétration du virus dans la cellule sont suivies de la  
synthèse par la transcriptase inverse d'ADN viral dans le cytoplasme.  
Celle-ci peut se poursuivre jusqu'à 12 à 24 heures après infection (Varmus et  
Shank, 1976) (Figure 4). Trois formes majeures d'ADN linéaire double brin sont  
détectées dans les cellules infectées :

(1) une forme d'ADN linéaire double brin (forme III) complémentaire  
de l'ARN viral,

(2) un ADN circulaire double brin (forme I) de taille identique à la  
forme précédente,

(3) un ADN proviral intégré dans l'ADN de l'hôte.

Chacune de ces formes peut être mise en évidence dans les cellules à différents  
temps après infection par le virus.

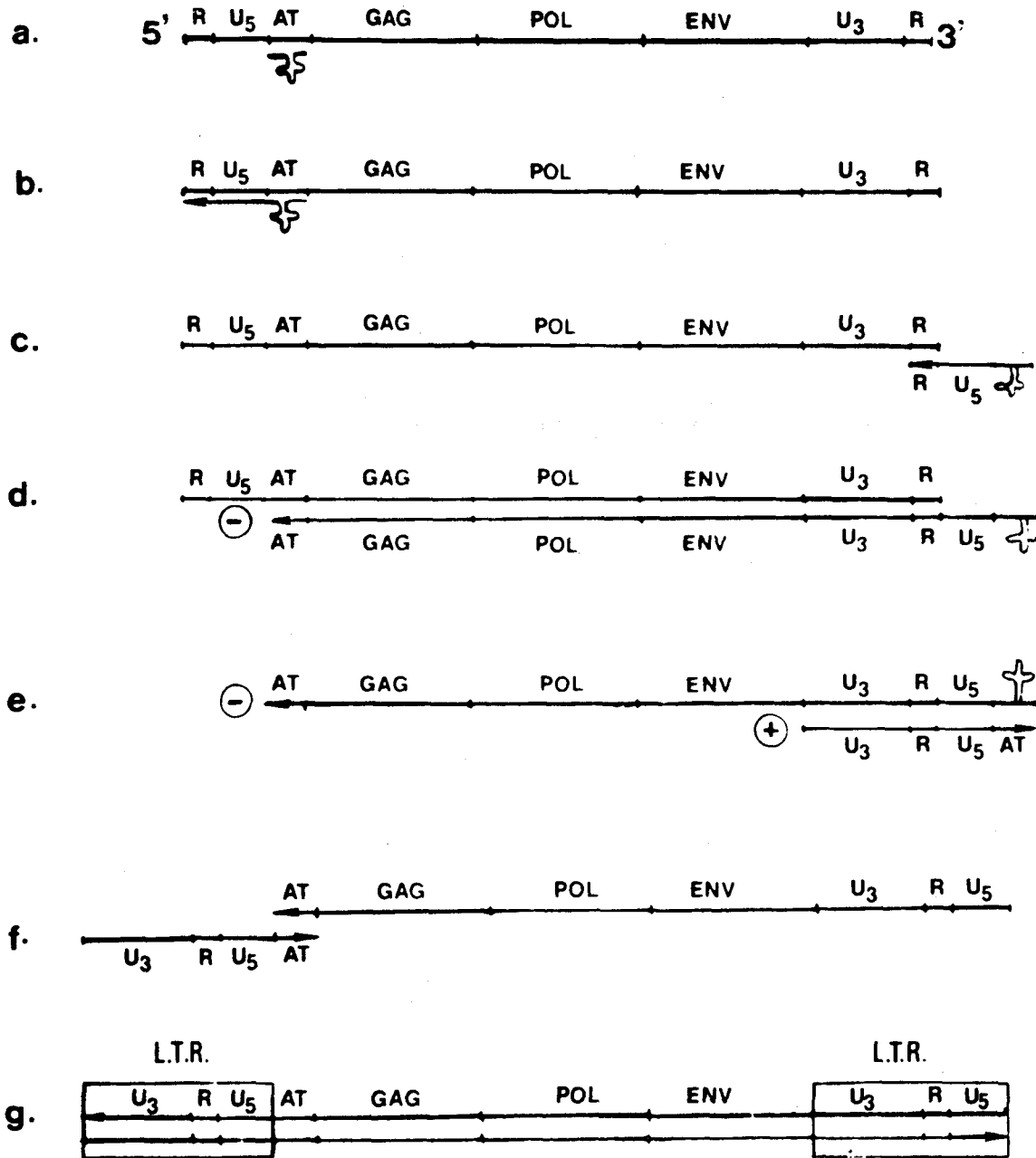


FIGURE 5 : Modèle de rétrotranscription de l'ARN viral en ADN

(d'après Gilboa et al, 1979)



L'étude des différentes étapes de la synthèse de l'ADN viral jusqu'à son intégration dans le chromosome de l'hôte a été pendant longtemps limitée par le petit nombre de copies d'ADN viral présent dans les cellules infectées [généralement 10 copies d'ADN viral par génome haploïde (voir Weinberg, 1977)] Le faible nombre de copies ne permettait pas l'utilisation des techniques classiques de marquage radioactif de l'ADN suivi de chasse. Cette étude n'a été rendue possible que grâce à la mise au point des techniques plus sensibles d'hybridation moléculaire. L'hybridation moléculaire peut être réalisée soit en phase liquide entre l'ADN cellulaire fractionné sur gradient de césium ou de saccharose et un ADN viral radioactif complémentaire synthétisé *in vitro*, soit en hybridant avec des sondes ADN viral [<sup>32</sup>P] l'ADN cellulaire immobilisé sur membrane de nitrocellulose après fractionnement en taille par migration électrophorétique sur gel d'agarose [la technique de Southern (1975)]. Ces dernières techniques permettent de détecter de très petites quantités d'ADN viral (jusqu'à 10 picogrammes). L'ordre dans lequel chacune des formes d'ADN viral apparaît a été particulièrement bien étudié dans les cellules de poulet infectées par ASV (Khoury et Hanafusa, 1976; Shank et Varmus, 1978), et dans les cellules de souris infectées par MuLV (Weinberg, 1977; Jolicoeur et Rassart, 1980; Yang et al, 1980).

#### IIa - Synthèse d'ADN Viral linéaire

Immédiatement après sa pénétration, l'ARN viral sert de matrice à la synthèse d'ADN viral par la rétopolymérase (Taylor et al, 1976). L'ADN double brin peut être détecté dans le cytoplasme quatre heures après infection (Shank et Varmus, 1978). Les mécanismes de synthèse de l'ADN viral double brin ont été étudiés soit en utilisant de la rétopolymérase purifiée dans des systèmes reconstitués *in vitro* où tous les composants ont été définis au préalable, soit par la caractérisation des produits de synthèse dans les cellules infectées en culture. Le modèle le plus probable de rétrotranscription a été proposé par Gilboa et al (1979) (voir Figure 5). Les différentes étapes de la rétrotranscription peuvent être décrites de la façon suivante :

a. L'attachement d'une amorce tRNA de façon non covalente à une distance d'environ 100 - 200 nucléotides de l'extrémité 5' du génome viral (au site AT) sert d'initiateur à la synthèse d'un ADN de polarité négative (-) (Dahlberg et al, 1974; voir Taylor, 1977).

b. La rétrotranscription commence par la synthèse d'un morceau complémentaire de 100 - 150 nucléotides de long appelé "strong stop DNA" (Haseltine et al, 1976) qui contient l'information 5' - R - U5.

Ce morceau d'ADN (-) est lié de façon covalente au tRNA et sa taille correspond à la distance entre AT et l'extrémité 5'.

c. L'ADN R - U5 (-) "saute" de sa position d'origine de l'extrémité 5' du génome ARN à l'extrémité 3' de la même sous-unité ou d'une sous-unité différente grâce à la séquence R aux extrémités 5' et 3' du génome viral (Haseltine et al, 1977; Schwartz et al, 1977). Ni le capuchon, ni le poly A ne sont copiés par la rétro polymérase.

d. Le morceau d'ADN (-) en position 3' sert d'initiateur à la synthèse d'une copie d'ADN simple brin qui s'arrête à l'extrémité 5' après le site d'attachement de tRNA (AT). Personne n'a pu isoler de molécule simple brin de polarité négative possédant la région U5 à l'extrémité 5' (Rothenberg et al, 1978; Novak et al, 1979).

e. L'initiation de la synthèse d'une molécule d'ADN de polarité (+) ("plus strong stop DNA") commence à la jonction entre le gène env et la région U3 (Mitra et al, 1979). Le site d'attachement du tRNA serait copié avant le détachement du tRNA amorce, lequel ne serait pas copié (Gilboa et al, 1979).

f. Le fait que l'ADN "strong stop (+)" possède des séquences AT homologues aux séquences AT du brin d'ADN (-) permet un deuxième saut de l'ADN (+) du côté 3' à l'extrémité 5' (Gilboa et al, 1979).

g. L'ADN strong stop (+) sert alors de matrice à la complétion du brin (-) ainsi que d'amorce à la synthèse du brin (+). L'ADN linéaire double brin intermédiaire acquiert donc deux extrémités identiques (U3 - R - U5) appelées LTR (pour "Long Terminal Repeat") (Hsu et al, 1978; Shank et al, 1978b). La partie U3 de chaque LTR est de longueur variable suivant l'espèce considérée :

~ 250 nucléotides pour les virus aviaires

~ 450 pour les virus murins de type C et,

~ 1200 pour le virus MMTV de type B

(Dhar et al, 1980; Ju et Skalka, 1980; Donehower et al, 1980).

L'ADN linéaire double brin ainsi synthétisé représente une copie fidèle de l'ARN viral possédant à chaque extrémité des séquences réitérées (LTR).

La présence de deux LTR suggère fortement que la rétopolymérase est transférée deux fois d'une matrice à l'autre. L'ordre des séquences dans l'ADN linéaire intermédiaire par rapport à l'ARN viral est donc :

U3-R-U5 - AT - L - gag - pol - env - U3-R-U5  
(LTR 5') (LTR 3')

## I Ib - Circularisation de l'ADN linéaire

L'ADN circulaire a été décrit exclusivement dans le noyau des cellules infectées (Guntaka et al, 1976; Shank et Varmus, 1978). On peut le détecter à partir de 5 heures après l'infection, ce temps permettant la synthèse d'ADN linéaire et son transport dans le noyau (Khoury et Hanafusa, 1976). Toutefois, une partie seulement des molécules linéaires synthétisées seraient circularisées. Certaines molécules seraient alors sélectionnées préférentiellement à d'autres sans que l'on en connaisse la raison.

L'analyse des formes circulaires d'ADN viral dans les cellules infectées a été grandement facilitée par l'utilisation des enzymes de restriction et les techniques de clonage moléculaire. La plupart des molécules circulaires ont la taille des molécules d'ADN linéaire (avec deux régions LTR). Certaines formes circulaires et linéaires ne possèdent qu'une copie des séquences virales LTR peut être à cause d'erreurs de transcription par la rétopolymérase ou à cause de recombinaisons entre les séquences identiques d'une même molécule. Le clonage moléculaire des formes d'ADN circulaire montre que les deux LTR sont joints l'un à l'autre à leurs extrémités (Hager et al, 1979; Goff et al, 1980).

Si l'on sait par les études cinétiques que la forme linéaire est le précurseur de la forme circulaire, aucune expérience n'a pu prouver que les formes circulaires étaient requises pour l'intégration dans les chromosomes de l'hôte. Plusieurs expériences suggèrent que l'ADN circulaire est la forme qui s'intègre. Premièrement, le bromure d'éthidium, agent intercalant, bloque la circularisation de l'ADN linéaire et l'intégration de l'ADN viral (Guntaka et al, 1975). Deuxièmement, la souris possède un gène (Fv-1) (Hartley et al, 1970; Pincus et al, 1971) qui inhibe la circularisation de l'ADN viral et son intégration sans pour autant empêcher la formation de molécules d'ADN intermédiaire linéaires (Jolicoeur et Rassart, 1980; Yang et al, 1980a).

Cependant, des expériences de transfection par l'ADN viral ont montré que l'ADN linéaire est intégré avec une plus grande efficacité que l'ADN circulaire (Smotkin et al, 1976). Etant donné que l'ADN transfectant est nu, il est possible que la conformation circulaire superenroulée soit un obstacle à la pénétration dans la cellule ou à l'intégration elle-même lorsque l'ADN est associé à des nucléoprotéines. Il est clair que, dans la cellule, l'ADN est associé à des nucléoprotéines et à certains facteurs du noyau probablement responsables de la circularisation. Par exemple, l'addition de cycloheximide, inhibiteur de la



synthèse protéique, à des cultures infectées bloque la circularisation de l'ADN linéaire et son intégration (Yang et al, 1980b).

### IIC - Intégration de l'ADN viral.

La preuve de l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire a été apportée par les expériences de Hill et Hillova (1972). En transfectant l'ADN de haut poids moléculaire de cellules transformées par un rétrovirus, ils ont pu transmettre les caractères de transformation à des cellules saines montrant que l'ADN cellulaire était porteur d'une information virale à l'état intégré.

L'ADN viral est intégré dans l'ADN cellulaire à l'état de provirus avec une polarité identique à celle de l'ARN viral, flanqué à chaque extrémité par un LTR (Shank et al, 1978b; Shank et Varmus, 1978; et voir Figure 5). Ceci montre que l'ADN viral circulaire subit une recombinaison avec l'ADN cellulaire de l'hôte aux extrémités des LTRs (Shoemaker et al, 1980; Hishinuna et al, 1981). L'analyse de la séquence des LTR et des séquences cellulaires adjacentes a permis de détecter une séquence de 4 nucléotides d'origine cellulaire, chez MuLV, répétée au site d'intégration. La présence d'une autre séquence répétée inversée dans la région U3 à la jonction LTR - ADN cellulaire (11 nucléotides chez MuLV) suggère que les rétrovirus ont des propriétés d'intégration comparables aux transposons des bactéries (Shapiro, 1979; Vande Woude et al, 1979; Hager et al, 1979; Shimotohno et al, 1980; Cohen et Shapiro, 1980; Sutcliffe et al, 1980).

En général, les cellules chroniquement infectées par les rétrovirus possèdent une à trois copies de provirus par génome haploïde. Or dans de nombreux cas, une centaine de copies d'ADN viral non intégrées s'accumulent dans le noyau 24 heures après infection, ce nombre de copies diminuant au cours des passages des cellules (Khoury et Hanafusa, 1976). On ne sait pas si cet excès de formes non intégrées reflète une inefficacité du système de transport au noyau, une abondance de molécules d'ADN défectives incapables de s'intégrer, une inefficacité du processus d'intégration lui-même, ou bien une restriction à l'intégration d'autres copies par une copie intégrée. Il est peu probable que cette inefficacité soit due à une restriction du nombre de sites potentiels d'intégration puisqu'il est possible de démontrer que l'intégration se fait à de nombreux sites dans les chromosomes d'une même cellule hôte (Keshet et Temin, 1978; Sabran et al, 1979). L'intégration se fait soit au hasard à de nombreux sites dans les chromosomes, soit à des sites n'ayant qu'une spécificité très faible.

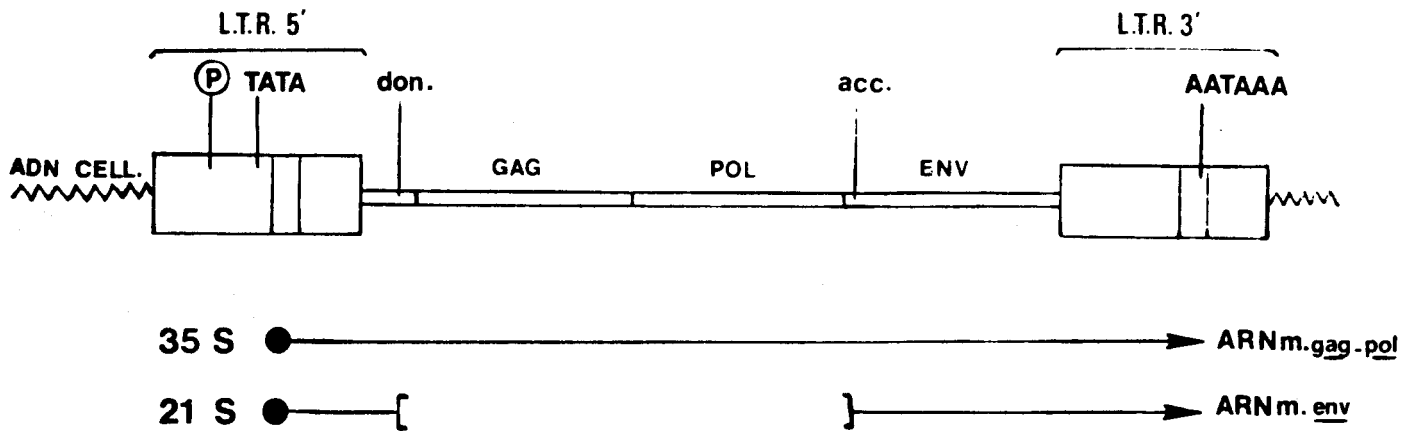


FIGURE 6 : Transcription de l'ADN proviral

- P - promoteur
- TATA - séquence riche en A + T qui précise l'origine de la transcription
- U3 - séquence unique 3'
- R - séquence répétitive
- U5 - séquence unique 5'
- don. - site d'épissure donneur
- acc. - site d'épissure accepteur
- AATAAA - signal de polyadénylation



### III - Transcription de l'ADN proviral

La transcription des ARNs messagers viraux par l'ARN polymérase II cellulaire (voir Darnell, 1979; Rosenberg et Court, 1979) est initiée dans le LTR du côté 5' et est terminée dans le LTR du côté 3' de l'ADN proviral (Yamamoto et al, 1980; Huang et al, 1981). Les séquences requises pour la promotion de la transcription sont situées dans la région U3 (Blair et al, 1980; Dhar et al, 1980). Elles comprennent une séquence riche en AT (ou "TATA box") qui détermine le site d'initiation de la transcription à 30 paires de bases du site cap (Pribnow, 1975; Weil et al, 1979; Manley et al, 1979; Benoist et Chambon, 1981; Mathis et Chambon, 1981). La transcription de l'ARN génomique total se termine par un signal de polyadénylation (Proudfoot et Brownlee, 1976). La région U3 située aux deux extrémités de l'ADN proviral est particulièrement importante car elle contrôle l'initiation et la terminaison de la transcription (Figure 6).

La quantité d'ARN viral transcrit dans la cellule infectée représente 0.1 à 1.0% de l'ARN cellulaire total et 5 à 8% de l'ARN polyadénylé (Hayward et Hanafusa, 1973). Compte tenu du petit nombre de copies d'ADN proviral (1 - 20) par rapport au nombre de copies d'ARN viral [jusqu'à 10.000 copies dans les cellules de poulet infectées par RSV (Hayward et Hanafusa, 1976)], la transcription du provirus représente une amplification énorme de l'information virale.

L'efficacité de la transcription est cependant très variable comme cela a été montré dans des cellules de rat transformées par ASV où on peut trouver des clones qui n'expriment peu ou pas d'ARN viral, ou d'autres exprimant deux à trois ordres de grandeur en plus (Deng et al, 1977).

L'expression de l'ARN viral peut être aussi très variable entre des clones différents de cellules infectées par un virus non transformant (Goldberg et al, 1976). De récentes études suggèrent que la variation de la transcription peut dépendre de l'état de méthylation de l'ADN proviral (Cohen, 1980; Stuhlmann et al, 1981).

Certains virus peuvent voir leur expression affectée par des agents hormonaux ou chimiques. Le meilleur exemple est celui du virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV). L'addition de dexaméthasone (glucocorticoïde de synthèse) augmente de 10 à 1000 fois la concentration d'ARN viral dans les cellules infectées (Parks et al, 1974; Ringold et al, 1975; Young et al, 1977). L'induction de la transcription dépend de la présence d'une séquence dans la région U3 de MMTV (Huang et al, 1981; Lee et al, 1981).

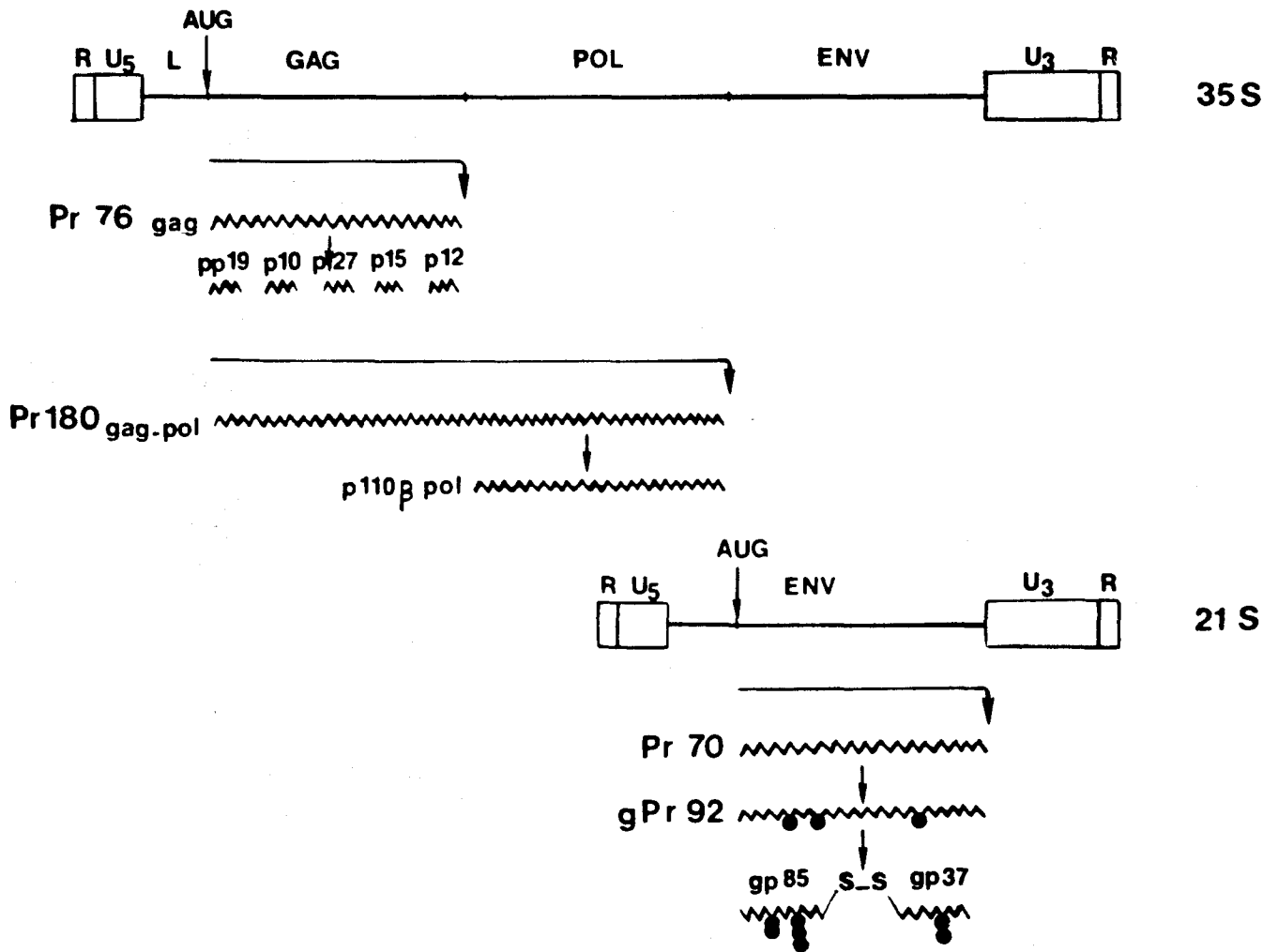


FIGURE 7 : Traduction des ARNs messagers

- AUG - codon d'initiation
- Pr - protéine précurseur
- pp - protéine phosphorylée
- gp - glycoprotéine
- (●) - sucres



L'analyse des ARNs viraux messagers dans les cellules de poulet infectées par un ALV révèle deux espèces d'ARN messenger de polarités identiques à celles du génome viral (Hayward, 1977; Weiss et al, 1977),

l'une, de coefficient de sédimentation 35S (soit environ 8000 nucléotides), représentant la totalité du génome viral, et

une autre de 21 S (soit environ 3600 nucléotides) représentant le produit de transcription du gène env.

Chacune de ces espèces est polyadénylée, possède le capuchon, les séquences U5 et L, ainsi que tout ou partie de la région 3' du génome viral (Mellon et Duesberg, 1977; Weiss et al, 1977). Des résultats semblables obtenus dans plusieurs autres systèmes ont montré que les espèces d'ARNs messagers sous-génomiques et de taille égale au génome viral sont détectées dans des cellules infectées par différents rétrovirus. Dans tous les cas, les ARNs sous-génomiques procèdent par épissage (Rothenberg et al, 1978). Les analyses récentes des séquences d'ADN viral cloné ont permis de localiser la position d'un site d'épissage accepteur à l'extrémité 5' du gène viral env (Dhar, communication personnelle).

#### IV - Traduction de l'ARN messenger

Les protéines de structure (produits du gène gag) et la rétopolymérase (produit du gène pol) sont traduites à partir de l'ARN messenger de taille identique à celle du génome viral alors que les protéines d'enveloppe (produits du gène env) sont traduites à partir du messenger épissé (Rothenberg et al, 1978; Stephenson et al, 1978). Les protéines virales sont formées après clivage de protéines précurseurs (Eisenman et Vogt, 1978) (voir Figure 7). Dans le système aviaire, le gène gag code pour une protéine précurseur de 76.000 daltons (Pr76gag) qui est ensuite clivée en cinq petits polypeptides constitutifs du nucléoïde viral (Eisenman et al, 1974; Vogt et al, 1975). L'ordre des polypeptides ("p") dans le précurseur est NH<sub>2</sub>-pp19-p10-p27-p15-p12-COOH. Chaque nombre représente le poids moléculaire de chaque produit en millier de daltons (August et al, 1974). Chez les rétrovirus murins et félins, la protéine gag précurseur est plus petite (Pr65gag) et code pour quatre polypeptides dont l'ordre est NH<sub>2</sub>-p15-pp12-p30-p10-COOH (Arlinghaus et al, 1976; Barbacid et al, 1976; Shapiro et al, 1976).

Dans chacun des systèmes, l'un des polypeptides obtenu après clivage du précurseur (pp19 ou pp12) est phosphorylé avant l'assemblage du virion (Pal et Roy-Burman, 1976; Lai, 1976; Sen et al, 1977).

La suppression occasionnelle du codon de terminaison du gène gag amène à la formation d'une molécule précurseur de 180.000 daltons (Pr180gag-pol) par lecture continue des gènes gag et pol (Kerr et al, 1976; Oppermann et al, 1977; Jamjoom et al, 1977). Pr180gag-pol possède la protéine précurseur du gène gag ainsi que la rétropolymérase. Le clivage de Pr180gag-pol donne la rétropolymérase, également incorporée dans le virion. La faible quantité de Pr180gag-pol par rapport à Pr76gag suggère que la suppression du signal de terminaison a lieu seulement pour un événement de traduction sur vingt.

Dans le système aviaire, le premier produit de traduction de l'ARN messenger du gène env est un précurseur (Pr70env) (England et al, 1977; Moelling et Hayami, 1977). Ce polypeptide est ensuite glycosylé pour former un produit intermédiaire (gPr92). A la fin du processus de glycosylation, gPr92 est clivé en deux glycoprotéines (gp85 et gp37) reliées entre elles par un pont disulfure. Chez les virus de mammifères, les glycoprotéines d'enveloppe (gp70 et p15E) sont formées par un mécanisme tout à fait semblable (Famulari et al, 1976; Naso et al, 1976; Shapiro et al, 1976). L'ordre des polypeptides dans les molécules précurseurs est  $\text{NH}_2\text{-gp85-gp37-COOH}$  et  $\text{NH}_2\text{-gp70-p15E-COOH}$  (ou "E" veut dire enveloppe pour distinguer p15E de p15gag) (Ikeda et al, 1975).

#### V - Assemblage des particules virales

Les protéines virales sont synthétisées dans différentes parties de la cellule. Les glycoprotéines d'enveloppe sont traduites par les polyribosomes liés aux membranes intracellulaires et transportées à la surface cellulaire à travers le reticulum endoplasmique (Watson, 1976). Comme d'autres protéines sécrétrices (Eylar, 1965; Redman et al, 1966; Redman, 1969; Sabatini and Blobel, 1970), l'addition de sucres a lieu dans les citernes du reticulum endoplasmique et à la surface de la cellule; elle est catalysée par les glycosyltransferases de la cellule-hôte. Les molécules restent associées à la membrane plasmique, probablement en tant que composants transmembranaires, et sont localisées aux sites de formation des virions (Witte et Weissman, 1976; Famulari et al, 1976; Witte et al, 1977).

Par contre, la protéine précurseur du gène gag et la rétropolymérase sont synthétisées sur les polyribosomes libres dans le cytoplasme (Edwards et Fan, 1979; Schultz et al, 1979). Le mécanisme par lequel elles sont transportées à la surface interne de la membrane plasmique est encore mal connu. La formation des particules de type C commence à la surface interne de la membrane plasmique

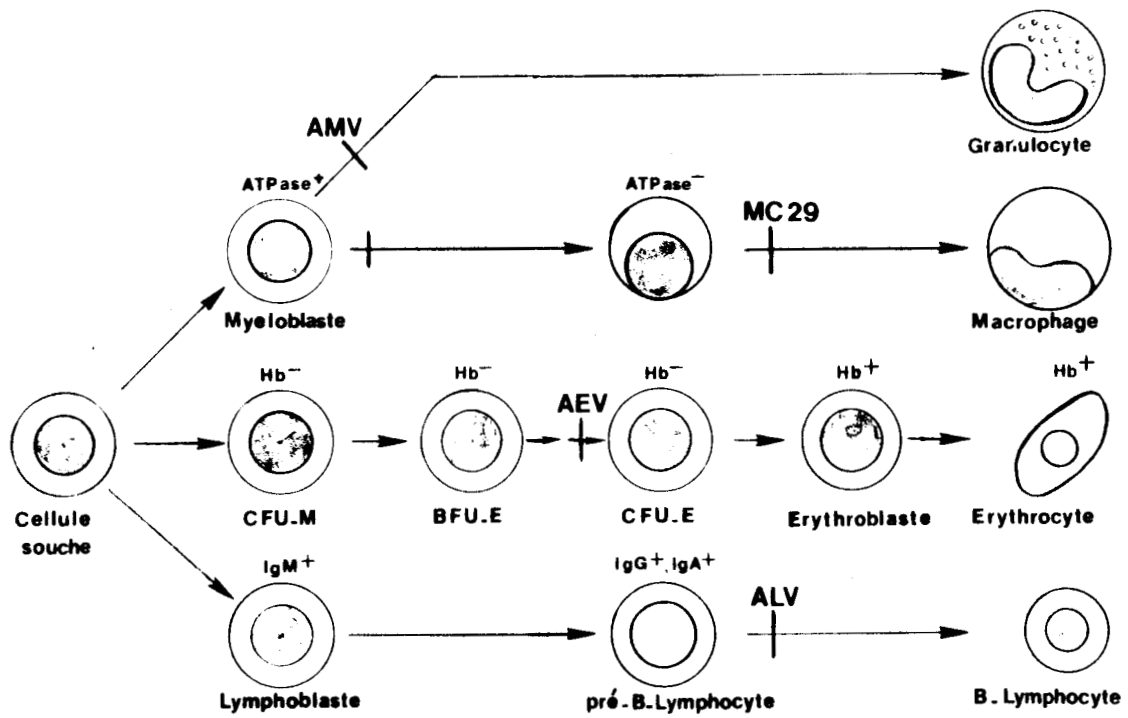


FIGURE 8 : Voies de différenciation des cellules hématopoïétiques chez les oiseaux et cellules cibles des rétrovirus aviaires

(d'après Graf et Beug, 1978; Gazzolo et al, 1980)

- - sens de la différenciation
- + → - blocage de la différenciation
- IgM - immunoglobuline M
- IgG - immunoglobuline G
- IgA - immunoglobuline A
- Hb - hemoglobine
- CFU.M - "colony forming unit, marrow"
- BFU.E - "burst forming unit, erythroid"
- CFU.E - "colony forming unit, erythroid"

par assemblage des protéines de la nucléocapside virale. L'incorporation d'ARN viral dans le nucléoïde suivie du bourgeonnement des particules aux sites des glycoprotéines d'enveloppe termine le cycle de réplication du virus et donne naissance à des particules capables de réinfecter d'autres cellules.

#### D - POTENTIEL ONCOGENE des VIRUS NON DEFECTIFS

##### I - Cellules cibles

Parmi les nombreux virus oncogènes de type C, la classe la plus répandue est représentée par les virus capables de provoquer des leucémies chroniques chez l'animal après une période de latence relativement longue suivant l'infection (trois mois à deux ans) (voir Graf et Beug, 1978; Sherr et Todaro, 1979). Chez la souris, l'étiologie des virus de type C les lie aux lymphomes spontanés ou radioinduits desquels ont été isolés plusieurs variants génétiques viraux provoquant la même néoplasie (Gross, 1960; Gross, 1974; Kaplan, 1967; Kaplan, 1974). Qu'elle soit spontanée ou expérimentalement induite, la leucémie doit être le résultat d'une interaction intime entre le virus et la cellule cible.

La grande majorité des virus leucémiques murins (MuLV) et félins (FeLV) produit des leucémies lymphocytaires des cellules de type T (dérivées du thymus). Bien que n'étant pas le seul organe où le virus puisse se répliquer, le thymus possède des cellules cibles susceptibles à l'action du virus oncogène (Kaplan, 1974). L'ablation néonatale du thymus chez des souris (souche AKR) inhibe drastiquement l'incidence des leucémies spontanées alors que l'ablation de la rate n'a aucun effet (Furth, 1946; Kaplan, 1974). La susceptibilité du thymus au virus est maximale à la naissance (Kaplan, 1967) et décroît parallèlement à l'involution de l'organe au cours de la croissance. L'irradiation d'animaux adultes par de faibles doses de rayons X entraîne la différenciation intrathymique de nouveaux lymphocytes de type T et restaure en partie le niveau de susceptibilité néonatale aux virus leucémogènes (Kaplan, 1967).

Dans le système aviaire, les cellules cibles du système hématopoïétique des virus leucémiques lymphoïdes (LLV) sont les lymphocytes immatures de type B localisés dans la bourse de Fabricius (Graf et Beug, 1978) (voir Figure 8). Les poulets bursectomisés ne sont plus susceptibles aux virus LLVs (Peterson et al, 1964; Purchase et Gilmour, 1975), mais peuvent être rendus à nouveau susceptibles par réimplantation de cellules de la bourse (Purchase et Gilmour, 1975; Purchase et al, 1977).



La plupart des néoplasmes apparus naturellement chez les poulets possèdent des virus leucémiques lymphoïdes qui sont transmissibles et qui, bien qu'étant la cause principale de leucémies lymphoïdes de type B, provoquent aussi des ostéopétroses, néphroblastomes, érythroblastoses, et, avec une fréquence moins grande, des endothéliomes et des sarcomes (Burmester et Fredrickson, 1964). Chez les oiseaux burséctomisés, on observe une augmentation de l'incidence d'ostéopétrose alors que celle de l'érythroblastose reste inchangée (Peterson et al, 1964; Peterson et al, 1966; Purchase et Gilmour, 1975). Cette hétérogénéité potentielle du spectre oncogénique indique que les facteurs aussi bien cellulaires que viraux doivent déterminer le résultat de l'interaction virus-hôte.

## II - Défense de l'hôte

La réponse immunitaire de l'hôte constitue le déterminant majeur de l'interaction virus-cellule cible. Chez la souris, l'infection virale est suivie de la production d'anticorps dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe du virus (Ihle et al, 1974; Hunsmann et al, 1975; Ihle et al, 1976; Stephenson et al, 1976). La formation d'anticorps anti-gp70 permet de neutraliser l'infectivité du virus et empêche sa propagation.

Les gènes de la réponse immunitaire ("IR gènes") aussi exprimés dans les lymphocytes sont également nécessaires à une reconnaissance efficace des antigènes viraux (Lee et Ihle, 1979; Lee et Ihle, 1981). D'autres produits non reliés aux anticorps tels que les facteurs lipoprotéiques de neutralisation du sérum, dépendants du complément, peuvent aussi jouer un rôle dans la neutralisation du virus (Levy et al, 1975). Les animaux virémiques étant beaucoup plus susceptibles aux leucémies que ceux qui contrôlent la dissémination du virus, une réponse immunitaire efficace peut diminuer sensiblement l'incidence de la maladie (Essex, 1975).

La première étape de l'infection virale étant la reconnaissance entre le virus et son récepteur cellulaire, la nature du gène env et des gènes cellulaires qui codent pour les récepteurs spécifiques régule donc la pénétration des cellules par le virus. Bien que la présence de récepteurs ne soit pas suffisante pour établir la susceptibilité cellulaire (Lilly et Pincus, 1973; Sveda et al, 1974; Lemons et al, 1977; O'Brien et al, 1978; Brown et al, 1979), les cellules qui sont déficientes pour ces récepteurs sont résistantes à l'infection (voir Weiss, 1975).

Les cellules lymphoïdes qu'elles soient d'origine thymique ou myeloïde (lymphocytes de type B ou dérivées de la moelle) expriment un nombre relativement élevé de récepteurs de la glycoprotéine d'enveloppe du virus de Rauscher MuLV (De Larco et al, 1976; De Larco et al, 1978; McGrath et Weissman, 1979).

D'autres gènes cellulaires peuvent empêcher la réplication virale après pénétration du virus dans la cellule (voir Lilly et Pincus, 1973).

Chez la souris, le locus Fv-1 (Hartley et al, 1970; Pincus et al, 1971) contrôle la circularisation et l'intégration de l'ADN proviral par un mécanisme encore mal connu (Jolicoeur et Rassart, 1980; Yang et al, 1980a).

Chez l'homme, le locus Bevi, localisé sur le chromosome 6, contrôle l'intégration de certains virus venant des primates conduisant à l'inhibition de l'expression des gènes viraux (Lemons et al, 1977; Lemons et al 1978; Brown et al, 1979).

Un locus génétique contrôlant la réplication virale a été localisé sur le chromosome X du chat (O'Brien, 1976; O'Brien et Simonson, 1978).

L'interféron, synthétisé par les cellules infectées, inhibe la synthèse des protéines virales et retarde la maturation des virions sans exercer d'effet majeur sur la synthèse des protéines cellulaires (Friedman et al, 1975).

Le fait que les virus de type C induisent des néoplasmes préférentiellement dans les organes cibles lymphocytaires suggère qu'il doit exister un équilibre subtil entre la réplication virale dans les tissus cibles et la réponse immunitaire des cellules cibles au virus. Les cellules lymphoïdes proliférantes, recrutées pour répondre aux antigènes viraux, pourraient elles-mêmes être infectées et devenir incapables de remplir leur rôle physiologique (Lee et Ihle, 1979; Lee et Ihle, 1981). Le stimulus entraînant la division chronique des cellules lymphoïdes pourrait éventuellement causer un développement de cellules néoplasiques parmi les cellules proliférantes. Ceci donnerait naissance à des cellules qui se diviseraient indépendamment du stimulus antigénique viral. Ce modèle propose que le virus serve d'antigène ainsi que de mutagène.

## E - LES VIRUS ENDOGENES

### I - Les gènes viraux à l'état latent

L'existence d'une information génétique virale inductible présente à l'état latent chez l'hôte a été démontrée par les expériences classiques de Gross en 1951 (Gross, 1951a; Gross 1951b). L'inoculation d'extraits cellulaires, préparés à partir de lymphomes apparus spontanément chez les souches de souris à haute incidence de leucémie AKR ou C58, augmentait considérablement le taux

de leucémies lymphatiques chez des souriceaux nouveaux-nés, appartenant aux souches à basse incidence de leucémie, C3H ou C57Br. Les agents responsables de leucémies se sont avérés être des virus leucémiques de type C transmis de façon génétique (ou verticale) dans les souches d'origine (Gross, 1958).

Peu après, Lieberman et Kaplan (1959) ont démontré la présence de virus leucémique dans les tumeurs de souris induites par irradiations aux rayons X. Ce virus leucémique de souris qu'ils ont appelé "radiation leukemia virus" ou RadLV induisait des tumeurs lymphoïdes après inoculation à des souris non irradiées. Ces résultats montraient pour la première fois que les animaux sont porteurs d'éléments génétiques capables de donner naissance à un rétrovirus infectieux.

Par la suite, d'autres auteurs ont décrit dans les cellules normales de poulet la transmission mendélienne d'un gène dominant autosomal codant pour la production d'un antigène viral spécifique de groupe, "gs" (pour groupe specific) (Payne et Chubb, 1968). Weiss (1969) et Hanafusa et al (1970) ont rapporté la production d'un facteur, "chf" (pour chick helper factor), chez le poulet. Ce produit, détecté dans les cellules non infectées, est capable de compléter et de rendre infectieux le virus sarcomatogène aviaire de Bryan (BrRSV) défectif pour la glycoprotéine d'enveloppe.

Depuis ces expériences, il a été montré que l'antigène gs est un produit du gène viral gag et que chf est un produit du gène env. La présence de ces protéines démontre l'existence d'une information génétique virale, intégrée dans la lignée germinale des poulets, et, transmise de façon verticale en tant que gènes viraux "endogènes". En 1971, Vogt et Friis ont décrit la production spontanée d'un virus endogène du poulet dans la lignée 100, amenant la preuve biologique de la présence de séquences virales endogènes capables de donner naissance à des virus infectieux complets.

Tout comme les souris ou les poulets qui peuvent exprimer des gènes endogènes, les cellules de souris en culture (n'exprimant aucun virus pendant plusieurs centaines de générations) peuvent se mettre à produire spontanément des rétrovirus (Todaro, 1972). De plus, des cellules, chez lesquelles aucune expression des gènes viraux n'est détectable, peuvent être induites à produire des virus de type C par les pyrimidines halogénées (Lowy et al, 1971; Aaronson et al, 1971). Les virus induits par les agents chimiques ne peuvent en général pas se répliquer dans les cellules dont ils sont issus, mais peuvent être transmis à des cellules

hétérologues (Levy, 1973; Aaronson et Stephenson, 1973; Benveniste et al, 1974b; Sherr et al, 1974b). Le fait que les cellules de plusieurs espèces animales soient capables de produire des rétrovirus spontanément ou après induction (Lieber et al, 1973), montre que chacune de ces espèces possède des gènes capables de coder pour des particules infectieuses.

## II - Polymorphisme des loci viraux

Des séquences nucléotidiques homologues aux rétrovirus ont été révélées dans l'ADN de tissus sains de nombreuses espèces animales aussi bien aviaires (Baluda, 1972; Nieman, 1973) et murines (Chattopadhyay et al, 1974) que porcines (Todaro et al, 1974), félines (Baluda et Roy-Burman, 1973; Benveniste et al, 1975b) et simiennes (Benveniste et al, 1974a; voir aussi revue par Todaro, 1977). Ces séquences virales endogènes sont présentes en copies multiples (estimées de 5 à 50) dans les cellules somatiques et germinales de tous les individus d'une même espèce. Des études biochimiques utilisant les enzymes de restriction et le clonage moléculaire de gènes ont permis d'étudier de façon très précise le nombre et la structure des virus endogènes. L'analyse de l'ADN de poulet ou de souris sains montre une très grande hétérogénéité des loci viraux d'une souche à l'autre et même d'un animal à l'autre. Ainsi, chez le poulet domestique, 15 loci différents ont été identifiés appelés EV (pour endogenous virus) et numérotés de 1 à 15 (Astrin, 1978; Astrin et al, 1979b). Chacun de ces loci est unique en ce qui concerne son taux d'expression, sa structure, et ses produits de transcription (Hayward et al, 1979). On a identifié chez la souris plus de 15 copies de virus endogènes homologues aux génomes des virus leucémiques murins (Steffen et Weinberg, 1978).

## III - Transmission des virogènes endogènes

Comme les autres gènes cellulaires, les virogènes endogènes, intégrés dans les chromosomes de l'hôte, sont transmis dans la lignée germinale en suivant les lois de Mendel. L'activation des loci viraux endogènes non défectifs donne lieu à la production de particules virales infectieuses qui peuvent être transmises de cellule à cellule, ou même, d'un animal à l'autre.

Dans la nature, il semble que les rétrovirus de type C soient capables de transfert d'information génétique entre des espèces qui ne sont pas reliées phylogénétiquement.

Todaro et ses collègues ont montré que le virus endogène du babouin et le virus endogène du chat ont une origine commune (Sherr et al, 1974a; Todaro et al, 1974b; Sherr et Todaro, 1974; Benveniste et Todaro, 1974). Le virus endogène du chat provient d'un virus ancestral des singes de l'ancien monde qui aurait infecté un ancêtre du chat domestique plus récemment (il y a environ 5 millions d'années). L'infection aurait eu lieu dans une région géographique relativement limitée (Benveniste et Todaro, 1974). D'autres exemples de transmission inter-espèces des rétrovirus ont été décrits par la suite (Benveniste et al 1975b; Lieber et al, 1975; Benveniste et Todaro, 1975a).

L'intégration d'un virus exogène dans la lignée germinale de l'hôte et l'étude de sa transmission génétique a été réalisée en laboratoire par Jaenisch (Jaenisch et al, 1975; Jaenisch, 1976). En dépassant les limites organotropiques des virus MuLV par infection de blastocystes de souris au stade 4-8 cellules et en transplantant ces cellules dans des souris mères adoptives, il a pu obtenir des souris non leucémiques qui possèdent le virus endogène MuLV intégré dans toutes leurs cellules. Le croisement de ces souris avec des souris non infectées a montré que les gènes acquis expérimentalement étaient hérités de façon autosomale (Jaenisch, 1977).

Comme chez certaines souches, les leucémies spontanées chez ces souris étaient associées à l'activation d'éléments viraux à l'état latent ainsi qu'à leur réintégration et leur réplication dans les tissus cibles (Jaenisch et al, 1975; Berns et Jaenisch, 1976).

La persistance des rétrovirus à l'état endogène pendant des millions d'années et leur évolution comparable à celle des gènes cellulaires a apporté une nouvelle approche à l'étude de l'évolution des espèces (Benveniste et al, 1975a; Benveniste et Todaro, 1976) et a permis en conséquence d'étudier quelle pouvait être l'origine des rétrovirus. Il est généralement admis que la cellule, par mesure d'économie, ne conserve que l'information génétique nécessaire à son développement, l'information non utile étant rejetée. On peut alors se demander comment et pourquoi les rétrovirus ont persisté pendant si longtemps chez l'animal, s'ils jouent un rôle physiologique particulièrement important pour la cellule, et quelle est leur origine.

C'est à ces questions que nous essaierons de répondre dans la première partie de cette thèse. En particulier, nous étudierons l'origine de virus endogène chez les espèces aviaires.

## F - LES RETROVIRUS : VECTEURS de GENES CELLULAIRES

L'un des grands intérêts porté à certains rétrovirus réside sans aucun doute dans leur puissant pouvoir oncogène. Ainsi, contrairement aux virus de leucémies chroniques, qui provoquent des leucémies lymphoïdes chez l'animal après une longue période de latence, les virus sarcomatogènes et les virus des leucémies aiguës provoquent des néoplasmes deux à trois semaines après infection.

### I - Virogènes et oncogènes

Les rétrovirus des leucémies chroniques peuvent être comparés à des bactériophages tempérés pour ce qui concerne certaines de leurs propriétés biologiques. Les ADNs proviraux peuvent être insérés à plusieurs sites différents dans le génome cellulaire de l'hôte, peuvent persister à l'état latent, et peuvent être induits par de nombreux agents chimiques ou physiques (voir Bishop, 1978). Dans le cas du bactériophage lambda, une des conséquences à ces insertions multiples est le développement occasionnel de phages recombinants qui transduisent des gènes bactériens.

L'expression d'un gène cellulaire ainsi transduit se trouve alors régulée par les éléments de contrôle du vecteur. L'infection des cellules par un phage recombinant tempéré peut alors conduire à une expression aberrante du gène cellulaire dans le nouvel hôte (Watson, 1976).

Par analogie avec les systèmes procaryotes, il était logique de penser que les rétrovirus ("virogènes") pouvaient acquérir des gènes cellulaires ("oncogènes") (Huebner et Todaro, 1969) à partir du matériel génétique de l'hôte par recombinaison au cours du cycle répliatif du virus, de tels gènes cellulaires étant alors sous contrôle viral. Un tel phénomène de recombinaison a été démontré pour la première fois chez les rongeurs. Harvey (1964) et Kirsten et Mayer (1967), par passages répétés chez le rat du virus de la leucémie murine (MuLV), ont pu obtenir des tumeurs solides desquelles ont été isolés deux nouveaux virus sarcomatogènes (Kirsten et Harvey sarcoma virus, KiSV et HaSV). Ces virus possèdent, en plus d'une information génétique homologue aux virus de souris MuLV, des séquences homologues à des gènes cellulaires normaux du rat (Scolnick et al, 1973; Scolnick et Parks, 1974). Ces expériences montrent que les virus des leucémies chroniques peuvent transduire de façon stable des séquences cellulaires normales de l'hôte et que cette acquisition de séquences cellulaires provoque la formation de virus oncogènes extrêmement puissants.

## II - Le virus sarcomatogène aviaire de Rous (RSV)

L'existence ou non d'un gène viral responsable de la transformation a été abordée par les études sur le virus sarcomatogène aviaire de Rous.

RSV a été le virus le plus étudié pendant ces dix dernières années car il est compétent pour la répllication et provoque de manière extrêmement rapide (deux à trois semaines) des sarcomes chez le poulet. L'infection par RSV de fibroblastes de poulet en culture donne lieu à la formation de cellules transformées qui ont des caractéristiques typiques. La transformation a été définie par les critères suivants :

- (1) le passage à une forme ronde accompagné d'une forte réfringence.
- (2) la perte de l'inhibition de contact.
- (3) un besoin plus limité en sérum.
- (4) un accroissement du transport des sucres.
- (5) la capacité à provoquer des tumeurs par injection à l'animal.

Les fibroblastes de poulet infectés par des mutants thermosensibles (ts) de RSV (Toyoshima et Vogt, 1969; Martin, 1970; Kawai et Hanafusa, 1971) peuvent être transformés de manière réversible en fonction de la température sans affecter la production virale. Ceci constitue la preuve directe de la participation du produit d'un gène viral de RSV dans la transformation.

A partir d'un stock de RSV, Vogt (1971), puis Kawai et Hanafusa (1972), ont rapporté la ségrégation spontanée de virus défectifs pour la transformation (tdRSV). Cette ségrégation était probablement due à la délétion d'un gène viral. L'analyse biochimique du génome des virus RSV et tdRSV a montré que :

- (1) le virus tdRSV a un génome de complexité identique à celle des virus des leucémies chroniques aviaires (ALV);
- (2) la complexité du génome du virus transformant RSV est plus grande de 1500 bases; et
- (3) les séquences additionnelles sont localisées du côté 3' du génome viral entre le gène env et la séquence U3. Le virus RSV diffère donc des virus des leucémies chroniques par le fait qu'il possède non seulement toute l'information nécessaire à la répllication virale (gag, pol, env) mais encore un gène responsable de la transformation appelé src pour sarcomatogène (voir Hanafusa, 1977; Bishop 1978).

Les différences de structure entre les génomes de RSV et tdRSV ont permis à Stehelin et al (1976a) de préparer une sonde ADN radioactive, cDNAsrc, représentative et totalement spécifique du gène src viral.

Après synthèse d'un ADN radioactif complémentaire du génome viral RSV, et élimination de toutes les séquences complémentaires tdRSV, la sonde s'est avérée hybrider à 100% avec toutes les souches virales sarcomatogènes aviaires de Rous alors qu'aucune hybridation n'a été détectée avec les virus des leucémies chroniques aviaires testés. D'autre part, ce cDNA<sub>src</sub> ne présentait aucune homologie avec les génomes des virus sarcomatogènes et leucémogènes de mammifères; il n'en présentait pas non plus avec les génomes des virus transformants à ADN tels que ceux du virus SV40, de l'adenovirus V, ou du virus de herpès simplex.

Cet outil a permis à Stehelin et collaborateurs (1976b) de montrer que le gène src est présent dans l'ADN de tissus sains de plusieurs espèces aviaires de l'émeu au poulet en accord avec la relation phylogénétique de ces espèces, le poulet étant pris comme point de référence. De plus, le fait qu'il ait été possible de détecter des séquences apparentées au gène src même chez les espèces de mammifères (Roussel, 1978; Stehelin et al, 1978) montre que les séquences src cellulaires (ou "c-src") possèdent une stabilité remarquable au cours de l'évolution, et implique qu'elles doivent jouer un rôle vital pour les cellules normales de vertébrés.

Les virus sarcomatogènes aviaires se seraient alors constitués par recombinaison entre l'unité répliquative de type ALV et les séquences cellulaires c-src du poulet domestique. Les séquences aviaires c-src n'étant pas liées génétiquement aux séquences du génome du virus endogène du poulet (RAV-0) (Padgett et al, 1977), une telle recombinaison pourrait avoir lieu par "crossing over" au niveau de l'ADN cellulaire, ou par intégration accidentelle d'un virus leucémique adjacent aux séquences c-src (voir Discussion).

Le produit du gène src récemment identifié est une protéine phosphorylée de 60.000 daltons (P60<sub>src</sub>) (Brugge et Erikson, 1977; Purchio et al, 1978). Cette protéine a une activité phosphokinase (Collett et Erikson, 1978) qui possède la propriété de phosphoryler les résidus tyrosine (Hunter et Sefton, 1980; Collett et al, 1980). La phosphorylation des résidus tyrosine est extrêmement rare dans la cellule et semble intimement liée au phénomène de transformation par RSV. Cette activité n'est en effet pas retrouvée, ou est considérablement réduite, dans les cellules normales ou infectées par le mutant de délétion (tdRSV); elle est thermosensible dans les cellules transformées par des mutants thermosensibles du RSV (tsRSV).



TABLEAU I

Classification des oncovirus de type C

| Neoplasme induit<br>Espèce animale | LEUCEMIES CHRONIQUES  | SARCOMES  | LEUCEMIES AIGUES                    |                  |
|------------------------------------|---|---|-------------------------------------|------------------|
| POULET                             | Virus leucémiques associés aux RSVs<br>RAV-1, RAV-2, RAV-49, RAV-50                         | <u>Virus du sarcome de Rous</u><br>-Bryan BH-RSV<br>-Prague PR-RSV<br>-Schmidt Ruppin SR-RSV<br>-Harris HA-RSV<br>-Carr-Zilber CZ-RSV | Virus de la myéloblastose aviaire   | AMV<br>E26       |
|                                    | Virus associés aux virus des leucémies aigües aviaires<br>MAV, EAV, AEA, MCAV               | <u>Virus du sarcome aviaire</u><br>-Bratislava B77-ASV<br>-Fujinami FSV<br>-PRCII, PRCIIp, PRCIV<br>-Y73<br>-ESH                      | Virus de l'érythroblastose aviaire  | AEV              |
| SOURIS                             | Virus leucémiques associés aux virus des leucémies aigües murines                           | <u>Virus du sarcome murin</u><br>-Moloney MoSV<br>-Gazdar GaSV  | Virus de la leucémie d'Abelson      | A-MuLV           |
|                                    | Virus leucémiques murins de Gross, Moloney, Kirsten, Friend, Rauscher etc..                 |   | Virus SFFV de Friend et de Rauscher | F-SFFV<br>R-SFFV |
| RAT                                | Virus leucémique radioinduit RadLV  | <u>Virus du sarcome du rat</u><br>-Harvey HaSV<br>-Kirsten KiSV<br>-Gardner-Rasheed RaSV  |                                     |                  |
| CHAT                               | Virus leucémiques felins FeLV   | <u>Virus du sarcome félin</u><br>-Snyder-Theilen ST-FeSV<br>-Gardner-Arnstein Ga-FeSV<br>-McDonough SM-FeSV                           |                                     |                  |
| SINGE                              | Virus leucémique du gibbon GalV<br>Virus leucémique associé au virus du sarcome simien SSAV | Virus du sarcome du singe laineux SSV   |                                     |                  |



### III - Les virus sarcomatogènes défectifs pour la réplication

D'autres virus sarcomatogènes isolés des espèces aviaires ainsi que de mammifères (voir Tableau I) possèdent également des séquences d'origine cellulaire, responsables de la transformation, transmises de l'ADN de l'hôte. Contrairement au virus sarcomatogène de Rous, chacun de ces virus est défectif pour la réplication et a besoin pour sa propagation de la présence d'un virus non défectif auxiliaire (ou "helper") auquel il est toujours associé. Ces virus sont aussi caractérisés par le fait qu'ils transforment les fibroblastes et les cellules épithéliales en culture. Déficients dans tout ou partie des gènes nécessaires au cycle répliatif, les virus sarcomatogènes défectifs ont besoin des fonctions complémentaires apportées par leur virus "helper", pour pénétrer dans la cellule et, pour être intégrés dans le génome cellulaire de l'hôte. Une fois intégré, le provirus peut être transcrit, et l'ARN viral intracytoplasmique peut être encapsidé par le virion du virus "helper" compétent (Huebner et al, 1966; Aaronson et Rowe, 1970).

Les cellules transformées in vitro peuvent donc exprimer deux phénotypes différents : soit productrices, après infection par le virus transformant défectif et le virus "helper" qui l'accompagne, soit non productrices ("NP"), après infection par le seul virus transformant défectif. Les cellules NP sont alors incapables de produire des particules virales mais expriment l'ARN viral et les protéines codées par les gènes transformants. L'infection des cellules NP par un virus "helper" entraîne la formation de nouvelles particules virales (démasquage ou "rescue") dans lesquelles le génome transformant est empaqueté par l'enveloppe du virus hétérologue. Les particules résultantes ("pseudotypes") possèdent les propriétés antigéniques du virus auxiliaire ainsi que sa spécificité d'hôte.

Expérimentalement, les cellules NP permettent l'étude du génome des virus défectifs pour la réplication dans leur forme intégrée, en tant qu'ARN viral intracytoplasmique, ou en tant que génome empaqueté dans un virus "helper" hétérologue.

L'un des prototypes des virus sarcomatogènes défectifs est le virus du sarcome félin (FeSV). L'ordre des gènes dans le génome de deux souches différentes de FeSV est 5' - gag - fes - env - 3'. Les séquences responsables de la transformation ("fes") ont été acquises par recombinaison entre un gène cellulaire (c-fes) et le virus des leucémies chroniques du chat (FeLV) dont seulement une partie des gènes gag et env est représentée (Frankel et al, 1979; Sherr et al,

1979; Sherr et al, 1980). Dans les cellules transformées, un seul ARN messager viral codant pour un produit de fusion des gènes gag et fes est transcrit (Stephenson et al, 1977; Sherr et al, 1978). Cette polyprotéine possède une activité phosphokinase spécifique des résidus tyrosine (Van de Ven et al, 1980; Barbacid et al, 1980) nécessaire à la transformation (Barbacid et al, 1981). Depuis ces deux dernières années, d'autres virus sarcomatogènes défectifs ont été isolés chez les espèces aviaires qui présentent les mêmes caractéristiques que FeSV, et parmi eux les virus de Fujinami et PRC II (Shibuya et al, 1980; Barbacid et al, 1981).

#### IV - Les virus défectifs des leucémies aiguës

Les virus des leucémies aiguës ont pour cible des cellules du système hématopoïétique. Le prototype des virus des leucémies aiguës murines est le virus de la leucémie d'Abelson (A-MuLV). Ce virus induit une leucémie lymphoïde chez la souris et a pour cellule cible des précurseurs des lymphocytes de type B (Abelson et Rabstein, 1970; Siden et al, 1979; et voir Rosenberg et Baltimore, 1980). Le virus d'Abelson a d'autre part la capacité de transformer les lymphocytes B présents dans les cellules de moelle en culture (Rosenberg et Baltimore, 1976) ainsi que les fibroblastes de souris de la lignée NIH/3T3 in vitro (Scher et Siegler, 1975). Ce virus possède un gène spécifique (abl), qui comme celui de FeSV, code pour une polyprotéine (P120<sub>gag-abl</sub>) possédant une activité phosphokinase (Witte et al, 1978; Witte et al, 1980).

Les virus défectifs des leucémies aiguës du poulet ("defective leukemia viruses" ou DLVs) possèdent également la propriété de transformer différentes cellules cibles du système hématopoïétique entraînant la mort de l'animal en deux semaines. Les DLVs, composés de sept isolats indépendants, et provenant de leucémies naturelles du poulet, ont été subdivisés en trois groupes en fonction du type de néoplasme induit et du phénotype de différenciation des cellules hématopoïétique qu'ils transforment in vitro (Graf et Beug, 1978; Beug et al, 1979) (voir Tableau II).

Cela comprend le virus de l'érythroblastose (AEV), les virus de la myélocytomatose (MC-29, MH-2, CM-II, et OK-10), et les virus de la myéloblastose (AMV et E26) qui transforment respectivement les érythroblastes, les macrophages, et les myéloblastes (voir Figure 8). A l'exception d'AMV, tous les DLVs transforment les fibroblastes in vitro et sont capables d'induire des sarcomes (AEV et MC-29) et des carcinomes (MC-29) in vivo.

TABLEAU II

Les virus défectifs des leucémies aiguës (DLVs)

| Type de virus | Souche virale | Pays et année d'origine       | Neoplasme d'origine                           | Type de neoplasme induit   |
|---------------|---------------|-------------------------------|---|--|
| AEV           | ES4           | Danemark, 1933                | Sarcome et myélocytomatose<br>Erythroblastose | Erythroblastoses;<br>sarcomes<br>Erythroblastoses;<br>sarcomes           |
|               | R             | Danemark, 1931                |   |  |
| MC29          | MC29          | Bulgarie, 1964                | Myélocytomatose                               | Myélocytomatoses;<br>carcinomes du foie et des reins                     |
|               | CMII          | Rep. Federale Allemande, 1964 | Myélocytomatose                               | Myélocytomatoses   |
|               | MH2           | Angleterre, 1927              | Endothéliome (?)                              | Carcinomes du foie et des reins;<br>sarcomes;<br>leucémies monocytaires. |
|               | OK10          | Finlande, 1975                | Endothéliome (?)                              | Endothéliome (?)   |
| AMV           | AMV/BAI-A     | U.S.A., 1941                  | Neurolymphome                                 | Myéloblastose  |
|               | E26           | Bulgarie, 1962                | Leucémie                                      | Erythroblastose  |

( d'après Graf et Beug, 1978 )

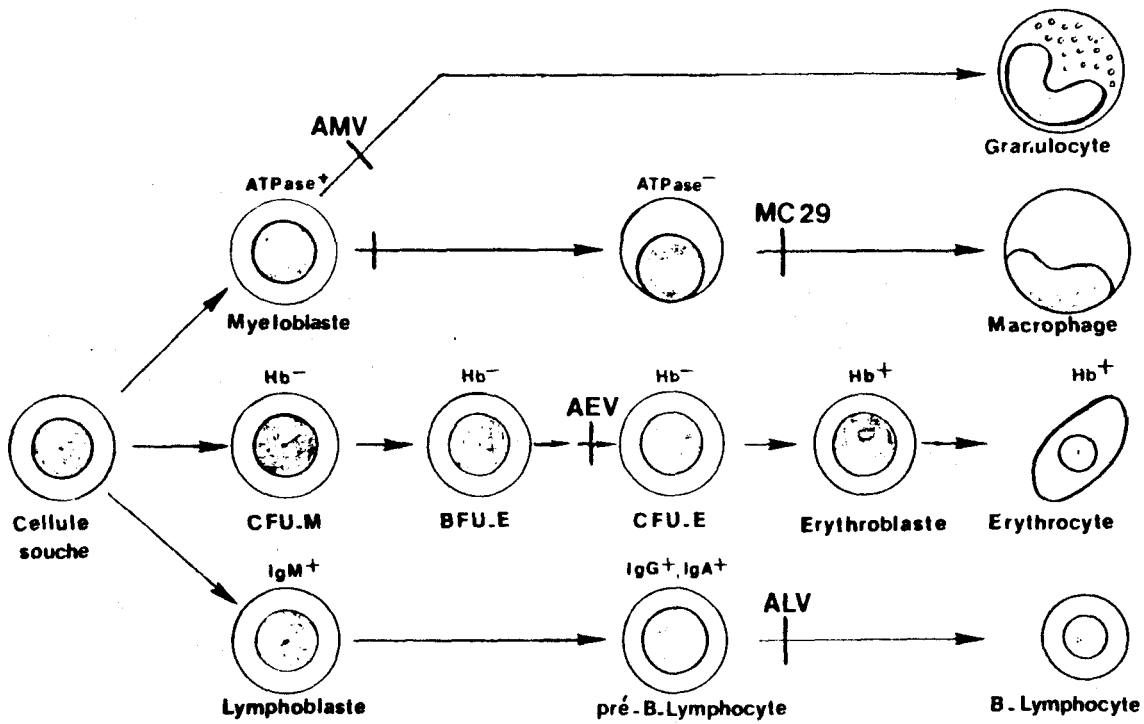


FIGURE 8 : Voies de différenciation des cellules hématopoïétiques chez les oiseaux et cellules cibles des rétrovirus aviaires

(d'après Graf et Beug, 1978; Gazzolo et al, 1980)

- - sens de la différenciation
- ⊥→ - blocage de la différenciation
- IgM - immunoglobuline M
- IgG - immunoglobuline G
- IgA - immunoglobuline A
- Hb - hemoglobine
- CFU.M - "colony forming unit, marrow"
- BFU.E - "burst forming unit, erythroid"
- CFU.E - "colony forming unit, erythroid"



Les DLVs représentent le seul système rétroviral où trois types de néoplasmes différents sont induits de façon spécifique et reproductible par différents virus provenant d'une seule espèce. L'utilisation de ce système devrait nous permettre de répondre aux questions suivantes :

(1) Différents gènes cellulaires, tous transduits du poulet, peuvent-ils produire différents types de leucémies aiguës ?

(2) Combien de gènes transformants sont en jeu ?

(3) Existe-t-il une corrélation entre la présence d'un gène donné et un type particulier de maladie hématopoïétique ?

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous attacherons à répondre à ces questions, et nous montrerons que le phénomène de transduction des gènes cellulaires par un virus leucémogène peut être ainsi généralisé.

RESULTATS

PREMIERE PARTIE



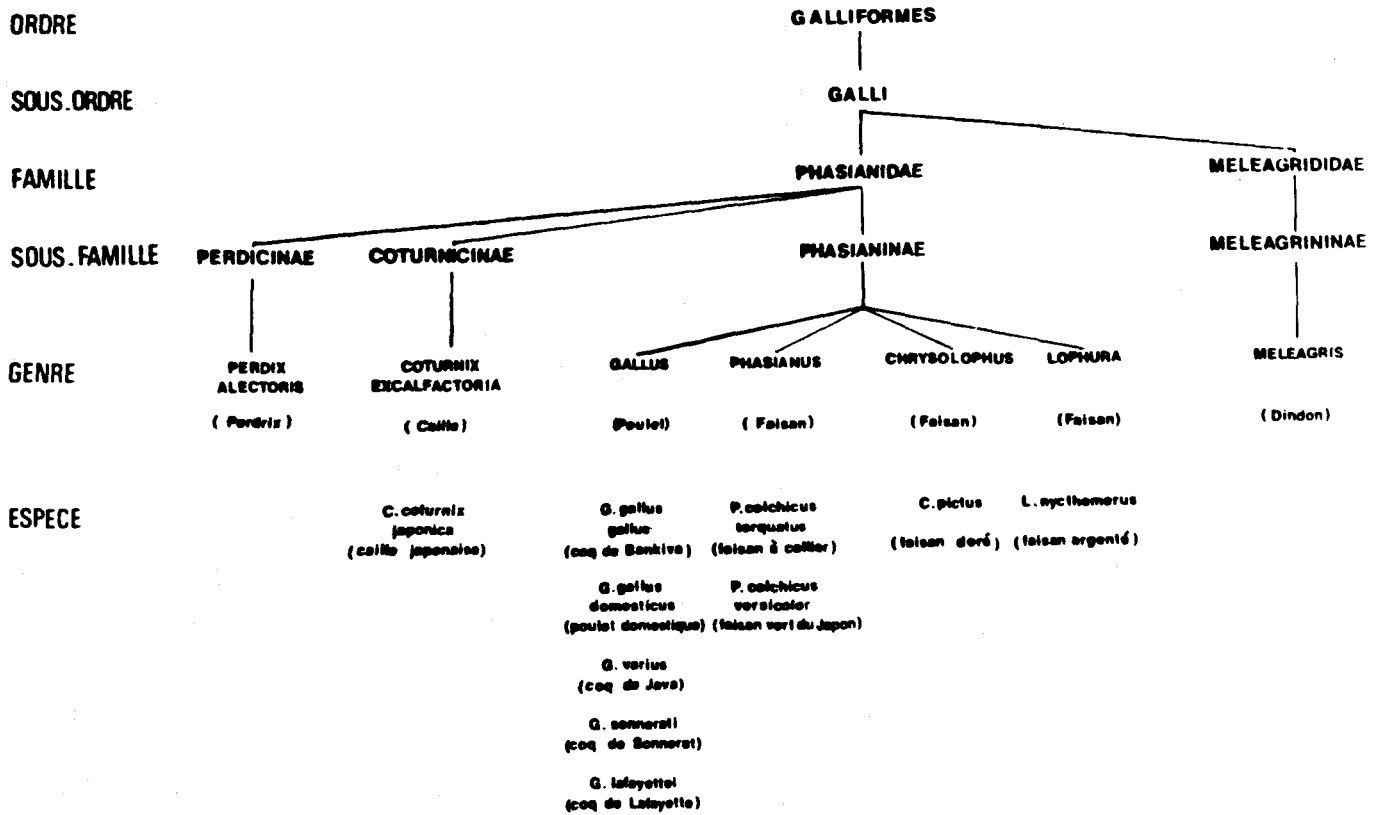


FIGURE 9 : Schéma de l'arbre phylogénétique des espèces de l'ordre des Galliformes



ORIGINE et REPARTITION des SEQUENCES HOMOLOGUES au VIRUS

ENDOGENE RAV-0 CHEZ les ESPECES de GALLIFORMES

La présence de génomes endogènes homologues aux rétrovirus de type C a été démontrée chez de nombreuses espèces de vertébrés (Huebner et Todaro, 1969; et voir Weiss, 1975; et Todaro, 1978). Chez le poulet domestique, on a mis en évidence des gènes endogènes viraux qui peuvent être silencieux ou exprimés, et qui peuvent coder pour tout ou partie de l'information génétique du virus RAV-0 (Vogt et Friis, 1971; Hayward et Hanafusa, 1975; Astrin, 1978; Astrin et al, 1979b; Hayward et al, 1979). Les expériences d'hybridation moléculaire en phase liquide ont indiqué que des séquences homologues au génome RAV-0 sont aussi endogènes chez d'autres espèces aviaires (Tereba et al, 1975; Stehelin et al, 1976b), et que le pourcentage d'hybridation et la thermostabilité des hybrides, formés entre les sondes virales radioactives et l'ADN de tissus sains, sont en accord avec la phylogénie des espèces d'oiseaux par rapport au poulet. Ces expériences amenaient à penser que les séquences homologues à RAV-0 divergeaient de manière similaire aux autres gènes cellulaires, en suivant strictement l'évolution des Galliformes (voir Figure 9).

En recherchant la présence des séquences homologues à RAV-0 chez des espèces exotiques, nous avons obtenu des résultats qui sont en désaccord avec cette interprétation.

I - Expression des gènes viraux endogènes chez plusieurs espèces de Galliformes

La capacité des fibroblastes d'embryons de différentes espèces d'oiseaux à compléter un mutant de délétion du gène env du virus RSV est une fonction de l'expression des gènes viraux endogènes. Seuls les fibroblastes d'embryon de poulet domestique (Gallus gallus) et de son ancêtre présumé, le coq de Bankiva, "Red Jungle Fowl" (Gallus gallus) ainsi que du faisan japonais vert, "Green Jungle Fowl" (Phasianus versicolor) possèdent le facteur "helper" du poulet ("chf") permettant la production de virus RSV complet. Par contre, deux espèces de poulets exotiques, le coq de Sonnerat (Gallus sonnerati) et

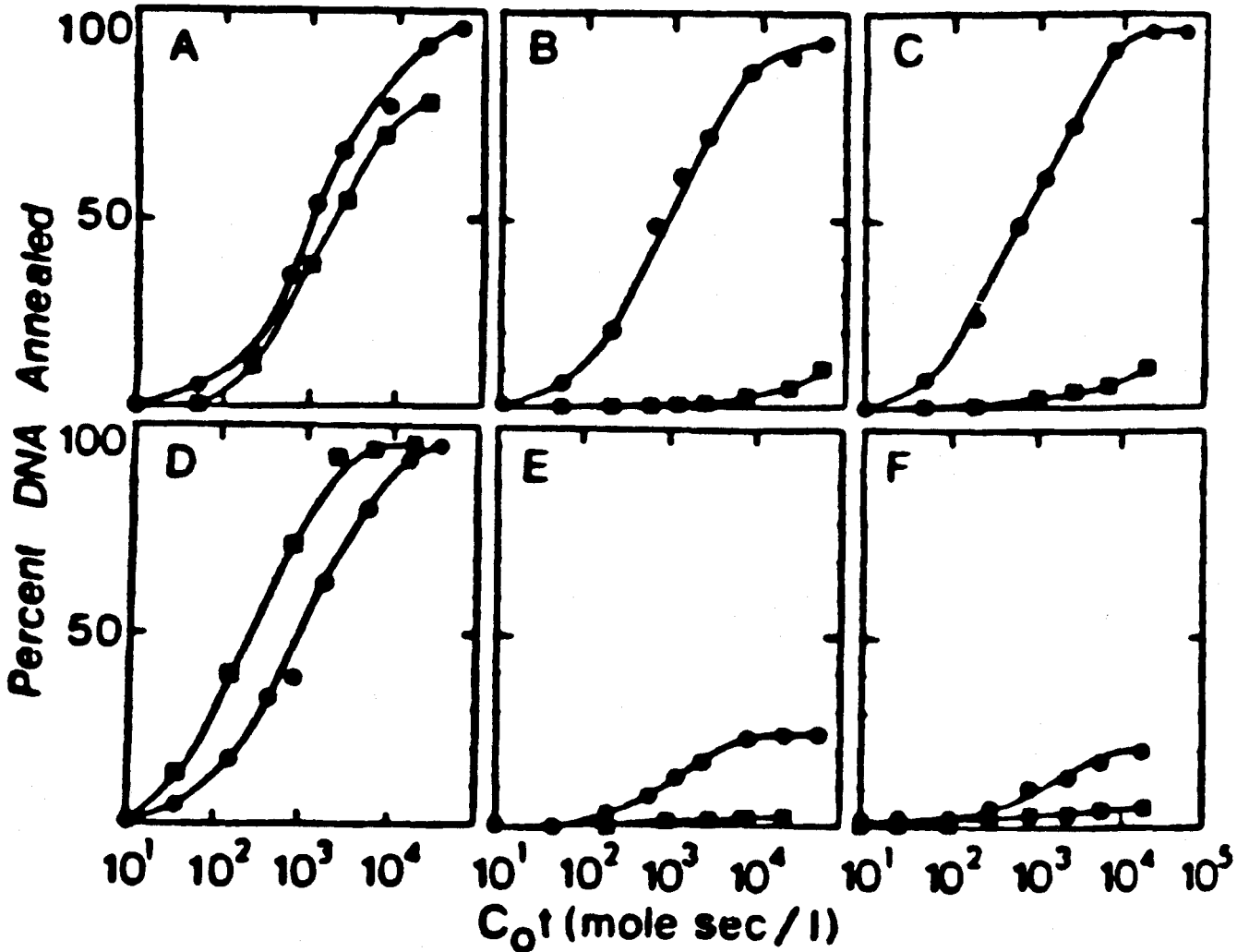


FIGURE 10 : Cinétiques d'hybridation des sondes  $cdNA_{RAV-0}$  et des séquences d'ADN de poulet avec différents ADNs d'espèces aviaires

(●—●) ADN séquence unique [ $^3H$ ] et (■—■)  $cdNA_{RAV-0}$

- (A) - ADN de poulet domestique
- (B) - ADN de coq de Sonnerat
- (C) - ADN de coq de Java

- (D) - ADN de coq de Bankiva
- (E) - ADN de faisan à collier
- (F) - ADN de caille japonaise

le coq de Java (Gallus varius), ne permettent aucune complémentation. Nous avons alors cherché s'il y avait une relation entre la présence de gènes viraux endogènes de type RAV-0 et la complémentation.

## II - Présence de RAV-0 et Phylogénie des espèces de Galliformes.

En utilisant les techniques d'hybridation moléculaire en phase liquide, nous avons cherché à savoir si la présence des séquences RAV-0 chez différentes espèces aviaires pouvait être liée à la phylogénie.

L'ADN total de ces espèces a été hybridé avec, d'une part, une sonde radioactive représentant les séquences RAV-0 et, d'autre part, une sonde représentant les séquences uniques (ou non réitérées) du poulet domestique.

Les séquences non répétitives ne sont représentées qu'une fois par génome haploïde (Britten et Kohne, 1968) et ont été utilisées comme standard dans les réactions d'hybridation moléculaire. Les cinétiques d'hybridation entre l'ADN non répétitif de poulet et l'ADN cellulaire d'espèces aviaires ont permis le calcul du nombre de copies de virus endogènes. De plus, le pourcentage maximum d'hybridation a donné une indication de la distance phylogénétique entre l'ADN testé et celui du poulet (Benveniste et Todaro, 1976).

Les cinétiques en condition stricte d'hybridation sont rapportées sur la Figure 10 (Article I, Figure 1, page 624). Elles montrent l'hybridation entre une sonde RAV-0 et l'ADN total de poulet domestique, G. gallus (A), de trois espèces de poulet exotique, G. sonnerati (B), G. varius (C), G. gallus (D), du faisan à collier, Phasianus colchicus (E), et de la caille japonaise, C. coturnix japonica (F). Les résultats d'hybridation avec l'ADN "séquences uniques" de poulet ont donné une valeur de Cot plateau de 100% avec toutes les espèces du genre Gallus, le plateau n'atteignant que 25% avec l'ADN de faisan, et 20% avec l'ADN de caille.

Ces résultats sont en accord avec la relation phylogénétique de ces espèces, étudiée par la systématique classique des membres de la famille des Phasianidae (voir Figure 9) (Darwin, 1868; Delacour 1977), ou par l'étude des transferrines ou albumines de ces espèces (Prager et al, 1974). Par contre, les pourcentages d'hybridation obtenus avec la sonde cDNA<sub>RAV-0</sub> sont de 81% et 99% avec l'ADN de poulet et l'ADN de G. sonnerati respectivement, alors que l'on n'a détecté aucune homologie avec l'ADN des autres espèces du genre Gallus, du faisan, ou de la caille. Les valeurs de Cot<sub>1/2</sub> permettent d'estimer à une ou deux le nombre de copies des séquences RAV-0 par génome haploïde chez le poulet domestique, et à trois à quatre chez le poulet exotique, Gallus gallus.

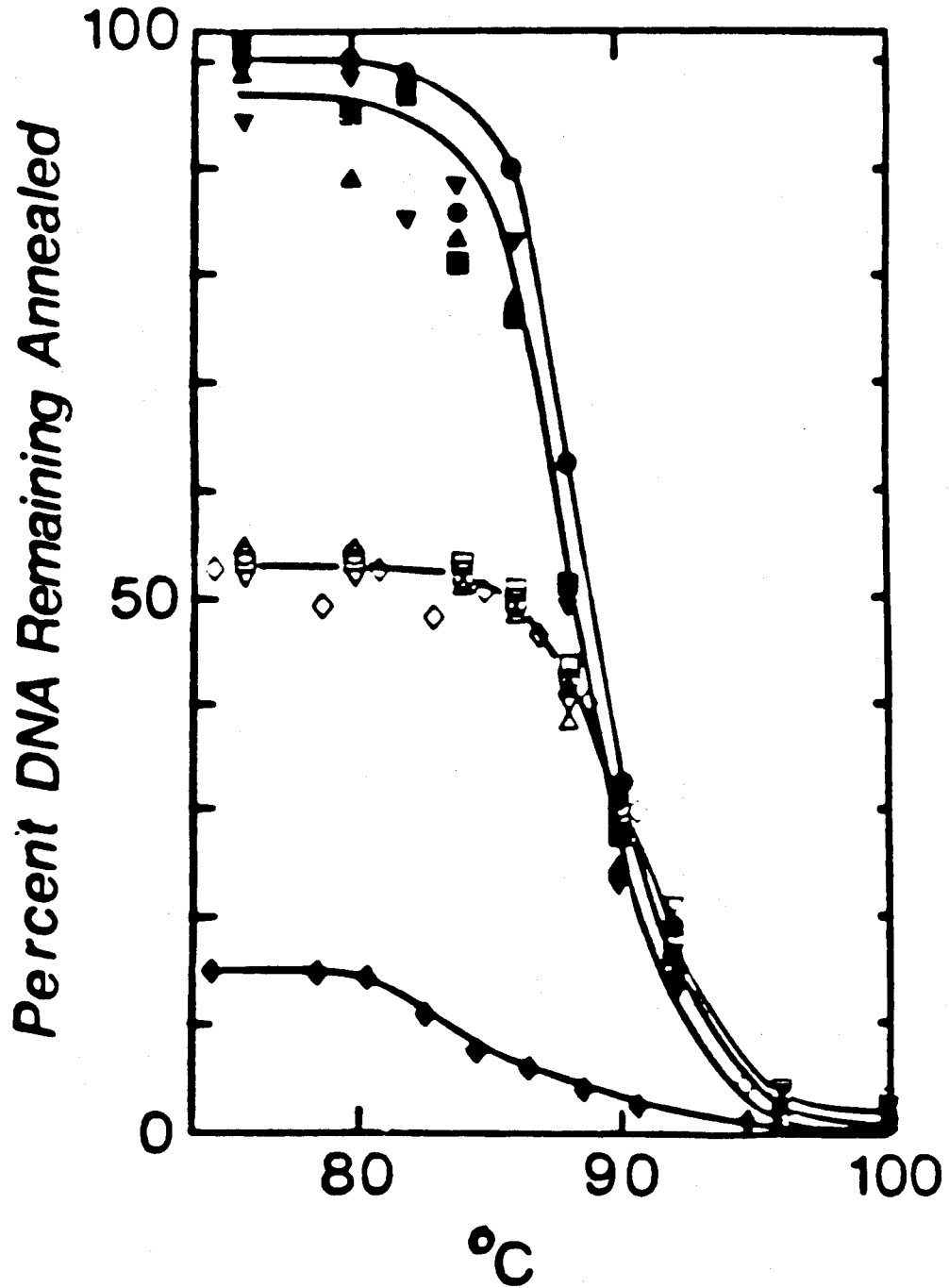


FIGURE 11 : Profils de dénaturation thermique d'hybrides formés entre l'ADN séquence unique de poulet [ $^3\text{H}$ ] et différents ADNs d'espèces aviaires

- (●—●) - ADN de poulet domestique
- (■—■) - ADN de coq de Bankiva
- (▲—▲) - ADN de coq de Sonnerat
- (▼—▼) - ADN de coq de Java
- (◆—◆) - ADN de faisan à collier

Dans chaque série d'hybridation a été inclus un contrôle interne représentant un hybride formé entre un cDNA td Pr C [ $^{32}\text{P}$ ] et l'ADN de cellules XC (voir symboles ouverts).



### III - Etudes par dénaturation thermique

Afin d'étudier plus précisément la relation entre espèces aviaires, nous avons comparé les profils de dénaturation des hybrides formés entre l'ADN de trois espèces de poulet exotique et d'une espèce de faisan. Le  $T_m$ , ou température de fusion de 50% des hybrides, donne une mesure exacte du taux de mutation des bases nucléotidiques; une baisse d'un degré de  $T_m$  correspond à 1% de bases mutées (Kohne, 1970; Bonner et al, 1973). La thermostabilité des hybrides formés avec l'ADN non répétitif de différentes espèces donne une mesure de leur distance phylogénétique.

Les valeurs de  $T_m$  de 85° entre l'ADN non répétitif de poulet et l'ADN d'autres espèces (Figure 11; Article I, Figure 2, p 625) ont montré que les espèces du genre Gallus sont plus étroitement reliées phylogénétiquement au poulet domestique que les espèces du genre Phasianus. Par contre, la présence des séquences RAV-0 n'est pas corrélable avec l'évolution des espèces de Galliformes.

### IV - Recherche de séquences homologues à RAV-0 en conditions non strictes

En utilisant des conditions strictes d'hybridation moléculaire, nous n'avons pas pu détecter d'homologie entre la sonde RAV-0 et l'ADN de faisan à collier (P. colchicus) alors que cette espèce a été montrée posséder RAV-0 par d'autres auteurs (Tereba et al, 1975). Nous avons donc testé les mêmes espèces de Galliformes en utilisant des conditions plus douces d'hybridation (en haute concentration saline) et de détection des hybrides (par colonne d'hydroxyapatite permettant de révéler des hybrides à bases peu ou mal appariées (Pice et Paul, 1971). Les résultats présentés sur la Figure 12 (Article I, Figure 3, p 626) et résumés dans le Tableau III (Article I, Tableau I, p 627) montrent que même dans ces conditions, on n'a pas détecté d'homologie de séquences avec RAV-0 dans l'ADN des deux poulets exotiques, G. sonnerati et G. varius, alors qu'une plus grande homologie a été observée chez le faisan et la caille.

### V - Détection des séquences RAV-0 par la méthode de Southern

Afin d'examiner plus finement la présence des séquences apparentées à RAV-0 dans l'ADN des espèces de poulet exotique G. sonnerati et G. varius ainsi que dans l'ADN de poulet domestique et de son ancêtre présumé G. gallus, nous avons digéré l'ADN par l'enzyme de restriction Eco RI puis analysé l'ADN par transfert et hybridation sur nitrocellulose (Southern, 1975).

Cette méthode extrêmement sensible permet de détecter moins de 10 picogrammes

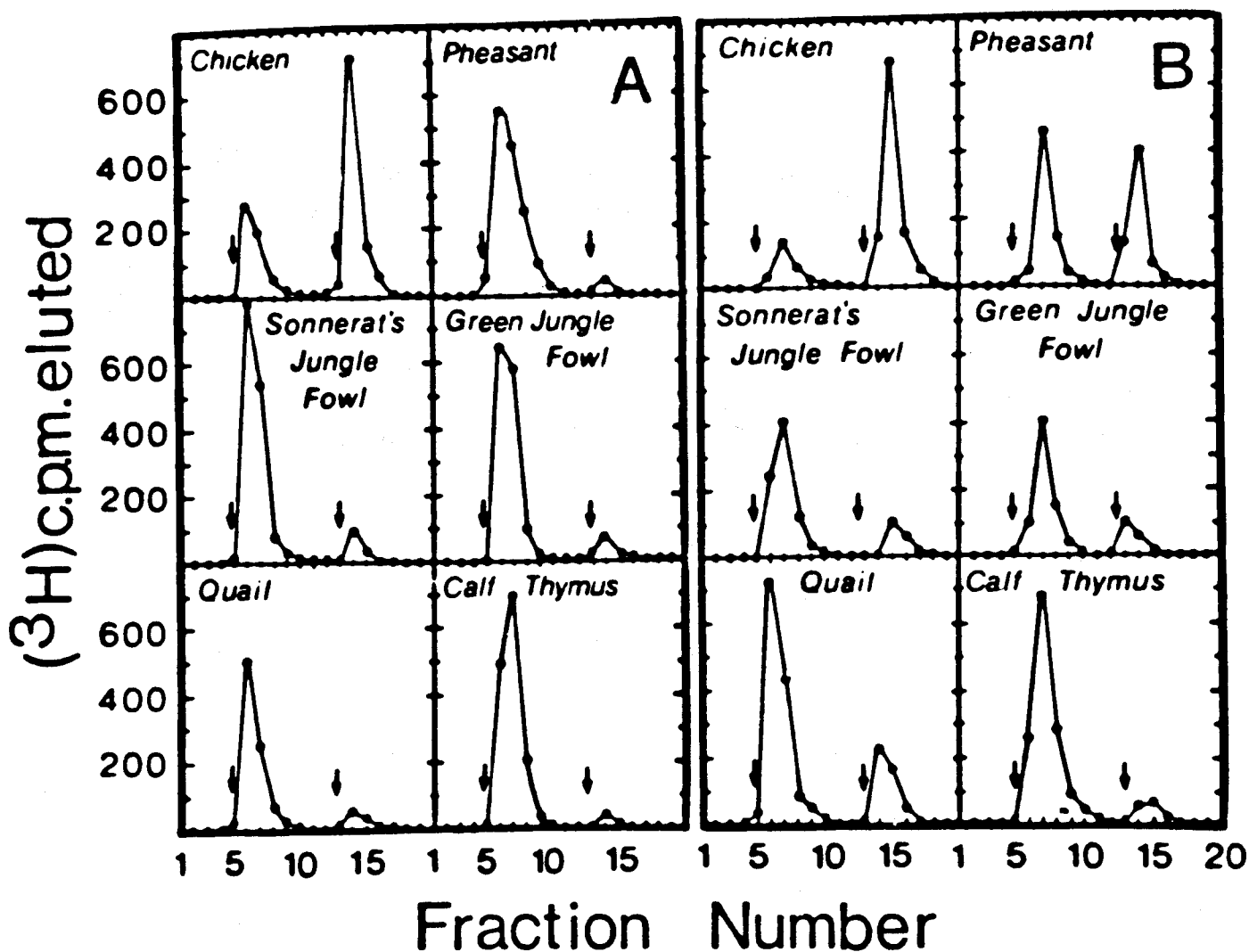


FIGURE 12 : Séparation sur colonnes d'hydroxyapatite d'hybrides formés entre une sonde  $cDNA_{RAV-0}$  [ $^3H$ ] et différents ADNs d'espèces aviaires

Panneau A - conditions strictes

Panneau B - conditions douces

"chicken" - poulet domestique

"pheasant" - faisan à collier

"Sonnerat's jungle fowl" - coq de Sonnerat

"green jungle fowl" - coq de Java

"quail" - caille

"calf thymus" - thymus de veau

TABLEAU III

Hybridation de l'ADN d'espèces aviaires saines avec une sonde cDNA<sub>RAV-0</sub> [<sup>3</sup>H]  
 en différentes conditions de salinité

| Hybridization of <sup>3</sup> H-RAV-0 cDNA to Normal Avian DNAs under Varying Conditions of Stringency |  |  |                                     |  |  |
|--|--|--|-------------------------------------|--|--|
| Source of DNA  | Extent of Hybridization (%) of <sup>3</sup> H-RAV-0 as Assayed by: |  |                                     |  |  |
|  | S <sub>1</sub> Nuclease Digestion <sup>a</sup>                     | Hydroxyapatite Chromatography <sup>b</sup> |                                     | T <sub>m</sub> with <sup>3</sup> H-Unique Sequence Chicken DNA (°C) <sup>c</sup> | Approximate Phylogenetic Distance from Domestic Chicken (Years x 10 <sup>-2</sup> ) <sup>d</sup> |
|  |  | Stringent Conditions of Hybridization      | Relaxed Conditions of Hybridization |  |  |
| Domestic chicken (Spafas)  | 54   | 62   | 61                                  | 89   | 0  |
| Red Junglefowl   | 68   | NT <sup>e</sup>                            | NT                                  | 89   | 0  |
| Sonnerat's Junglefowl  | 7  | 9  | 21                                  | 89   | 0  |
| Green Junglefowl   | 8  | 8  | 20                                  | 89   | 5  |
| Ring-necked Pheasant <sup>f</sup>  | 2  | 4  | 48                                  | 85   | 30   |
| Japanese Quail   | 3  | 2  | 24                                  | 81   | 30   |
| Calf thymus  | NT   | 5  | 10                                  | —  | —  |





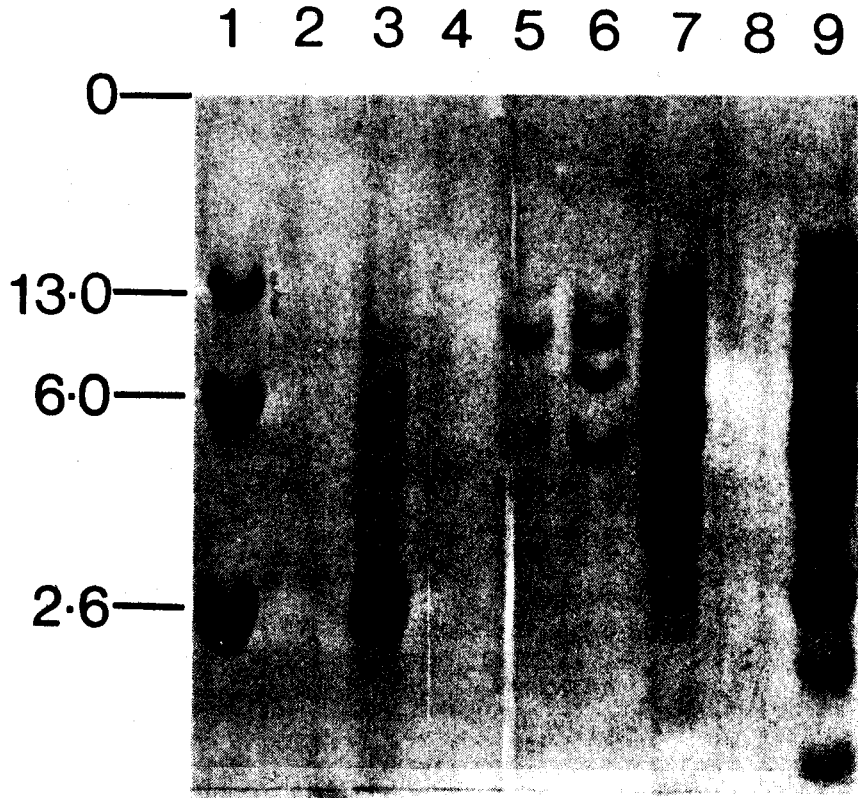


FIGURE 13 : Fragments d'ADN homologues à RAV-0 dans l'ADN de diverses espèces de la famille des Phasianidae

L'ADN extrait de fibroblastes en culture d'embryons de poulet ou d'érythrocytes du sang circulant a été digéré par l'enzyme de restriction EcoRI. Les fragments d'ADN fractionnés en taille par migration électrophorétique sur gel d'agarose sont transférés sur membranes de nitrocellulose. Les membranes sont hybridées avec une sonde radioactive cDNA<sub>RAV-0</sub> [<sup>32</sup>p] et les fragments hybrides révélés par autoradiographie.

Couloirs :

- (1) ADN de poulet domestique de souche SPAFAS (Embryon 100, fibroblastes en culture)
- (2) ADN de coq de Sonnerat (fibroblastes en culture d'embryon 1)
- (3) ADN de coq de Sonnerat (fibroblastes en culture d'embryon 6 infectés par RAV-0)
- (4) ADN de coq de Java (érythrocytes d'oiseau adulte)
- (5) ADN de faisan vert du Japon (fibroblastes d'embryon 2)
- (6) ADN de faisan vert du Japon (fibroblastes d'embryon 6)
- (7) ADN de faisan à collier (fibroblastes en culture d'embryon 2)
- (8) ADN de faisan argenté (érythrocytes d'oiseau adulte)
- (9) ADN de cellules XC (cellules de rat contenant dix à vingt copies de génome de RSV)

d'ADN viral. La Figure 13 (Article I, Figure 4, p 628) montre sans ambiguïté que l'on n'a observé aucun signal d'hybridation entre l'ADN de G. sonnerati, G. varius, ou du faisan argenté, Lophura nycthemerus, et une sonde  $cdNA_{RAV-0}$  marquée au phosphore 32 de haute radioactivité spécifique. Par contre, on a détecté une hybridation variable avec les autres ADNs testés, isolés du poulet domestique (couloir 1), du faisan japonais, P. versicolor (couloirs 5 et 6), du faisan à collier, P. colchicus (couloir 7), ou de cellules XC de rat qui possèdent 10 à 20 copies intégrées du virus RSV (couloir 9). La Figure 14 (Article I, Figure 5, p 629) montre qu'aucune hybridation n'a pu non plus être détectée avec l'ADN d'un autre poulet exotique, G. Lafayettei ou poulet de Ceylan.

Il était possible que l'absence des séquences apparentées à RAV-0 soit due à une restriction à l'infection de ces espèces par le virus RAV-0. Nous avons trouvé que les cellules de G. sonnerati, infectées par RAV-0 contiennent des copies provirales (Figure 13, couloir 3; Figure 14, couloir 13) et produisent du virus. Ces résultats démontrent que les poulets exotiques qui ne possèdent pas d'information relative aux séquences virales endogènes, peuvent être infectés par le virus RAV-0.

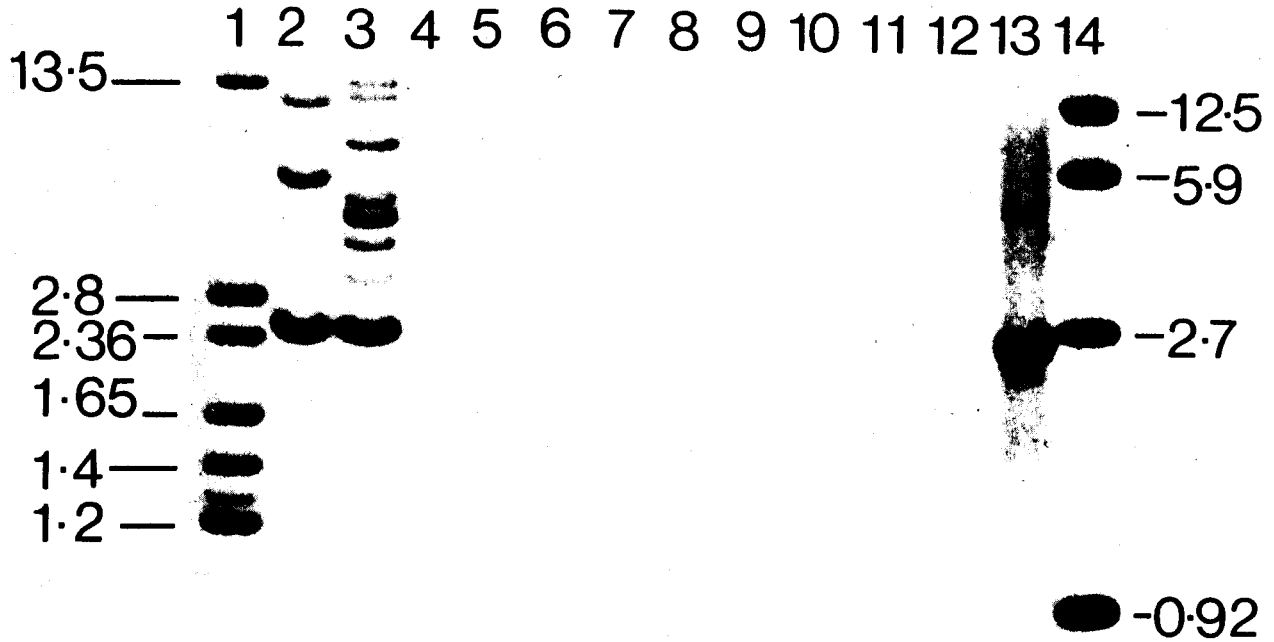


FIGURE 14 : Fragments d'ADN "EcoRI" homologues à RAV-0 dans l'ADN d'autres espèces de l'ordre des Galliformes

Procédé expérimental (voir Figure 13)

Couloirs :

- (1) ADN d'adenovirus II digéré par EcoRI marqué au  $[^{32}\text{P}]$
- (2) ADN de poulet domestique de souche SPAFAS (fibroblastes en culture)
- (3) ADN de coq de Bankiva (fibroblastes en culture)
- (4-7) ADN de coq de Ceylan (érythrocytes de quatre oiseaux adultes différents)
- (8-11) ADN de coq de Sonnerat (érythrocytes de quatre adultes distincts)
- (12) ADN de coq de Sonnerat (fibroblastes en culture d'embryon 6)
- (13) ADN de coq de Sonnerat (fibroblastes en culture d'embryon 6 infectés par RAV-0)
- (14) ADN d'adenovirus II digéré par XbaI marqué au  $[^{32}\text{P}]$



## CONCLUSION

L'ancêtre du poulet domestique, le coq de Bankiva, "Red Jungle Fowl" (G. gallus), possède des séquences très semblables à RAV-0, en accord avec les expériences biologiques de Weiss et Biggs (1972). Les cinétiques de réassociation indiquent que le poulet domestique possède une à deux copies complètes du génome RAV-0 par génome haploïde, résultats en accord avec ceux de Neiman (1973) et Groudine et al (1978) alors que le coq de Bankiva contient trois à quatre copies du génome RAV-0 par génome haploïde. On n'a jamais détecté de séquences apparentées à RAV-0 dans les ADNs des poulets exotiques, G. sonnerati, G. varius, et G. Lafayettei, quelque soit les conditions (strictes ou douces) alors que des séquences partiellement homologues ont été observées chez le faisan (Phasianus) en conditions douces.

L'analyse des fragments digérés par les enzymes de restriction a révélé la présence de séquences homologues à RAV-0 dans l'ADN des espèces de faisan, P. versicolor et P. colchicus, mais pas dans l'ADN des trois poulets exotiques.

DEUXIEME PARTIE

MISE en EVIDENCE de TROIS NOUVEAUX ONCOGENES CHEZ les VIRUS

DEFECTIFS des LEUCEMIES AIGÜES AVIAIPES

Les virus défectifs des leucémies aiguës aviaires (DLVs) ont été classés en trois groupes en fonction de leurs propriétés biologiques in vivo et in vitro. Nous avons recherché s'il existait un lien entre le type de néoplasme induit par les virus de chacun des groupes de DLVs et la présence de séquences nucléotidiques spécifiques. Certains rétrovirus étant capables de transduire des gènes cellulaires les rendant hautement cancérogènes, de telles séquences spécifiques pourraient représenter de nouveaux oncogènes viraux.

I - Les DLVs sont apparentés aux ALVs

Les DLVs, isolés de tumeurs apparues naturellement chez le poulet, sont toujours associés à un ou plusieurs virus "helpers" aviaires qui sont nécessaires à leur propagation. Seuls les virus leucémiques aviaires (ALVs) sont capables de compléter la déficience des DLVs à se répliquer (Hu et al, 1978). Cette étroite association nous a amené à penser à l'existence d'une analogie entre les gènes des ALVs et ceux des DLVs.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé des cellules aviaires clonées possédant le provirus DLV en l'absence de son virus auxiliaire.

De telles cellules, incapables de produire des particules virales (cellules non productrices ou "NP") possèdent dans leur cytoplasme plusieurs copies d'ARN viral représentant les produits de transcription du provirus DLV intégré.

L'ARN total des cellules NP a été analysé par les techniques d'hybridation moléculaire avec des sondes cDNA radioactives représentant :

- (1) une copie fidèle et complète du génome d'un ALV (cDNA<sub>rep</sub>),
- (2) des parties du génome d'un ALV (cDNA<sub>gag</sub>, cDNA<sub>pol</sub>, cDNA<sub>gag-pol</sub>, cDNA<sub>env</sub>, cDNA<sub>U3</sub>) ou
- (3) le gène src de RSV (cDNA<sub>src</sub>) (voir Figure 15).

Nos premières expériences ont été réalisées avec les sondes cDNA<sub>rep</sub> et cDNA<sub>src</sub> (Tableau IV; Article II, Tableau I, p 452). Nous avons ensuite précisé le

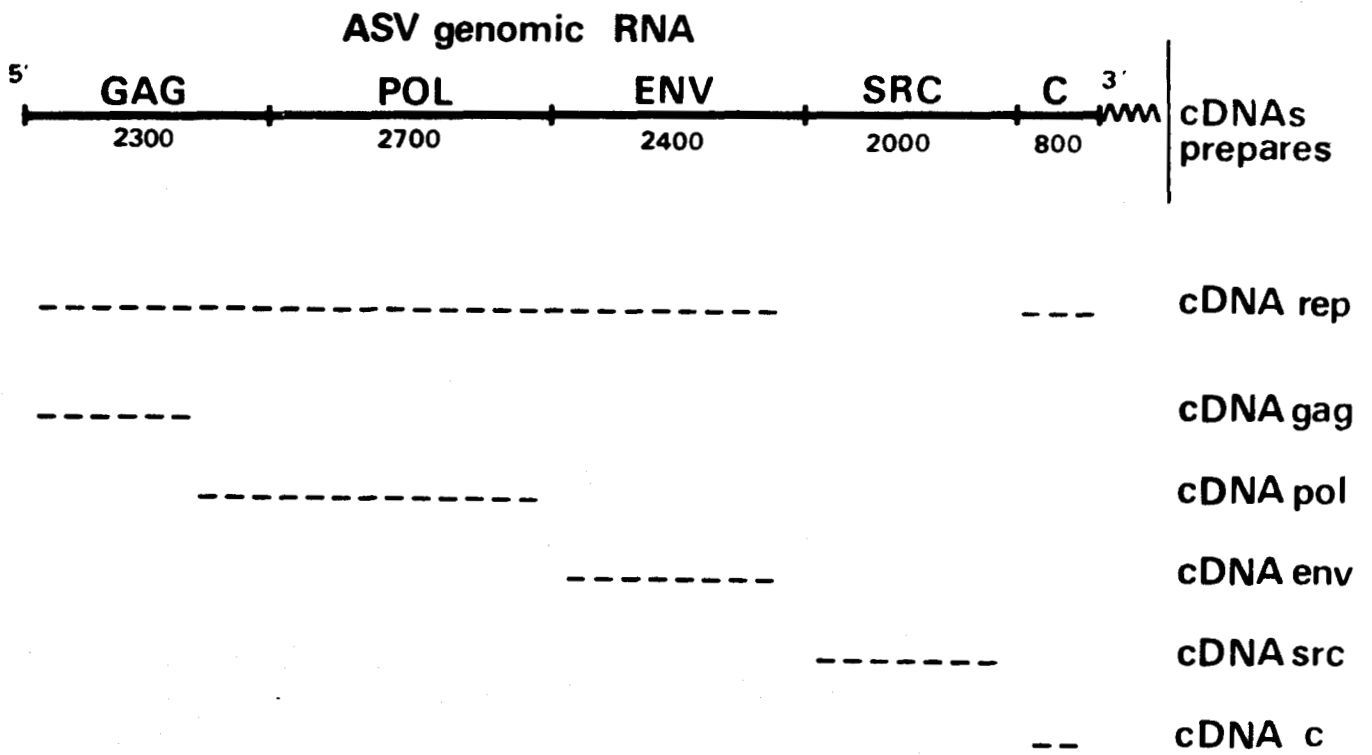


FIGURE 15 : Sondes radioactives [ $^{32}\text{P}$ ] et [ $^3\text{H}$ ] préparées à partir du génome d'un virus sarcomatogène aviaire.



TABLEAU IV

Le génome des DLVs est apparenté aux ALVs

| DLV strain | Type of nonproducer cell | Annealing  |                     |
|------------|--------------------------|--|---------------------|
|            |                          | (% S <sub>1</sub> resistance) with cDNA <sub>rep</sub> | cDNA <sub>src</sub> |
| 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                 |

L'ARN total de cellules non productrices transformées par différents DLVs a été extrait et hybridé avec les sondes cDNA<sub>rep</sub> et cDNA<sub>src</sub>. Les hybrides ont été révélés par la nucléase S<sub>1</sub>.



TABLEAU V

Le génome des DLVs est apparenté aux ALVs

| RNAs  | NP cell   | cDNAs tested: [% S <sub>1</sub> Resistance] |                   |                 |             |             |          |
|-------|-----------|---|-------------------|-----------------|-------------|-------------|----------|
|       |           | td rep<br>8200                              | gag.pol c<br>5800 | gag pol<br>5000 | env<br>2200 | pol<br>3000 | c<br>330 |
| AEV   | NP 75     | 28  | 27                | 15              | 16          | <5          | 28       |
| MC 29 | Q8        | 45  | 38                | 30              | 66          | <5          | 38       |
| CM II | QA6, QB2  | 42  |                   | 24              | 79          |             |          |
| MH 2  | QB3       | 32  |                   | 25              | 10          | <10         | 35       |
| OK 10 | QB9       | 77  | 87                |                 | 45          | 96          | 71       |
| E 26  | NP2 mbls  | 36  |                   | 13              | 60          | <3          |          |
| AMV   | Pool mbls | 50  |                   | 59              | <3          | 44          | 35       |

L'ARN total de cellules non productrices transformées par différents DLVs a été hybridé avec plusieurs sondes représentatives des gènes viraux d'un ASV.



contenu génétique de chacun des DLVs en hybridant les ARNs avec chacune des sondes représentant un gène d'ALV (Tableau V; Article III Tableau II, p 1216). Seul le pourcentage maximum d'hybridation a été rapporté pour chaque cDNA testé. Un exemple des courbes obtenues est rapporté (Figure 16) (Article IV, Figure 1, p 25) pour l'ARN des myéloblastes NP transformés par AMV et E26.

Les résultats ont montré que tous les DLVs testés contiennent des séquences apparentées aux ALVs avec des proportions variables d'un virus à l'autre (28% à 77%). Le pourcentage d'homologie avec les ALVs ne rend pas compte du contenu génétique total des DLVs dont le génome de taille 28S à 34S contient de 6000 à 8000 nucléotides (voir plus loin). Le fait qu'aucun des DLVs ne possède de séquences apparentées au gène src de RSV<sub>g</sub> (voir aussi Stehelin et Graf, 1978) indique que ces virus doivent contenir des séquences nucléotidiques non apparentées aux ALVs et RSV.

## II - Les DLVs possèdent des séquences spécifiques

La recherche de séquences spécifiques a été réalisée en analysant un prototype viral de chacun des trois groupes de DLVs, à savoir AEV, MC29, et AMV.

Les souches virales AEV et MC29 ont été obtenues par surinfection de cellules NP par un ALV auxiliaire hétérologue, RAV-2. Le virus produit a alors été testé pour son pouvoir oncogène sur des cellules de moelle en culture et propagé sur des érythroblastes (AEV) et des fibroblastes d'embryon de poulet (MC29). AMV a été obtenu à partir de plasma de poulets infectés.

Nous avons préparé des sondes cDNA spécifiques de ces virus en suivant la méthode utilisée pour la préparation de la sonde cDNA<sub>src</sub> (Figure 17; Article II, Figure 1 p 452; Stehelin et al, 1976a).

Les sondes cDNAs ont été sélectionnées de façon à hybrider exclusivement à l'ARN viral d'origine sans hybrider à l'ARN des virus "helpers" ou à l'ARN d'autres virus aviaires non défectifs. De telles sondes représentent les séquences spécifiques des virus AEV (cDNA<sub>aev</sub>), MC29 (cDNA<sub>mc29</sub>), (Sheiness et al, 1978; Sheiness et Bishop, 1979; Saule et al, 1980), et AMV (cDNA<sub>amv</sub>). En possession de telles sondes (de complexité d'environ 3700, 1800, et 2000 nucléotides pour les cDNAs aev, mc29 et amv, respectivement) nous avons mesuré le pourcentage maximum d'hybridation obtenu avec l'ARN total de tous les DLVs. Les résultats (Tableau VI; Article II, Tableau II, p 454) permettent de tirer plusieurs conclusions :

(1) Les cDNAs testés sont spécifiques des DLVs utilisés pour leur préparation et représentent des séquences non apparentées entre elles par

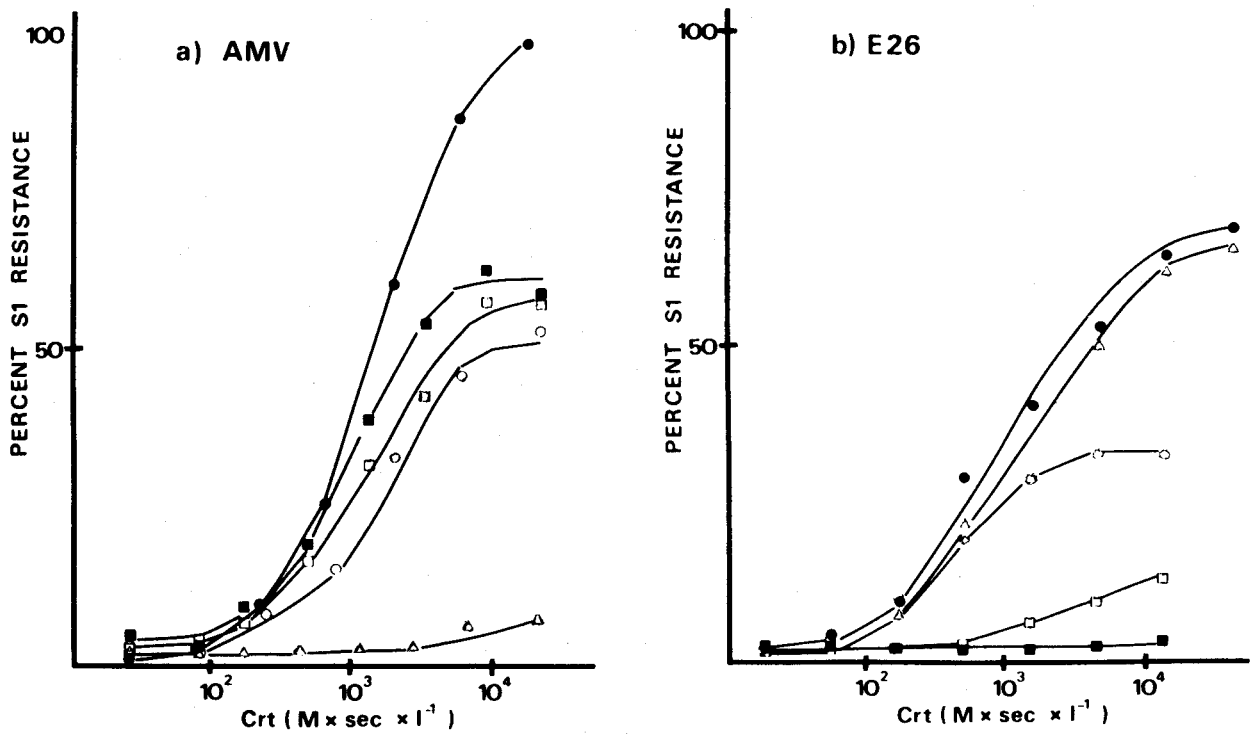


FIGURE 16 : Contenu génétique d'AMV et de E26

L'ARN total de myéloblastes transformés in vitro par AMV (panneau a) et par E26 (panneau b) a été hybridé avec différentes sondes en variant la concentration d'ARN. Les hybrides formés en conditions strictes d'hybridation (0.6 M NaCl; 68°C) sont détectés par digestion à la nucléase  $S_1$  comme décrit précédemment (Stehelin et Graf, 1978).

- Symboles : (○—○) -  $cDNA_{rep}$   
 (□—□) -  $cDNA_{gag-pol-U3}$   
 (▽—▽) -  $cDNA_{env}$   
 (●—●) -  $cDNA_{amv}$   
 (■—■) -  $cDNA_{mav}$



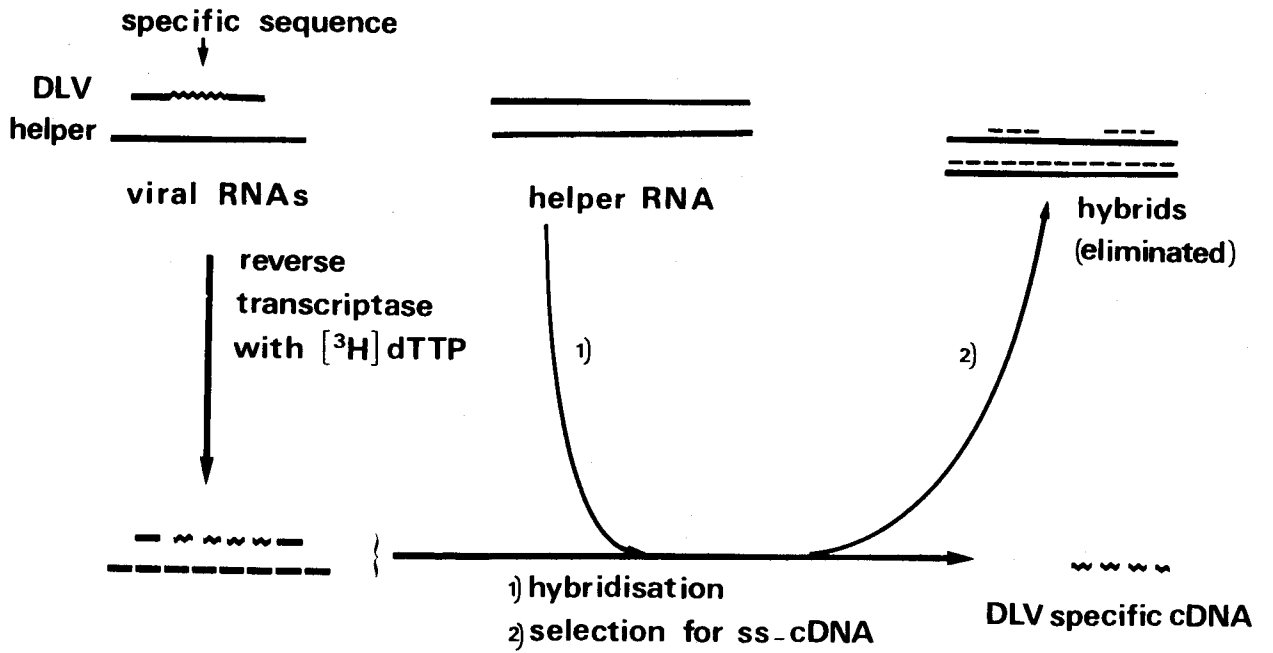


FIGURE 17 : Schéma de la préparation de sondes cDNA spécifiques du génome des DLVs



TABLEAU VI

Les DLVs possèdent des séquences spécifiques

| RNA derived from             | Annealing (% S <sub>1</sub> resistance) with |                      |                     |
|------------------------------|--|----------------------|---------------------|
|                              | cDNA <sub>aev</sub>                          | cDNA <sub>mc29</sub> | cDNA <sub>amv</sub> |
| <b>AEV</b>                   | 100  | <3                   | <3                  |
| <b>MC29</b>                  | <3   | 100                  | <3                  |
| <b>CMII</b>                  | <3   | 96                   | <3                  |
| <b>OK10</b>                  | <3   | 91                   | <3                  |
| <b>MH2</b>                   | <3   | 66                   | <3                  |
| <b>AMV</b>                   | <3   | <3                   | 100                 |
| <b>E26</b>                   | <3   | <3                   | 68                  |
| <b>ALV helpers (control)</b> | <3   | <3                   | <3                  |

L'ARN viral 50-70S de chaque souche de DLV a été extrait et hybridé à une valeur de Crt plateau avec les sondes spécifiques cDNA<sub>aev</sub>, cDNA<sub>mc29</sub>, et cDNA<sub>amv</sub>. Les pourcentages d'hybridation ont été standardisés à 100%.

hybridations croisées.

(2) Le cDNA<sub>mc29</sub> hybride avec les autres virus du groupe soit CMII, OK10 et MH-2. On retrouve cette même spécificité lorsque l'on teste l'ARN intracellulaire de cellules NP, montrant que les sondes sont bien spécifiques de chaque type de DLV (voir plus loin).

Il existe donc une stricte corrélation entre les séquences spécifiques détectées chez les virus et le type de leucémie aiguë.

### III - Taille du génome des DLVs

Les résultats d'hybridation moléculaire en phase liquide avec les sondes représentatives des gènes du génome d'ALV et des séquences spécifiques des DLVs ont permis un calcul de la complexité totale des séquences apparentées aux différentes sondes pour chacun des virus. Si nous avons détecté toute l'information génétique, la complexité totale devrait être égale au nombre de nucléotides du génome viral. Pour estimer la taille des génomes viraux, notre approche a été d'utiliser la technique de transfert ("blotting") adaptée aux ARNs (Alwine et al, 1977). Le milieu de culture de cellules productrices de virus DLV associé à son "helper" a été recueilli toutes les quatre heures. Les ARNs viraux ont été extraits puis séparés par électrophorèse en gel d'agarose avec des marqueurs ribosomiques de bactérie *E. coli* (16S et 23S), de caille (18S et 27S) et de cellules de singe (18S et 28S). L'ARN a été ensuite transféré sur papier activé et hybridé successivement avec des sondes marquées au [<sup>32</sup>P] cDNA<sub>rep</sub>, cDNA<sub>aev</sub>, cDNA<sub>mc29</sub>, et cDNA<sub>amv</sub>. Les résultats de ces expériences sont reportés sur la Figure 18 (Article III, Figure 2, p 1218) et Figure 19 (Article IV, Figure 2, p 24, et Figure 3, p 25).

Toutes les souches étudiées possèdent un ARN de 34S détecté par la sonde cDNA<sub>rep</sub>, représentant le génome du virus auxiliaire. Les bandes détectées par les sondes spécifiques sont plus petites (30S-32S), correspondant aux génomes des DLVs, excepté OK10 de taille 34S. Les résultats obtenus quant à la taille du génome 32S de l'AMV (7200-7400 nucléotides de long) ont été confirmés par plusieurs auteurs (Souza et al 1980; Duesberg et al, 1980; Gonda et al, 1981; Chen et al, 1981). La taille des génomes MC29 et MH-2, déterminée par hétéroduplexes (5700 nucléotides de long) (Hu et al, 1979a,b), est aussi en accord avec nos résultats. A l'exception de E26 et MH-2, la taille des génomes viraux des autres DLVs correspond aux complexités estimées par hybridation moléculaire.

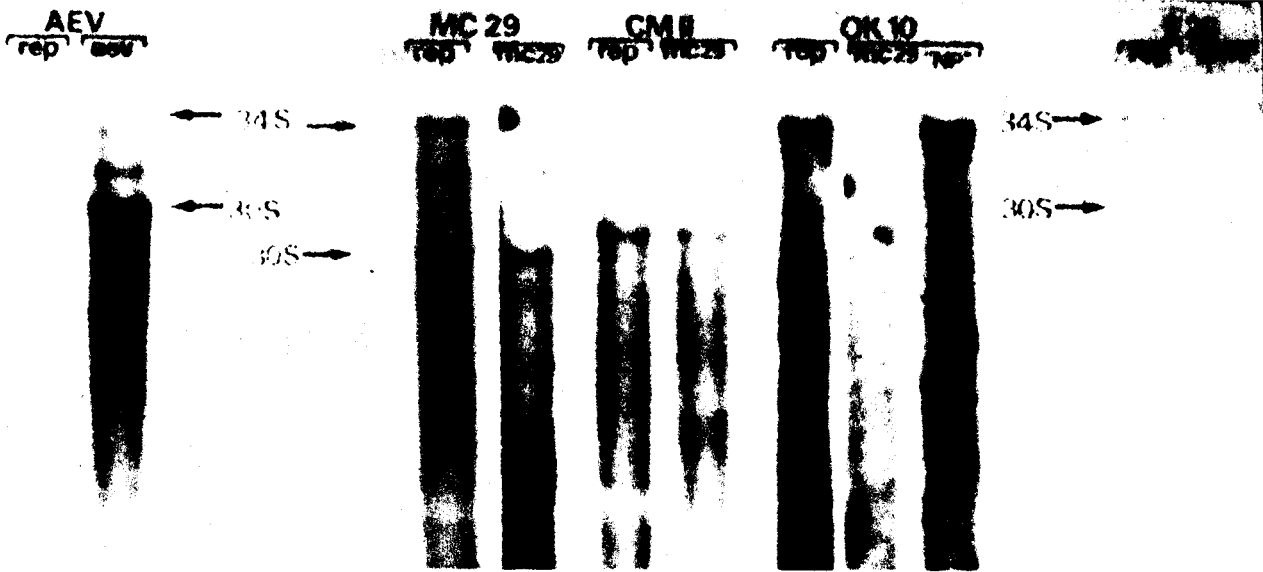


FIGURE 18 : Taille du génome des DLVs

L'ARN viral a été extrait de virus obtenus à partir de surnageants de cultures recueilli toutes les quatre heures. L'ARN a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose, puis transféré sur papier activé (DBM) et hybridé avec les sondes [<sup>32</sup>P] cDNA<sub>rep</sub>, cDNA<sub>aev</sub>, cDNA<sub>mc29</sub>, et cDNA<sub>amv</sub>.

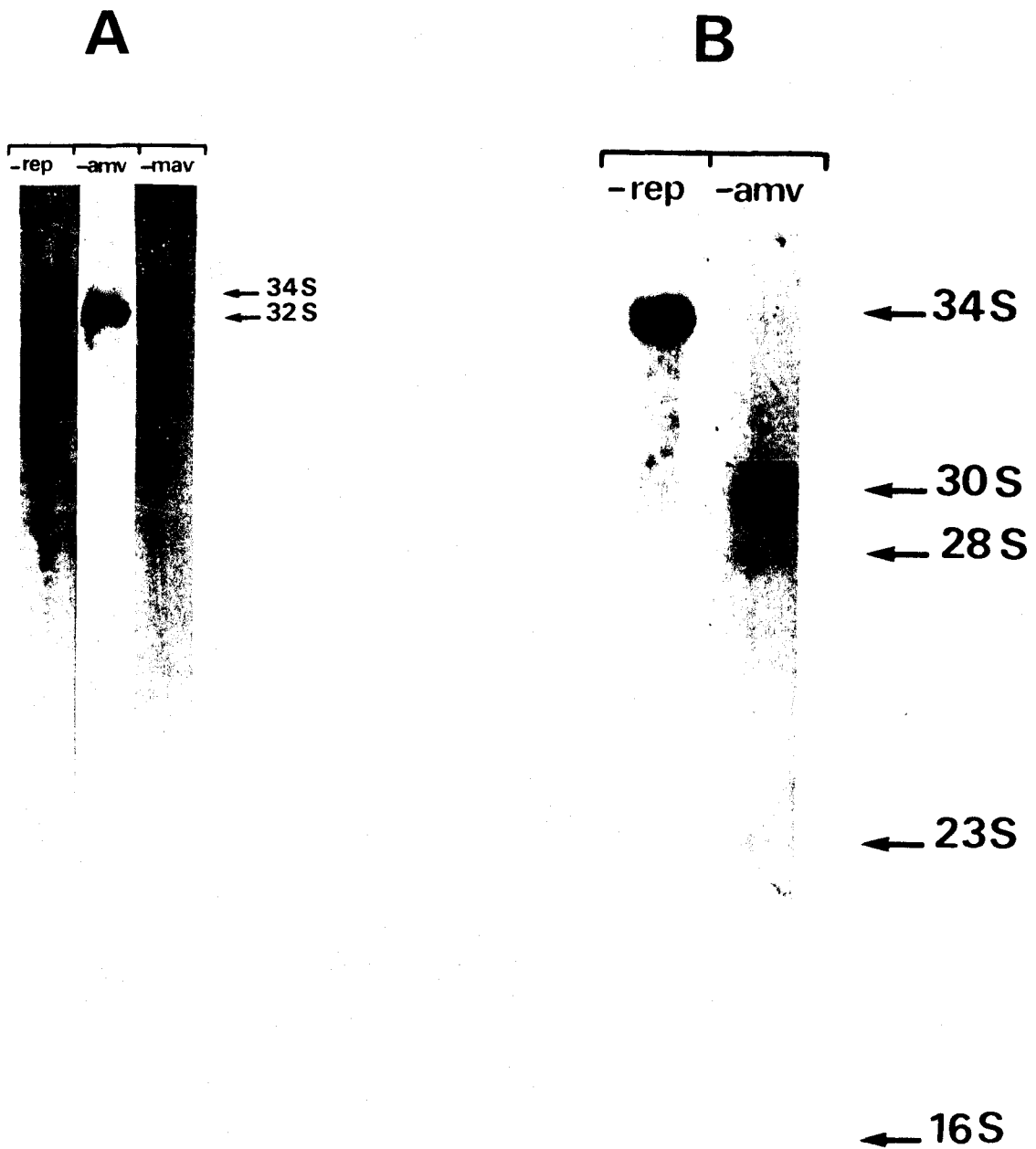


FIGURE 19 : Taille des génomes d'AMV et de E26:

L'ARN viral total a été extrait du plasma d'oiseaux malades. L'ARN a été sélectionné sur oligo dT cellulose, puis fractionné en taille par migration électrophorétique sur gel d'agarose. L'ARN a été ensuite transféré sur papier activé (DBM) et hybridé successivement avec les sondes marquées au [ $^{32}$ P].

(panneau A) - ARN de plasma de poulets infectés par AMV(MAV)

(panneau B) - ARN de plasma de poulets infectés par E26 (RAV-2).





#### IV - Structure du génome des DLVs

Nos résultats nous ont permis d'établir une carte provisoire de la structure génétique des DLVs [Figure 20 (Article III, Figure 3, p 1218) et Figure 21]. Cinq isolats (AEV, MC-29, CMII, MH-2, et E26) contiennent une partie du gène gag d'ALV qui doit être localisée à l'extrémité 5'.

Chacun de ces virus code pour une polyprotéine de fusion qui contient des déterminants antigéniques uniques (la portion "x"). La présence des protéines gag - x suggère que les séquences spécifiques sont adjacentes aux séquences gag. AMV et OK10 synthétisent une protéine gag précurseur (Pr76gag). Ces deux isolats possèdent tout ou partie du gène pol, montrant que les séquences spécifiques doivent être localisées dans la moitié 3' du génome. En accord avec cette interprétation, nous avons trouvé dans les myéloblastes NP transformés par AMV un messenger épissé de taille 20S (2500 nucléotides) qui contient les séquences spécifiques associées à la région U3 (Article III, Figure 2, p 24); de plus, aucune séquence apparentée au gène env des ALVs n'a été détectée (Article III, Tableau I p 21).

Les virus MH-2 et E26 semblent posséder des séquences nucléotidiques supplémentaires que nous n'avons pas détectées. Si ces séquences sont d'origine cellulaire, il est possible que le virus ait pu transduire différentes portions d'un gène dont seule une partie est présente dans différents isolats transformants. Dans ce cas, une partie seulement des séquences spécifiques serait détectée par la sonde. En conséquence, il nous a été impossible de déterminer l'ordre exact des gènes de ces deux virus.

#### V - Les séquences spécifiques ont une origine cellulaire

Nous avons recherché si on retrouvait chez le poulet des séquences nucléotidiques apparentées aux séquences spécifiques des DLVs. L'ADN total de cellules de poulet sain a été hybridé avec les sondes cDNA<sub>aev</sub>, cDNA<sub>mc29</sub>, et cDNA<sub>amv</sub>. La Figure 22 (Article II, Figure 2, p 453) montre que les trois types de séquences spécifiques possèdent un homologue dans l'ADN normal de cellules de poulet à raison de une à deux copies par génome haploïde.

Nous avons alors étendu cette recherche de séquences à d'autres espèces aviaires telles que le faisan, la caille, et le canard ainsi qu'à d'autres espèces de vertébrés. Les cinétiques d'hybridation en phase liquide (Figure 23; Article II, Figure 3, p 453) montrent que de telles séquences spécifiques peuvent être détectées non seulement chez les espèces aviaires que nous avons étudiées mais aussi chez les vertébrés supérieurs, Homo sapiens inclus. Le pourcentage

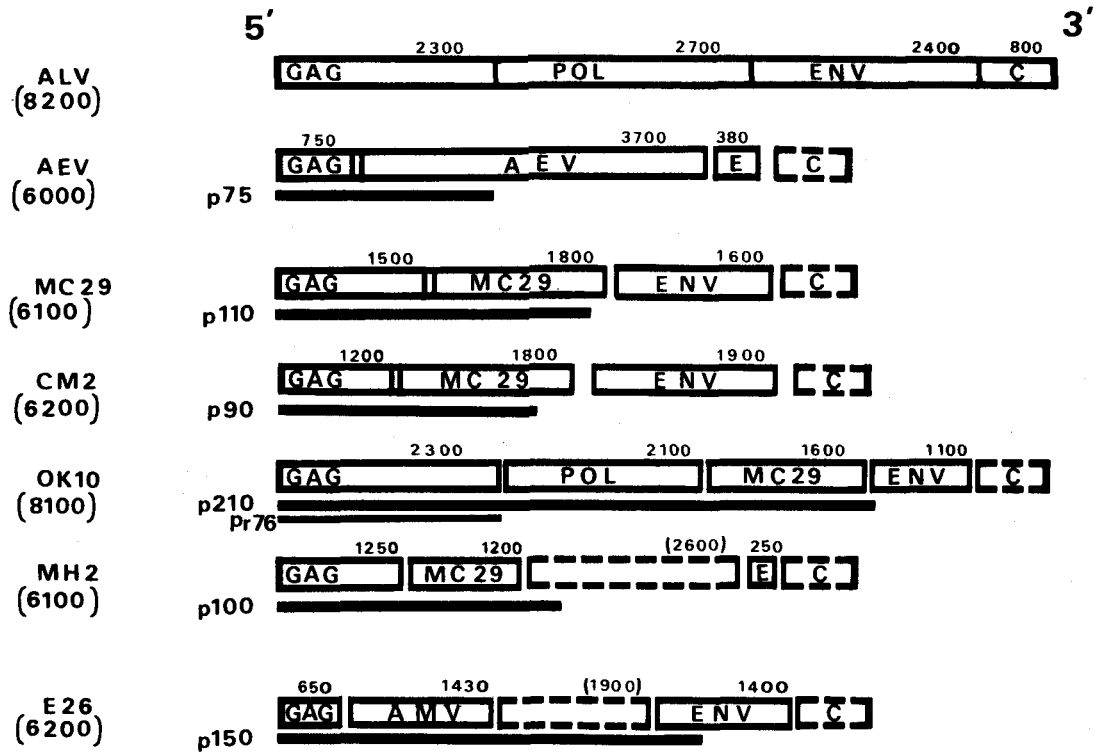


FIGURE 20 : Carte génétique de l'ARN des DLVs



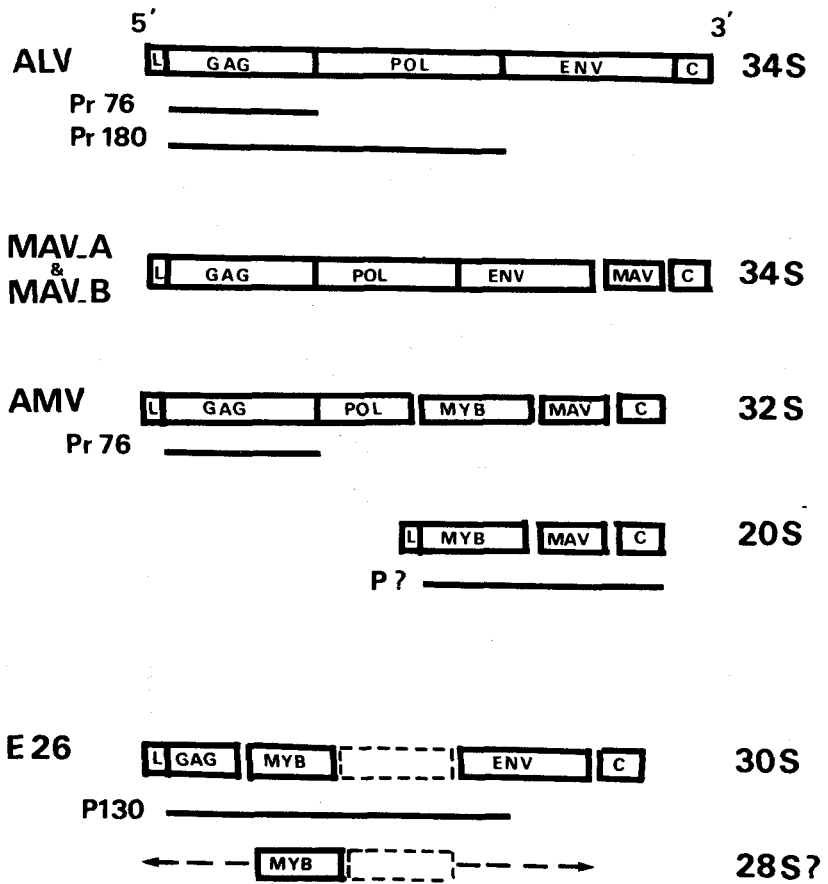


FIGURE 21 : Carte génétique comparée de l'ARN d'AV(MAV) et de E26



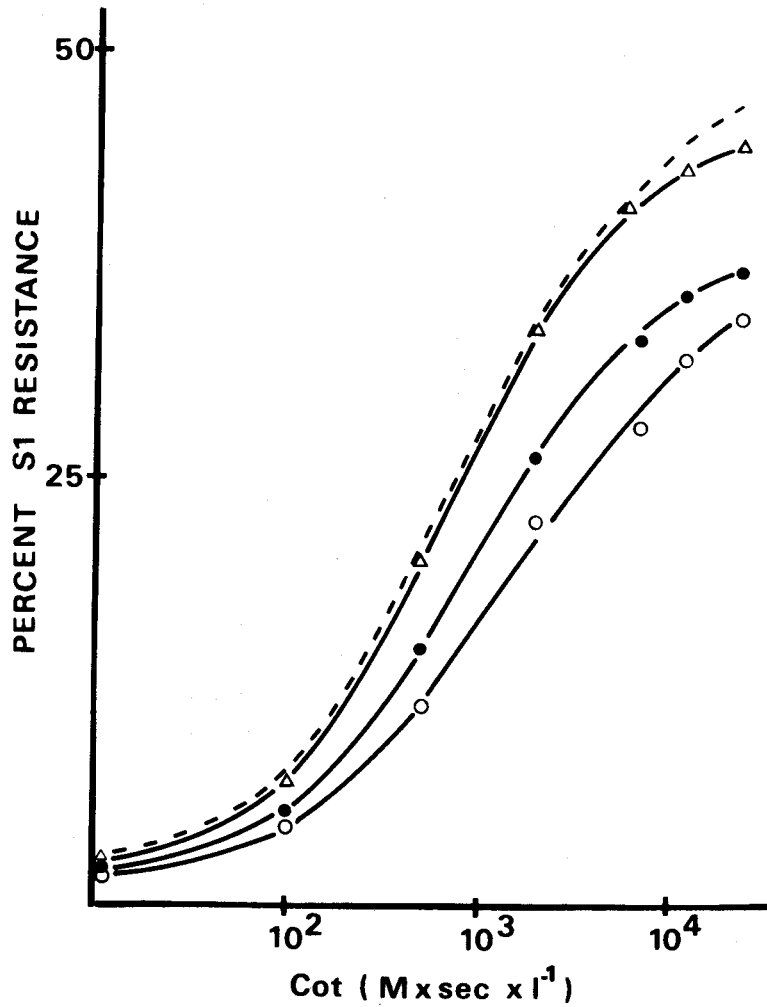


FIGURE 22 : Les séquences spécifiques des DLVs sont présentes dans l'ADN de poulets sains

L'ADN d'embryons de poulets de 11 jours, soniqué à une taille de 4-6 S, a été hybridé avec différentes sondes spécifiques :

- (●—●) - cDNA<sub>aev</sub>                      (○—○) - cDNA<sub>amv</sub>  
(△—△) - cDNA<sub>mc29</sub>                (---) - cDNA<sub>src</sub>

Des résultats très semblables ont été obtenus avec l'ADN d'embryons de cailles sains.



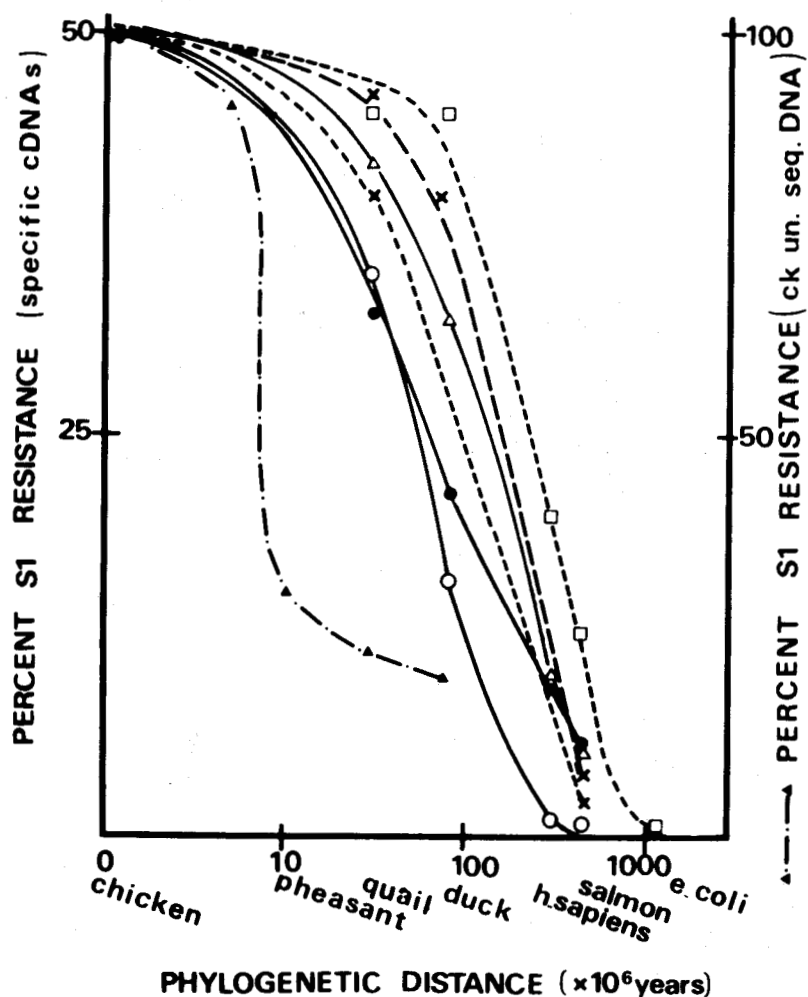


FIGURE 23 : Stabilité des séquences spécifiques cellulaires au cours de l'évolution

L'ADN extrait de différentes espèces animales a été hybridé avec plusieurs sondes spécifiques :

- (●—●) - cDNA<sub>aev</sub>
- (▲—▲) - cDNA<sub>mc29</sub>
- (○—○) - sDNA<sub>amv</sub>
- (x---x) - cDNA<sub>ovalbumine</sub>
- (---) - cDNA<sub>src</sub>
- (▲—▲) - ADN séquence unique de poulet
- (x---x) - cDNA<sub>globine</sub>

Les valeurs obtenues ont été standardisées à 50% pour le poulet qui a été choisi comme point zéro de l'évolution phylogénétique.



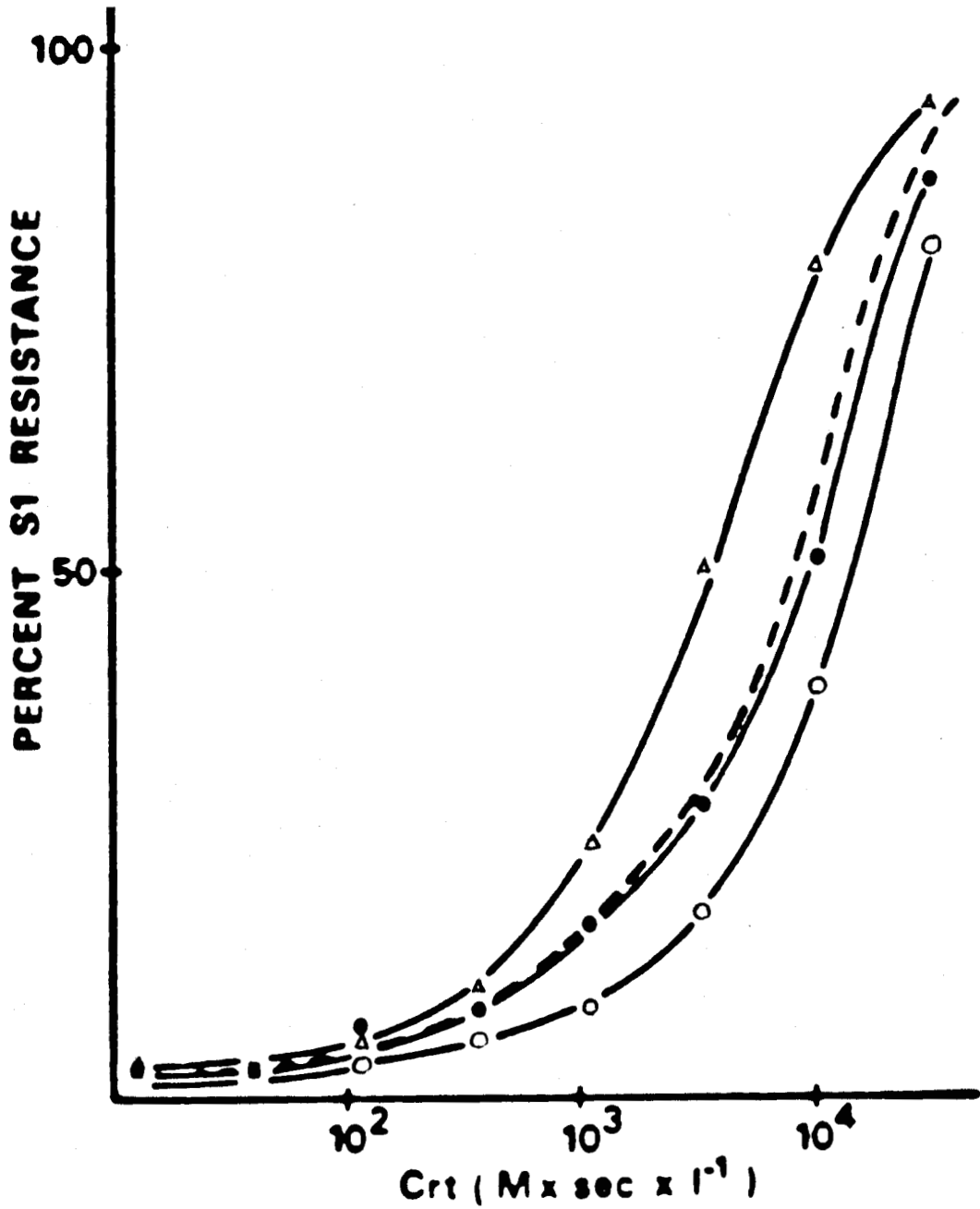


FIGURE 24 : Transcription des séquences spécifiques des DLVs dans les cellules normales de poulet et de caille

L'ARN total extrait de fibroblastes d'embryons de poulet ou de caille a été hybridé avec différentes sondes spécifiques :

(●—●) - cDNA<sub>aev</sub>

(○—○) - cDNA<sub>amv</sub>

(△—△) - cDNA<sub>mc29</sub>

(---) - cDNA<sub>src</sub>



d'hybridation obtenu diminue en fonction de la distance phylogénétique des espèces, le poulet étant pris comme référence. Avec une sonde d'ADN non répétitif de poulet (Figure 23; Article II, Figure 3, p 453), nous avons confirmé que les séquences spécifiques virales ont évolué de manière parallèle aux autres gènes cellulaires. Ces résultats montrent que l'ADN non répétitif de poulet a rapidement muté au cours de l'évolution, alors que les séquences cellulaires apparentées aux séquences des DLVs semblent avoir été mieux conservées.

En effet, elles sont au moins aussi stables, sinon plus, que deux gènes cellulaires connus pour être particulièrement bien conservés, les gènes globine et ovalbumine. Des résultats semblables ont été trouvés pour le gène c-src (Stehelin et al, 1976b; Roussel, 1978; Stehelin et al, 1978) et pour les séquences d'origine cellulaire de MC29 (Sheiness et Bishop, 1979).

#### VI - Les séquences spécifiques sont transcrites dans les cellules normales

Les cellules saines de poulet possédant des séquences apparentées à des gènes hautement cancérigènes, nous avons étudié le taux de transcription de ces séquences cellulaires dans les cellules non infectées. L'ARN total de fibroblastes de poulet sain (ou de caille) a été hybridé avec les trois différentes sondes spécifiques. Les résultats (Figure 24; Article II Figure 4, P 454) indiquent que les séquences cellulaires, transcrites à faible taux (quelques copies par cellule), hybrident à 100% avec les sondes spécifiques montrant qu'elles sont totalement représentées. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés pour les séquences cellulaires c-src, apparentées au gène src des ASVs (Roussel, 1978; Stehelin et al, 1978; Spector et al, 1978).

## CONCLUSION

Les DLVs ont été formés par recombinaison entre les ALVs et des séquences spécifiques d'origine cellulaire. Comme la plupart des autres virus transformants, les DLVs ont perdu une partie des gènes nécessaires à la réplication. Il existe une corrélation stricte entre le type de néoplasme induit et la présence de séquences spécifiques, indiquant que des gènes cellulaires différents sont impliqués dans la transformation des cellules cibles différentes du système hématopoïétique.



DISCUSSION

PREMIERE PARTIE

Nos travaux sur la distribution des séquences apparentées au virus endogène de poulet RAV-0 montrent que ces séquences proviennent d'une infection relativement récente, probablement après divergence des espèces du genre Gallus à partir d'un ancêtre commun, il y a environ 10 millions d'années. Ces conclusions sont basées sur le fait que des séquences partagées par deux espèces très proches l'une de l'autre phylogénétiquement doivent provenir en descendance directe d'une même séquence présente chez leur ancêtre commun le plus récent, le taux de mutation des séquences nucléotidiques déterminant l'évolution des espèces. Si les gènes endogènes viraux de poulet évoluent en accord avec les autres gènes cellulaires, nous devrions trouver chez toutes les espèces du genre Gallus une information apparentée au virus endogène RAV-0. Bien que nous ayons montré que toutes les espèces aviaires sont indistinguables les unes des autres par le critère de leur ADN séquence unique, les séquences apparentées à RAV-0 sont totalement absentes chez trois espèces de poulets exotiques du genre Gallus: G. varius, G. sonnerati, et G. Lafayettei. Seule une autre espèce de poulet exotique (également Gallus gallus), ainsi que des espèces de faisân et de caille plus éloignées phylogénétiquement du poulet, possèdent des séquences homologues au virus endogène RAV-0. Des études menées indépendamment sur la systématique classique de Phasianidae (Darwin, 1868; Delacour, 1977) et sur l'étude de l'évolution de la transférine et de l'ovalbumine des oiseaux (Prager et al, 1974) suggèrent que la spéciation du genre Gallus a eu lieu il y a environ 10 millions d'années.

Donc l'interprétation la plus simple est que RAV-0 a été acquis relativement récemment par certaines espèces et non par d'autres après la divergence des espèces à partir d'un ancêtre commun.

On ne peut cependant pas exclure totalement la possibilité que les séquences virales endogènes apparentées à RAV-0 aient ségrégué de la lignée germinale chez certaines espèces de Gallus et non chez d'autres. Ceci semble peu probable car de nombreux loci endogènes ont été identifiés chez le poulet (Astrin, 1978; Astrin et al, 1979) et localisés dans différents chromosomes (Tereba et al, 1979; Tereba et Astrin, 1980). Des études semblables ont été faites utilisant les techniques de "blotting" sur les virus de souris apparentés au virus MMTV (Cohen et Varmus, 1979).

Ces virus endogènes ont été localisés sur plus de deux chromosomes différents de la souris. Une grande hétérogénéité du nombre et de la structure des virus

endogènes chez le poulet et chez la souris, d'une souche à l'autre et même d'un animal à l'autre, indiquent que les virus endogènes sont le résultat d'infections multiples, indépendantes les unes des autres, et probablement rares, des cellules de la lignée germinale des espèces.

S'il est possible de détecter à l'heure actuelle de nombreuses copies de virus endogène chez les espèces de vertébrés (singes, chats, souris, oiseaux), certains virus endogènes n'ont pas toujours existé dans la lignée germinale des espèces. Quelle est alors l'origine de ces virus endogènes, et par quels mécanismes les espèces acquièrent-elles de telles séquences virales ?

De nombreuses études menées sur l'évolution des gènes viraux de type C indiquent que les rétrovirus ont la capacité d'établir leur génome dans la lignée germinale de l'hôte à l'état latent. Ces gènes cryptiques, sous le contrôle de la cellule, sont transmis verticalement selon les lois de Mendel.

Ce transfert de matériel génétique a été réalisé dans certains cas par infection (transmission horizontale) inter-espèces.

Ainsi un virus endogène d'une espèce donnée peut :

- (1) être exprimé,
- (2) infecter une autre espèce très éloignée phylogénétiquement ou appartenant à un autre ordre,
- (3) être intégré dans la lignée germinale, et
- (4) demeurer endogène et silencieux dans la nouvelle espèce hôte.

Dans la nature, c'est le cas d'un virus endogène du chat (RD-114) dont l'ancêtre est un virus endogène de primate qui aurait été introduit dans la lignée germinale du chat relativement récemment il y a environ 5 millions d'années. Bien qu'il n'y ait aucune homologie détectable de séquences non répétitives entre les primates et les chats qui se sont séparés les uns des autres il y a plus de 100 millions d'années (voir Benveniste et al, 1975a), le virus endogène de chat RD-114 est étroitement relié au virus endogène de babouin (group M7). En effet, des séquences apparentées aux deux virus ont été mises en évidence chez tous les singes de l'ancien monde et chez les grands singes (chimpanzé et gorille).

Ceci indique qu'elles sont présentes dans la lignée germinale de primates depuis 30 millions d'années, point de divergence des singes de l'ancien monde et des grands singes. Ces séquences nucléotidiques ont également été retrouvées dans l'ADN de 4 parmi les 27 espèces de félins du genre Felis (Benveniste et Todaro, 1974). Ces quatre espèces de chat sont originaires du Bassin Méditerranéen et semblent avoir évolué géographiquement en étroite association

avec les primates de l'ancien monde, et en particulier, les ancêtres du babouin. Ainsi, des séquences apparentées aux virus de primates détectées dans l'ADN de certaines espèces de chat ont dû être acquises par infection horizontale après spéciation des Felidae, au cours de ces 5 derniers millions d'années. Dans un contexte plus général, le fait que l'homologie entre les virus endogènes de deux espèces soit beaucoup plus grande que ne l'est celle de leurs gènes cellulaires permet de suspecter une transmission horizontale par infection.

D'autre part, un faible nombre d'espèces possédant un virus endogène commun dans un seul genre animal montre que l'acquisition de gènes viraux est probablement récente et a lieu après la divergence de ces espèces à partir d'un ancêtre commun.

L'infection inter-espèces par un virus endogène ne donne pas toujours lieu à l'établissement d'un rétrovirus endogène non pathogène généralement bien supporté par l'hôte. Deux exemples de transmission horizontale de virus endogènes inter-espèces ont donné naissance à des virus infectieux responsables de néoplasmes chez la deuxième espèce infectée. Le premier exemple a été rapporté pour un virus exogène infectieux de primates, le virus leucémique de gibbon (GALV). Ce rétrovirus de type C, transmis horizontalement parmi les gibbons (Scolnick et al, 1974), proviendrait de l'infection inter-espèces des gibbons par un virus endogène de type C de souris asiatique, Mus caroli ou d'une espèce de souris phylogénétiquement très proche (Lieber et al, 1975). Dans ce cas, le virus endogène de souris n'est pas apparenté aux séquences des cellules de la lignée germinale de primate, mais est homologue au virus leucémique infectieux de primate transmis horizontalement d'un animal à l'autre. Un deuxième exemple est celui du virus leucémogène félin (FeLV). Benveniste et al (1975b) ont proposé que la leucémie du chat provienne de l'activation d'un virus endogène de rongeur (proche du rat), rarement exprimé chez ces animaux, qui aurait été transmis au chat par infection inter-espèces. Bien que FeLV soit transmis horizontalement chez les chats, des séquences partiellement apparentées à ce virus, héritées de façon verticale, peuvent aussi être détectées dans l'ADN d'animaux sains.

D'une façon générale, on peut penser que lorsqu'un rétrovirus se réplique facilement dans une espèce, l'hôte n'étant pas capable d'en contrôler l'expression, l'incidence de leucémies est fortement augmentée.

Par contre, les séquences virales endogènes, sous contrôle cellulaire de l'hôte, peuvent représenter les vestiges d'une infection virale ancestrale.

Ceci représenterait alors un mécanisme par lequel les espèces accommoderaient

des agents viraux potentiellement leucémogènes. Ainsi, une infection inter-espèces très récente (d'une souris au gibbon) se manifeste par une forte incidence de leucémie chronique, alors qu'une infection ancienne (d'un primate au chat) n'est plus associée avec cette maladie. Du point de vue du virus aussi bien que de la cellule, l'état endogène représente un moyen de se perpétuer.

Jusqu'à présent, aucune évidence directe de l'oncogénéicité du virus endogène n'a été apportée chez le poulet. La plupart des virus endogènes sont défectifs et représentent les résidus de l'interaction virus-hôte.

Lorsqu'ils sont exprimés, les virus endogènes ont un taux d'expression très faible et ne peuvent généralement pas infecter la cellule dont ils sont issus. Ceci pourrait expliquer pourquoi ils ont persisté chez les oiseaux.

Pendant longtemps, plusieurs auteurs ont attribué aux rétrovirus endogènes un rôle important pour la cellule. Nos travaux sur la distribution des séquences apparentées au génome RAV-0 parmi les espèces du genre Gallus, et les résultats publiés par Astrin et al (1979a) indiquent que les virus endogènes ne sont pas essentiels au développement des espèces. En effet, nous avons montré que trois espèces de poulets exotiques du genre Gallus se portent parfaitement bien sans pour autant posséder le virus endogène RAV-0.

Chez le poulet domestique de la souche white leghorn, Astrin et al (1979a) ont réussi à sélectionner un poulet également non porteur de séquences apparentées à RAV-0. Les virus endogènes persisteraient donc chez l'animal non pas parcequ'ils jouent un rôle essentiel dans le développement de l'espèce, mais plutôt parce qu'ils ne causent aucune maladie.

Si les virus ne sont pas essentiels, apportent-ils aux espèces quelque avantage dissimulé ou représentent-ils simplement les vestiges d'anciens assauts par des virus endogènes ? Le fait que les virus endogènes puissent être activés et se mouvoir de cellule à cellule ou d'une espèce à l'autre, pourrait en soi apporter un avantage évolutif si, en de rares occasions, les virus servent de transducteurs d'information génétique.

La possibilité d'évènements de recombinaison entre le virus et au moins certains gènes cellulaires (voir plus loin) pourrait conférer aux organismes supérieurs un mécanisme plus général de transduction de gènes.



DEUXIEME PARTIE

Les virus défectifs des leucémies aiguës (DLVs) induisent trois formes différentes de néoplasies hématopoïétiques chez le poulet, des érythroblastoses, des myelocytomatoses, et des myeloblastoses. Sept isolats différents viraux ont été classés en trois groupes, en accord avec leur capacité à transformer une cellule hématopoïétique cible spécifique in vivo et in vitro (Graf et Beug, 1978; Beug et al, 1979; Gazzolo et al, 1979). En utilisant les techniques d'hybridation moléculaire, nous avons trouvé que chacun des DLVs est un recombinant entre une partie du génome d'un rétrovirus ALV et une séquence spécifique cellulaire de poulet. Nous avons montré qu'il existe une corrélation stricte entre la présence d'une séquence spécifique dans un virus donné et sa capacité à transformer sélectivement des érythroblastes, macrophages, ou myéloblastes. Ces résultats suggèrent pour la première fois que les différents gènes cellulaires, transduits et sous contrôle d'éléments viraux, peuvent déterminer la spécificité de la transformation de différentes cellules cibles. Ce travail a donc conduit à définir trois nouveaux oncogènes (erb, mac [maintenant appelé myc] et myb) impliqués dans la transformation des érythroblastes, macrophages, et myéloblastes, respectivement.

Quelles sont les évidences montrant que ces gènes sont responsables de la transformation? Dans le cas d'AEV, une polyprotéine de fusion de 75.000 daltons (P75gag-erb), codée par la portion 5' du gène gag et une portion des séquences cellulaires erb est synthétisée (Hayman et al, 1979; Rettenmier et al, 1979). Un mutant thermosensible (ts), défectif conditionnel pour la transformation, ne produit à la température non permissive aucune polyprotéine antigéniquement reconnaissable (Graf et al, 1978). Un autre mutant de délétion, défectif non conditionnel pour la transformation (td), produit une polyprotéine de taille un peu plus petite dans laquelle les peptides codés par les séquences erb sont altérés (Royer-Pokora et al, 1979; Beug et al, 1980). Le virus MC29 code aussi pour une polyprotéine de fusion de 110.000 daltons (P110gag-mac), dont une portion est spécifiée par les séquences cellulaires (Bister et al, 1977; Mellon et al, 1978; Kitchener et Hayman, 1980). Dans ce cas, plusieurs mutants de délétion (td) codant pour des polyprotéines gag-mac de tailles P100, P95, et P90 ont été isolés (Ramsey et al, 1980). Chacune de ces protéines est délétée dans la partie codée par les séquences mac spécifiques. En ce qui concerne AMV, aucun produit du gène myb n'a pu encore être identifié. L'insertion des



séquences spécifiques myb à la place du gène env d'ALV ne permet pas la synthèse d'un produit de fusion précipitable avec un sérum anti-gag. Pour erb et mac, des évidences génétiques impliquent les séquences cellulaires transduites dans le processus de transformation.

Le phénomène de transduction de gènes cellulaires par les rétrovirus et d'acquisition d'un potentiel transformant semble général puisque au moins quatorze gènes transformants différents ont été identifiés tant chez les espèces aviaires que chez les mammifères (voir Tableau VII). Chacun de ces oncogènes viraux (v-onc) possède un analogue cellulaire (c-onc), présent dans l'ADN de cellules normales, remarquablement bien conservé au cours de l'évolution des espèces. A l'heure actuelle, huit des quatorze oncogènes connus ont été identifiés chez une seule espèce, le poulet.

Cela, en soi, suggère que le nombre de gènes transformants différents est peut-être important. Cependant, la comparaison des résultats récents obtenus pour l'oncogène du virus sarcomatogène de Fujinami (v-fps) et celui d'autres isolats (Shibuya et al, 1980; Barbacid et al, 1981a), a permis d'établir une parenté avec le gène transformant (v-fes) appartenant à deux souches virales du virus du sarcome félin (FeSV). L'acquisition d'une séquence cellulaire homologue par deux rétrovirus différents des leucémies chroniques (ALV et FeLV) appartenant à deux espèces d'ordres différents (le poulet et le chat) confirme que le même élément onc peut être transduit au cours d'évènements de recombinaison indépendants. Cela suggère aussi, contrairement à toute attente, que le nombre de gènes capables d'être transduits peut être faible.

Il reste à savoir si d'autres éléments cellulaires qui n'ont jamais été associés aux rétrovirus peuvent aussi servir d'oncogènes. Plusieurs groupes, en transfectant l'ADN de tumeurs sur les cellules NIH/3T3, ont prouvé que certains des ADNs forment des foyers de transformation avec une grande efficacité (Shih et al, 1979; 1981; Cooper et al, 1980; Cooper et Neiman, 1980; Perucho et al, 1980; Krontiris et Cooper, 1981; Lane et al, 1981; Murray et al, 1981). La transfection de l'ADN de ces cellules transformées sur de nouvelles cellules a redonné des résultats identiques, suggérant que chacun des ADNs était porteur d'un oncogène actif. En analysant l'ADN des cellules NIH/3T3 transformées, aucun oncogène viral connu ni aucune information rétrovirale n'ont été détectés (R.A. Weinberg, G.M. Cooper, communications personnelles). Par clonage moléculaire de cet ADN dans un bactériophage, et en utilisant la technique de transfection pour rechercher la séquence oncogène, il devrait être possible d'isoler des gènes oncogènes cellulaires différents de ceux déjà connus.

TABLEAU VII

Les retrovirus : vecteurs de gènes cellulaires

| Name                         | Viral insert   | Virus strain   | Probable animal origin   | Protein product   |
|------------------------------|--|--|--|---|
| <i>rel</i>                   | <i>rel</i>   | Avian reticuloendotheliosis virus-T  | Turkey   |   |
| <i>src</i>                   | RSV- <i>src</i><br>B77- <i>src</i><br>rASV- <i>src</i>           | Rous sarcoma virus<br>B77 avian sarcoma virus<br>Recovered avian sarcoma virus           | Chicken<br>Chicken<br>Chicken,<br>Japanese<br>quail                          | pp60 <sup>src</sup><br>pp60 <sup>src</sup><br>pp60 <sup>src</sup>             |
|                              | PR-RSV- <i>src</i>   | Prague strain Rous sarcoma virus   | Chicken  | pp60 <sup>src</sup>   |
| <i>myb</i>                   | AMV- <i>myb</i>  | Avian myeloblastosis virus strain BAI-A  | Chicken  |   |
|                              | E26- <i>myb</i>  | Avian leukemia virus strain E26  | Chicken  |   |
| <i>myc</i>                   | MC29- <i>myc</i>   | Avian myelocytomatosis virus MC29  | Chicken  | P110 <sup>myc-myc</sup>   |
|                              | CMII- <i>myc</i>   | Avian myelocytomatosis virus CMII  | Chicken  | P90 <sup>myc-myc</sup>  |
|                              | MH2- <i>myc</i>  | Avian myelocytomatosis and carcinoma virus MH2   | Chicken  | P100 <sup>myc-myc</sup>   |
|                              | OK10- <i>myc</i>   | Avian myelocytomatosis virus OK10  | Chicken  | P200 <sup>myc-pod-myc</sup>   |
| <i>erb-A</i><br><i>erb-B</i> | AEV- <i>erb-A</i><br>AEV- <i>erb-B</i>                           | Avian erythroblastosis virus<br>Avian erythroblastosis virus                             | Chicken<br>Chicken   | P75 <sup>myc-erb-A</sup><br>p45 <sup>erb-B</sup>                              |
| <i>fps</i> <sup>a</sup>      | FSV- <i>fps</i><br>PRCII- <i>fps</i><br>PRCIV- <i>fps</i>        | Fujinami sarcoma virus<br>PRCII sarcoma virus<br>PRCIV sarcoma virus                     | Chicken<br>Chicken<br>Chicken  | P140 <sup>myc-fps</sup><br>P105 <sup>myc-fps</sup><br>P170 <sup>myc-fps</sup> |
|                              | <i>yes</i>   | Y73 avian sarcoma virus<br>Esh sarcoma virus   | Chicken<br>Chicken   | P90 <sup>myc-yes</sup><br>P80 <sup>myc-yes</sup>                              |
|                              | <i>ros</i>   | UR2 avian sarcoma virus  | Chicken  | P68 <sup>myc-ros</sup>  |
| <i>mos</i> <sup>a</sup>      | Moloney- <i>mos</i><br>Gazdar- <i>mos</i>                        | Moloney murine sarcoma virus<br>Gazdar murine sarcoma virus                              | Mouse<br>Mouse   |   |
| <i>ras</i>                   | Kirsten- <i>ras</i><br>Harvey- <i>ras</i><br>Rasheed- <i>ras</i> | Kirsten murine sarcoma virus<br>Harvey murine sarcoma virus<br>Rasheed rat sarcoma virus | Rat<br>Rat<br>Rat  | p21 <sup>ras</sup><br>p21 <sup>ras</sup><br>P29 <sup>myc-ras</sup>            |
|                              | <i>abl</i> <sup>a</sup>  | Abelson murine leukemia virus  | Mouse  | P120 <sup>myc-abl b</sup>   |
|                              | <i>fes</i>   | ST- <i>fes</i><br>GA- <i>fes</i>   | Snyder-Theilen feline sarcoma virus<br>Gardner-Arnstein feline sarcoma virus | Cat<br>Cat  |
| <i>fms</i> <sup>a</sup>      |  | McDonough feline sarcoma virus   | Cat  | P170 <sup>myc-fms</sup>   |
| <i>sis</i>                   | <i>sis</i>   | Simian sarcoma virus   | Woolly monkey  |   |



(d'après Coffin et al, 1981)

Une autre question, apparentée aux précédentes, concerne la capacité des rétrovirus à transduire d'autres gènes cellulaires non transformants. Il est clair qu'à l'heure actuelle, il n'existe aucun mécanisme permettant de repérer des événements rares de recombinaison entre les rétrovirus et des gènes dont les fonctions resteraient cryptiques. La capacité des virus à s'intégrer à plusieurs sites dans l'ADN cellulaire suggère que de nombreux événements de recombinaison peuvent avoir lieu avec l'ADN de la cellule hôte. Les rétrovirus pourraient offrir un mécanisme plus général de déplacement des gènes, analogue à celui de transposons des procaryotes (Temin, 1980; Shimotohno et al, 1980).

Pour la plupart des virus rapidement transformants, il a été possible de mettre en évidence, isoler, et purifier dans certains cas une protéine spécifique, produit du gène v-onc (voir Tableau VII). L'obtention de mutants viraux des gènes onc, soit conditionnels thermosensibles (ts), soit non conditionnels de délétion (td), a permis d'impliquer les protéines onc dans l'initiation et le maintien de la transformation. Certaines protéines virales sont localisées à la surface de la cellule transformée, soit à la face interne de la membrane plasmique (P60src, P21ras) (Willingham et al, 1979; Willingham et al, 1980; Hynes, 1980), soit en tant que protéine transmembranaire (P120gag-abl) (Witte et al, 1980). Ceci laisse à penser que la membrane cellulaire est un des sites majeurs de l'action de ces protéines au cours de la transformation. Six des quatorze gènes onc connus (src, fps, yes, ras, abl, et fes) codent pour une protéine associée à une activité phosphokinase, AMP cyclique indépendante, qui utilise l'ATP comme substrat afin de phosphoryler des résidus tyrosine (Collett et Erikson, 1978; Witte et al, 1980; Hunter et Sefton, 1980; Feldman et al, 1980; Pawson et al, 1980; Van de Ven et al, 1980; Ghysdael et al, 1981). Le gène ras code pour un polypeptide (P21ras) qui se lie spécifiquement aux GTP ou GDP et qui peut être phosphorylé sur les résidus thréonine in vitro (Scolnick et al, 1979; Shih et al, 1980), suggérant que cette classe d'oncogènes transforme les cellules par un mécanisme comparable aux précédents.

Aucune activité kinase (ou autre fonction connue) n'a pu être mise en évidence pour les protéines spécifiques des DLVs. Les protéines codées par les gènes v-erb, v-mac, et v-myb seraient impliquées dans le blocage spécifique de la différenciation de cellules appartenant à différentes lignées de l'hématopoïèse. Le modèle de Graf et Beug (1978) propose que les protéines virales agissent par une réaction de compétition avec les protéines cellulaires homologues, exprimées dans les cellules cibles. A l'appui de cette hypothèse, il faut noter que les

DLVs peuvent se répliquer dans les cellules hématopoïétiques non cibles sans toutefois les transformer bien que la protéine transformante y soit exprimée (Graf et al, 1980). L'expression des gènes c-onc serait donc fonction de l'état différencié de la cellule. Cette hypothèse prédit que les gènes cellulaires c-erb, c-mac, et c-myb sont exprimés dans les erythroblastes, macrophages, et myeloblastes, ou dans leurs précurseurs directs.

Cette prédiction sera difficilement vérifiable à cause de la difficulté à obtenir des populations pures de cellules cibles. En effet, AEV, MC29, et AMV ne transforment respectivement que 100, 2500, et 500 cellules cibles sur  $10^6$  cellules de moelle totales (Gazzolo et al, 1979; Graf et al, 1980). En association avec le pouvoir transformant des DLVs sur ces cellules hématopoïétiques cibles, les DLVs ont la capacité d'induire des sarcomes (AEV et MC29) et des carcinomes (MC29). Ce pouvoir transformant multiple suggère que le mécanisme de blocage de la différenciation par les produits spécifiques viraux n'est pas unique et que ces protéines peuvent avoir des effets pléiotropes.

Les gènes cellulaires (c-onc), étant homologues aux oncogènes viraux (v-onc), doivent aussi posséder la capacité de transformer des cellules.

Comment un gène cellulaire devient-il oncogène ? Hanafusa et al (1977), après injection aux poulets de virus non transformants ayant perdu la plus grande partie du gène v-src (td partiels), ont pu réobtenir des virus sarcomatogènes qui ont acquis l'information transformante par recombinaison in vivo avec le gène cellulaire c-src. Ces expériences suggèrent que la réintroduction des gènes cellulaires c-onc sous le contrôle du virus entraîne une augmentation de l'expression de l'oncogène conduisant au néoplasme (Wang et al, 1978; Karess et al, 1979; Vigne et al, 1980).

Une expérience analogue, utilisant les techniques de clonage moléculaire, confirme l'idée que l'activation des gènes c-onc par les régulateurs viraux peut les rendre transformants (Oskarsson et al, 1980; Blair, McClements, et Vande Woude, communication personnelle). Bien que l'un des oncogènes cellulaires cloné de souris (c-mos) soit inactif par transfection et soit incapable de produire des foyers de transformation in vitro, son association à une séquence promotrice virale (le LTR) permet de le rendre transformant avec une efficacité comparable à celle obtenue avec les séquences clonées du virus de Moloney (MSV). Les rétrovirus permettraient l'augmentation de l'expression d'un gène cellulaire normalement exprimé à un taux plus faible.

Les virus des leucémies chroniques, bien que ne possédant pas de gènes transfor-

mants, causent des lymphomes et, dans certains cas, d'autres néoplasmes (fibrosarcomes, nephroblastomes, érythroblastoses, ostéopétroses) et des anémies. La longue période de latence séparant l'infection de l'apparition de tumeurs permet de penser que le processus de transformation est indirect. Dans le système aviaire, Hayward et collaborateurs (Hayward et al, 1981; Neel et al, 1981) ont trouvé que dans 85% des lymphomes induits par les ALVs, une séquence virale était intégrée à proximité du gène c-mac (maintenant appelé c-myc). L'activation du gène cellulaire par insertion d'un promoteur viral entraîne l'apparition de molécules d'ARN messagers hybrides initiées au niveau de la séquence virale insérée (Hayward et al, 1981; Payne et al, 1981). L'accroissement de la transcription du gène c-myc n'a été détecté que dans les cellules tumorales transformées, ce qui amène à conclure que l'effet des ALVs dans les lymphomes de la bourse de Fabricius est indirect, et passe par l'activation d'un gène onc connu. Bien que le virus soit capable de s'intégrer à plusieurs sites dans l'ADN cellulaire, seule son intégration à des sites particuliers peut apparemment causer un néoplasme. La faible probabilité pour un virus de s'intégrer au hasard à un site spécifique peut expliquer la longue période de latence précédant la franche manifestation de la maladie.

Les rétrovirus peuvent induire des néoplasmes par au moins deux mécanismes différents : par recombinaison et transduction d'éléments cellulaires c-onc, ou par activation in situ de ces gènes onc par les régulateurs viraux. On pourrait très bien imaginer que des mutations ou des réarrangements dans les éléments régulateurs cellulaires, ou que la transposition des gènes onc eux-mêmes dans les cellules somatiques, puissent de la même façon altérer l'expression de leurs produits. Les rétrovirus, transformants et recombinants, représentent un système naturel unique de purification des gènes cellulaires impliqués dans les maladies.

Bien qu'aucun virus de ce genre n'ait pu être isolé chez l'homme, des éléments onc homologues aux rétrovirus sont présents dans l'ADN humain.

Il est possible que ces séquences jouent également un rôle important dans les processus de développement, de différenciation, et, peut-être dans le cancer. L'isolement de ces gènes par les techniques de clonage moléculaire, et leur activation in vitro devrait permettre de contribuer à la compréhension des processus aussi bien pathologiques que physiologiques chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE



- Aaronson, S. A., and Rowe, W. P. (1970). Nonproducer clones of murine sarcoma virus transformed BALB/3T3 cells. Virology 42, 9-19.
- Aaronson, S. A., and Stephenson, J. R. (1973). Independent segregation of loci for activation of biologically distinguishable RNA C-type viruses in mouse cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2055-2058.
- Aaronson, S. A., Todaro, G. J. and Scolnick, E. M. (1971). Induction of murine C-type viruses from clonal lines of virus-free BALB/3T3 cells. Science 174, 157-159.
- Abelson, H. T., and Rabstein, L. S. (1970). Lymphosarcoma virus-induced thymic-independent disease in mice. Cancer Res. 30, 2213-2222.
- Alwine, J. C., Kemp, J. K. and Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5350-5354.
- Arlinghaus, R. B., Naso, R. B., Jamjoom, G. A., Arcement, L. J., and Karshin, W. L. (1976). In Animal Virology, ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. (Baltimore, D., Huang, A., and Fox, C. F., eds.), Vol. 4, pp. 689-715.
- Astrin, S. M. (1978). Endogenous viral genes of the white leghorn chicken: common site of evidence and sites associated with specific phenotypes of viral gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5941-5945.
- Astrin, S. M., Buss, E. G., and Hayward, W. S. (1979a). Endogenous viral genes are non-essential in the chicken. Nature 282, 339-341.
- Astrin, S. M., Robinson, H. L., Crittenden, L. B., Buss, E. G., Wyban, J., and Hayward, W. S. (1979b) Ten genetic loci in the chicken that contain structural genes for endogenous virus. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 44, 1105-1109.
- August, J. T., Bolognesi, D. P., Fleissner, E., Gilden, R. V., and Nowinski, R. C. (1974). A proposed nomenclature for the virion proteins of oncogenic RNA virus. Virology 60, 595-601.
- Baltimore, D. (1975). Tumor viruses: 1974. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 1187-1200.
- Baluda, M. A. (1972). Widespread presence, in chickens, of DNA complementary to the RNA genome of avian leukosis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 576-580.



- Baluda, M. A. and Roy-Burman, P. (1973). Partial characterization of RD114 virus by DNA-RNA hybridization studies. Nature, New Biology 244, 59-62.
- Baluda, M. A., Shoyab, M., Markham, P. D., Evans, R. M., and Drohan, W. N. (1974). Base sequence complexity of 35S Avian Myeloblastosis Virus RNA determined by molecular hybridization kinetics. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 869-874.
- Barbacid, M., Breitman, M. L., Lauer, A. V., Long, L. K., and Vogt, P. K. (1981a). The transformation-specific proteins of avian (Fujinami and PRC-11) and feline (Snyder-Theilen and Gardner-Arnstein) sarcoma viruses are immunologically related. Virology 110, 411-419.
- Barbacid, M., Donner, L., Ruscetti, S. K., and Sherr, C. J. (1981b). Transformation-defective mutants of Snyder-Theilen feline sarcoma virus lack tyrosine-specific protein kinase activity. J. Virol. 39, 246-254.
- Barbacid, M., Lauer, A. V., and Devare, S. G. (1980). Biochemical and immunological characterization of polyproteins coded for by the McDonough, Gardner-Arnstein, and Snyder-Theilen strains of feline sarcoma virus. J. Virol. 33, 196-207.
- Barbacid, M., Stephenson, J. R., and Aaronson, S.A. (1976). Gag gene of mammalian type-C RNA tumor viruses. Nature 262, 554-559.
- Bender, W., and Davidson, N. (1976). Mapping of poly(A) sequences in the electron microscope reveals unusual structure of type C oncornavirus RNA molecules. Cell 7, 595-607.
- Benoit, C., and Chambon, P. (1981). In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region. Nature 290, 304-310.
- Benveniste, R. E., Heinemann, R., Wilson, G. L., Callahan, R., and Todaro, G. J. (1974a). Detection of baboon type-C viral sequences in various primate tissues by molecular hybridization. J. Virol. 14, 56-67.
- Benveniste, R. E., Lieber, M. M., and Todaro, G. J. (1974b). A distinct class of murine type-C viruses that replicates in the rabbit SIRC cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 602-606.
- Benveniste, R. E., Sherr, C. J., Lieber, M. M., Callahan, R., and Todaro, G. J. (1975a). Evolution of primate type-C viral genes. Fundamental Aspects of Neoplasia (A. Gottlieb, O. J. Plescia, and D. H. L. Bishop, eds.). Springer Verlag, Inc., New York, pp. 29-53.



- Benveniste, R. E., Sherr, C. J., and Todaro, G. J. (1975b). Evolution of type-C viral genes: origin of feline leukemia virus. Science 190, 886-888.
- Benveniste, R. E., and Todaro, G. J. (1974). Evolution of C-type viral genes: Inheritance of exogenously acquired viral genes. Nature 252, 456-459.
- Benveniste, R. E., and Todaro, G. J. (1975a). Evolution of type-C viral genes: preservation of ancestral murine type C viral sequences in pig cellular DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4090-4094.
- Benveniste, R. E., and Todaro, G. J. (1975b). Segregation of RD-114 and FeLV related sequences in crosses between domestic cat and leopard cat. Nature 257, 506-508.
- Benveniste, R. E., and Todaro, G. J. (1976). Evolution of type C viral genes: evidence for an Asian origin of man. Nature 261, 101-108.
- Bernhard, W. (1960). The detection and study of tumor viruses with the electron microscope. Cancer Res. 20, 712-727.
- Berns, A., Jaenisch, R. (1976). Increase of AKR-specific sequences in tumor tissues of leukemic AKR mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2448-2452.
- Beug, H., Kitchener, G., Doederlein, G., Graf, T, and Hayman, M. J. (1980). Mutant of avian erythroblastosis virus defective for erythroblast transformation: deletion in the erb portion of p75 suggests function of the protein in leukemogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6683-6686.
- Beug, H., von Kirchbach, A., Doederlein, G., Conscience, J.-F., and Graf, T. (1979). Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. Cell 18, 375-390.
- Bishop, J. M. (1978). Retroviruses. Ann. Rev. Biochem. 47, 35-88.
- Bister, K., Hayman, M. J., and Vogt, P. K. (1977). Defectiveness of avian myelocytomatosis virus MC29: Isolation of long-term producer cultures and analysis of virus-specific polypeptide synthesis. Virology 82, 431-448.
- Bittner, J. J. (1936). Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. Science 84, 162-164.



- Bittner, J. J. (1942). The milk influence of breast tumors in mice. Science 95, 462-463.
- Blair, D. G., McClements, W. L., Oskarsson, M. L., Fischinger, P. J., and Vande Woude, G. F. (1980). Biological activity of cloned Moloney sarcoma virus DNA: terminally redundant sequences may enhance transformation efficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 3504-3508.
- Bonner, T. I., Brenner, D. J., Neufeld, B. R., and Britten, R. J. (1973). Reduction in the rate of DNA reassociation by sequence divergence. J. Mol. Biol. 81, 123-135.
- Britten, R. J., and Kohne, D. E. (1968). Repeated sequences in DNA. Science 161, 529-540.
- Brown, S., Oie, H. K., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. (1979). Requirement of human chromosomes 19, 6 and possibly 3 for infection of hamster x human hybrid cells with baboon M7 type C virus. Cell 18, 135-143.
- Brugge, J. S., and Erikson, R. L. (1977). Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. Nature, 269, 346-348.
- Burmester, B. R., and Fredrickson, T. N. (1964). Transmission of virus from field cases of avian lymphomatosis. I. Isolation of virus in line 51 chickens. J. Natl. Cancer Inst. 32, 37-63.
- Callahan, R., Benveniste, R. E., Sherr, C. J., Schidlovsky, G., and Todaro, G. J. (1976). A new class of genetically transmitted retroviruses isolated from Mus cervicolor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3579-3583.
- Chattopadhyay, S. K., Lowy, D. R., Teich, N. M., Levine, A. S., and Rowe, W. P. (1974). Evidence that the AKR murine-leukemia-virus genome is complete in DNA of the high-virus AKR mouse and incomplete in the DNA of the "virus-negative" NIH mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 167-171.
- Chen, J. H., Hayward, W. S., and Moscovici, D. (1980). Size and genetic content of virus-specific RNA in myeloblasts transformed by avian myeloblastosis virus (AMV). Virology 110, 128-136.
- Chopra, H. C. and Mason, M. M. (1970). A new virus in a spontaneous mammary tumor of a rhesus monkey. Cancer Res. 30, 2081-2086.



- Coffin, J. M. (1979). Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. J. Gen. Virol. 42, 1-26.
- Coffin, J. M., Hageman, T. C., Maxam, A. M., and Haseltine, W. A. (1978). Structure of the genome of Moloney murine leukemia virus: a terminally redundant sequence. Cell 13, 761-773.
- Cohen, J. C. (1980). Methylation of milk-borne and genetically transmitted mouse mammary tumor virus proviral DNA. Cell 19, 653-662.
- Cohen, J. C. and Varmus, H. E. (1979). Endogenous mammary tumour virus DNA varies among wild mice and segregates during inbreeding. Nature 278, 418-423.
- Cohen, S. N., and Shapiro, J. A. (1980). Transposable genetic elements. Sci. Amer. Feb., 40-49.
- Collett, M. S., and Erikson, R. L. (1978). Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2021-2024.
- Collett, M. S., Purchio, A. F., and Erikson, R. L. (1980). Avian sarcoma virus-transforming protein pp60src shows protein kinase activity for tyrosine. Nature 285, 167-169.
- Cooper, G. M., and Neiman, P. E. (1980). Transforming genes of neoplasms induced by avian lymphoid leukosis viruses. Nature 287, 656-659.
- Cooper, G. M., Okenquist, S., and Silverman, L. (1980). Transforming activity of DNA of chemically transformed and normal cells. Nature 284, 418-421.
- Dahlberg, J. E., Sawyer, R. C., Taylor, J. M., Faras, A. J., Levinson, W. E., Goodman, H. M., and Bishop, J. M. (1974). Transcription of DNA from the 70S RNA of Rous sarcoma virus. I. Identification of a species of 4S RNA which serves as primer. J. Virol. 13, 1126-1133.
- Dhar, R., McClements, W. L., Enquist, L. W., and Vande Woude, G. F. (1980). Nucleotide sequences of integrated Moloney sarcoma provirus long terminal repeats and their host and viral junctions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3937-3941



- Dalton, A. J., Melnick, J. L., Bauer, H., Beaudreau, G., Bentvelzen, P., Bolognesi, D., Gallo, R., Graffi, A., Haguenu, F., Heston, W., Huebner, R., Todaro, G., and Heine, U. I. (1974). The case for a family of reverse transcriptase viruses: retroviridae. Intervirology 4, 201-206.
- Darnell, J. E. (1979). Transcription units for mRNA production in eukaryotic cells and their DNA viruses. Prog. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol. 22, 327-353.
- Darwin, C. (1868). The variation of animals and plants under domestication. I. Murray, London.
- Delacour, J. (1977). The pheasants of the world. Hindhead: Spur publications, Saiga Publ. Co. Ltd. with the World Pheasant Association.
- DeLarco, J., Rapp, U., and Todaro, G. J. (1978). Cell surface receptors for ecotropic MuLV: detection and tissue distribution of free receptors in vivo. Int. J. Cancer 21, 356-360.
- DeLarco, J., and Todaro, G. J. (1976). Membrane receptors for murine leukemia viruses: characterization using the purified envelope glycoprotein, gp71. Cell 8, 365-371.
- Deng, C. T., Stehelin, D., Bishop, J. M., and Varmus, H. E. (1977). Characteristics of virus-specific RNA in avian sarcoma virus-transformed BHK-21 cells and revertants. Virology 76, 313-330.
- Donehower, L. A., Huang, A. L., and Hager, G. L. (1980). Regulatory and coding potential of the mouse mammary tumor virus long terminal redundancy. J. Virol. 37, 226-238.
- Duesberg, P. H. (1970). On the structure of RNA tumor viruses. Curr. Topics in Microbiol. Immunol. 51, 79-104.
- Duesberg, P. H., Bister, K., and Moscovici, C. (1980) Genetic structure of avian myeloblastosis virus released from transformed myeloblasts as a defective virus particle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5120-5124.
- Duesberg, P. H., Vogt, P. K., Beemon, K., and Lai, M. (1974). Avian RNA tumor viruses: mechanism of recombination and complexity of the genome. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 847-857.



- Eisenman, R. N., and Vogt, V. M. (1978). The biosynthesis of oncovirus proteins. Biochim. Biophys. Acta 473, 187-239.
- Essex, M. (1975). Horizontally and vertically transmitted oncornaviruses of cats. Adv. Cancer Res. 21, 175-248.
- Eylar, E. H. (1965). On the biological role of glycoproteins. J. Theoret. Biol. 10, 89-113.
- Famulari, N. G., Buchhagen, D. L., Klenk, H., and Fleissner, E. (1976). Presence of murine leukemia virus envelope proteins gp70 and p15(E) in a common polyprotein of infected cells. J. Virol. 20, 501-508.
- Feldman, R. A., Hanafusa, T. and Hanafusa, H. (1980). Characterization of protein kinase activity associated with the transforming gene product of Fujinami sarcoma virus. Cell 22, 757-765.
- Frankel, A.E., Gilbert, J. H., Porzig, K. J., Scolnick, E. M., and Aaronson, S. A. (1979) Nature and distribution of feline sarcoma virus nucleotide sequences. J. Virol. 30, 821-827.
- Friedman, R. M., Chang, E. H., Ramseur, J. M. and Meyers, M. W. (1975). Interferon directed inhibition of chronic murine leukemia virus production in cell cultures: lack of effect on intracellular viral markers. J. Virol. 16, 569-574.
- Friend, C. 1957. Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. J. Exp. Med. 105, 307-318.
- Fujinami, A. and Inamoto, K. (1914). Ueber Geschwulste bei Japanischen Haushuhnern insbesondere uber einen transplatablen tumor. Z. Krebsforsch. 14, 94.
- Furuichi, Y., Shatkin, A. J., Stavnezer, E., and Bishop, J. M. (1975). Blocked methylated 5° terminal sequence in avian sarcoma virus RNA. Nature 257, 618-620.
- Furth, J. (1946). Prolongation of life with prevention of leukemia by thymectomy in mice. J. Gerontol. 1, 46-52.
- Gazdar, A. F., Oie, H., Lalley, P., Moss, W. W., Minna, J. D. and Francke, U. (1977). Identification of mouse chromosomes required for murine leukemia virus replication. Cell 11, 949-956.





- Gazdar, A. F., Russell, E. K. and Minna, J. D. (1974). Replication of mouse-tropic and xenotropic strains of murine leukemia virus in human x mouse hybrid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2642-2645.
- Gazzolo, L., Moscovici, C., Moscovici, M. G., Samarut, J. (1979). Response of hemopoietic cells to avian acute leukemia viruses: effects on the differentiation of the target cells. Cell 16, 627-638.
- Gazzolo, L., Samarut, J., Bouadelli, M., and Blanchet, J. P. (1980). Early precursors in the erythroid lineage are the specific target cells of avian erythroblastosis virus in vitro. Cell 22, 683-691.
- Ghysdael, J., Meil, J. C., Wallbank, A. M. and Vogt, P. K. (1981). ESH avian sarcoma virus codes for a gag-linked transformation-specific protein with an associated protein kinase activity. Virology 111, 386-400.
- Gilboa, E., Mitra, S. W., Goff, S. and Baltimore, D. (1979). A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. Cell 18, 93-100.
- Goff, S. P., Gilboa, E., Witte, O. N. and Baltimore, D. (1980). Structure of the Abelson murine leukemia virus genome and the homologous cellular gene: study with cloned viral DNA. Cell 22, 777-785.
- Goldberg, R. J., Levin, R., Parks, W. P., and Scolnick, E. M. (1976). Quantitative analysis of the rescue of RNA sequences by mammalian type C viruses. J. Virol. 17, 43-50.
- Gonda, T. J., Sheiness, D. K., Faushier, L., Bishop, J. M., Moscovici, C. and Moscovici, M. G. (1981). The genome and the intracellular RNAs of avian myeloblastosis virus. Cell 23:279-280.
- Graf, T., Ade, N. and Beug, H. (1978). Temperature sensitive mutant of avian erythroblastosis virus suggests a block of differentiation as mechanism of leukaemogenesis. Nature 257, 496-501.
- Graf, T. and Beug, H. (1978). Avian leukemia viruses. Interaction with their target cells in vivo and in vitro. Biochim. Biophys. Acta 516, 269-299.
- Graf, T., Beug, H. and Hayman, M. J. (1980). Target cell specificity of defective avian leukemia viruses: hematopoietic target cells for a given virus type can be infected but not transformed by strains of a different type. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 389-393.



- Green, M. and Cartas, M. (1972). The genome of RNA tumor viruses contains polyadenylic acid species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69, 791-794.
- Gross, L. (1951a). "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation, in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 76, 27-32.
- Gross, L. (1951b). Pathologic properties, and "vertical" transmission of the mouse leukemia agent. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 78, 342-348.
- Gross, L. (1958). Attempt to recover filterable agent from X ray-induced leukemia. Acta Haematol. 19, 353-361.
- Gross, L. (1960). Biological and pathogenic properties of a mouse leukemia virus. Acta Haematol. 23, 259-275.
- Gross, L. (1970). Oncogenic viruses, 2nd ed. Pergamon, Oxford.
- Gross, L. (1974). Facts and theories on viruses causing cancer and leukemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 2013-2017.
- Groudine, M., Das, S., Neiman, P. and Weintraub, H. (1978). Regulation of expression and chromosomal subunit conformation of avian retrovirus genomes. Cell 14, 865-878.
- Guntaka, R. V., Mahy, B. W. J., Bishop, J. M. and Varmus, H. E. (1975). Ethidium bromide inhibits appearance of closed circular viral DNA and integration of virus-specific DNA in duck cells infected by avian sarcoma virus. Nature 253, 507-511.
- Guntaka, R. V., Richards, O. C., Shank, P. R., Kung, H. J., Davidson, N., Fritsch, E., Bishop, J. M. and Varmus, H. E. (1976). Covalently closed circular DNA of avian sarcoma virus: purification from nuclei of infected quail tumor cells and measurement by electron microscopy and gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 106, 337-357.
- Hager, G. L., E. H. Chang, H. W. Chan, C. F. Garon, M. A. Israel, M. A. Martin, E. M. Scolnick, and D. R. Lowy. (1979). Molecular cloning of the Harvey sarcoma virus closed circular DNA intermediates: Initial structural and biological characterization. J. Virol. 31, 95-809.



- Hanafusa, H. (1977): Cell transformation by RNA tumor viruses. In: Comprehensive Virology, Vol. 10, edited by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 401-483. Plenum Press, New York.
- Hanafusa, H., Halpern, C. C., Buchhagen, D. L., and Kawai, S. (1977). Recovery of avian sarcoma virus from tumors induced by transformation-defective mutants. J. Exp. Med., 146, 1735-1747.
- Hanafusa, T., Miyamoto, T. and Hanafusa, H. (1970). A type of chick embryo cell that fails to support formation of Infectious RSV. Virology 40, 55-64.
- Hartley, J. W., Rowe, W. P., and Huebner, R. J. (1970). Host range restrictions of murine leukemia viruses in mouse embryo cell cultures. J. Virol. 5:221-225.
- Harvey, J. J. (1964). An unidentified virus which causes the rapid production of tumors in mice. Nature 204, 1104-1105.
- Haseltine, W. A., Kleid, D. G., Panet, A., Rothenberg, E. and Baltimore, D. (1976). Ordered transcription of RNA tumor virus genomes. J. Mol. Biol. 106, 109-131.
- Haseltine, W. A., Maxam, A. and Gilbert, W. (1977). Rous sarcoma virus genome is terminally redundant: the 5' sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 989-993.
- Hayman, M. J., Royer-Pokora, B., and Graf, T. (1979). Defectiveness of avian erythroblastosis virus: Synthesis of a 75K gag-related protein. Virology 92:31-45.
- Hayward, W. S. (1977). Size and genetic content of viral RNAs in avian oncovirus-infected cells. J. Virol. 24, 47-63.
- Hayward, W. S., Braverman, S. G. and Astrin, S. M. (1979). Transcriptional products and DNA structure of endogenous avian proviruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 44, 1111-1121.
- Hayward, W. S. and Hanafusa, H. (1973). Detection of avian tumor virus RNA in uninfected chicken embryo cells. J. Virol. 11, 157-167.
- Hayward, W. S. and Hanafusa, H. (1975). Recombinations between endogenous and exogenous RNA tumor virus genes as analyzed by nucleic acid hybridization. J. Virol. 15, 1367-1377.



- Hayward, W. S. and Hanafusa, H. (1976). Independent regulation of endogenous and exogenous avian RNA tumor virus genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 2259-2263.
- Hayward, W. S., Neel, B. G. and Astrin, S. M. (1981). Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. Nature 290, 475-480.
- Hill, M. and Hillova, J. (1972). Recovery of the temperature sensitive mutant of Rous sarcoma virus from chicken cells exposed to DNA extracted from hamster cells transformed by the mutant. Virology 49, 309-313.
- Hishinuma, F., DeBona, P. J., Astrin, S. and Skalka, A. M. (1981). Nucleotide sequence of acceptor site and termini of integrated avian endogenous provirus ev1: Integration creates a 6 bp repeat of host DNA. Cell 23, 155-164.
- Hsu, T. W., J. L. Sabran, G. E. Mark, R. V. Guntaka, and Taylor, J. M. (1978). Analysis of unintegrated avian RNA tumor virus double-stranded DNA intermediates. J. Virol. 28, 810-818.
- Hu, S. S. F., Duesberg, P. H., Lai, M. M. C. and Vogt, P. K. (1979). Avian oncovirus MH2: preferential growth in macrophages and exact size of the genome. Virology 96, 302-306.
- Hu, S. S. F., Lai, M. M. C. and Vogt, P. K. (1979). Genome of avian myelocytomatosis virus MC29: analysis by heteroduplex mapping. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 1265-1268.
- Hu, S. S. F., Moscovici, C. and Vogt, P. K. (1978). The defectiveness of Mill Hill 2, a carcinoma-inducing avian oncovirus. Virology 89, 162-178.
- Huang, A. L., Ostrowski, M. C., Berard, D., and Hager, G. L. (1981) Glucocorticoid regulation of the Ha-MuSV p21 gene conferred by sequences from mouse mammary tumor virus. Cell 27, 245-255.
- Huebner, R. J., Hartley, J. W., Rowe, W. P., Lane, W. T., and Capps, W. I. (1966): Rescue of the defective genome of Moloney sarcoma virus from a non-infectious hamster tumor and the production of pseudotype sarcoma viruses with various murine leukemia viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 56, 1164-1172.
- Huebner, R. J. and Todaro, G. J. (1969). Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 64, 1087-1094.



- Hunsmann, G., Moening, V. and Schafer, W. (1975). Properties of mouse leukemia virus IX. Active and passive immunization of mice against Friend leukemia with isolated viral gp71 glycoprotein and its corresponding antiserum. Virology 66:327-329.
- Hunter, T. (1980). Proteins phosphorylated by the RSV transforming function. Cell 22, 647-648.
- Hunter, T., and Sefton, B. M. (1980): Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1311-1315.
- Hynes, R. O. (1980). Cellular location of viral transforming proteins. Cell 21, 601-602.
- Ihle, J. N., Domotor, J. J., Bengali, K. M. (1976). Characterization of the type and group specificities of the immune response in mice to murine leukemia viruses. J. Virol. 18, 124-131.
- Ihle, J., Hanna, M. G., Robertson, L. E., Kenney, F. T. (1974). Autogenous immunity to endogenous RNA tumor virus: identification of antibody reacting to select viral antigens. J. Exp. Med. 136, 1568-1581.
- Ikeda, H., Hardy W., Tress, E. and Fleissner, E. (1975). Chromatographic separation and antigenic analysis of proteins of the oncornaviruses. V. Identification of a new murine viral protein p15(E). J. Virol. 16, 53-61.
- Jaenisch, R. (1976). Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1260-1264.
- Jaenisch, R. (1977). Germ line integration of Moloney leukemia virus: effect of homozygosity at the M-MuLV locus. Cell 12, 691-696.
- Jaenisch, R., Fan, H., Croker, B. (1975). Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4008-4012.
- Jamjoom, G. A., Naso, R. B. and Arlinghaus, R. B. (1977). Further characterization of intracellular precursor polyproteins of Rauscher leukemia virus. Virology 78, 11-34.



- Jolicoeur, P. and Rassart, E. (1980). Effect of Fv-1 gene product on synthesis of linear and supercoiled viral DNA in cells infected with murine leukemia virus. J. Virol. 33, 183-195.
- Ju, G. and Skalka, A. M. (1980). Nucleotide sequence analysis of the long terminal repeat (LTR) of avian retroviruses: structural similarities with transposable elements. Cell 22, 379-386.
- Kaplan, H. S. (1967). On the natural history of the murine leukemias: Presidential address. Cancer Res. 27, 1325-1340.
- Kaplan, H. S. (1974). Leukemia and lymphoma in experimental and domestic animals. Ser. Haemat. 7, 2-10.
- Karess, R. E., Hayward, W. S. and Hanafusa, H. (1979). Cellular information in the genome of recovered avian sarcoma virus directs the synthesis of transforming protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 3154-3158.
- Kawal, S. and Hanafusa, H. (1971). The effects of reciprocal changes in temperature on the transformed state of cells infected with a Rous sarcoma virus mutant. Virology 46, 470-479.
- Kawal, S. and Hanafusa, H. (1972). Genetic recombination with avian tumor virus. Virology 49, 37-44.
- Kerr, I. M., Olshevsky, V., Lodish, H. F., and Baltimore, D. (1976). Translation of murine leukemia virus DNA in cell-free systems from animal cells. J. Virol. 18, 627-635.
- Keshet, E. and Temin, H. M. (1978). Sites of integration of reticuloendotheliosis virus DNA in chicken DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3372-3376.
- Khoury, A. T. and Hanafusa, H. (1976). Synthesis and integration of viral DNA in chicken cells at different times after infection with various multiplicities of avian oncornaviruses. J. Virol. 18, 383-400.
- Kirsten, W. H., and Mayer, L. A. (1967): Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. J. Natl. Cancer Inst. 39, 311-335.
- Kitchener, G. and Hayman, M. J. (1980). Comparative tryptic peptide mapping studies suggest a role in cell transformation for the gag-related protein of avian erythroblastosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 1637-1641.



- Kohne, D. E. (1970). Evolution of higher organism DNA. Quart. Rev. Biophys. 3, 327-375.
- Krontiris, T. G., and Cooper, G. M. (1981). Transforming activity of human tumor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1181-1184.
- Lai, M. M. C. (1976). Phosphoproteins of Rous sarcoma viruses. Virology 74, 287-301.
- Lane, M. A., Sainten, A., and Cooper, G. M. (1981) Activation of related transforming genes in mouse and human mammary carcinomas. Proc. Natl. Acad. Sci USA 78, 5185-5189.
- Lee, F., Mulligan, R., Berg, P., and Ringold, G. (1981) Glucocorticoids regulate expression of dihydrofolate reductase cDNA in mouse mammary tumor virus chimaeric plasmids. Nature 294, 228-231.
- Lee, J. C. and Ihle, J. N. (1979). Mechanisms of C-type viral leukemogenesis: I. Correlation of in vitro lymphocyte blastogenesis to viremia and leukemia J. Immunol. 123, 2351-2358.
- Lee, J. C. and Ihle, J. N. (1981). Chronic immune stimulation is required for Moloney leukemia virus-induced lymphomas. Nature 289, 407-409.
- Lemons, R. S., Nash, W. G., O'Brien, S. J., Benveniste, R. E., Sherr, C. J. (1978). A gene (Bev1) on human chromosome 6 is an integration site for baboon type C DNA provirus in human cells. Cell 14, 995-1005.
- Lemons, R. S., O'Brien, S. J. and Sherr, C. J. (1977). A new genetic locus, Bev1, on human chromosome 6 which controls the replication of baboon type C virus in human cells. Cell 12, 251-262.
- Levy, J. A. (1973). Xenotropic viruses: murine leukemia viruses associated with NIH Swiss, NZB, and other mouse strains. Science 182, 1151-1153.
- Levy, J. A., Ihle, J. N., Oleszko, O., Barnes, R. D. (1975). Virus specific neutralization by a soluble non-immunoglobulin factor found naturally in normal mouse sera. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 5071-5075.
- Lieber, M., Benveniste, R. E., Livingston, D. M., and Todaro, G. J. (1973). Mammalian cells in culture frequently release type C viruses. Science 182, 56-58.



- Lieber, M. M., Sherr, C. J., Todaro, G. J., Benveniste, R. E., Callahan, R. and Coon, H. G. (1975). Isolation from the Asian mouse mus caroli of an endogenous type C virus related to infectious primate type C viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 2315-2319.
- Lieberman, M. and Kaplan, H. S. (1959). Leukemogenic activity of filtrates from radiation-induced lymphoid tumors of mice. Science 130, 387-388.
- Lilly, F., and T. Pincus. (1973). Genetic control of murine viral leukemogenesis. Adv. Cancer Res. 17, 231-277.
- Lowy, D. R., Rowe, W. P., Teich, N. and Hartley, J. A. (1971). Murine leukemia virus: high frequency activation in vitro by 5-iododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine. Science 174, 155-156.
- Manley, J. L., Sharp, P. A. and Geffer, M. L. (1979). RNA synthesis in isolated nuclei: In vitro initiation of adenovirus 2 major late mRNA precursor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 160-164.
- Martin, G. S. (1970). Rous sarcoma virus: A function required for the maintenance of the transformed state. Nature 227, 1021-1023.
- Mathis, D. J. and Chambon, P. (1981). The SV40 early region TATA box is required for accurate in vitro initiation of transcription. Nature 290, 310-315.
- McGrath, M. S. and Weissman, I. L. (1979). AKR leukemogenesis: identification and biological significance of thymic lymphoma receptors for AKR retroviruses. Cell 17, 65-75.
- Mellon, P. and Duesberg, P. H. (1977). Subgenomic cellular Rous sarcoma virus RNAs contain oligonucleotides from the 3<sup>o</sup> half and the 5<sup>o</sup> terminus of virion RNA. Nature 270, 631-634.
- Mellon, P., Pawson, A., Bister, K., Martin, G. S. and Duesberg, P. H. (1978). Specific RNA sequences and gene products of MC29 avian acute leukemia virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 5874-5878.
- Mitra, S., Goff, S., Gilboa, E., and Baltimore, D. (1979). Synthesis of a 600-nucleotide-long plus strand of DNA by virions of Moloney murine leukemia virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 4355-4359.



- Moelling, K. and Hayami, M. (1977). Analysis of precursors to the envelope glycoproteins of avian RNA tumor viruses in chicken and quail cells. J. Virol. 22, 598-607.
- Moloney, J. B. (1960). Biological studies on a lymphoid leukemia virus extracted from sarcoma S37. I. Origin and introductory investigations. J. Natl. Cancer Inst. 24, 933-951.
- Murray, M. J., Shilo, B. Z., Shih, C., Cowing, D., Hsu, D. W., and Weinberg, R. A. (1981) Three different human tumor cell lines contain different oncogenes. Cell 25, 355-361.
- Naso, R. B., Arcement, L. J., Karshin, W. L., Jamjoom, G. A. and Arlinghaus, R. B. (1976). A fucose-deficient glycoprotein precursor to Rauscher leukemia virus gp69/71. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 2326-2330.
- Neel, B. G., Hayward, W. S., Robinson, H. L., Fang, J. and Astrin, S. M. (1981). Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: Oncogenesis by promoter insertion. Cell 23, 323-334.
- Neiman, P. E. (1973). Measurement of endogenous leukosis virus nucleotide sequences in the DNA of normal avian embryos by RNA-DNA hybridization. Virology 53, 196-204.
- Nermut, M. V., Hermann, F. and Schafer, W. (1972). Properties of mouse leukemia viruses: III. Electron microscopic appearance as revealed after conventional preparation techniques as well as freeze-drying and freeze-etching. Virology 49, 345-358.
- Novak, U., Friedrich, R. and Moelling, K. (1979). Elongation of DNA complementary to the 5° end of the avian sarcoma virus genome by the virion-associated RNA-dependent DNA polymerase. J. Virol. 30, 438-452.
- O'Brien, S. J. (1976). Bvr-1, a restriction locus of a type C RNA virus in the feline cellular genome: Identification, location, and phenotypic characterization in cat x mouse somatic cell hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4618-4622.
- O'Brien, S. J., and Simonson, J. M. (1978). Bvr-1, a restriction locus of type C RNA virus in the feline cellular genome: pleiotropic restriction of endogenous BALB virus in cat x mouse somatic cell hybrids. J. Exp. Med. 147, 219-232.



- Ofe, H. K., Gazdar, A. F., Lalley, P. A., Russell, E. K., Minna, J. D., DeLarco, J., Todaro, G. J. and Francke, U. (1978). Mouse chromosome 5 codes for ecotropic murine leukaemia virus cell-surface receptor. Nature 274, 60-62.
- Oppermann, H., Bishop, J. M., Varmus, H. E. and Levintow, L. (1977). A joint product of the genes gag and pol of avian sarcoma virus: a possible precursor of reverse transcriptase. Cell 12, 993-1005.
- Oskarsson, M., McClements, W. L., Blair, D. G., Maizel, J. V. and Vande Woude, G. F. (1980). Properties of a normal mouse cell DNA sequence (sarc) homologous to the src sequence of Moloney sarcoma virus. Science 207, 1222-1224.
- Padgett, T. G., Stubblefield, E. and Varmus, H. E. (1977). Chicken macrochromosomes contain an endogenous provirus and microchromosomes contain sequences related to the transforming gene of ASV. Cell 10, 649-657.
- Pal, B. K., and Roy-Burman, P. (1975). Phosphoproteins: structural components of oncornaviruses. J. Virol. 15, 540-549.
- Parks, W. P., Scolnick, E. M. and Kozikowski, E. H. (1974). Dexamethasone stimulation of murine mammary tumor virus expression. Science 183, 158-160.
- Pawson, T., Guyden, J., Kung, T.-H., Radke, K., Gilmore, T. and Martin, G. S. (1980). A strain of Fujinami sarcoma virus which is temperature-sensitive in protein phosphorylation and cellular transformation. Cell 22, 767-775.
- Payne, G. S., Courtneidge, S. A., Crittenden, L. B., Fadly, A. M. Bishop, J. M. and Varmus, H. E. (1981). Analysis of avian leukosis virus DNA and RNA in bursal tumors: viral gene expression is not required for maintenance of the tumor state. Cell 23, 311-322.
- Payne, L. N. and Chubb, R. (1968). Studies on the nature and genetic control of an antigen in normal chick embryos which reacts in the COFAL test. J. Gen. Virol. 3, 379-391.
- Peters, G., Harada, F., Dahlberg, J. E., Panet, A., Haseltine, W. and Baltimore, D. (1977). The low molecular weight RNAs of Moloney murine leukemia virus: identification of the primer for RNA-directed DNA synthesis. J. Virol. 21, 1031-1041.
- Perucho, M., Hanahan, D., and Wigler, M. (1980). Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells. Cell 22, 309-317.



- Peterson, R., Burmester, B. R., Fredrickson, T. N., Purchase, H. G. and Good, R. A. (1964). Effects of bursectomy and thymectomy on the development of visceral lymphomatosis in the chicken. J. Natl. Cancer Inst. 32, 1343-1354.
- Peterson, R., Purchase, H. G., Burmester, B. R., Cooper, M. D. and Good, R. A. (1966). Relationships among visceral lymphomatosis, bursa of Fabricius, and bursa-dependent lymphoid tissue of the chicken. J. Natl. Cancer Inst. 36, 585-598.
- Pincus, T., Hartley, J. W. and Rowe, W. P. (1971). A major genetic locus affecting resistance to infection with murine leukemia viruses. I. Tissue culture studies of naturally occurring viruses. J. Exp. Med. 133, 1219-1241.
- Prager, E. M., Brush, A. H., Nolan, R. A., Wakamishi, N., and Wilson, A. C. (1974). Slow evolution of transferrin and albumin in birds according to micro-complement fixation analysis. J. Mol. Evol. 3, 243-262.
- Pribnow, D. (1975). Bacteriophage T<sub>7</sub> early promoters: nucleotide sequences of two RNA polymerase binding sites. J. Mol. Biol. 99, 419-433.
- Proudfoot, N. J. and Brownlee, G. G. (1976). 3' non-coding region sequences in eucaryotic messenger RNA. Nature 263, 211-214.
- Purchase, H. G. and Gilmour, D. G. (1975). Lymphoid leukosis in chickens chemically bursectomized and subsequently inoculated with bursa cells. J. Natl. Cancer Inst. 55, 851-855.
- Purchase, H. G., Gilmour, D. G., Romero, C. H. and Okazaki, W. (1977). Post-infection genetic resistance of avian lymphoid leukosis resides in B target cells. Nature 270, 61-62.
- Purchio, A. F., Erikson, E., Brugge, J. S. and Erikson, R. L. (1978). Identification of a polypeptide encoded by the avian sarcoma virus src gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 1567-1571.
- Ramsay, G., Graf, T., and Hayman, M. J. (1980). Mutants of avian myelocytomatosis virus with smaller gag gene-related proteins have an altered transforming ability. Nature 288, 170-172.
- Redman, C. M. (1969). Biosynthesis of serum proteins and ferritin by free and attached ribosomes of rat liver. J. Biol. Chem. 244, 4308-4315.



- Redman, C. M., Siekevitz, P., and Palade, G. E. (1966). Synthesis and transfer of amylase in pigeon pancreatic microsomes. J. Biol. Chem. 241, 1150-1158.
- Rettenmier, C. W., Anderson, S. M., Riemen, M. W., and Hanafusa, H. (1979). gag-related polypeptides encoded by replication-defective avian oncovirus. J. Virol. 32, 749-761.
- Rice, N., and Paul, P. (1971). Reassociation of single copy DNA sequences. Carnegie Inst. Washington Yearbook 71, 262-264.
- Ringold, G. M., Yamamoto, K. R., Tomkins, G. M., Bishop, J. M. and Varmus, H. E. (1975). Dexamethazone-mediated induction of mouse mammary tumor virus RNA: A system for studying glucocorticoid action. Cell 6, 299-305.
- Robinson, H. L., Astrin, S. M., Senior, A. M., and Salazar, F. H. (1981) Host susceptibility to endogenous viruses: defective glycoprotein-expressing proviruses interfere with infections. J. Virol. 40, 745-751.
- Rosenberg, M., and Court, M. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. Ann. Rev. Genet. 13, 319-353.
- Rosenberg, N., and Baltimore, D. (1976). A quantitative assay for transformation of bone marrow cells by Abelson murine leukemia virus. J. Exp. Med. 143, 1453-1463.
- Rosenberg, N., and Baltimore, D. (1980). Abelson virus in *Viral Oncology*, ed. Klein, G. (Raven Press, New York) pp. 187-203.
- Rothenberg, E., Donoghue, D. J., and Baltimore, D. (1978). Analysis of a 5' leader sequence on murine leukemia virus 21S RNA: Heteroduplex mapping with long reverse transcriptase products. Cell 13, 435-451.
- Rous, P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent from the tumor cells. J. Exp. Med. 13, 397-411.
- Roussel, M. (1978). These de 3eme cycle. Etude des sequences nucleotidiques cellulaires apparentees au gene transformant des retrovirus aviaires.
- Royer-Pokora, B., Beug, H., Clarietz, M., Winkhardt, H.- J., Friis, R. R., and Graf, T. (1978). Transformation parameters in chicken fibroblasts transformed by AEV and MC29 avian leukemia viruses. Cell 13, 751-760.



- Royer-Pokora, B., Grieser, S., Beug, H., and Graf, T. (1979). Mutant of avian erythroblastosis virus (AEV) with restricted target cell specificity. Nature 282, 750-752.
- Sabatini, D. D., and Blobel, J. (1970). Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver fractions. II. Location of the polypeptides in rough microsomes. J. Cell Biol. 45, 146-157.
- Sabran, J. L., Hsu, T. W., Yeater, C., Kaji, A., Mason, W. S., and Taylor, J. M. (1979). Analysis of integrated avian RNA tumor virus DNA in transformed chicken, duck, and quail fibroblasts. J. Virol. 29, 170-178.
- Saule, S., Roussel, M., Lagrou, C. and Stehelin, D. (1981) Characterization of the oncogene (erb) of Avian Erythroblastosis Virus and its cellular progenitor. J. Virol. 38, 409-419.
- Scher, C. D., and Siegler, R. (1975). Direct transformation of 3T3 cells by Abelson murine leukemia virus. Nature 253, 729-731.
- Schultz, A. M., Rabin, E. H., and Oroszlan, S. (1979). Post-translational modification of Rauscher leukemia virus precursor polyproteins encoded by the gag gene. J. Virol. 30, 255-266.
- Schwartz, D. E., Zamecnik, P. C., and Weith, H. L. (1977). Rous sarcoma virus genome is terminally redundant: the 3' sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 994-998.
- Scolnick, E. M., Papageorge, A. G., and Shih, T. Y. (1979): Guanine nucleotide-binding activity as an assay for src protein of rat-derived murine sarcoma viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5355-5359.
- Scolnick, E. M., and Parks, W. P. (1974): Harvey sarcoma virus: A second murine type-C sarcoma virus with rat genetic information. J. Virol. 13, 1211-1219.
- Scolnick, E. M., Parks, W., Kawakami, T., Kohne, D., Okabe, H., Gilden, R., and Hatanaka, M. (1974). Primate and murine type-C viral nucleic acid association kinetics: analysis of model systems and natural tissues. J. Virol. 13: 363-369.
- Scolnick, E. M., Rands, E., Williams, D., and Parks, W. P. (1973). Studies on the nucleic acid sequences of Kirsten sarcoma virus: a model for formation of a mammalian RNA-containing sarcoma virus. J. Virol. 12, 458-463.



- Sen, A., Sherr, C. J., and Todaro, G. J. (1977). Phosphorylation of murine type C viral p12 proteins regulates their extent of binding to the homologous viral RNA. Cell 10, 489-496.
- Shank, P. R., Cohen, J. C., Varmus, H. E., Yamamoto, K. R., and Ringold, G. M. (1978a). Mapping of linear and circular forms of mouse mammary tumor virus DNA with restriction endonucleases: evidence for a large specific deletion occurring at high frequency during circularization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2112-2116.
- Shank, P. R., Hughes, S. H., Kung, H. J., Majors, J. E., Quintrell, N., Guntaka, R. V., Bishop, J. M., and Varmus, H. E. (1978b). Mapping unintegrated avian sarcoma virus DNA: termini of linear DNA bear 300 nucleotides present once or twice in two species of circular DNA. Cell 15, 1383-1395.
- Shank, P. R., and Varmus, H. E. (1978). Virus-specific DNA in the cytoplasm of avian sarcoma virus-infected cells is a precursor to covalently closed circular DNA in the nucleus. J. Virol. 25, 104-114.
- Shapiro, J. A. (1979). Molecular model for the transposition and replication of bacteriophage Mu and other transposable elements. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1933-1937.
- Shapiro, S. Z., Strand, M., and August, J. T. (1976). High molecular weight precursor polypeptides of structural proteins of Rauscher murine leukemia virus. J. Mol. Biol. 107, 459-477.
- Sharp, D. G., Eckert, E. A., Beard, D., and Beard, J. W. (1952). Morphology of the virus of avian erythromyeloblastic leukosis and a comparison with the agent of Newcastle disease. J. Bacteriol. 63, 151-161.
- Sheiness, D., and Bishop, J. M. (1979). DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. J. Virol. 31, 514-521.
- Sheiness, D., Fanshier, L., and Bishop, J. M. (1978). Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. J. Virol. 28, 600-610.
- Sherr, C. J., Fedele, L. A., Donner, L., and Turek, L. P. (1979). Restriction endonuclease mapping of unintegrated proviral DNA of Snyder-Theilen feline sarcoma virus: Localization of sarcoma-specific sequences. J. Virol. 32, 860-875.



- Sherr, C. J., Fedele, L. A., Oskarsson, M., Maizel, J., and Vande Woude, G. F. (1980). Molecular cloning of Snyder-Theilen feline leukemia and sarcoma viruses: Comparative studies of feline sarcoma virus with its natural helper virus and with Moloney murine sarcoma virus. J. Virol. 34, 200-212.
- Sherr, C. J., Lieber, M. M., Benveniste, R. E., and Todaro, G. J. (1974a). Endogenous baboon type C virus (M7): biochemical and immunologic characterization. Virology 58, 492-503.
- Sherr, C. J., Lieber, M. M., and Todaro, G. J. (1974b). Mixed splenocyte cultures and graft versus host reactions selectively induce an "S-tropic" murine type C virus. Cell 1, 55-58.
- Sherr, C. J., Sen, A., Todaro, G. J., Sliski, A., and Essex, M. (1978). Pseudotypes of feline sarcoma virus contain an 85,000-dalton protein with feline oncornavirus-associated cell membrane antigen (FOCMA) activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 1505-1509.
- Sherr, C. J., and Todaro, G. J. (1974). Radioimmunoassay of the major group specific protein of endogenous baboon type-C viruses: relation to the RD-114/CCC group and detection of antigen in normal baboon tissues. Virology 61, 168-181.
- Sherr, C. J., and Todaro, G. J. (1979). Type C viruses: natural derivatives of cellular genes involved in malignant transformation. Springer Semin. Immunopathol. 2, 339-353.
- Shibuya, M., Hanafusa, T., Hanafusa, H., and Stephenson, J. R. (1980). Homology exists among the transforming sequences of avian and feline sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6536-6540.
- Shih, C., Shilo, B., Goldfarb, M. P., Dannenberg, A., and Weinberg, R. A. (1979) Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5714-5718.
- Shih, C., Padhy, L. C. Murray, M., and Weinberg, R. A. (1981). Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. Nature 290, 261-264.
- Shih, T. Y., Papageorge, A. G., Stokes, P. E., Weeks, M. O., and Scolnick, E. M. (1980): Guanine nucleotide binding and autophosphorylating activities associated with the purified p21 src protein of Harvey murine sarcoma virus. Nature 287, 686-691.



- Shimotohno, K., Mizutani, S., and Temin, H. M. (1980): Sequence of retrovirus provirus resembles that of bacterial transposable elements. Nature, 285, 550-554.
- Shoemaker, C., Goff, S., Gilboa, E., Paskind, M., Mitra, S. W., and Baltimore, D. (1980). Structure of a cloned circular Moloney murine leukemia virus DNA molecule containing an inverted segment: Implications for retrovirus integration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3932-3936.
- Siden, E., Baltimore, D., Clark, D., and Rosenberg, N. (1979). Immunoglobulin synthesis by lymphoid cells transformed in vitro by Abelson murine leukemia virus. Cell 16, 389-396.
- Smotkin, D., Yoshimura, F. K., and Weinberg, R. A. (1976). Infectious, linear, unintegrated DNA of Moloney murine leukemia virus. J. Virol. 20, 621-629.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.
- Souza, L. M., Briskin, M. J., Hillyard, R. L., and Baluda, M. A. (1980). Identification of the avian myeloblastosis virus genome II. Restriction endonuclease analysis of DNA from  $\lambda$  proviral recombinants and leukemic myeloblast clones. J. Virol. 36, 325-336.
- Spector, D. H., Smith, K., Padgett, T., McCombe, A., Roulland-Dussoix, D., Moscovici, C., Varmus, H. E., and Bishop, J. M. (1978). Uninfected avian cells contain RNA related to the transforming gene of avian sarcoma viruses. Cell 13, 371-379.
- Stehelin, D., and Graf, T. (1978). Avian myelocytomatosis and erythroblastosis viruses lack the transforming gene src of avian sarcoma viruses. Cell 13, 745-750.
- Stehelin, D., Guntaka, R. V., Varmus, H. E., and Bishop, J. M. (1976a). Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. J. Mol. Biol. 101, 349-365.
- Stehelin, D., Rousset, M., and Gardes, M. (1978). The transforming gene of avian sarcoma viruses, in Avian RNA Tumor Viruses, S. Barlati and C. de Giuli, eds., Piccin Medical Books, Padova, pp 134-144.



- Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., and Vogt, P. K. (1976b). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. Nature 260, 170-173.
- Steffen, D., and Weinberg, R. A. (1978). The integrated genome of murine leukemia virus. Cell 15, 1003-1010.
- Stephenson, J. R., Devare, S. G., and Reynolds, F. H. (1978). Translational products of type C RNA tumor viruses. Adv. Cancer Res.
- Stephenson, J. R., Khan, A. S., Sliski, A. H., and Essex, M. (1977). Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen: evidence for an immunologically cross-reactive feline sarcoma virus-coded protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5608-5612.
- Stephenson, J. R., Peters, R. L., Hino, S., Donahoe, R. M., Long, L. K., Aaronson, S. A., and Kelloff, G. J. (1976). Natural immunity in mice to structural polypeptides of endogenous type C RNA virus. J. Virol. 19, 890-898.
- Stuhlmann, H., Jahner, D., and Jaenisch, R. (1981). Infectivity and methylation of retroviral genomes is correlated with expression in the animal. Cell 26, 221-232.
- Sutcliffe, J. G., Shinnick, T. M., Verma, I. M., and Lerner, R. A. (1980). Nucleotide sequence of Moloney leukemia virus: 3' end reveals details of replication, analogy to bacterial transposons, and an unexpected gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3302-3306.
- Sveda, M. M., Fields, B. N., Soeiro, R. (1974). Host restriction of Friend leukemia virus: fate of input virion RNA. Cell 2, 271-277.
- Taylor, J. M. (1977). An analysis of the role of tRNA species as primers for the transcription into DNA of RNA tumor virus genomes. Biochim. Biophys. Acta 473, 57-71.
- Taylor, J. M., Illmensee, R., and Summers, J. (1976). Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase. Biochim. Biophys. Acta 442, 324-330.
- Temin, H. M. (1980). Origin of retroviruses from cellular moveable genetic elements. Cell 21, 599-600.



- Temin, H. M., and Baltimore, D. (1972). RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. Adv. Virus Res. 17, 129-186.
- Tereba, A., and Astrin, S. M. (1980). Chromosomal localization of ev-1, a frequently occurring endogenous retrovirus locus in white leghorn chickens, by in situ hybridization. J. Virol. 35, 888-894.
- Tereba, A., Lai, M. M. C., and Murti, K. G. (1979). Chromosome 1 contains the endogenous RAV-0 retrovirus sequence in chicken cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6486-6490.
- Tereba, A., Skoog, L., and Vogt, P. K. (1975). RNA tumor virus specific sequences in nuclear DNA of several avian species. Virology 65, 524-534.
- Todaro, G. J. (1972). 'Spontaneous' release of type C viruses from clonal lines of 'spontaneously' transformed BALB/3T3 cells. Nature New Biol. 240: 157-160.
- Todaro, G. J. (1978). RNA tumor virus genes and transforming genes: patterns of transmission. Brit. J. Cancer 37, 139-158.
- Todaro, G. J., Benveniste, R. E., Lieber, M. M., and Sherr, C. J. (1974a). Characterization of a type C virus released from the porcine cell line PK(15). Virology 58, 65-74.
- Todaro, G. J., Benveniste, R. E., Sherr, C. J., Schlom, J., Schidlovsky, G., and Stephenson, J. R. (1978). Isolation and characterization of a new type D retrovirus from the Asian primate presbytis obscurus (spectacled Langur). Virology 84, 189-194.
- Todaro, G. J., Sherr, C. J., Benveniste, R. E., Lieber, M. M., and Melnick, J. L. (1974b). Type-C viruses of baboons: isolation from normal cell cultures. Cell 2, 55-61.
- Tooze, J. (1973). The Molecular Biology of Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Toyoshima, K., and Vogt, P. K. (1969). Temperature sensitive mutants of an avian sarcoma virus. Virology 39, 930-931.



- Van Beveren, C., Goddard, J. G., Berns, A., and Verma, I. M. (1980). Structure of Moloney murine leukemia viral DNA: nucleotide sequence of the 5' long terminal repeat and adjacent cellular sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3307-3311.
- Van de Ven, W. J. M., Reynolds, F. H., and Stephenson, J. R. (1980). The nonstructural components of polyproteins encoded by replication-defective mammalian transforming retroviruses are phosphorylated and have associated protein kinase activity. Virology 101, 185-197.
- Vande Woude, G. F., Oskarsson, M., Enquist, L. W., Nomura, S., Sullivan, S., and Fischinger, P. J. (1979). The cloning of integrated Moloney sarcoma proviral DNA sequences in bacteriophage lambda. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4464-4468.
- Varmus, H. E., and Shank, P. R. (1976). Unintegrated viral DNA is synthesized in the cytoplasm of avian sarcoma-transformed duck cells by viral DNA polymerase. J. Virol. 18, 567-573.
- Verma, I. M. (1977) The reverse transcriptase. Biochim. Biophys. Acta 473, 1-38.
- Vigne, R., Neil, J. C., Breitman, M. L., and Vogt, P. K. (1980). Recovered src genes are polymorphic and contain host markers. Virology 105, 71-85.
- Vogt, P. K. (1971). Spontaneous segregation of nontransforming viruses from cloned sarcoma viruses. Virology 46, 939-946.
- Vogt, P. K., and Friis, R. R. (1971). An avian leukosis virus related to RSV(0): properties and evidence for helper activity. Virology 43, 223-234.
- Vogt, V. M., Eisenman, R., and Diggelman, H. (1975). Generation of avian myeloblastosis virus structural proteins by proteolytic cleavage of a precursor polypeptide. J. Mol. Biol. 96, 471-493.
- Wang, L.- H., Halpern, C. C., Nadel, M., and Hanafusa, H. (1978). Recombination between viral and cellular sequences generates transforming sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5812-5816.
- Warburg, O. (1967). The prime cause and prevention of cancer (Triltsch, Wurzburg, Germany) pp 6-16.



- Watson, J. D. (1976). *The Molecular Biology of the Gene*. 3rd edition. Cold Spring Harbor and Harvard University.
- Weil, P. A., Luse, D. S., Segall, J., and Roeder, R. G. (1979). Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. Cell 18, 469-484.
- Weinberg, R. A. (1977). Structure of the intermediates leading to the integrated provirus. Biochim. Biophys. Acta 473, 39-55.
- Weiss, R. A. (1969). The host range of Bryan strain Rous sarcoma virus synthesized in the absence of helper virus. J. Gen. Virol. 5, 511-528.
- Weiss, R. A. (1975). Genetic transmission of RNA tumor viruses. In *Perspectives in Virology*, 9 (New York: Academic Press) pp 165-205.
- Weiss, R. A., and Biggs, P. M. (1972). Leukosis and Marek's disease viruses of feral red jungle fowl and domestic fowl in Malaysia. J. Natl. Cancer Inst. 49, 1713-1725.
- Weiss, S. R., Varmus, H. E., and Bishop, J. M. (1977). The size and genetic composition of virus-specific RNAs in the cytoplasm of cells producing avian sarcoma-leukosis viruses. Cell 12, 983-992.
- Weissman, C., Parsons, J. T., Coffin, J. W., Rymo, L., Billeter, M. A., and Hofstetter, H. (1974). Studies on the structure and synthesis of Rous sarcoma virus RNA. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 1043-1056.
- Willingham, M. C., Jay, G., and Pastan, I. (1979). Localization of the ASV src gene product to the plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. Cell 18, 125-134.
- Willingham, M. C., Pastan, I., Shih, T. Y., and Scolnick, E. M. (1980). Localization of the src gene product of the Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. Cell 19, 1005-1014.
- Witte, O. H., Dasgupta, A., and Baltimore, D. (1980). Abelson murine leukaemia virus protein is phosphorylated in vitro to form phosphotyrosine. Nature 283, 826-831.



- Witte, O. N., Rosenberg, N., Paskind, M., Shields, A., and Baltimore, D. (1978). Identification of an Abelson murine leukemia virus-encoded protein present in transformed fibroblast and lymphoid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2488-2492.
- Witte, O. N., Tsukamoto-Adey, A., and Weissman, I. L. (1977). Cellular maturation of oncornavirus glycoproteins: topological arrangement of precursor and product forms in cellular membranes. Virology 76, 539-553.
- Witte, O., and Weissman, I. L. (1976). Oncornavirus budding: kinetics of formation and utilization of viral membrane glycoprotein. Virology 69, 464-473.
- Yamamoto, T., Jay, G., and Pastan, I. (1980). Unusual features in the nucleotide sequence of a cDNA clone derived from the constant region of avian sarcoma virus messenger RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 176-180.
- Yang, W. K., Kiggans, J. O., Yang, D. M., Ou, C.-Y., Tennant, R. W., Brown, A., and Bassin, R. H. (1980a). Synthesis and circularization of N- and B-tropic retroviral DNA in Fv-1 permissive and restrictive mouse cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2994-2998.
- Yang, W. K., Yang, D., and Kiggins, J. O. (1980b). Covalently closed circular DNAs of murine type C retrovirus: depressed formation in cells treated with cycloheximide early after infection. J. Virol. 36, 181-188.
- Young, H. A., Shih, T. Y., Scolnick, E. M., and Parks, W. P. (1977). Glucocorticoid-receptor interaction and induction of murine mammary tumor virus: effects upon synthesis and degradation of viral DNA. J. Virol. 21, 139-146.

APPENDIX



ARTICLE I

# The Distribution of Endogenous Chicken Retrovirus Sequences in the DNA of Galliform Birds Does Not Coincide with Avian Phylogenetic Relationships

David P. Frisby and Robin A. Weiss

Imperial Cancer Research Fund Laboratories  
Lincoln's Inn Fields

London WC2A 3PX, England

Martine Roussel and Dominique Stehelin

INSERM U.102

Unite de Recherches de Virologie

2 Place de Verdun

and Institut Pasteur de Lille

Lille 59045, Cedex, France

## Summary

The chicken is a domesticated form of Red Junglefowl (*Gallus gallus*), which belongs to the Pheasant family (Phasianidae) within the order Galliformes. Domestic chickens carry the genome of the endogenous retrovirus RAV-O as DNA sequences integrated into host chromosomes transmitted through the germ line. We have examined the presence and distribution of RAV-O-related sequences in the DNA of Red Junglefowl and other closely related species of Junglefowl, as well as more distantly related Pheasants and Quail. DNA sequences homologous to RAV-O were analyzed by molecular hybridization in liquid and after electrophoresis of restriction endonuclease fragments. The presence of RAV-O-related sequences in avian DNA does not correlate with phylogenetic relationships. Under stringent conditions of hybridization in liquid, DNA sequences homologous to RAV-O cDNA were detected at high levels (>80% homology) only in the genomes of the domestic chicken and its phylogenetic ancestor, the Red Junglefowl (*Gallus gallus*). The DNA of two other species of *Gallus* (*G. sonnerati*, Sonnerat's Junglefowl and *G. varius*, Green Junglefowl), of Ring-necked Pheasant and of Japanese Quail contained sequences with <10% homology to RAV-O cDNA. Under conditions permitting mismatching, however, Ring-necked Pheasant DNA hybridized up to 50% of the RAV-O cDNA, and Quail DNA 24%, whereas the extent of hybridization to Sonnerat's and Green Junglefowl DNA was not markedly increased. Analysis of restriction enzyme digests revealed several distinct fragments of DNA hybridizing to chick retrovirus cDNA in both Red Junglefowl and domestic chicken, and multiple fragments in DNA from two species of Phasianus. No fragments with sequences related to chicken retroviruses were found, however, in digests of DNA prepared from Sonnerat's, Ceylonese and Green Junglefowl, from two other Pheasant genera (*Chrysolophus* and *Lophura*), or from one Quail genus (*Coturnix*). Thus the DNA of three Junglefowl species closely related to *Gallus gallus* lacked RAV-O sequences while the DNA of more distantly related Phasianus species

showed significant homology. These results show that RAV-O-related sequences have not diverged together with the normal host genes during the evolution of the Phasianidae. Although RAV-O sequences are endogenous in all domestic chickens and Red Junglefowl studied thus far, it appears that the RAV-O genome has been introduced relatively recently into the germ line of *Gallus gallus*, following speciation but before domestication, and independently of the related sequences found in members of the genus Phasianus.

## Introduction

The concept that the genomes of retroviruses may be inherited by the host at chromosomal loci (Payne and Chubb, 1968; Bentvelzen et al., 1968; Weiss, 1969; Huebner and Todaro, 1969) has now been illustrated for numerous vertebrate host species (reviewed by Weiss, 1975; Aaronson and Stephenson, 1976; Robison, 1978; Todaro, 1978). The origin and function of such endogenous viral genomes in the host, however, remain obscure.

Evidence that avian retrovirus *gag* and *env* genes (Baltimore, 1975) are transmitted through the germ line first accrued from studies of uninfected chick cells which synthesized viral *gag* antigens representing the group-specific virion core antigens (Payne and Chubb, 1968), and a helper factor which complemented *env*-defective strains of Rous sarcoma virus lacking the virion envelope glycoprotein, gp85 (Weiss, 1969; Hanafusa, Miyamoto and Hanafusa, 1970; Weiss and Payne, 1971). The presence of a complete viral genome in normal chicken cells became evident from the release of infectious virus, either spontaneously (Vogt and Friis, 1971) or upon induction with mutagens (Weiss et al., 1971). This endogenous virus is called Rous-associated virus-O (RAV-O; Vogt and Friis, 1971). At first it was thought that only those chickens expressing viral antigens inherited the genome, but the ready induction of RAV-O from the antigen-negative Reaseheath C-line (Weiss et al., 1971) and the presence of sequences homologous to the RNA of avian leukosis viruses in the DNA of all embryos tested (Rosenthal et al., 1971; Baluda, 1972; Neiman, 1972, 1973; Varmus et al., 1972) suggested that all domestic chickens contain genes related to the genome of RAV-O, whether or not they were expressed.

Examination of Red Junglefowl, the feral progenitor of domestic chicken (Darwin, 1868; Delacour, 1977), revealed the presence of a complete inducible viral genome and showed that *gag* and *env* antigens are expressed in embryonic cells (Weiss et al., 1971; Weiss and Biggs, 1972). Furthermore, it was not possible to distinguish any difference between the endogenous viruses of Red Junglefowl and several

strains of domestic chicken, regarding the host range and antigenic properties of the major *env* gene product gp85, in contrast to the wide variation in gp85 evident between exogenous strains of avian leukosis virus. These results suggested that the endogenous viral genomes of chickens and Red Junglefowl (*Gallus gallus*) were of common origin and that at least the *env* gene was highly conserved during domestication.

Molecular hybridization experiments indicated that DNA sequences related to RAV-O are endogenous in other species of Galliform birds (Neiman, 1973; Kang and Temin, 1974; Shoyab and Baluda, 1975; Tereba, Skoog and Vogt, 1975; Stehelin, et al., 1976). The extent of annealing and the thermal stability of the hybrids formed between viral probes and host DNA appeared to correlate with the phylogenetic relationship of the hosts, and led to the notion that RAV-O-related sequences diverged along with other cellular genes during Galliform evolution.

This paper reports new observations that are inconsistent with this interpretation. We have examined the DNA of four closely related species of Junglefowl, together with DNA of other Galliform birds. The RAV-O sequences in the Red Junglefowl (*Gallus gallus*) are closely related to those in chicken (also *G. gallus*). No RAV-O-related sequences are detectable, however, in the DNA of *G. sonnerati* (Sonnerat's or Grey Junglefowl), *G. lafayettei* (Ceylonese Junglefowl) or *G. varius* (Green or Japanese Junglefowl), yet sequences with partial homology to RAV-O are present in the DNA of two species of the less closely related True Pheasants (genus *Phasianus*). Thus the distribution among Galliform birds of genetic sequences related to the endogenous chicken retrovirus is sporadic in nature, in contrast to the previous evidence which suggested a phylogenetically related distribution and diversification of RAV-O genes.

## Results

### Expression of Endogenous Viral Genes in the Galliform Species Studied

Embryo fibroblast cultures were established from all the available species of embryo. The expression of helper factors for *env*-defective RSV was tested by co-cultivation with 16Q cells (Murphy, 1977), and the spontaneous release of infectious retrovirus was tested by co-cultivation with *gs<sup>-</sup> chf<sup>-</sup>* chick cells and with Sonnerat's Junglefowl cells. Of the Galliform species used in this study, only embryo fibroblasts of domestic chicken, Red Junglefowl (*Gallus gallus*) and Japanese Green Pheasant (*Phasianus versicolor*) were helper factor positive. The RSV pseudotypes rescued by domestic chicken and Red Junglefowl cells carried the subgroup E *env* specificity as judged by host range and interference assays, whereas the RSV pseudotypes formed with Japanese Green Pheasant cells resembled subgroup F, characteristic

of the endogenous virus of the closely related Ring-necked Pheasant (*P. colchicus*). Upon prolonged passage, two out of eight Japanese Green Pheasant embryo fibroblast cultures released low titers of an infectious virus with subgroup F properties.

No helper factors or retroviruses were produced by Sonnerat's Junglefowl fibroblasts or by leukocyte cultures of Green Junglefowl. A fuller description of the endogenous helper factors, susceptibility to exogenous infection and other properties of a variety of Galliform fibroblasts will be reported separately (H. Murphy and R. Weiss, unpublished observations).

### Annealing of Chicken Unique Sequence and RAV-O-Specific Probes to Normal Avian DNAs

To determine the relatedness of the DNA of different avian species to that of the chicken, and to investigate the presence of RAV-O-related sequences, avian DNA preparations were hybridized to chicken unique sequence and to RAV-O-specific probes, respectively. Figure 1 shows the kinetics of hybridization, under stringent conditions, of unique sequence chicken DNA and of RAV-O cDNA to the DNA of the domestic chicken, three species of Junglefowl, Ring-necked Pheasant and Japanese Quail. All values have been corrected such that the maximal reassociation between the <sup>3</sup>H-unique sequence chicken DNA and chicken DNA represented 100% annealing (see legend to Figure 1). At a *Cot* of  $2 \times 10^4$  mole-sec/l. the

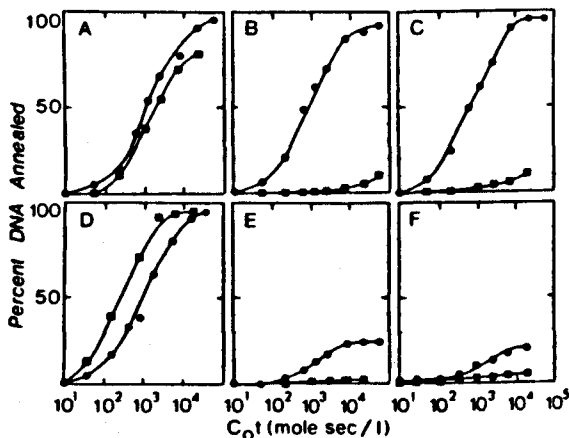


Figure 1. Kinetics of Annealing of RAV-O cDNA and Unique Sequence Chicken DNA to Various Avian DNAs

<sup>3</sup>H-unique sequence chicken DNA (●—●) and <sup>3</sup>H-RAV-O cDNA (■—■) were annealed to excess cellular DNAs from various avian species at 68°C in 0.6 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.01 M EDTA, and the percentage of annealing was assayed by S1 nuclease digestion as described in Experimental Procedures. (A) Domestic chicken DNA; (B) Sonnerat's Junglefowl DNA; (C) Green Junglefowl DNA; (D) Red Junglefowl DNA; (E) Ring-necked Pheasant DNA; (F) Japanese Quail DNA. Annealing values have been standardized such that the maximal plateau value of the <sup>3</sup>H-unique sequence chicken DNA in (A) represented 100% annealing; all other values, including those for the <sup>3</sup>H-RAV-O cDNA, have been corrected by the same factor. (Uncorrected values for annealing of the RAV-O cDNA are presented in Table 1.)



unique sequence chicken DNA annealed extensively (>95%) to each of the Junglefowl (*Gallus*) species examined, and the  $Cot_{1/2}$  of each reaction was approximately  $1 \times 10^3$  mole-sec/l. The unique sequence chicken DNA annealed to 25% with Ring-necked Pheasant DNA and to 20% with Japanese Quail DNA. These values are consistent with studies of the evolutionary relatedness of their albumins and transferrins (Prager et al., 1974) and with the classical systematics of these members of the Phasianidae (Darwin, 1868; Delacour, 1977).

In contrast to the results obtained using unique sequence chicken DNA, the annealing of RAV-0 cDNA to cellular DNA revealed species-specific homology. Whereas the RAV-0 cDNA annealed extensively to DNA of chicken (81%) and Red Junglefowl (99%), little or no homology was detected in DNA from the other Junglefowl species or from the Pheasant and Quail. The  $Cot_{1/2}$  values for duplexes formed between RAV-0 cDNA and chicken and Red Junglefowl DNA ( $1 \times 10^3$  and  $3 \times 10^2$  mole-sec/l, respectively) suggest that chicken DNA contains between 1 and 2 copies per haploid genome of RAV-0-related information, whereas Red Junglefowl DNA has 3-4 copies per haploid genome.

The above experiments were performed on DNA preparations from peripheral blood erythrocyte nuclei (isolated in each case from one bird), with the exception of the chicken, Ring-necked Pheasant and Japanese Quail DNA preparations, which were obtained from pooled whole embryo tissue. Similar results were obtained when other DNA preparations from these birds were examined.

### Thermal Denaturation Studies

Although the results of cross-annealing kinetic studies using unique sequence chicken DNA (described above) conform well to the existing classification of these avian species, thermal denaturation profiles of the cross-annealed DNAs were determined to examine the molecular relatedness of these DNAs more precisely.

The  $^3H$ -unique sequence chicken DNA was annealed to DNAs prepared from chicken, Red Junglefowl, Sonnerat's Junglefowl, Green Junglefowl and Ring-necked Pheasant to a  $Cot$  of  $2 \times 10^4$  mole-sec/l. The duplexes were then subjected to thermal denaturation analysis as detailed in Experimental Procedures.

The thermal denaturation profiles for the DNA samples annealed to the unique sequence chicken DNA are shown in Figure 2 (solid symbols). It is evident that all the Junglefowl species studied are very closely related, having  $T_m$ s of  $89 \pm 1^\circ C$  with the unique sequence chicken DNA in an average of three experiments. Under the same conditions the  $^3H$ -unique sequence chicken DNA gave a  $T_m$  of  $85^\circ C$  with Ring-necked Pheasant DNA. An analogous experiment in

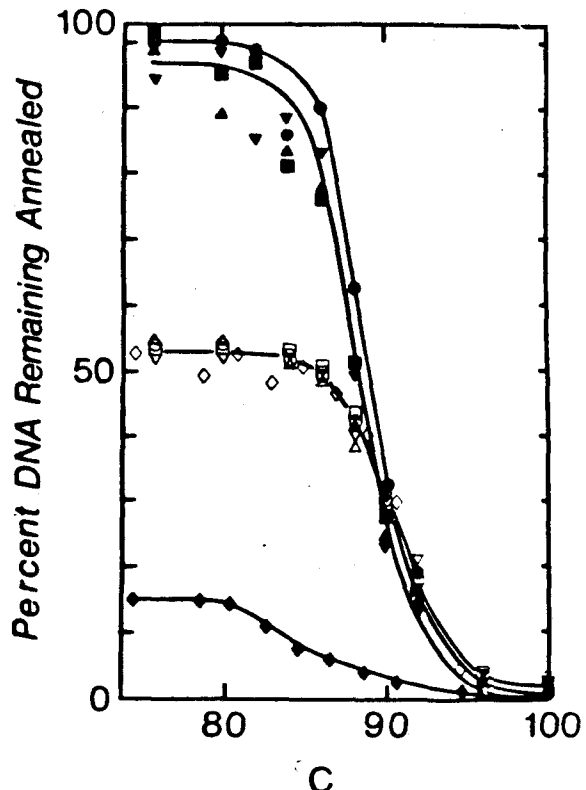


Figure 2. Thermal Denaturation Profiles of Duplexes Formed between Unique Sequence Chicken DNA and Normal Avian DNAs. The avian DNAs were annealed to  $^3H$ -unique sequence chicken DNA.  $T_m$ s were determined and the values were normalized as described in Experimental Procedures. A duplex formed between  $^{32}P$ -tdPrC cDNA and XC cell DNA was included in each  $T_m$  series as an internal control (open symbols, corresponding to key for solid symbols given below). Thermal denaturation of duplexes formed between  $^3H$ -unique sequence chicken DNA and chicken DNA (●—●); Red Junglefowl DNA (■—■); Sonnerat's Junglefowl DNA (▲—▲); Green Junglefowl DNA (▼—▼); Ring-necked Pheasant DNA (◄—◄).

which  $^3H$ -Quail DNA was annealed to chicken DNA gave a  $T_m$  of  $81 \pm 1^\circ C$  (data not shown). The extent of annealing of duplexes (formed at a  $Cot$  of  $2 \times 10^4$  mole-sec/l and still remaining after incubation at  $80^\circ C$ ) between the  $^3H$ -unique sequence chicken DNA and the various avian DNAs indicated that Red Junglefowl and chicken were more closely related to one another than to either *G. varius* or *G. sonnerati*. These results, together with the kinetic studies described in the previous section, show that the two hitherto unstudied Junglefowl species are indeed very closely related to both the domestic chicken and its phylogenetic ancestor, the Red Junglefowl. Furthermore, it may be concluded that all the Junglefowl species are phylogenetically much closer to the domestic chicken than to either the Pheasant or Quail species studied.

**Annealing of the RAV-0-Specific Probe to Normal Avian DNAs under Less Stringent Conditions**  
In view of the extremely low levels of RAV-0 homology

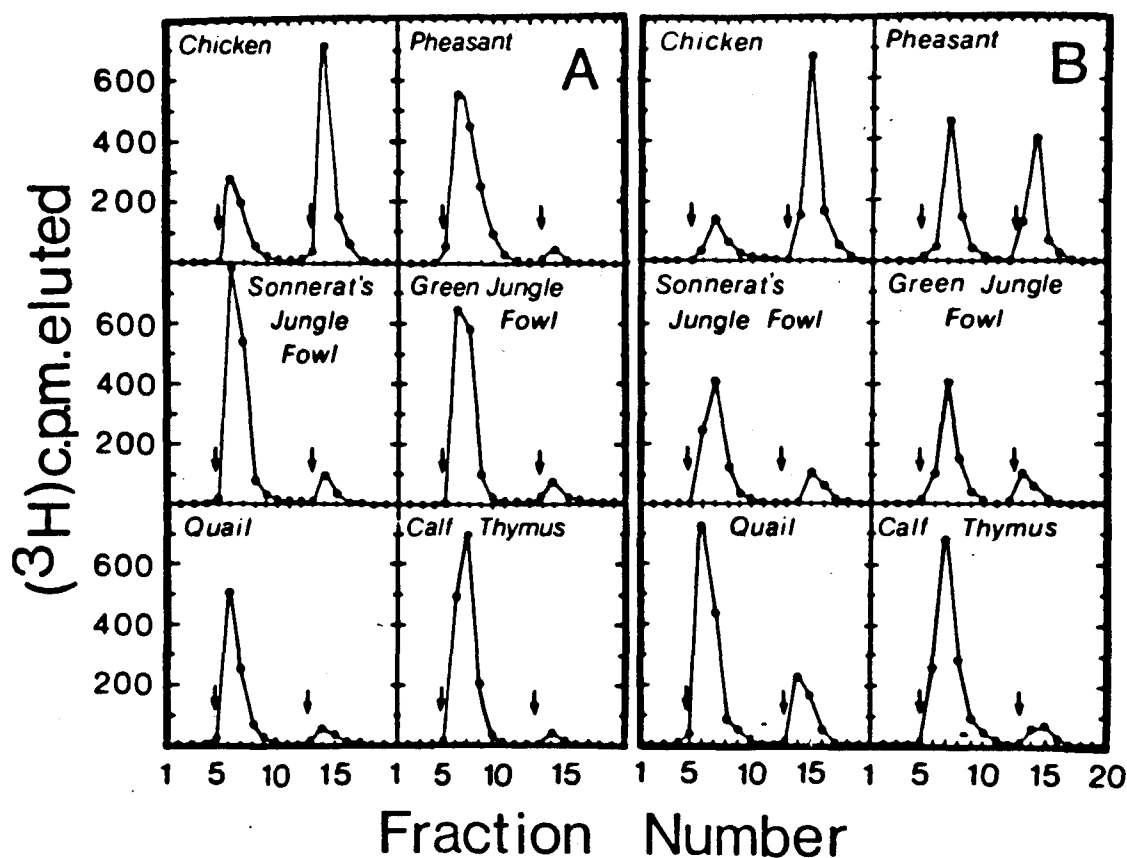


Figure 3. Hydroxyapatite Chromatography of Duplexes between RAV-0 cDNA and Various Normal Avian DNAs Formed under Varying Conditions of Stringency

Elution profiles from hydroxyapatite chromatography columns of <sup>3</sup>H-RAV-0 cDNA annealed to various normal avian DNAs under (A) "stringent" (0.6 M NaCl at 68°C) or (B) "relaxed" (1.5 M NaCl at 68°C) conditions. Further details are given in Experimental Procedures. The arrow at fraction 5 indicates a buffer change from 10 mM to 0.14 M sodium phosphate (pH 6.8), and the arrow at fraction 13 indicates a change from 0.14 M to 0.40 M sodium phosphate (pH 6.8).

found within both Sonnerat's and Green Junglefowl DNAs, together with the low levels found in the DNA of the Ring-necked Pheasant (*Phasianus colchicus*), a species which had previously been found to be positive for RAV-0-related sequences (Neiman, 1973; Kang and Temin, 1974; Tereba et al., 1975), we examined these avian DNAs for RAV-0-related sequences under less stringent conditions of hybridization. Such conditions allow the detection of mismatched hybrids (Rice and Paul, 1971). The <sup>3</sup>H-RAV-0 cDNA was annealed to the avian DNAs as described in Experimental Procedures, in the presence of either 0.6 M NaCl (stringent conditions) or 1.5 M NaCl (relaxed conditions), and the extent of annealing was estimated by hydroxyapatite (HAP) chromatography at 60°C as shown in Figure 3. A summary of these results is presented in Table 1, giving uncorrected values for the percentage of the <sup>3</sup>H-RAV-0 cDNA probe in duplexes at the two conditions of stringency examined together with the values obtained by S1 nuclease assay of hybrids formed in 0.6 M NaCl (see Figure 1) for comparison. It is evident that analysis of

the duplexes formed in 0.6 M salt by HAP chromatography gave results essentially analogous to those obtained when such duplexes were analyzed by S1 nuclease, that is, extensive RAV-0 homology was detected solely in the DNA prepared from domestic chicken (Red Junglefowl DNA was not examined in these experiments). When these DNAs were hybridized to the RAV-0 cDNA in 1.5 M NaCl and assayed on HAP, however, a marked increase in the level of cDNA annealing to Ring-necked Pheasant DNA was observed compared to lower increases in the degree of annealing to the other avian DNAs. These results indicate that Ring-necked Pheasant DNA contains extensive regions of partial homology to RAV-0, whereas the levels of RAV-0 homology within Sonnerat's and Green Junglefowl DNAs are comparable to that found for Japanese Quail DNA. Also included in Table 1 are the T<sub>m</sub> values for the duplexes formed between the <sup>3</sup>H-unique sequence chicken DNA and the various avian DNAs. These values give an indication of the degree of relatedness of the cellular sequences within these DNAs.

Table 1. Hybridization of <sup>3</sup>H-RAV-O cDNA to Normal Avian DNAs under Varying Conditions of Stringency

| Source of DNA                     | Extent of Hybridization (%) of <sup>3</sup> H-RAV-O as Assayed by: |  |                                     |    | T <sub>m</sub> with <sup>3</sup> H-Unique Sequence Chicken DNA (°C) <sup>c</sup> | Approximate Phylogenetic Distance from Domestic Chicken (Years × 10 <sup>-3</sup> ) <sup>d</sup> |
|-----------------------------------|--|--|-------------------------------------|----|--|--|
|                                   | S <sub>1</sub> Nuclease Digestion <sup>a</sup>                     | Hydroxyapatite Chromatography <sup>b</sup> |                                     |    |  |  |
|                                   |  | Stringent Conditions of Hybridization      | Relaxed Conditions of Hybridization |    |  |  |
| Domestic chicken (Spafas)         | 54   | 62   | 81                                  | 89 | 0  |  |
| Red Junglefowl                    | 68   | NT <sup>e</sup>                            | NT                                  | 89 | 0  |  |
| Sonnerat's Junglefowl             | 7  | 9  | 21                                  | 89 | 0  |  |
| Green Junglefowl                  | 8  | 8  | 20                                  | 89 | 5  |  |
| Ring-necked Pheasant <sup>f</sup> | 2  | 4  | 48                                  | 85 | 30   |  |
| Japanese Quail                    | 3  | 2  | 24                                  | 81 | 30   |  |
| Calf thymus                       | NT   | 5  | 10                                  | —  | —  |  |

<sup>a</sup> Values refer to the uncorrected percentage of the total cpm of the <sup>3</sup>H-RAV-O cDNA remaining acid-precipitable after S<sub>1</sub> nuclease digestion (see legend to Figure 1 and text).

<sup>b</sup> Values refer to the uncorrected percentage of the total cpm of the <sup>3</sup>H-RAV-O cDNA eluting as double-stranded DNA from a hydroxyapatite column (see Experimental Procedures). Stringent conditions involved hybridization at 68°C in 0.6 M NaCl; relaxed conditions hybridization at 68°C in 1.5 M NaCl at 68°C (for further details see Experimental Procedures).

<sup>c</sup> T<sub>m</sub> values are taken from Figure 2 and the unpublished data of the authors (for further details see legend to Figure 2 and text).

<sup>d</sup> As estimated by Prager et al. (1974) on the basis of the immunological relatedness of transferrin and albumin.

<sup>e</sup> The data presented were obtained with DNA prepared from a single bird. Other experiments performed with DNA pooled from five embryos, however, also gave comparably low values of homology to the RAV-O cDNA when hybridized in the presence of 0.6 M NaCl. The highest level of homology to RAV-O sequences in an individual embryo DNA under these conditions of hybridization detected by S<sub>1</sub> nuclease assay was 11% (uncorrected).

<sup>f</sup> NT = not tested.

### Restriction Enzyme Analysis of RAV-O-Related Sequences Present within the DNAs of Junglefowl and Pheasant Species

To examine further the possibility of the presence of low levels of sequences homologous to RAV-O cDNA present within the DNAs of Sonnerat's and Green Junglefowl, these DNAs together with domestic chicken (Spafas strain) and Red Junglefowl DNA were subjected to restriction enzyme digestion and analysis using the DNA transfer and hybridization methods developed by Southern (1975). Since we found that DNA from Ring-necked Pheasant (a species phylogenetically quite distant from Junglefowl) contained significantly more RAV-O-related information than the exotic species of Junglefowl, DNAs from this and other Pheasant genera were also examined using this technique. High molecular weight DNAs were digested with Eco RI endonuclease and the fragments were separated by agarose gel electrophoresis prior to transfer to nitrocellulose filters and annealing to a <sup>32</sup>P-t<sub>1</sub>dPrC cDNA (t<sub>1</sub>dPrC is 85% homologous to RAV-O RNA; Neiman et al., 1977). The pattern of RAV-O-related Eco RI digestion products was detected subsequently by autoradiography. All DNAs were routinely checked for DNAase contamination, completeness of restriction enzyme digestion and satisfactory transfer of restriction fragments to the cellulose nitrate filter prior to hybridization, as detailed in Experimental Procedures.

Figure 4 is an autoradiograph of such an analysis.

Cleavage of Spafas chicken DNA with Eco RI (lane 1) revealed three RAV-O-related DNA fragments of approximate molecular weights 13.0 × 10<sup>6</sup>, 6.0 × 10<sup>6</sup> and 2.6 × 10<sup>6</sup>, in agreement with the pattern obtained for the same chicken embryo examined by J. Arrand, C. Glover and E. Humphries (personal communication). The 2.6 × 10<sup>6</sup> molecular weight fragment has been shown to represent an internal DNA fragment of the endogenous RAV-O provirus (S. Hughes et al., personal communication; J. Arrand, C. Glover and E. Humphries, personal communication). Eco RI digestion fragments of Sonnerat's Junglefowl DNA (lane 2), Green Junglefowl DNA (lane 4) and Silver Pheasant (*Lophura nycthemera*) DNA (lane 8) failed to demonstrate significant annealing to the <sup>32</sup>P-t<sub>1</sub>dPrC cDNA. Additional experiments with DNAs from Golden Pheasant (*Chrysolophus pictus*) and Japanese Quail (*Coturnix coturnix*) similarly showed no specific annealing of the same probe (data not shown). In marked contrast, all three embryos from the Phasianus genus (two embryos of the Japanese Green Pheasant, *P. versicolor*, and one embryo of the Ring-necked Pheasant, *P. colchicus*) revealed multiple fragments of DNA hybridizing to the viral probe (lanes 5, 6 and 7). Although some restriction fragments were found in common among these Phasianus species, several differences were noted. Furthermore, it is of interest to note that although identical amounts of cellular DNA were present in the three lanes (5, 6 and 7) of Pheasant DNA, the hybridization of RAV-O cDNA to Ring-

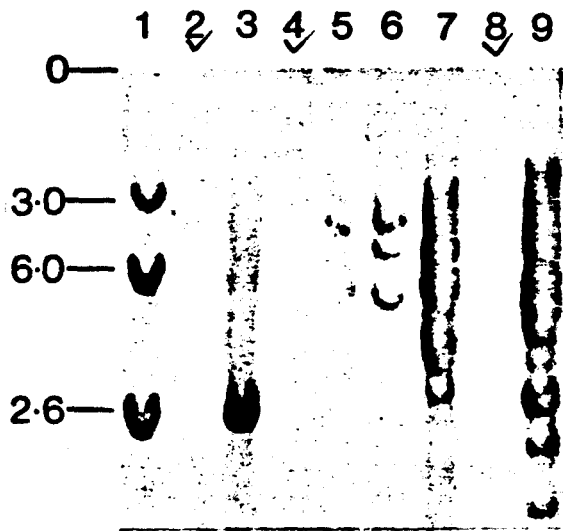


Figure 4. RAV-0-Related Specific Eco RI Fragments in DNA Samples from Various Avian Species

DNA was extracted from fibroblast cultures of individual avian embryos or from peripheral blood erythrocytes, and equivalent amounts of DNA were digested by Eco RI endonuclease (see Experimental Procedures). The fractionation of DNA fragments by agarose gel electrophoresis and transfer to nitrocellulose filters were as described by Southern (1975). The filters were annealed to  $^{32}\text{P}$ -labeled cDNA and the RAV-0-related DNA fragments were located by autoradiography as described in Experimental Procedures. Marker DNA from phage  $\lambda$  was included in each digestion to determine molecular weights, which are shown  $\times 10^{-6}$ . The samples were: (lane 1) Spafas chicken DNA (tissue culture fibroblasts, embryo 100); (lane 2) Sonnerat's Junglefowl DNA (tissue culture fibroblasts, embryo 6); (lane 3) Sonnerat's Junglefowl DNA (tissue culture fibroblasts, embryo 6) infected with RAV-0 (see Experimental Procedures); (lane 4) Green Junglefowl DNA (prepared from erythrocyte nuclei of an adult bird); (lane 5) Japanese Green Pheasant DNA (tissue culture fibroblasts, embryo 2); (lane 6) Japanese Green Pheasant DNA (tissue culture fibroblasts, embryo 6); (lane 7) Ring-necked Pheasant DNA (from tissue culture fibroblasts, embryo 2); (lane 8) Silver Pheasant DNA (prepared from erythrocyte nuclei of an adult bird); (lane 9) XC cell DNA. (XC cells contain multiple copies of the Pr-RSV-C genome, and the  $2.6 \times 10^6$  dalton Eco RI band representing the internal fragment of the RAV-0 provirus is clearly visible.)

necked Pheasant DNA on this and other filters appeared stronger than that to Japanese Green Pheasant DNA. Studies with another restriction endonuclease, Bam HI, confirmed the interpretation of the results given above for the Eco RI enzyme (data not shown).

We have recently had the opportunity to examine the DNA of the Ceylonese Junglefowl (*G. Lafayettei*) for RAV-0-related sequences, thus completing our survey of the extant species of the genus *Gallus*. Figure 5 shows the restriction pattern of Red and Ceylonese Junglefowl in addition to further Sonnerat's Junglefowl. Red Junglefowl DNA (lane 3) gave an Eco RI restriction pattern quite distinct from that observed for Spafas chicken DNA (lane 2), with the notable exception of a  $2.6 \times 10^6$  dalton fragment. Neither the DNAs of four Ceylonese Junglefowl (lanes 4-7) nor the DNAs of four further specimens of Sonnerat's

Junglefowl (lanes 8-11) yielded Eco RI fragments that hybridized to RAV-0 cDNA. Faint bands, however, of  $4.6-4.9 \times 10^6$  daltons were observed in the DNA digests of both Ceylonese and Sonnerat's Junglefowl. It was suspected that these bands represented restriction fragments of ribosomal genes, hybridizing a low amount of 28S ribosomal cDNA and possibly contaminating the RAV-0 cDNA probe. That this was indeed the case was indicated by melting off the RAV-0 cDNA from the filter and reincubating the filter with a cDNA probe prepared from 28S and 18S RNA of NIH/3T3 cells. Upon subsequent autoradiography, two faint series of bands ( $0.9 \times 10^6$  and  $14 \times 10^6$ ) were visible in all lanes as well as one intense band (at  $4.9 \times 10^6$  for *G. gallus* and *G. lafayettei*, and at  $4.6 \times 10^6$  for *G. sonnerati*). These intense bands were precisely superimposable over the faint bands detected on the same filter by the RAV-0 probe.

Eco RI endonuclease digestion of DNA from Sonnerat's Junglefowl cells that had been infected experimentally with RAV-0 (lane 3 of Figure 4, lane 13 of Figure 5) gave a single restriction fragment of molecular weight  $2.6 \times 10^6$ , corresponding to the internal Eco RI fragment of RAV-0 DNA (see above). This result shows that Sonnerat's Junglefowl cells are readily susceptible to infection by RAV-0. The diffuse hybridization visualized solely in these two lanes suggests that RAV-0 sequences are integrated within high molecular weight DNA at a sufficiently large number of sites to exclude the visualization of distinct restriction fragments containing viral DNA linked to cellular DNA.

## Discussion

Several conclusions may be drawn from our data regarding the presence and distribution among Junglefowl and Pheasant species of DNA sequences related to the genome of the endogenous chicken retrovirus, RAV-0. Extensive homology to RAV-0 cDNA was found within Red Junglefowl DNA, thus providing additional data supporting previous biological evidence (Weiss et al., 1971; Weiss and Biggs, 1972) that Red Junglefowl carry a genetically transmitted virus closely related to RAV-0. Reassociation kinetics studies suggested that 1-2 copies of the RAV-0 genome are present per haploid genome of the domestic chicken, in agreement with Neiman (1973) and Grouine et al. (1978), whereas Red Junglefowl DNA appeared to contain 3-4 copies of RAV-0 per haploid genome. At the level of stringency (0.6 M NaCl) used in our initial studies, little if any homology to RAV-0 cDNA was found within the DNA of Sonnerat's Junglefowl, Green Junglefowl, Ring-necked Pheasant and Japanese Quail DNAs (see Table 1). Under more relaxed conditions (1.5 M NaCl, hydroxyapatite chromatography) which permit the detection of up to 15% mismatched duplexes (Rice and Paul, 1971; Stehelin

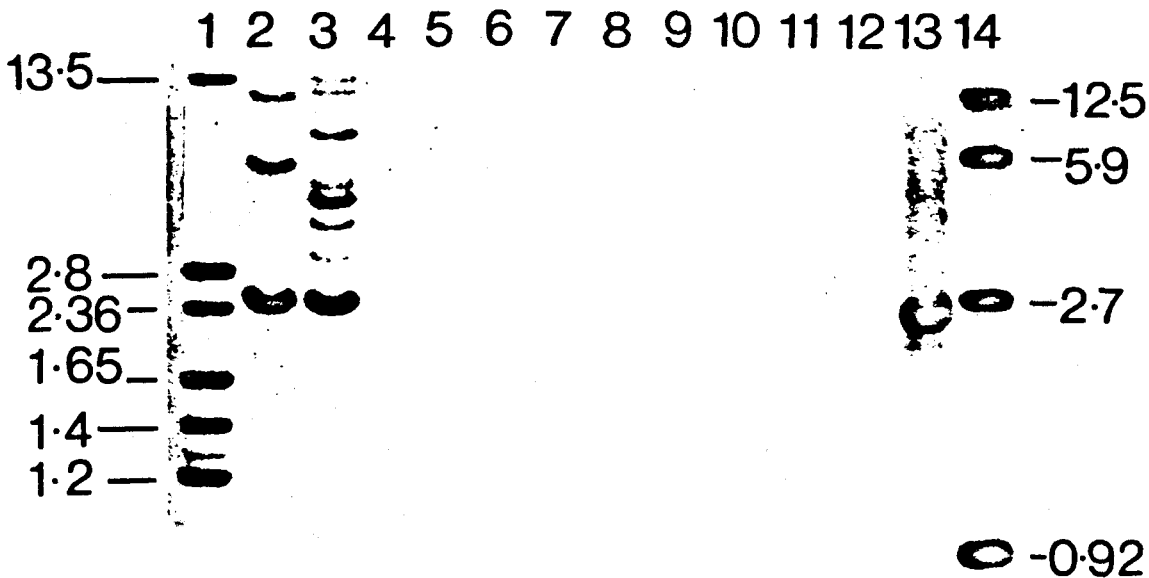


Figure 5. RAV-0-Related Specific Eco RI Fragments in DNA Samples from Further Gallus Species

DNA was extracted from fibroblast cultures of individual embryos or from peripheral blood erythrocytes as indicated, and digested by Eco RI endonuclease; the digests were fractionated by agarose gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose filters as described in Experimental Procedures. The filters were then annealed to a <sup>32</sup>P-RAV-0 cDNA and the RAV-0-related fragments were located by autoradiography. <sup>32</sup>P-labeled Xba and Eco RI digests of Adenovirus 2 (Ad2) DNA were included as molecular weight markers. The samples were: (lane 1) <sup>32</sup>P-labeled Eco RI digest of Ad2 DNA; (lane 2) Spafas chicken DNA (tissue culture fibroblasts, embryo 100); (lane 3) Red Junglefowl DNA (tissue culture fibroblasts); (lanes 4-7) Ceylonese Junglefowl DNA (prepared from erythrocyte nuclei from four individual birds); (lanes 8-11) Sonnerat's Junglefowl DNA (prepared from erythrocyte nuclei from four individual birds); (lane 12) Sonnerat's Junglefowl DNA (tissue culture fibroblasts, embryo 6); (lane 13) Sonnerat's Junglefowl DNA (tissue culture fibroblasts, embryo 6) infected with RAV-0 (see Experimental Procedures); (lane 14) <sup>32</sup>P-labeled Xba digestion fragments of Ad2 DNA.

et al., 1976), however, a marked increase in annealing of Ring-necked Pheasant DNA to RAV-0 cDNA became evident, while the degree of RAV-0 homology within the DNAs of Sonnerat's and Green Junglefowl was still comparable to that found for Japanese Quail DNA. Furthermore, analysis of restriction endonuclease fragments of these avian DNAs revealed multiple high molecular weight fragments containing sequences related to RAV-0 cDNA in Ring-necked and Japanese Green Pheasant (*Phasianus* species) DNAs, whereas no significant hybridization was found to restriction endonuclease fragments of Sonnerat's, Ceylonese and Green Junglefowl DNAs.

Our molecular hybridization data on the relatedness of various avian DNAs, obtained using chicken unique sequence DNA, are consistent with the classical systematics of the Phasianidae, demonstrating in particular that the cellular DNAs of all the *Gallus* species studied are closely related, there being only small differences in the extent of cross-annealing and less than 2.0°C change in thermal stability. These results indicate the recent divergence of the different *Gallus* species from a common ancestor.

It is thus apparent that three of the four closely related species of the genus *Gallus* appear to lack gene sequences related to the endogenous chicken retrovirus as detected by kinetic hybridization or restriction enzyme analyses, whereas sequences par-

tially related to RAV-0 were found within the DNA of the more distantly related *Phasianus* species. The DNAs of two other Pheasant genera (*Chrysolophus* and *Lophura*), closely related to *Phasianus* and more distantly to *Gallus* (unpublished results of the authors), also failed to reveal significant levels of RAV-0 homology when examined by liquid hybridization and by restriction endonucleases (Figure 4 and our unpublished observations). Thus RAV-0 sequences have been found only in *Gallus gallus*, representing the domestic fowl and Red Junglefowl, and related sequences showing less homology and a markedly different restriction enzyme pattern have been found only in the genus *Phasianus*. Little if any homology was observed in the DNA of one Quail genus studied (*Coturnix*), representing a Phasianid genus only distantly related to *Gallus* or *Phasianus*. While our data are consistent with those of previous reports (Kang and Temin, 1974; Shoyab and Baluda, 1975; Tereba et al., 1975), insofar as hybridization under different conditions is comparable, the new data for Junglefowl species and for further genera of Pheasants have revealed an unexpectedly discontinuous representation of RAV-0 sequences in the nuclear DNA of members of the family Phasianidae.

The specific occurrence of complete RAV-0 genomes in *Gallus gallus* but not in the other *Gallus* species strongly suggests that the germ line of *G.*



*Gallus* acquired the RAV-O genome by infection after separation from the other species, although the deletion of entire viral genomes from these other species cannot be ruled out. Our data, therefore, do not support previous suggestions that the extent of RAV-O homology within the DNA of a Galliform bird depends upon the phylogenetic distance of that species from the domestic chicken. The sporadic occurrence of RAV-O-related sequences in avian DNA suggests that the origin of RAV-O does not follow the evolution of endogenous retroviruses as postulated in either the virogene (Huebner and Todaro, 1969; Todaro and Huebner, 1972) or the protovirus (Temin 1971, 1974) hypotheses. The virogene concept infers the divergence of endogenous retrovirus genomes from an ancestral viral genome in the germ line of vertebrates in parallel with host gene divergence; the protovirus hypothesis postulates that endogenous viruses arise within each host species (or even individuals) from the rearrangement and evolution of cellular genes. Our results favor a different interpretation for the presence of RAV-O-related sequences in the DNA of some members of the Phasianidae. We propose that the occurrence of RAV-O genomes in *G. gallus* and of sequences partially related to RAV-O in *Phasianus colchicus* and *P. versicolor* represent independent infections of the germ lines of the two genera. The sequences partially related to RAV-O in *Phasianus* DNA probably represent the endogenous Ring-necked Pheasant virus, which is related to RAV-O (Hanafusa and Hanafusa 1973; Fujita et al., 1974), although their *env* genes are quite distinct (Hu, Lai and Vogt, 1978; Fujita et al., 1978). At the present time we do not know which host harbored RAV-O-related viruses before their introduction into *Phasianus* species and *Gallus gallus*, but we can conclude that the viral genomes have been acquired recently (in evolutionary terms) from an external source.

The inheritance of exogenously acquired viral genomes has been exemplified previously by Benveniste and Todaro (1974, 1975) in their studies of the endogenous cat virus, RD-114. The genome of RD-114 is present in the germ line of some but not all species of *Felis*, and it is genetically related to the endogenous virus of baboons. The virus-host relationship of RAV-O and *G. gallus*, however, is not entirely analogous to that of RD-114 and *Felis*. First, RAV-O is not represented as reiterated viral genomes at a single locus, as RD-114 appears to be (Benveniste and Todaro, 1975); second, sequences related to RAV-O RNA are present in only one of the four extant species of *Gallus*, whereas RD-114 is present in all Euro-Mediterranean *Felis* species; and third, RAV-O is closely related to the infectious transmitted chicken leukosis viruses, thus allowing continuing interactions between endogenous and exogenous genetic elements.

Indeed, endogenous and exogenous retrovirus genomes undergo frequent genetic recombination

(Weiss, Mason and Vogt, 1973; Hayward and Hanafusa, 1975). Laboratory recombinants between chicken and pheasant viruses have also been described (Shoyab and Baluda, 1975; Temin and Kassner, 1976; Hanafusa et al., 1976; Keshet and Temin, 1977; Hu et al., 1978). It is possible that cross-infection and recombination may take place naturally where the appropriate host species are in contact. While this is likely to be a rare occurrence in feral populations, we have preliminary evidence that cross-species infection can occur between domestic chickens and distantly related species living in close proximity in a semi-domesticated situation (our unpublished observations).

Among domestic chickens, the exogenous leukosis viruses are frequently transmitted through congenital infection of eggs, resulting in chronically viremic birds (Burmester, Gentry and Waters, 1955; Rubin, Cornelius and Fanshier, 1961). There has thus been ample opportunity for new insertions of these viruses into the chicken germ line or insertions of recombinants derived from exogenous and endogenous sequences. But investigations have so far failed to reveal genes for helper factors or inducible viral genomes possessing the *env* specificity of exogenous virus strains in the germ line of any chickens or Red Junglefowl (Weiss and Biggs, 1972). Recent evidence, however, shows that there is considerable heterogeneity in organization location of RAV-O-related sequences in different breeds of the domestic chicken (Astrin, 1978; J. Arrand, C. Glover and E. Humphries, personal communication; S. Hughes et al., personal communication); similar heterogeneity is apparent for RAV-O-related genetic elements within the germ line of Red Junglefowl (our unpublished observations). Heterogeneity has also been found in inbred and wild mice (*Mus musculus*) for murine leukemia virus genomes (Chattopadhyay et al., 1975; Steffen and Weinberg, 1978) and murine mammary tumor virus genomes (Cohen and Varmus, 1979).

We envisage that RAV-O first infected *Gallus gallus* after speciation but before domestication, and that this virus was the progenitor of exogenous chicken leukosis viruses as well as the endogenous genetic elements transmitted through the germ line. The Red Junglefowl DNA studied here contained more copies of RAV-O-related sequences than did Spafas White Leghorn Chicken DNA, and showed a more complex Eco RI restriction pattern, suggesting that RAV-O sequences are integrated at several chromosomal sites in Red Junglefowl DNA. Further studies of the organization of RAV-O-related sequences in the DNA of Red Junglefowl from different locations are in progress, together with studies directed toward determining the relationship between the endogenous viral sequences of the *Gallus* and *Phasianus* genera.

The results of our studies of the four Junglefowl species do not exclude the possibility that *G. sonner-*

ati, *G. varius* and *G. lafayettei* carry endogenous C-type viral genomes unrelated to RAV-0, as has been demonstrated, for example, in the genus *Chrysolophus*, which includes the Golden and Lady Amherst Pheasants (Fujita et al., 1974; Hanafusa et al., 1976; Chen and Vogt, 1977). Whether endogenous viruses have any functional role in the life of their hosts remains speculative, although it is noteworthy that RAV-0 *gag* and *env* genes are expressed in feral Red Junglefowl that have not been subject to artificial selection (Weiss and Biggs, 1972).

Finally, we note that Sonnerat's Junglefowl cells should prove useful in the experimental genetics and biology of chicken leukosis viruses, being susceptible to infection by all envelope subgroups (H. Murphy and R. Weiss, unpublished observations) and lacking any related endogenous virus. Furthermore, because Sonnerat's Junglefowl form fertile hybrids with domestic chickens (Darwin, 1868; Hutt, 1949), cross-breeding experiments can be used to analyze the genetic segregation and expression of endogenous viral genes.

#### Experimental Procedures

##### Cell Culture

Primary fibroblast cultures of all avian embryos examined were established by trypsinization according to standard procedures. Cells were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% tryptose phosphate broth, 1% fetal calf serum and 1% chicken serum.

##### Eggs and Embryos

Fertile eggs were obtained from the following suppliers: chicken, C/E Brown Leghorn (Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France); Sonnerat's and Red Junglefowl (K. Howman, Shepperton, UK); Japanese Green and Ring-necked Pheasants (D.C. Watson, Dreis, North Berwick, UK); Japanese Quail (Houghton Poultry Research Station, Huntingdon, UK); Ring-necked Pheasant (Stagstone Bird Gardens, Bedford, UK). Eggs were incubated under standard conditions for chicken eggs and embryos were processed for primary fibroblast cultures or DNA extraction after 9–11 days of incubation.

##### Virus and Infection

Fibroblast cultures of Sonnerat's Junglefowl were infected with filtered, undiluted supernatant medium of chicken C/O Line 100 cells producing RAV-0. DNA was extracted 12 days later after the detection of high levels of reverse transcriptase in the medium. Transformation-defective Prague-strain Rous sarcoma virus (tdPrC) was propagated in Brown Leghorn cells.

##### Helper Factor Assay

The expression of envelope glycoprotein such as chick helper factor (chf) was assayed by co-cultivation of the cells under test with 16Q cells releasing *env*-defective RSV(-), as described by Murphy (1977).

##### Preparation of Nuclei and Extraction of DNA from Avian Erythrocytes

With the permission of K. Howman, 5–10 ml samples of blood were obtained from the following birds in his pheasantry: Bantam chicken (*Gallus gallus*), Red Junglefowl (*G. gallus*, one bird), Sonnerat's (Grey) Junglefowl (*G. sonnerati*, four birds) Green Junglefowl (*G. Varius*, two birds) and Silver Pheasant (*Lophura nychthemera*, one bird). Samples of blood from Ceylonese Junglefowl (*G. lafayettei*, four birds) were obtained with the permission of P. Brown on behalf of the World Pheasant Association. Blood samples were drawn into a heparinized syringe and transported to the laboratory on ice.

The heparinized blood was centrifuged at 500 × g for 5 min at room temperature, and the erythrocytes were gently resuspended in PBS-A. The erythrocytes were then washed several times (600 × g, 10 min) in 3–4 vol of PBS-A, 20 mM EDTA before a final centrifugation at 100 × g for 10 min and resuspension in 10 ml TNE [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 20 mM EDTA]. After cell lysis in ice-cold 1% (v/v) Nonidet P-40, the nuclei were washed 4–5 times in 10 ml TNE (1500 × g, 10 min) until colorless. The nuclear pellet was then resuspended in 40–100 ml TNE, and fresh proteinase K (B.D.H. Poole, Dorset) was added to a final concentration of 200 µg/ml before lysis of the nuclei in a final concentration of 1% (v/v) sodium dodecylsulphate (SDS). The lysed nuclei were then incubated overnight at 37°C or until the solution was clear. In some cases further dilution and proteinase K digestion were necessary before the protein was satisfactorily digested. The DNAs were then extracted in TNE-saturated phenol, 0.05% 8-hydroxyquinoline (in a final vol of up to 200 ml aqueous phase) until the interface was clear, and extracted once with PCI (TNE-saturated phenol:chloroform:isoamyl alcohol: 50:50:1) and once with chloroform:isoamyl alcohol (CI) alone prior to the addition of one tenth vol 2 M sodium acetate and precipitation with 3 vol of 98% ethanol. The precipitated DNAs were spooled out on a 1 ml pipette, washed twice in 99.8% ethanol and air-dried. The spooled DNAs were dissolved overnight at a concentration of 1–2 mg/ml in TE buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA].

##### Preparation of Cellular DNA from Avian Embryos and Tissue-Culture Cells

Embryos of known helper factor status were homogenized (in 10–20 ml of TNE per embryo) at 0°C for 30–60 sec at setting no. 7 with an Ultra-Turrax homogenizer (Scientific Instruments Ltd., London). The homogenate was then made 1% (v/v) SDS and proteinase K was added to 200 µg/ml. Tissue culture cells (~2 × 10<sup>7</sup> cells per 90 mm dish; up to 100 dishes) were harvested with the aid of a rubber policeman into a solution of 200 µg/ml proteinase K, 1% (v/v) SDS in TNE buffer. After proteinase K digestion the lysates were phenol-extracted and processed as described above for erythrocyte nuclear DNA.

##### Preparation of High Molecular Weight DNA for Endonuclease Restriction

High molecular weight DNAs from both erythrocyte nuclei and tissue culture cells were prepared in a manner analogous to that just described, except that care was taken not to shear the DNA at any stage. DNAs prepared in this fashion were of molecular weight >20 × 10<sup>6</sup> as assessed by electrophoresis in 1% agarose gels (see below). DNAs were checked for purity and DNA concentrations determined as described below for sonicated DNAs.

##### Analysis of High Molecular Weight DNA Preparations

All macromolecular DNA preparations were routinely examined for nuclease contamination and to ensure that the samples were of sufficiently high molecular weight for restriction enzyme analysis. DNA samples [5 µg in a total of 20 µl of 40 mM Tris-HCl (pH 8.15), 2 mM EDTA, 20 mM sodium acetate and 20 mM NaCl (TEA), containing 12% Ficoll and 0.02% bromophenol blue] were incubated for 5 hr in 0.1 M MgCl<sub>2</sub> at 37°C and then electrophoresed through 1% agarose (Seakem) horizontal slab gels in TEA containing 1 µg/ml ethidium bromide (4–5 hr at 2–3 V/cm). Such gels were also used to estimate the size of the sonicated cellular DNAs and the cDNA (see below). When used for the analysis of restriction fragments these gels were electrophoresed initially at 5 V/cm for 15–20 min until the sample had entered the gel, and subsequently at 2–3 V/cm for 12–16 hr. The DNA bands were visualized with the aid of a Camag Reprostar ultraviolet light source and photographed using a Polaroid Land Camera with positive/negative film type 665 (Polaroid Corporation, Massachusetts, USA). A standard exposure of 40 sec at f.8 (with ultraviolet filter-type 264) was used in each case. Samples that showed evidence of DNase contamination were subjected to further deproteinization extractions until free of this activity.

#### Sonication and Alkaline Denaturation of DNAs

Spoiled DNA preparations were incubated at 50°C momentarily to ensure the dissolution of the DNA, and then checked for protein and phenol contamination by scanning in the ultraviolet spectrum from 190–360 nm (Perkin Elmer spectrophotometer). Reextraction with PCI or CI was performed if necessary. The DNAs were sonicated at position no. 7 (70W Branson Sonifier) for 10 min at 4°C, and incubated overnight in 0.3 N NaOH at 37°C. After the addition of one tenth vol 2 M Tris-HCl (pH 7.5), 2 M sodium acetate containing a trace of phenol red indicator, the alkali-treated DNAs were adjusted to neutral pH by the addition of 3 N HCl and precipitated with 2 vol of 99.8% ethanol, 0.2 M sodium acetate, at -20°C. The DNAs were dissolved in TE buffer prior to ultraviolet spectral analysis. The  $A_{260}/A_{280}$  ratio was >1.95 for all DNAs tested. Quantitation of DNA samples was by the mithramycin method as described by Hill and Whatley (1975), and the final concentration was adjusted to ~10 mg/ml. DNAs prepared in this way were approximately 500 nucleotides in length as estimated by electrophoresis in a 1.0% alkaline agarose gel (see above) using Hpa II restriction fragments of polyoma DNA as size markers (data not shown).

#### Growth and Purification of Virus RNAs

Early passage line 100 (C/O) cells were seeded in Corning plastic rollers in the presence of 2.5  $\mu$ Ci/ml  $^3$ H-uridine and grown to confluence. Medium was harvested every 4–6 hr from fully confluent monolayers. Virus-containing medium was stored at 0–4°C and virus was processed through to an RNA precipitate on a daily basis. Virus was extracted by clarification at 12,000  $\times$  g for 10 min followed by sedimentation (39,000  $\times$  g for 30 min at 4°C); the pellets were resuspended in STE [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA]; and proteinase K was added to a final concentration of 200  $\mu$ g/ml prior to incubation for 10 min at room temperature. After lysis in 0.5% (v/v) SDS and further incubation for 20 min, the RNA was extracted with STE-saturated phenol followed by PCI and CI extractions. RNA was precipitated by the addition of one tenth vol of 2 M sodium acetate plus 2 vol 99.8% ethanol at -20°C, collected by centrifugation (12,000  $\times$  g, 10 min) and finally dissolved in STE prior to preparative sucrose gradient centrifugation. RAV-0 70S RNA was collected by ethanol precipitation from a 5 ml 10–25% sucrose gradient (in STE plus 1% SDS) centrifuged for 1 hr at 300,000  $\times$  g (+22°C), heat-denatured (45 sec, 85°C) and re-run as 35S subunit RNA on a similar gradient centrifuged at 300,000  $\times$  g for 2 hr. The 35S peak fractions of RAV-0 subunit RNA from such gradients were pooled after location by counting aliquots for  $^3$ H-radioactivity, reprecipitated with 99.8% ethanol, 0.2 M sodium acetate and stored at -20°C. Subsequent ultraviolet spectral analysis (see above) was used to determine the purity and estimate the yield of RAV-0 35S RNA; average yields were ~10  $\mu$ g of 35S RNA per liter of medium. 70S RNA of tdPrC was prepared in a similar manner.

#### Preparation of $^3$ H-Unique Sequence Chicken DNA

Subconfluent chicken embryo fibroblast cultures were labeled in medium 199 supplemented with 8% (v/v) calf serum and 1% chick serum in the presence of 5  $\mu$ Ci/ml of methyl- $^3$ H-thymidine (spec. act. 24 Ci/mole) for a total of 3–5 days at 37°C. Cells were harvested and lysed, and DNA was prepared, sonicated and alkaline-treated as described. The DNA was then annealed in glass capillaries (Brand) at 68°C in TE buffer containing 0.6 M NaCl until a Cot value was reached sufficient for all of the repetitive sequences to have reannealed (100 mole-sec/l). Hydroxyapatite chromatography was then used as previously described (Stehelin et al., 1976) to separate the unique sequence-specific single-stranded DNA from the double-stranded repetitive DNA. The DNA was then prepared for liquid hybridization experiments as described above for cellular DNAs.

#### Preparation of Virus-Specific Complementary DNAs

Representative radioactive complementary DNAs (cDNAs) were synthesized on a 35S (RAV-0) or 70S (tdPrC) RNA template with fragmented calf thymus DNA primer (Taylor, Illmensee and Summers, 1976) using the exogenous AMV polymerase reaction essentially as

described by Shank et al. (1978). Such a reaction gave probes of specific activity  $4 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ g for  $^3$ H-cDNAs and  $1 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g for  $^{32}$ P-cDNAs. The yield was between 0.5 and 1.0  $\mu$ g cDNA per  $\mu$ g of virus RNA. The  $^{32}$ P-tdPrC,  $^{32}$ P-RAV-0 and  $^3$ H-RAV-0 35S-specific cDNAs thus obtained were further purified by PCI and CI extraction, treated with alkaline and centrifuged on 5–20% (w/v) sucrose gradients (in 0.3 N NaOH, 0.6 M NaCl, 10 mM EDTA) for 24 hr at 110,000  $\times$  g at 24°C. The cDNAs ranged in size from 4–10S with a peak at 5S (data not shown). A size pool of 6–8S (equivalent to 500–600 nucleotides) was utilized throughout the studies described. Thus both components used in the kinetic hybridization studies were of a similar size.

#### Characterization of the RAV-0 and tdPrC cDNA Probes

Standard Cot analysis of both probes hybridized to 35S RAV-0 or tdPrC RNAs, respectively, demonstrated over 85% cross-hybridization between these RNAs in confirmation of previous studies of Neiman et al. (1977). The tdPrC cDNA was therefore used for hybridization to the restriction enzyme fragments in addition to the  $^{32}$ P-labeled RAV-0 probe. Both the  $^3$ H-RAV-0 and  $^{32}$ P-tdPrC cDNAs hybridized 80% to RAV-0 35S RNA with Cot<sub>1,2</sub> values of  $2 \times 10^{-2}$  mole-sec/l (data not shown). Self-annealing background values of 1% for the  $^{32}$ P-tdPrC cDNA and 4% for the  $^3$ H-RAV-0 cDNA were subtracted from the experimental values.

#### Molecular Hybridization and Reassociation

All DNA samples were fully denatured by boiling for 5 min prior to annealing experiments. All reactions (unless otherwise specified) were performed in 0.6 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.01 M EDTA in glass capillaries (Brand) at 68°C. The extent of annealing was analyzed by S1 nuclease digestion (Leong et al., 1972). S1 nuclease was prepared according to the method of Sutton (1971). Cot curves were performed at a final cellular DNA concentration of 10 mg/ml.

#### Determination of Thermal Denaturation

The different avian DNAs examined were annealed in the presence of the  $^3$ H-unique sequence chicken DNA (alkaline-treated and sonicated, 6–8S, 2000 cpm per point) to Cots of  $2 \times 10^4$  mole-sec/l at 68°C at a final cellular DNA concentration of 10 mg/ml. After annealing for the requisite time, samples were diluted to a final concentration of 0.3 M NaCl; 20,000 cpm of  $^{32}$ P-tdPrC cDNA were annealed to XC cell DNA added as an internal control; and the sample was divided into ten aliquots, each in a 100  $\mu$ l sealed capillary (Brand). The capillaries were incubated in a water bath equilibrated to the required temperature (using a Braun thermomix) for exactly 10 min, and the percentage of probe DNA remaining annealed to the particular cellular DNA at each defined temperature was determined by S1 nuclease digestion (Leong et al., 1972). After subtraction of 3% self-annealing of the  $^3$ H-unique sequence chicken DNA, 70% of the probe remained annealed to chicken DNA at 76°C. This value was normalized to 100%, and the factor required for this normalization was used to correct the degree of annealing present at 76°C for the other DNAs examined. The internal control, a duplex of  $^{32}$ P-tdPrC cDNA annealed to XC cell DNA, was normalized to a value of 55% still annealed at 76°C (under these conditions of DNA excess and stringency of hybridization) to facilitate data presentation. The  $T_m$  values of this internal control were within  $\pm 0.5^\circ$ C.

#### Hydroxyapatite Chromatography

Analysis of the degree of annealing of both the  $^{32}$ P-tdPrC and  $^3$ H-RAV-0 cDNAs to various avian DNAs (annealed to Cot values of  $2 \times 10^4$  mole-sec/l) at both 0.6 M NaCl and 1.5 M NaCl concentrations was performed by hydroxyapatite column chromatography (Biogel HTP, BioRad Labs) at 60°C. Samples were loaded in 10 mM sodium phosphate (pH 6.8) (with 1 M NaCl in the case of reassociations performed in 1.5 M NaCl). Single-stranded DNA was eluted with 0.14 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) (plus 1 M NaCl as above, for reassociations performed in 1.5 M NaCl) and double-stranded DNA with 0.40 M sodium phosphate (pH 6.8). 4 ml fractions were collected

In each case. Each fraction was precipitated by the addition of 0.2 ml of calf thymus DNA (400 µg/ml) plus 8 ml 4x perchloric acid at 4°C. Precipitates were collected on glass-fiber filters (GF/C Whatman), washed extensively with 10% HCl, dried for 10 min at 60°C and counted for 20 min in scintillation fluid in an Intertechnique SL4000 scintillation counter.

#### Restriction Endonuclease Digestion, Transfer of DNA Fragments, Hybridization and Autoradiography

Eco RI (Boehringer) digestions were performed in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.01 M MgCl<sub>2</sub>, 0.05 M NaCl for 6 hr at 37°C. Each reaction mixture contained 100 units of Eco RI per 10 µg of cellular DNA together with 5 µg of phage λ DNA in a final volume of 50 µl. The reaction was terminated by the addition of 10 µl of a solution containing 5% (w/v) SDS, 0.1 M EDTA, 60% Ficoll, 0.1% bromophenol blue, and incubation at 50°C for 10 min. Equivalent amounts of the restricted DNA fragments from the avian DNAs were then fractionated by electrophoresis on 1% agarose (Seakem) horizontal slab gels containing 1 µg/ml ethidium bromide in 1x TEA buffer as described elsewhere. Restriction fragments of phage λ DNA used as molecular weight markers were visualized under ultraviolet transillumination (see above). Optical density estimations using ultraviolet transilluminator also showed that equivalent amounts of DNA transferred to the filters from each electrophoresis lane.

After soaking the gel for 1 hr in denaturation buffer (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) and 1-2 hr in neutralization buffer [0.5 M Tris-HCl (pH 7.0), 3.0 M NaCl], the DNA fragments were transferred from the agarose gel to nitrocellulose filter paper (Schleicher and Schuell, NC B6 0.45 µ BA85, Selectron) with a stream of 6 x SSC (1 x SSC is 0.15 M NaCl, 0.015 M Na citrate) essentially as described by Southern (1975). The filters were then baked for 2 hr at 80°C (in vacuo), and preannealing and annealing with the <sup>32</sup>P-labeled cDNA were carried out essentially as described by Shank et al. (1978).

#### Acknowledgments

We are most grateful to Keith Howman and Peter Brown of the World Pheasant Association for generously making available eggs and blood samples of the three Junglefowl species. We thank Helen Murphy and Ek Reichmann for help in the preparation of materials and Maureen Harrison and Bob McCormick for skillful technical assistance. We are also grateful to Harvey Lodish for useful suggestions and to Paul Neiman, Natalie Teich and Harold Varmus for discussions and for reading the manuscript.

This work was supported in part by INSERM contracts to D.S. and by the award to D.P.F. of a Study Visit Grant from the Royal Society.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received February 1, 1979; revised April 2, 1979

#### References

Aaronson, S. A. and Stephenson, J. R. (1976). Endogenous type-C RNA viruses of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 458, 323-354.

Astrin, S. M. (1978). Endogenous viral genes of the White Leghorn chicken: common site of residence and sites associated with specific phenotypes of viral gene expression. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75, 5941-5945.

Baltimore, D. (1975). *Tumor Viruses: 1974*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 1187-1200.

Baluda, M. (1972). Widespread presence, in chicken, of DNA complementary to the RNA genome of avian leukosis viruses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 576-580.

Benitez, P., Timmermans, A., Daams, A. H. and van der Gugten, A. (1968). Genetic transmission of mammary tumor inciting viruses in

mice: possible implications for murine leukemia. *Bibl. Haematol.* 31, 101-103.

Benveniste, R. E. and Todaro, G. J. (1974). Evolution of type C viral genes: inheritance of exogenously acquired viral genes. *Nature* 252, 456-459.

Benveniste, R. E. and Todaro, G. J. (1975). Segregation of RD-114 and FeLV related sequences in crosses between domestic cat and leopard cat. *Nature* 257, 506-508.

Burmester, B. R., Gentry, R. F. and Waters, N. F. (1955). The presence of the virus of visceral lymphomatosis in embryonated eggs of normal appearing hens. *Science* 34, 609-617.

Chattopadhyay, S. K., Lowry, D. R., Teich, N. M., Levine, A. S. and Rowe, W. P. (1975). Qualitative and quantitative studies of AKR-type murine leukemia virus sequences in mouse DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39, 1085-1101.

Chen, Y. C. and Vogt, P. K. (1977). Endogenous leukosis viruses in the avian family Phasianidae. *Virology* 76, 740-750.

Cohen, J. C. and Varmus, H. E. (1979). Endogenous mammary tumor virus DNA is heterogeneous in wild mice and segregates during inbreeding. *Nature*, 278, 418-423.

Darwin, C. (1868). *The Variation of Animals and Plants under Domestication*, 1 (London: Murray).

Delacour, J. (1977). *The Pheasants of the World* (Hindhead: Spur Publications, Saiga Publishing Co. Ltd., with the World Pheasant Association).

Fujita, D. J., Chen, Y. C., Friis, R. R. and Vogt, P. (1974). RNA tumor viruses of pheasants: characterization of avian leukosis subgroups F and G. *Virology* 60, 558-571.

Fujita, D. J., Tai, J., Varmus, H. E. and Bishop, J. M. (1978). Env gene of chicken RNA tumor viruses: extent of conservation in cellular and viral genomes. *J. Virol.* 27, 465-474.

Groudine, M., Das, S., Neiman, P. and Weintraub, H. (1978). Regulation of expression and chromosomal subunit conformation of avian retrovirus genomes. *Cell* 14, 865-878.

Hanafusa, H., Miyamoto, T. and Hanafusa, T. (1970). A cell-associated factor essential for formation of an infectious form of Rous sarcoma virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 66, 314-321.

Hanafusa, T. and Hanafusa, H. (1973). Isolation of leukosis-type virus from pheasant embryo cells: possible presence of viral genes in cells. *Virology* 51, 247-251.

Hanafusa, T., Hanafusa, H., Metroka, C. E., Hayward, W. S., Rettermier, C. W., Sawyer, R. C., Dougherty, R. M. and DiStefano, H. S. (1976). Pheasant virus: new class of ribodeoxyvirus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 1333-1337.

Hayward, W. S. and Hanafusa, H. (1975). Recombination between endogenous and exogenous RNA tumor virus genes as analyzed by nucleic acid hybridization. *J. Virol.* 15, 1367-1377.

Hill, B. T. and Whatley, S. (1975). A simple rapid microassay for DNA. *FEBS Letters* 56, 20-23.

Hu, S. F., Lai, M. M. C. and Vogt, P. K. (1978). Characterization of the env gene in avian oncoviruses by heteroduplex mapping. *J. Virol.* 27, 667-676.

Huebner, R. J. and Todaro, G. J. (1969). Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64, 1087-1094.

Hutt, F. B. (1949). In *The Genetics of the Fowl* (New York: McGraw-Hill).

Kang, C.-Y. and Temin, H. M. (1974). Reticuloendotheliosis virus nucleic acid sequences in cellular DNA. *J. Virol.* 19, 1179-1188.

Keshel, E. and Temin, H. M. (1977). Nucleotide sequences derived from pheasant DNA in the genome of recombinant avian leukosis viruses with subgroup F specificity. *J. Virol.* 24, 505-513.

Leong, J. A., Garapin, A. C., Jackson, N., Fanshier, L., Levinson, W. E. and Bishop, J. M. (1972). Virus-specific ribonucleic acid in cells producing Rous sarcoma virus: detection and characterization. *J. Virol.* 9, 891-902.

- Murphy, H. (1977). A new replication-defective variant of the Bryan high-titer strain Rous sarcoma virus. *Virology* 77, 705-721.
- Neiman, P. E. (1972). Rous sarcoma virus nucleotide sequences in cellular DNA: measurement by RNA-DNA hybridization. *Science* 178, 750-753.
- Neiman, P. E. (1973). Measurement of endogenous leukosis virus nucleotide sequences in the DNA of normal avian embryos by RNA-DNA hybridization. *Virology* 53, 196-204.
- Neiman, P. E., Das, S., Macdonnell, D. and McMillin-Hetsel, C. (1977). Organization of shared and unshared sequences in the genomes of chicken endogenous and sarcoma viruses. *Cell* 11, 321-329.
- Payne, L. N. and Chubb, R. C. (1968). Studies on the nature of the genetic control of an antigen in normal chick embryos which reacts in the COFAL test. *J. Gen. Virol.* 3, 379-391.
- Prager, E. M., Brush, A. H., Nolan, R. A., Nakanishi, M. and Wilson, A. C. (1974). Slow evolution of transferrin and albumin in birds according to micro-complement fixation analysis. *J. Mol. Evol.* 3, 243-262.
- Rice, N. and Paul, P. (1971). *Carnegie Inst. Washington Yearbook* 71, 262-264.
- Robinson, H. L. (1978). Inheritance and expression of chicken genes which are related to avian leukosis sarcoma virus genes. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 58, 1-36.
- Rosenthal, P. N., Robinson, H. L., Robinson, W. S., Hanafusa, T. and Hanafusa, H. (1971). DNA in uninfected and virus-infected cells complementary to avian tumor virus RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 2336-2340.
- Rubin, H., Cornelius, A. and Fanshier, L. (1961). The pattern of congenital transmission of an avian leukosis virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 47, 1058-1069.
- Shank, P. R., Hughes, S. H., Kung, H.-J., Majors, J. E., Quintrell, N., Guntaka, R. V., Bishop, J. M. and Varmus, H. E. (1978). Mapping unintegrated avian sarcoma virus DNA: termini of linear DNA bear 300 nucleotides present once or twice in two species of circular DNA. *Cell* 15, 1383-1395.
- Shoyab, M. and Baluda, M. (1975). Homology between avian oncornavirus RNAs and DNA from several avian species. *J. Virol.* 16, 1492-1502.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Steffen, D. and Weinberg, R. A. (1978). The integrated genome of murine leukemia virus. *Cell* 15, 1003-1010.
- Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M. and Vogt, P. K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma virus is present in normal avian DNA. *Nature* 260, 170-173.
- Sutton, W. D. (1971). A crude nuclease preparation suitable for use in DNA reassociation experiments. *Biochim. Biophys. Acta* 240, 522-531.
- Taylor, J. M., Illmensee, R. and Summers, J. (1976). Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase. *Biochim. Biophys. Acta* 442, 324-330.
- Temin, H. M. (1971). The provirus hypothesis. *J. Nat. Cancer Inst.* 46, 3-8.
- Temin, H. M. (1974). On the origin of RNA tumor viruses. *Ann. Rev. Genet.* 8, 155-177.
- Temin, H. M. and Kassner, V. K. (1976). Avian leukosis viruses of different subgroups and types isolated after passage of Rous sarcoma virus-Rous associated virus-O in cells from different ring-necked pheasant embryos. *J. Virol.* 19, 302-312.
- Tereba, A., Skoog, L. and Vogt, P. K. (1975). RNA tumor virus specific sequences in nuclear DNA of several avian species. *Virology* 65, 524-534.
- Todaro, G. J. (1978). RNA-tumour-virus genes and transforming genes: patterns of transmission. *Brit. J. Cancer.* 37, 139-158.
- Todaro, G. J. and Huebner, R. J. (1972). The viral oncogene hypothesis: new evidence. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 1009-1015.
- Varmus, H. E., Weiss, R. A., Friis, R. R., Levinson, W. E. and Bishop, J. M. (1972). Detection of avian tumor virus-specific nucleotide sequences in avian cell DNAs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 20-24.
- Vogt, P. K. and Friis, R. R. (1971). An avian leukosis virus related to RSV(O): properties and evidence for helper activity. *Virology* 43, 223-234.
- Weiss, R. A. (1969). The host range of Bryan strain Rous sarcoma virus synthesized in the absence of helper virus. *J. Gen. Virol.* 5, 511-539.
- Weiss, R. A. (1975). Genetic transmission of RNA tumor viruses. In *Perspectives in Virology*, 9 (New York: Academic Press), pp. 165-205.
- Weiss, R. A. and Payne, L. N. (1971). The heritable nature of the factor in chicken cells which acts as a helper for Rous sarcoma virus. *Virology* 45, 508-515.
- Weiss, R. A. and Biggs, P. M. (1972). Leukosis and Marek's disease viruses of feral red jungle fowl and domestic fowl in Malaysia. *J. Nat. Cancer Inst.* 49, 1713-1725.
- Weiss, R. A., Mason, W. S. and Vogt, P. K. (1973). Genetic recombinants and heterozygotes derived from endogenous and exogenous avian RNA tumour viruses. *Virology* 52, 535-552.
- Weiss, R. A., Friis, R. R., Katz, E. and Vogt, P. K. (1971). Induction of avian tumor viruses in normal cells by physical and chemical carcinogens. *Virology* 46, 920-938.



ARTICLE II

# 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).

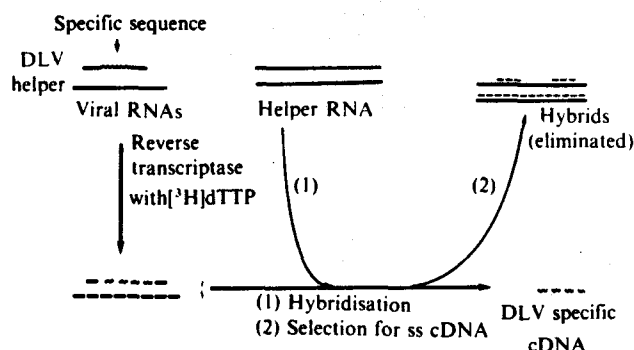
The seven available independent isolates of DLVs have been assigned to three subgroups based on the types of neoplasm they induce and on the differentiation phenotypes of haematopoietic cells they transform *in vitro*<sup>1,2</sup>. (1) The avian erythroblastosis-type viruses (AEV strains R and ES4 are probably identical<sup>3</sup>) induce erythroblastosis *in vivo* and transform erythroblasts *in vitro*. (2) The avian myelocytomatosis-type viruses (MC29, CM11, 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 transforms fibroblasts *in vitro*, and MC29-type viruses can induce carcinomas and occasional sarcomas and transform epithelial cells and fibroblasts *in vitro*<sup>1,2</sup>. 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 failed<sup>4</sup>. A possible homology between certain genomic sequences of the DLVs and ALV genes<sup>5-7</sup> was investigated by testing clones of avian cells containing the DLV provirus without its helper. Such cells, usually unable to produce virus<sup>6</sup>, 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 (cDNA<sub>sarc</sub>)<sup>8</sup>. 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<sup>9,10</sup>. 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<sup>11,12</sup>. Thus, these viruses may contain sets of nucleotide sequences unrelated to ALVs.

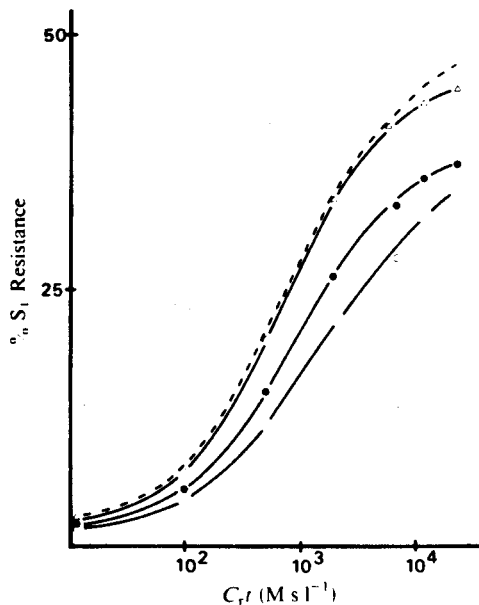
## DLV-specific sequences

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

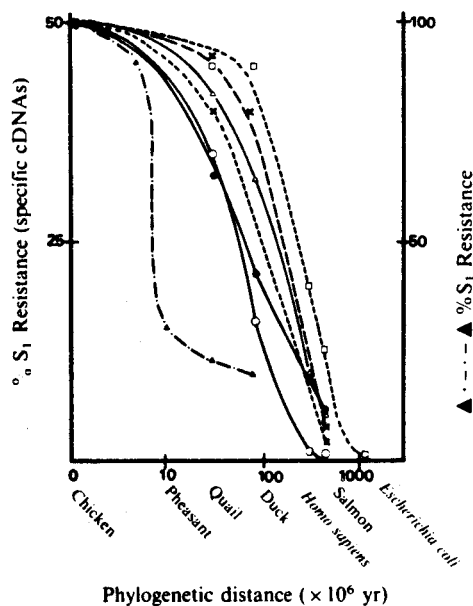


**Fig. 1** Scheme for the preparation of DLV-specific cDNAs. Cloned AEV (RAV-2) and MC29 (RAV-2) pseudotypes, obtained by rescuing these viruses with RAV-2 from cloned non-producer fibroblasts, were propagated in chicken fibroblasts. Viral RNAs were extracted from the pelleted viruses, then transcribed into labelled cDNA using *in vitro* reverse transcription with purified AMV reverse transcriptase, <sup>3</sup>H-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 RNAs<sup>8</sup> (not shown). Specific activities of the <sup>3</sup>H-cDNAs were ~50 × 10<sup>6</sup> c.p.m. per μg. Details of these experiments will be described elsewhere.

† To whom correspondence should be addressed.



**Fig. 2** DLV-specific sequences have their counterparts in normal chicken DNA. Aliquots of 11-day chicken embryo DNA (200  $\mu$ g 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  $C_0t$  values. Hybrids formed were tested for their resistance to  $S_1$  endonuclease. ●—●, cDNAaev;  $\Delta$ — $\Delta$ , cDNAmc29; ○—○, cDNAamv; — — —, cDNAsarc. Similar results were obtained with normal quail embryo DNA (not shown).



**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. ●—●, cDNAaev;  $\Delta$ — $\Delta$ , cDNAmc29; ○—○, cDNAamv; □—□, cDNAsarc. Also shown ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ) are results obtained with  $^3\text{H}$ -labelled chicken unique sequence DNA<sup>14</sup> (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;  $\times$ — $\times$ , cDNA<sub>lgo</sub> (ref. 16) for globin;  $\times$ — $\times$ , cDNA<sub>ova</sub> (ref. 16) for ovalbumin.

tested for their oncogenic potential *in vitro* (using the bone marrow transformation assay<sup>2</sup>) 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 ASVs<sup>3</sup>. 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 cDNAaev for AEV, cDNAmc29 for MC29 (ref. 13) and cDNAamv for AMV.

The distribution of viral nucleotide sequences related to these specific cDNAs was explored by hybridising them at plateau  $C_0t$  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, cDNAmc29 shows extensive homology to RNA of CMII, OK10 and MH2, as does cDNAamv 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

**Table 1** DLV genomes in nonproducer cells are related to ALVs

| DLV strain | Type of nonproducer cell | Annealing (% $S_1$ resistance) with |                      |
|------------|--------------------------|-------------------------------------|----------------------|
|            |                          | cDNA <sub>rep</sub>                 | cDNA <sub>sarc</sub> |
| 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- $\mu$ l aliquot containing 1–10  $\text{mg ml}^{-1}$  RNA, 0.6 M NaCl, 68 °C) with cDNAs (1,000 c.p.m. per point = 0.02 ng) to plateau  $C_0t$  values (defined as  $10 \times$  the  $C_0t_{1/2}$ ). cDNA<sub>rep</sub> and cDNA<sub>sarc</sub> were prepared as described earlier<sup>3</sup>, but using calf thymus-primed polymerase reactions<sup>14</sup>. Hybrids were assayed by  $S_1$  nuclease. No correction for the expression of endogenous RAV-O or cellular sarc was made as they gave values below 3% in each case.

to hybridise with cDNAaev, cDNAmc29 and cDNAamv. Figure 2 shows that all three types of sequences have their counterparts in normal cellular chicken DNA and, as judged from the  $C_0t_{1/2}$  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 Galliformes<sup>14</sup>. In contrast, cellular sequences related to cDNAaev, cDNAmc29

**Table 2** DLVs contain unique nucleotide sequences

| RNA derived from      | Annealing (% S <sub>1</sub> resistance) with |                      |                     |
|-----------------------|--|----------------------|---------------------|
|                       | cDNA <sub>Aev</sub>                          | cDNA <sub>Mc29</sub> | cDNA <sub>Amv</sub> |
| 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  $C_{it}$  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 S<sub>1</sub> nuclease resistance. Results obtained were standardised to the values of the homologous reaction. Maximum hybridisation of cDNA<sub>Aev</sub> with AEV RNA was 95%; that of cDNA<sub>Mc29</sub> with MC29 RNA 90% and that of cDNA<sub>Amv</sub> 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.

and cDNA<sub>Amv</sub> 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 ASVs<sup>15-17</sup> and agree with the results recently described for MC29 by Sheiness *et al.*<sup>18</sup>.

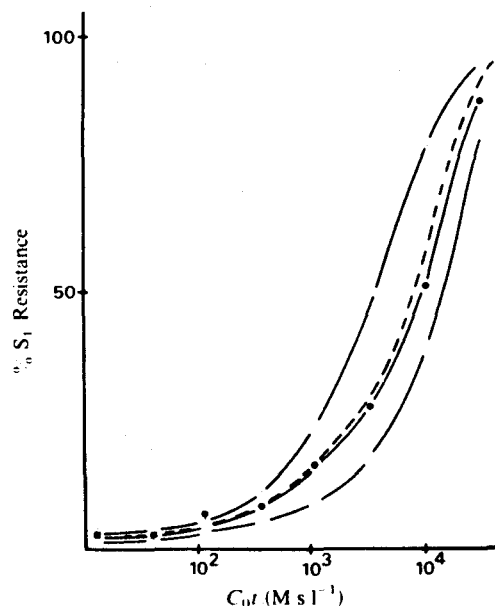
As normal cells contained nucleotide sequences related to highly transforming viruses, we studied the rate of transcription of such sequences. Total RNA extracted from normal chicken (or quail) fibroblasts was hybridised to the different specific cDNAs. Figure 4 shows that these sequences are all transcribed at a low level (a few copies per cell), as previously found for the expression of 'cellular sarc' (refs 16, 19). Cellular sequences related to cDNA<sub>Aev</sub> are transcribed at two or three copies per cell; cellular sequences related to cDNA<sub>Mc29</sub> are reproducibly expressed at a higher level (5-10 copies per cell), as Sheiness *et al.*<sup>18</sup> found. In contrast, cellular sequences related to cDNA<sub>Amv</sub> 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<sub>Aev</sub>, cDNA<sub>Mc29</sub> or cDNA<sub>Amv</sub>, 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<sub>Aev</sub>, cDNA<sub>Mc29</sub> and cDNA<sub>Amv</sub>, 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<sup>1,2,20</sup>. (2) The properties of these sequences and their origin are reminiscent of results obtained earlier for the transforming gene *src* of ASVs<sup>15</sup>: size, cellular origin and phylogenetic stability<sup>16,17</sup>. (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 erythroblasts<sup>22</sup>. (5) All DLVs tested contain the 5' region of the ALV genome (partial *gag* gene<sup>12</sup>). In the strains studied so far (MC29 and MH2) this region was located adjacent to the DLV-specific sequence<sup>21,23</sup>. 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), respectively, 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 polyproteins 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 polyproteins, avian DLVs resemble replication-defective mammalian retroviruses capable of inducing leukaemias or sarcomas with a short period of latency, such as the Abelson<sup>25</sup> murine virus and feline sarcoma virus<sup>26,27</sup>.

Avian DLVs behave like recombinants between an ALV-related vector virus of low oncogenicity and unknown origin<sup>14</sup> 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 Coffin<sup>28</sup>. How frequently such a recombination occurs is not known, although about 30 DLV-like and 1-3 ASV-like independent isolates have been reported<sup>2</sup>. 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



**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  $C_{it}$  values (varying RNA concentration up to  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) in stringent conditions (0.6 M NaCl, 68 °C), to the specific cDNAs (1,000 c.p.m. per point = 0.02 ng). Hybrids were scored for their S<sub>1</sub> endonuclease resistance. Symbols are as in Fig. 2.

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<sub>amv</sub> 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<sub>mc29</sub> 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<sup>22,24</sup>: 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<sup>2,17</sup>, 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.

1. Graf, T. & Beug, H. *Biochim. biophys. Acta* **516**, 269-299 (1978).
2. Beug, H. V., Kirchbach, A., Doederlein, G., Conscience, J. F. & Graf, T. *Cell* **18**, 375-390 (1979).
3. Hayman, M. J., Royer-Pokora, B. & Graf, T. *Virology* **92**, 31-45 (1979).
4. Hu, S. S. F., Moscovici, C. & Vogt, P. K. *Virology* **89**, 162-178 (1978).
5. Hu, S. S. F. & Vogt, P. K. *Virology* **92**, 278-284 (1979).
6. Bister, K., Hayman, M. J. & Vogt, P. K. *Virology* **82**, 431-448 (1977).
7. Hayman, M. J., Kitchener, G. & Graf, T. *Virology* (in the press).
8. Stéhelin, D., Guntaka, R. V., Varmus, H. E. & Bishop, J. M. *J. molec. Biol.* **101**, 349-365 (1976).
9. Stéhelin, D. & Graf, T. *Cell* **13**, 745-750 (1978).
10. Duesberg, P. H., Vogt, P. K., Bister, K., Troxler, D. & Scolnick, E. M. in *Avian RNA Tumor Viruses* 95-111 (Piccin, Padua, 1978).
11. Bishop, J. M. A. *Rev. Biochem.* **47**, 35-88 (1978).
12. Stéhelin, D. *et al. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* **44** (in the press).
13. Sheiness, D., Fanshier, L. & Bishop, J. M. *J. Virol.* **28**, 600-610 (1978).
14. Frisby, D. P., Weiss, R. A., Roussel, M. & Stéhelin, D. *Cell* **17**, 623-634 (1979).
15. Stéhelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M. & Vogt, P. K. *Nature* **260**, 170-173 (1976).
16. Stéhelin, D., Roussel, M. & Gardes, M. in *Avian RNA Tumor Viruses*, 134-144 (Piccin, Padua, 1978).
17. Spector, D. H., Varmus, H. E. & Bishop, J. M. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 4102-4106 (1978).
18. Sheiness, D. & Bishop, J. M. *J. Virol.* **31**, 514-521 (1979).
19. Spector, D. H. *et al. Cell* **13**, 371-379 (1978).
20. Gazzolo, L., Moscovici, C., Moscovici, M. G. & Samarut, J. *Cell* **16**, 627-638 (1979).
21. Hu, S. S. F., Lai, M. M. C. & Vogt, P. K. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 1265-1268 (1979).
22. Graf, T., Ade, N. & Beug, H. *Nature* **257**, 496-501 (1978).
23. Mellon, P. *et al. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 5874-5878 (1978).
24. Graf, T., Beug, H., V. Kirchbach, A. & Hayman, M. J. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* **44** (in the press).
25. Witte, O. N., Rosenberg, N., Paskind, M., Shidds, A. & Baltimore, D. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 2488-2492 (1978).
26. Stephenson, J. R., Khan, A. S., Sliski, A. H. & Essex, M. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5608-5612 (1977).
27. Sherr, C. J., Sen, A., Todaro, G. J., Sliski, A. & Essex, M. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 1505-1509 (1978).
28. Coffin, J. M. *J. gen. Virol.* **42**, 1-26 (1979).



ARTICLE III

**COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA  
ON QUANTITATIVE BIOLOGY**

**VOLUME XLIV**

**VIRAL ONCOGENES**

**COLD SPRING HARBOR LABORATORY  
1980**

# Three New Types of Viral Oncogenes in Defective Avian Leukemia Viruses.

## I. Specific Nucleotide Sequences of Cellular Origin Correlate with Specific Transformation

D. STÉHELIN, S. SAULE, M. ROUSSEL, A. SERGEANT, C. LAGROU, C. ROMMENS,  
AND M. B. RAES

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Oncologie Moléculaire, Institut Pasteur de Lille,  
F 59000 Lille, France*

On the basis of their oncogenic properties, avian retroviruses can be assigned to either of two major classes. Of many characterized natural field isolates, the vast majority (nondefective avian leukemia viruses ALVs) are weakly oncogenic and cause predominantly lymphatic leukemia after a prolonged latency period of months to years following inoculation of susceptible strains of chickens. ALVs most frequently occur as independent agents and contain all the genetic information required for viral replication. In contrast, several other avian retroviruses are highly oncogenic and produce disease after a short latency period of days to weeks. These highly oncogenic viruses include the replication-competent avian sarcoma viruses (ASVs) (or Rous viruses), which readily induce sarcomas in susceptible birds and transform fibroblasts in vitro, and the replication-defective leukemia viruses (DLVs), which require helper ALVs for their propagation in cultured cells (for review, see Graf and Beug 1978).

The seven available independent isolates of DLVs have been recently assigned to three subgroups (Table 1) based on the types of neoplasms they induce and on the differentiation phenotypes of hematopoietic cells transformed in vitro by these viruses (Beug et al. 1979). These subgroups are: (1) Avian erythroblastosis virus (AEV) (strains R and ES4 have been shown to be probably identical [Hayman et al. 1979b]) induces erythroblastosis in vivo and transforms erythroblasts in vitro. (2) Avian myelocytomatosis-type viruses (MC29, CMII, OK10, and MH2) transform macrophagelike cells in vitro and some strains induce myelocytomatosis in vivo. (3) Avian myeloblastosis-type viruses (AMV and E26) induce myeloblastosis in vivo and transform myeloblasts in vitro.

In addition, AEV is capable of inducing sarcomas and transforming fibroblasts in vitro; MC29-type viruses are capable of inducing carcinomas and occasionally sarcomas and of transforming epithelial cells and fibroblasts in vitro (Graf and Beug 1978; Beug et al. 1979), although AEV and MC29 have been shown

to lack the *src* gene of ASVs (Stéhelin and Graf 1978). In most cases, these viruses induce the same type of neoplasm as in the chicken of origin and thus are not likely to represent laboratory artifacts.

The aim of our work was to determine if the oncogenicity of these viruses could be related to the presence of specific nucleotide sequences in their genome. Such a relationship would then imply that part or all of these specific sequences represent new viral oncogenes.

### DLVs Are Related to Nondefective ALVs

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 helper viruses unrelated to ALVs have failed thus far (Hu et al. 1978) and indicate a possible homology between certain genomic sequences of the DLVs and ALV genes (Bister et al. 1977; Hu and Vogt 1979; Hayman et al. 1979b). Such a homology was verified by testing avian cell clones infected by pseudotypes of the DLVs, thus containing in their DNAs a given DLV provirus, but no ALV helper provirus (AEV, Graf et al. 1976; MC29, Bister et al. 1977; CMII, Graf et al. 1977; MH2, S. Saule, unpubl.; OK10 and E26, Graf et al. 1979b; AMV, T. Graf, unpubl.). These cells, usually unable to produce virus (nonproducer or NP cells), still contain numerous RNA transcripts of the DLV provirus. Whole RNA of these NP cells was analyzed, using molecular hybridization with labeled probes representing homogeneous transcripts of an ALV (cDNA<sub>rep</sub>), of parts of an ALV genome (cDNA<sub>gag-pol</sub>; cDNA<sub>env</sub>), or of the *src* gene of ASVs (cDNA<sub>src</sub>) (Tal et al. 1977; Frisby et al. 1979). Table 2 indicates that all the DLV genomes tested contain ALV-related nucleotide sequences in variable amounts, but lack the *src* gene of ASV. However, the detected homology to ALVs cannot account for the entire genetic content of the DLVs, which all contain about 6000–8000 nucleotides in their genomic RNAs

Table 1. Defective Avian Leukemia Viruses

| Virus type | Virus strain <sup>a</sup> | Country and year of origin        | Type of neoplasm in chicken of origin | Predominant types of neoplasms induced <sup>b</sup>           |
|------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---|
| AEV        | ES4                       | Denmark, 1933                     | sarcoma and myelocytomatosis          | erythroblastosis; sarcomas                                    |
| MC29       | R                         | Denmark, 1931                     | erythroblastosis                      | erythroblastosis; sarcomas                                    |
|            | MC29                      | Bulgaria, 1964                    | myelocytomatosis                      | myelocytomatosis; liver and kidney carcinomas                 |
|            | CMII                      | Federal Republic of Germany, 1964 | myelocytomatosis                      | myelocytomatosis  |
| AMV        | MH2                       | England, 1927                     | endothelioma (?)                      | liver and kidney carcinomas; sarcomas; monocytic leukemia (?) |
|            | OK10                      | Finland, 1975                     | endothelioma (?)                      | endothelioma (?)  |
|            | AMV BAI/A                 | United States, 1941               | neurolymphomatosis                    | myeloblastosis  |
|            | E26                       | Bulgaria, 1962                    | leukemia                              | erythroblastosis  |

Modified from Graf and Beug (1978).

<sup>a</sup>Other neoplasms such as lymphatic leukemia, osteopetrosis, and nephroblastoma are omitted from this list, since they are attributed to helper viruses present in stocks of DLVs.

(see below). Thus, these viruses must contain nucleotide sequences unrelated to ALVs.

#### DLVs Contain Nucleotide Sequences Not Related to ALVs

The search for specific sequences was conducted by analyzing the prototype strain of each of the three DLV subgroups, namely, AEV, MC29, and AMV. Cloned 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 assay (Graf et al. 1979a) and then propagated in chicken erythroblasts (for AEV) or chicken fibroblasts (for MC29). AMV was obtained in high yields from the plasma of infected chickens.

The strategy used to prepare specific cDNAs of these viruses was similar to that previously used to select cDNA specific for the *src* gene of ASVs (Stéhelin et al. 1976a) and is outlined in Figure 1. Briefly, cDNAs of AEV, MC29, and AMV were selected so that they were still capable of hybridizing to their RNAs of origin, but could not hybridize to the RNAs

of the helper viruses used to grow the virus stocks or of any of the other ALVs tested. These specific cDNAs were denoted cDNA<sub>aev</sub> for AEV, cDNA<sub>mc29</sub> for MC29 (Sheiness et al. 1978), and cDNA<sub>amv</sub> for AMV.

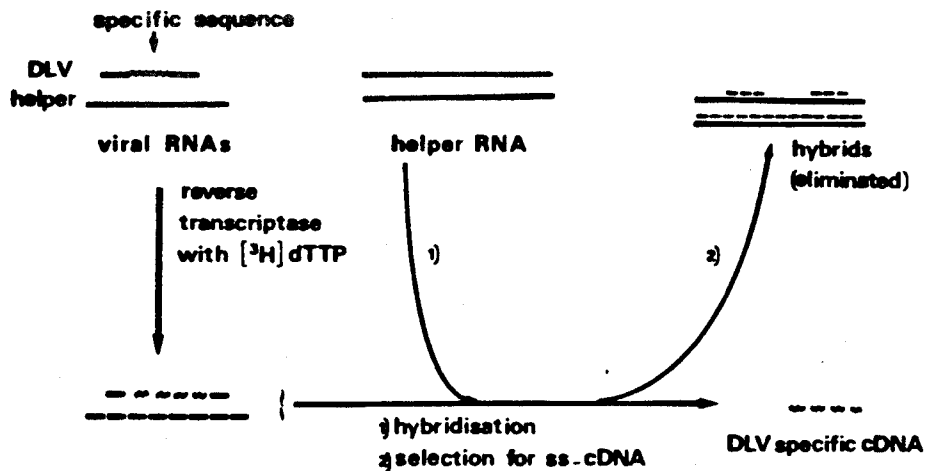
The distribution of viral nucleotide sequences related to these specific cDNAs was explored by hybridizing them at plateau  $C_{t,i}$  values to several viral RNAs. The results shown in Table 3 allowed us to draw several conclusions: (1) The cDNAs tested are specific for the DLVs used for their preparation. (2) They represent distinct sets of sequences, unrelated to each other by cross-hybridization experiments. (3) cDNA<sub>mc29</sub> shows extensive homology to CMII, OK10, and MH2 RNAs, as does cDNA<sub>amv</sub> to E26 RNA. As will be described elsewhere, the three cDNAs exhibited exactly the same specificity when tested with cellular RNAs extracted from NP cells, further demonstrating that the probes indeed detect sequences specific for the three types of DLVs.

The complexities of the specific cDNAs were shown to be 3700 nucleotides for cDNA<sub>aev</sub> and 2100 nucleotides for cDNA<sub>amv</sub> (S. Saule et al., in prep.); cDNA<sub>mc29</sub> was shown to comprise 1800 nucleotides (Sheiness et al. 1978).

Table 2. DLV Genomes in NP Cells Are Related to ALVs

| DLV strain | Type of NP cell <sup>†</sup> | Annealing (% nuclease-S1 resistance) with |                         |                     |                     |
|------------|------------------------------|---|-------------------------|---------------------|---------------------|
|            |                              | cDNA <sub>rep</sub>                       | cDNA <sub>gag-pol</sub> | cDNA <sub>env</sub> | cDNA <sub>src</sub> |
| AEV        | chicken fibroblast           | 28  | 15                      | 16                  | <3                  |
| MC29       | quail fibroblast             | 45  | 30                      | 66                  | <3                  |
| CMII       | quail fibroblast             | 41  | 24                      | 79                  | <3                  |
| OK10       | quail fibroblast             | 77  | 87                      | 45                  | <3                  |
| MH2        | quail fibroblast             | 32  | 25                      | 10                  | <3                  |
| AMV        | chicken myeloblast           | 50  | 59                      | <3                  | <3                  |
| E26        | chicken myeloblast           | 36  | 13                      | 60                  | <3                  |

Total RNA was extracted from the different avian NP cells and hybridized under stringent conditions (25- $\mu$ l aliquot containing 1-10 mg/ml of RNA, 0.6M NaCl at 68°C) with cDNAs (1000 cpm/point = 0.02 ng) to plateau  $C_{t,i}$  values (defined as 10 times the  $C_{t,i/2}$ ). cDNAs were prepared as described earlier, but using calf-thymus-primed polymerase reactions (Stéhelin et al. 1976a; Tal et al. 1977). Hybrids were assayed by nuclease S1. No correction for the expression of endogenous RAV-0 or cellular *src* was made since they gave values below 3% in each case.



**Figure 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 NP fibroblasts, were propagated in chicken erythroblasts (line 6C2) and fibroblasts, respectively. Viral RNAs were extracted from the pelleted viruses and then transcribed into labeled cDNA using in vitro reverse transcription with purified AMV reverse transcriptase,  $[^3\text{H}]d\text{TTP}$  and unlabeled dCTP, dGTP, and dATP, and calf-thymus-priming. In a negative selection step, each cDNA mixture was hybridized 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-virus RNAs extracted from RAV-1, RAV-2, and MAV-2 (0) viruses for the selection. Specific activities of the  $[^3\text{H}]c\text{DNAs}$  were about  $50 \times 10^6$  cpm/ $\mu\text{g}$ . Details of these experiments will be described elsewhere.

**Size of the Genomic RNAs of DLVs**

Among the DLVs, the genomic sizes of only MC29 and MH2 were determined recently by heteroduplex analysis to be about 5700 nucleotides long (Hu et al. 1979).

We used a different approach to study the sizes of the remaining DLVs. Medium was harvested (4-hr harvests) from cells infected with cloned pseudotypes of each DLV. The viral RNAs were extracted and separated by vertical agarose gel electrophoresis with rRNA markers of *Escherichia coli* (16S and 23S), quail

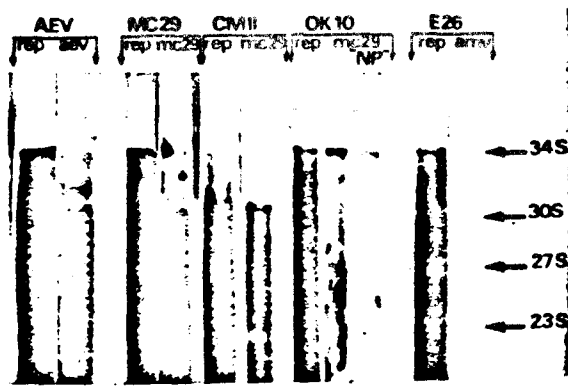
(18S and 27S), or CV-1 cells (18S and 28S). RNA blots were performed according to the method of Alwine et al. (1977) and hybridized to  $[^{32}\text{P}]c\text{DNA}_{\text{rep}}$  and, when appropriate, to  $[^{32}\text{P}]c\text{DNA}$  specific for AEV, MC29, or AMV. The results of these experiments, shown in Figure 2, led to the following conclusions: (1) All strains tested contain helper 34S RNAs detected by  $[^{32}\text{P}]c\text{DNA}_{\text{rep}}$ , and (2) specific bands corresponding to the DLV genomes are revealed by the specific cDNAs (30S-31S); the presence of additional minor bands seen occasionally has not been explained thus far. A notable exception is OK10 RNA which shows a much larger genome about

**Table 3.** DLVs Contain Unique Nucleotide Sequences

| RNA derived from             | Annealing (% nuclease-S1 resistance) with |                      |                     |
|------------------------------|---|----------------------|---------------------|
|                              | cDNA <sub>aev</sub>                       | cDNA <sub>mc29</sub> | cDNA <sub>amv</sub> |
| 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 helper viruses (control) | <3  | <3                   | <3                  |

Viral 50S-70S RNAs were extracted and hybridized to plateau  $C_{0t}$  values (over 10 M-sec/liter) under stringent conditions (0.6 M NaCl at 68°C) with the specific cDNAs (1000 cpm/point = 0.02 ng). The hybrids formed were tested for nuclease-S1 resistance. Results obtained were standardized to the values of the homologous reaction. Maximum hybridization of cDNA<sub>aev</sub> with AEV RNA was 95%, cDNA<sub>mc29</sub> with MC29 RNA 90%, and cDNA<sub>amv</sub> 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-virus RNAs tested as controls were obtained from RAV-1, RAV-2, RAV-49, RAV-50, and MAV-2 (0).





**Figure 2.** Sizes of the DLV genomes. DLV (helper) RNAs were extracted from 4-hr-harvested supernatants, fractionated by electrophoresis on vertical agarose gels, and then blotted according to the method of Alwine et al. (1977). The blots were hybridized to  $^{32}$ P-labeled cDNA<sub>rep</sub> (left) or specific cDNA<sub>env</sub>, cDNA<sub>mc29</sub>, cDNA<sub>cmii</sub> (right). The slot marked "NP" contained RNA of OK10 harvested from "nonproducer" cells without helper virus. Autoradiography was performed for 1–10 days as described by Frisby et al. (1979). In general, the ratio of DLV to helper RNAs was  $\leq 1$ , with the exception of CMII where it was about 4 to 1.

34S, in agreement with the high annealing seen for this virus with ALV cDNAs in Table 2. With such a genome, OK10 is obviously less defective than the other DLVs and is likely to be produced in the medium of NP cells containing only the OK10 provirus. This was indeed the case, as shown in Figure 2 where the slot marked "NP" contains RNAs extracted from the medium of "non-producer" cells. Although OK10 seems to have most of the *pol* sequences, no active polymerase could be demonstrated (M. B. Raes and D. Stéhelin, unpubl.), which agrees with the fact that this virus is not infectious (C. Lagrou et al., in prep.).

### Genetic Content of the DLVs

From our results, a provisional map was drawn (Fig. 3) of the genetic content of the DLVs studied (the size of MH2 was taken from previously described observations of Duesberg et al. 1978). Several remarks can be made. (1) All the genomes contain at least 650 nucleotides in the *gag* gene; this could correspond to the N-terminal part (p19) of the *gag* gene found to be present in the *gag*-gene-related proteins of DLVs. It may also be essential for the growth of these viruses or may contain an initiation site for the translation of a *gag*-x polyprotein (see Discussion). (2) The order of the different sets of nucleotide sequences is not known and has been chosen according to the known order of ALV structural genes and the putative location of sequences responsible for the *gag*-gene related proteins. There is good agreement between the size of these polyproteins and our nucleotide sequence data. No non-*gag*-gene-related polyproteins corresponding to comprising *env* sequences in these viruses have been detected. (3) There is no requirement for the presence in these viruses of nucleotide sequences related to the *env* gene of ALVs, since some lack most or all of such sequences (see Table 2). (4) MH2 and E26 contain nucleotide sequences unaccounted for by our hybridization studies. (5) Hybridization studies performed with cDNA<sub>gag-pol</sub> and with cDNA<sub>gag-pol-C</sub> (S. Saule et al., unpubl.) suggest that DLVs contain at least part of the C region detected in all avian viruses studied thus far.

### DLV-specific Sequences Represent Transduced Normal Cellular Genes

To investigate the origin of DLV-specific sequences, DNA extracted from normal avian cells was tested for its ability to hybridize with cDNA<sub>rep</sub>, cDNA<sub>mc29</sub>, and



**Figure 3.** Genetic maps of the DLV RNAs (see text). Standard deviation for the annealing values was  $\pm 5\%$  (for the polyproteins related to OK10 and E26 viruses, see Graf et al. [this volume]).

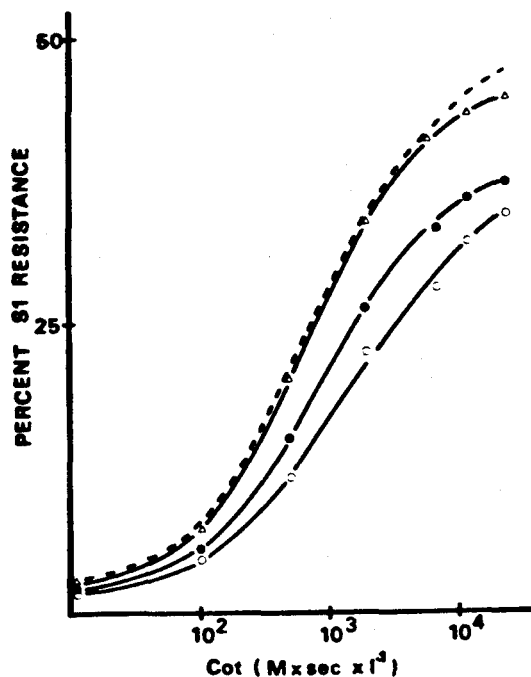


Figure 4. DLV-specific sequences have their counterparts in normal chicken DNA. Aliquots of 11-day-old chicken embryo DNAs (200  $\mu$ g/point, sheared to 4S-6S) were hybridized with the different specific cDNAs (1000 cpm/point = 0.02 ng) under stringent conditions (0.6 M NaCl at 68°C) at increasing  $C_{ot}$  values. Hybrids formed were tested for their resistance to endonuclease S1. (●) cDNA<sub>sar</sub>; (Δ) cDNA<sub>mc29</sub>; (○) cDNA<sub>mv</sub>; (—) cDNA<sub>sar</sub>. Similar results were obtained with normal quail embryo DNA.

cDNA<sub>mv</sub>. Figure 4 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 nonrepetitive DNA at one to two copies each per haploid genome. The low plateau values observed in Figure 4 are due to the competition of DNA reassociation with the DNA-cDNA hybridization reaction; transcription analyses (see below) show that most or all of the specific sequences are present in normal chicken DNA. Results obtained with molecular hybridization in liquid phase under stringent conditions show (Fig. 5) that the bulk of the nonrepetitive chicken DNA sequences are rapidly lost during evolution (~75% of the nuclease-S1-resistant hybrids formed are lost in the 30 million years of evolution from chicken to quail). Similarly, ALV-related virogene sequences, which have recently been shown to be absent in some species of the *Gallus* (Frisby et al. 1979), are also phylogenetically unstable. In contrast, cellular sequences related to cDNA<sub>sar</sub>, cDNA<sub>mc29</sub>, and cDNA<sub>mv</sub> are highly conserved throughout the phylogeny of higher vertebrates. As also shown in Figure 5, their evolutionary half-lives are comparable to that of known stable genes such as globin or ovalbumin. The latter values resemble those obtained earlier for the transforming *src* gene of ASVs (Stéhelin et al. 1976b,

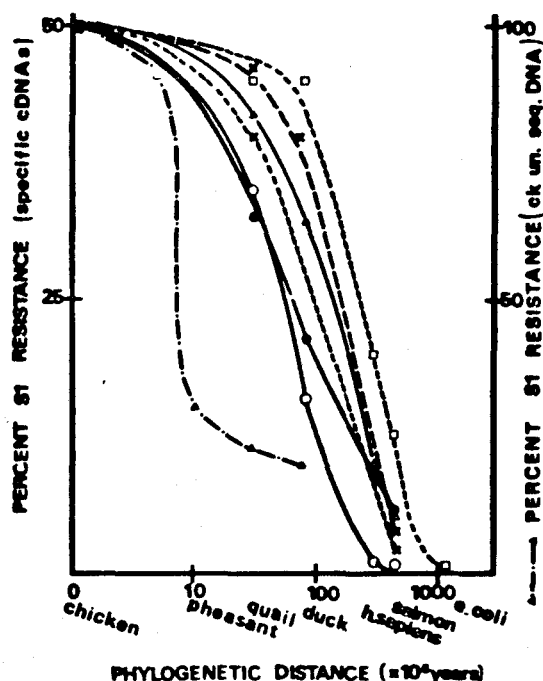


Figure 5. Stability of cellular DLV-related specific sequences during evolution. Aliquots of DNA extracted from different species that diverged increasingly long ago with speciation were hybridized under the specific conditions as described in Fig. 2. For comparison, the values obtained were standardized arbitrarily to 50% for the chicken; this was also taken as the origin of the scale indicating phylogenetic distance. (●) cDNA<sub>sar</sub>; (Δ) cDNA<sub>mc29</sub>; (○) cDNA<sub>mv</sub>; (—) cDNA<sub>sar</sub>; (▲) results obtained with the [<sup>3</sup>H]-labeled chicken DNA unique sequence (Frisby et al. 1979) (1000 cpm/point = 20 ng) in similar conditions (standardized to 100% for homologous reassociation) and with cDNAs representing genes known to be conserved throughout the evolution of vertebrates. (x—x) cDNA<sub>glo</sub> for globin; (x—x) cDNA<sub>ova</sub> for ovalbumin (Stéhelin et al. 1978).

1978; Spector et al. 1978a) and agree with the result recently described for MC29 by Sheiness and Bishop (1979).

#### Cellular DLV-related Specific Sequences Are Transcribed at Low Levels in Normal Cells

Since normal cells contain nucleotide sequences related to highly transforming viruses, it was of interest to study the rate of transcription of such sequences. Total RNA extracted from normal chicken (or quail) fibroblasts was hybridized to the different specific cDNAs. Figure 6 shows that these sequences are all transcribed at a low level (a few copies per cell). Again, similarity with the previously described cellular *sar*c expression is found (Stéhelin et al. 1978; Spector et al. 1978b), with cellular sequences related to cDNA<sub>mv</sub> transcribed at two to three copies per cell; cellular sequences related to cDNA<sub>mc29</sub> are reproducibly expressed at a higher level (five to ten copies/cell), as also found by Sheiness and Bishop (1979). In contrast, cellular sequences related to cDNA<sub>mv</sub> are slightly less

transcribed in fibroblasts (one copy/cell). As shown in Figure 6, all these cellular sequences reached plateau hybridization values close to 100% and therefore must be essentially fully represented in normal cellular nucleic acids (see also Roussel et al. 1979).

## DISCUSSION

### Three New Types of Viral Oncogenes Specific for Leukemic Transformation

Our results have shown that all seven defective leukemia viruses studied contain part or all of one of three different sets of specific nucleotide sequences complementary to cDNA<sub>aev</sub>, cDNA<sub>mc29</sub>, or cDNA<sub>amv</sub>. These specific sequences have their counterparts in normal cells of higher vertebrates, where their divergence correlates with the phylogeny of speciation. None of these sequences are related to the transforming *src* gene of ASVs. Although it is not yet understood how recombinants between ALV sequences and cell-derived sequences can acquire oncogenic capacity, several indications favor the hypothesis that three specific transforming genes, which we have termed *erb*, *mac*, and *myb*, in agreement with Graf et al. (this volume), are detected by cDNA<sub>aev</sub>, cDNA<sub>mc29</sub>, and cDNA<sub>amv</sub>, respectively. (1)

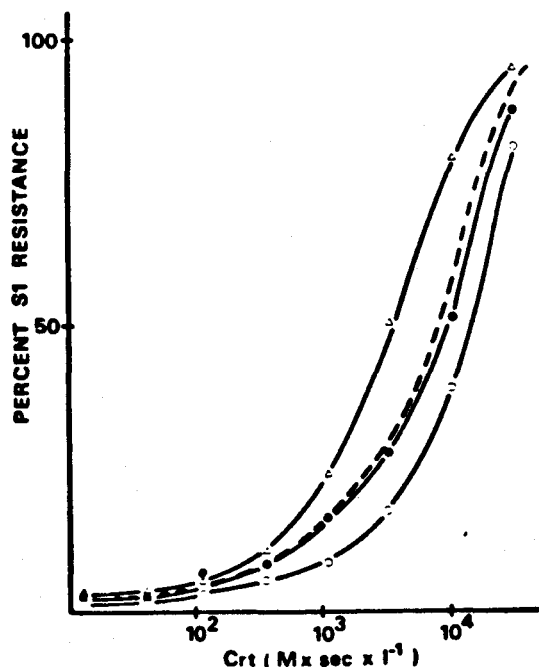


Figure 6. Transcription of the cellular DLV-related specific sequences in normal fibroblasts. Total RNA was extracted from normal chicken embryo fibroblasts and hybridized at increasing  $C_{rt}$  values (varying RNA concentration up to 10 mg/ml) under stringent conditions (0.6N NaCl at 68°C) to the specific cDNAs (1000 cpm/point = 0.02 ng). Hybrids were scored for their endonuclease S1 resistance. (●) cDNA<sub>aev</sub>; (Δ) cDNA<sub>mc29</sub>; (○) cDNA<sub>amv</sub>; (—) cDNA<sub>mav</sub>.

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, macrophagelike cells, or myeloblasts (Graf et al., this volume; Gazzolo et al. 1979; Beug et al. 1979). (2) The properties of these sequences and their origin are reminiscent of results obtained earlier for the transforming *src* gene of ASVs, i.e. size, cellular origin, and phylogenetical stability (Stéhelin et al. 1978; Spector et al. 1978a,b). (3) As indicated by heteroduplex mapping studies with MC29 (Hu et al. 1979), 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 synthesized to maintain the undifferentiated state of transformed erythroblasts (Graf et al. 1978). (5) All DLVs tested contain the 5' region of the ALV genome (partial *gag* gene).

In the strains studied so far (MC29 and MH2), this region was located adjacent to the DLV-specific sequence (Mellon et al. 1978; Hu et al. 1979). In addition, cells nonproductively transformed by AEV, MC29, CM11, and MH2 express novel polyproteins with molecular weights of 75,000 (Hayman et al. 1979), 110,000 (Bister et al. 1977; Hayman et al. 1979a), 90,000 (Hayman et al. 1979a), and 100,000 (Hu et al. 1978), respectively, with the structure: partial *gag-x* or *gag-y*, where *x* or *y* represents polypeptide moieties that are antigenically unrelated to known ALV proteins and presumably correspond to part or all of the specific *erb* or *mac* nucleotide sequences. That these polyproteins could be involved in the transformation process is indicated by the finding that the type of tryptic peptide pattern exhibited by the non-*gag*-gene portion of the polyprotein of a given DLV closely correlates with the transformation specificity of the virus (Graf et al., this volume; M. J. Hayman, pers. comm.) In their general structure and in their ability to code for *gag*-gene-related polyproteins, avian DLVs resemble replication-defective mammalian retroviruses capable of inducing leukemias or sarcomas with a short latency period, such as the Abelson (Witte et al. 1978) murine leukemia virus and feline sarcoma virus (Stephenson et al. 1977; Sherr et al. 1978).

Avian DLVs behave like recombinants (Fig. 3) between an ALV-related vector virus of low oncogenicity and unknown origin (Frisby et al. 1979) and an evolutionary stable set of nucleotide sequences of cellular origin; in this regard they also closely resemble ASVs (for review, see Bishop 1978). The mechanism of such a recombination remains unclear, but it could be related to the jumping polymerase hypothesis proposed recently by Coffin (1979). How frequently such a recombination occurs is not known. Since the beginning of this century, about 30 DLV-like and one to three ASV-like independent isolates have been reported (Graf and Beug 1978). Recent studies by Hanafusa and coworkers (1977) have shown that

cellular *src* sequences can be rescued at high frequencies by infection of chicks with mutants of ASV partially deleted in the *src* gene. However, a transduction of cellular sequences may not necessarily lead to such dramatic effects as the generation of a highly oncogenic virus and therefore may be much more frequent than anticipated. In fact, we have recently found in one ASV stock a new virus containing apparently unknown cellular genetic material (N. Pluquet and D. Stéhelin, unpubl.).

That only a partial homology was observed between the specific sequences of MC29 and MH2, as well as the specific sequences of AMV and E26 (Table 3), can be explained in three ways: (1) These viruses acquired cellular genes that already differed in their sequence, or (2) they acquired the same gene and the observed differences reflect a divergence introduced by passage of the virus, or (3) a second recombination event happened in MH2 and E26. The finding that there are only one to 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<sub>amv</sub> to cellular DNA than for other types of specific cDNAs tested (Fig. 4) might reflect the long passage history of AMV and also would be in agreement with the second of the above interpretations. However, hybridization experiments performed between cDNA<sub>mc29</sub> and MH2 RNA in nonstringent conditions do not show a significant increase of annealing as the second interpretation would predict (M. Roussel et al., unpubl.) and thus leave that question open.

#### Possible Role in Leukemic Transformation of the Transforming Genes of DLVs and Their Cellular Counterparts

Recent studies with a temperature-sensitive mutant of AEV indicate that a viral gene product required for maintenance of transformation causes a block of differentiation in its hematopoietic target cells (Graf et al. 1978). This observation, together with the findings that DLVs can infect and are expressed in nontarget hematopoietic cells (Graf et al. 1979a and this volume) and that phylogenetically stable cellular sequences exist that are related to the oncogenes of DLVs, leads to the following hypothesis: The transforming genes of DLVs are homologous to normal cellular genes coding for lineage-specific hematopoietic differentiation proteins; the transforming proteins act by competitively inhibiting the corresponding cellular proteins (Graf and Beug 1978), thus leading to a block of differentiation and subsequent leukemogenesis. This hypothesis also provides an explanation for the target-cell specificity of DLVs and predicts that RNA sequences homologous to *erb*, *mac*, and *myb* are preferentially expressed in normal erythroblasts, macrophages, and myeloblasts, respectively. We are currently trying to purify hematopoietic target cells for DLVs in order to test this prediction. In this regard, it would also be interesting to

determine whether or not erythroblastosis occasionally induced after injection of chicken embryos with ALVs (Fredrickson et al. 1965) expresses increased amounts of *erb* RNA.

Another assumption of the hypothesis is that the oncogenes of DLVs represent modified versions of their cellular counterparts, as also proposed in general terms in Temin's provirus hypothesis (Temin 1971). Such a modification may have occurred by a fusion of the cellular oncogenes with an endogenous ALV or by an aberrant splicing of the transduced sequences, thus leading to oncogenicity. Preliminary experiments indicate that the cellular *erb*, *mac*, and *myb* genes occur in pieces and therefore are likely to be subject to splicing mechanisms (S. Saule et al., unpubl.).

The capacity of AEV-type viruses to induce sarcomas and of MC29-type viruses to induce carcinomas suggests an additional specificity of *erb* and *mac* genes for nonhematopoietic tissues. This intriguing specificity is difficult to explain by the differentiation block hypothesis, although it is interesting to note that normal fibroblasts, which can be transformed by AEV, MC29, and ASV but not by AMV, express higher levels of cellular *erb*, *mac*, and *src* sequences than of cellular *myb* sequences (see Fig. 6). It is still unknown whether or not DLVs code for only one gene responsible for transformation that could exert a pleiotropic effect on different types of target cells, as suggested by the experiments of Calothy et al. (1978) with ASV.

The complexity of the DLV-specific probes is between 1800 and 3700 nucleotides, depending on the viral strain, thus allowing in some cases for enough space to code for more than one gene. In fact, a mutant of AEV has now been isolated that has lost its capacity to transform erythroblasts but is still transforming fibroblasts (Graf et al. 1979a; Royer-Pokora et al. 1979). On the other hand, results obtained with the *ts34* mutant of AEV (Graf et al. 1978) suggest that a single mutation affects the transforming capacity of the virus for both erythroblasts and fibroblasts (Graf et al. 1979a). Clearly, more work is needed along these lines to resolve these observations.

If indeed DLV-induced leukemogenesis is the result of a competitive inhibition of a cellular differentiation protein by the viral transforming protein, spontaneous leukemogenesis may simply result from a malfunction of the latter. Our newly developed probes should be useful for determining whether or not cells from spontaneous leukemias express differentiation-specific sequences related to avian DLVs.

#### Acknowledgments

We thank Drs. B. Royer-Pokora and K. Bister for providing cells, N. Oker-Blom for OK10 virus, and M. Bellard and A. Therwath for cDNAs of globin and ovalbumin; M. B. Raes for technical assistance and N. Devassine for typing; and Drs. C. Sherr, R. Marusyk, and M. Hayman for helpful corrections and discussions. AMV polymerase, PRC RSV, and chicken

plasma were kindly provided by the National Cancer Institute (Office of Resources and Logistics). This work was made possible through support from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (ASR 1-018 and CRL 77-5-054-2), Centre National de la Recherche Scientifique (AI, ERA 225), Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (77-7-1879), and the Pasteur Institute of Lille.

## REFERENCES

- AIWINE, J. C., J. K. KEMP, and G. R. STARK. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5350.
- BEUG, H., A. V. KIRCHBACH, G. DODERLEIN, J. F. CONSIENCE, and T. GRAF. 1979. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of DLVs display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell* 18:375.
- BISHOP, J. M. 1978. Retroviruses. *Ann. Rev. Biochem.* 47:35.
- BISTER, K., M. J. HAYMAN, and P. K. VOGT. 1977. The defectiveness of avian myelocytomatosis virus MC29: Isolation of long term nonproducer cultures and analysis of virus specific polypeptide synthesis. *Virology* 82:431.
- CALOTHY, G., F. POIRIER, P. CRISANTI-COMBES, and B. PES-SAC. 1978. Induction of cell proliferation in chicken neuroretinal cells infected with avian oncoviruses: A genetic study. In *Avian RNA tumor viruses*, p. 122. Piccin, Padua, Italy.
- COFFIN, J. M. 1979. Structure, replication and recombination of retrovirus genomes: Some unifying hypotheses. *J. Gen. Virol.* 42:1.
- DUESBERG, P. H., P. K. VOGT, K. BISTER, D. TROXLER, and E. M. SCOLNICK. 1978. Oncogenic genes of sarcoma, leukemia and carcinoma viruses. In *Avian RNA tumor viruses*, p. 95. Piccin, Padua, Italy.
- REDRICKSON, T. N., F. PIRAINO, W. OKASAKI, and B. R. BURMESTER. 1965. Transmission of virus from field cases of avian lymphomatosis. II. Development of strains by serial passage in line 15 I chickens. *Avian Dis.* 9:82.
- RISBY, D. P., R. A. WEISS, M. ROUSSEL, and D. STÉHELIN. 1979. The distribution of endogenous chicken retrovirus sequences in the DNA of Galliform birds does not coincide with avian phylogenetic relationships. *Cell* 17:623.
- IAZZOLO, L., C. MOSCOVICI, M. G. MOSCOVICI, and J. SAMARUT. 1979. Response of hemopoietic cells to avian acute leukemia viruses: Effects on the differentiation of the target cells. *Cell* 16:627.
- GRAF, T. and H. BEUG. 1978. Avian leukemia viruses: Interaction with their target cells in vivo and in vitro. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 516:269.
- GRAF, T., N. ADE, and H. BEUG. 1978. Temperature-sensitive mutant of avian erythroblastosis virus suggests a block of differentiation as mechanism of leukaemogenesis. *Nature* 257:496.
- GRAF, T., A. V. KIRCHBACH, and H. BEUG. 1979a. Mechanisms of leukemogenesis and of target cell specificity by defective avian leukemia viruses: a hypothesis. In *Modern trends in human leukemia, III* (ed. R. Neth et al.), p. 429. Springer-Verlag, New York.
- GRAF, T., N. OKER-BLOM, T. G. TODOROV, and H. BEUG. 1979b. Transforming capacities and defectiveness of avian leukaemia viruses OK10 and E26. *Virology* 99:431.
- GRAF, T., B. ROYER-POKORA, G. E. SCHUBERT, and H. BEUG. 1976. Evidence for the multiple oncogenic potential of cloned leukaemia virus: *In vitro* and *in vivo* studies with AEV. *Virology* 71:423.
- GRAF, T., B. ROYER-POKORA, W. MEYER-GLAUNER, M. CLAVIEZ, E. GOTZ, and H. BEUG. 1977. *In vitro* trans-formation with avian myelocytomatosis virus strain CMII: Characterization of the virus and its target cells. *Virology* 83:96.
- HANAFUSA, H. C., C. C. HALPERN, D. L. BUCHHAGEN, and S. KAWAI. 1977. Recovery of avian sarcoma virus from tumors induced by transformation-defective mutants. *J. Exp. Med.* 146:1735.
- HAYMAN, M. J., G. KITCHENER, and T. GRAF. 1979a. Cells transformed by avian myelocytomatosis virus strain CMII contain a 90K gag-related protein. *Virology* 98:191.
- HAYMAN, M. J., B. ROYER-POKORA, and T. GRAF. 1979b. Defectiveness of avian erythroblastosis virus: Synthesis of a 75K gag-related protein. *Virology* 92:31.
- HU, S. S. F. and P. K. VOGT. 1979. Avian oncovirus MH2 is defective in gag, pol, and env. *Virology* 92:278.
- HU, S. S. F., M. M. C. LAI, and P. K. VOGT. 1979. Genome of avian myelocytomatosis virus MC29: Analysis by heteroduplex mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:1265.
- HU, S. S. F., C. MOSCOVICI, and P. K. VOGT. 1978. The defectiveness of Mill Hill 2, a carcinoma-inducing avian oncovirus. *Virology* 89:162.
- MELLON, P., A. PAWSON, K. BISTER, G. S. MARTIN, and P. DUESBERG. 1978. Specific RNA sequences and gene product of MC29 avian acute leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:5874.
- ROUSSEL, M., S. SAULE, C. LAGROU, C. ROMMENS, H. BEUG, T. GRAF, and D. STÉHELIN. 1979. Three new types of viral oncogenes of cellular origin specific for hematopoietic cell transformation. *Nature* 281:452.
- ROYER-POKORA, B., S. GREISER, H. BEUG, and T. GRAF. 1979. Mutant AEV with restricted target cell specificity. *Nature* 282:750.
- SHEINESS, D. and J. M. BISHOP. 1979. DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J. Virol.* 31:514.
- SHEINESS, D., L. FANSHIER, and J. M. BISHOP. 1978. Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J. Virol.* 28:600.
- SHERR, C. J., A. SEN, G. J. TODARO, A. SLISKI, and M. ESSEX. 1978. Pseudotypes of feline sarcoma virus contain an 85,000 dalton protein with feline oncornavirus-associated cell membrane antigen (FOCMA) activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:1505.
- SPECTOR, D. H., H. E. VARMUS, and J. M. BISHOP. 1978a. Nucleotide sequences related to the transforming gene of ASV are present in DNA of uninfected vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:4102.
- SPECTOR, D. H., K. SMITH, T. PADGETT, P. MCCOMBE, D. ROULLAND-DUSSOIX, C. MOSCOVICI, H. E. VARMUS, and J. M. BISHOP. 1978b. Uninfected avian cells contain RNA related to the transforming gene of avian sarcoma viruses. *Cell* 13:371.
- STÉHELIN, D. and T. GRAF. 1978. Avian myelocytomatosis and erythroblastosis viruses lack the transforming gene *src* of ASVs. *Cell* 13:745.
- STÉHELIN, D., M. ROUSSEL, and M. GARDES. 1978. The transforming gene of ASVs. In *Avian RNA tumor viruses*, p. 134. Piccin, Padua, Italy.
- STÉHELIN, D., R. V. GUNTAKA, H. E. VARMUS, and J. M. BISHOP. 1976a. Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *J. Mol. Biol.* 101:349.
- STÉHELIN, D., H. E. VARMUS, J. M. BISHOP, and P. K. VOGT. 1976b. DNA related to the transforming gene of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260:170.
- STEPHENSON, J. R., A. S. KHAN, A. H. SLISKI, and M. ESSEX. 1977. Feline oncornavirus associated cell membrane antigen: Evidence for an immunologically cross-reactive



- feline sarcoma virus-coded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**:5608.
- TAL, J., D. J. FUJITA, S. KAWAI, H. E. VARMUS, and J. M. BISHOP. 1977. Purification of DNA complementary to the *env* gene of ASV and analysis of relationship among the *env* genes of ALVs. *J. Virol.* **21**:497.
- TEMIN, H. M. 1971. The provirus hypothesis: Speculations on the significance of RNA-directed DNA synthesis for normal development and for carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **46**:3.
- WITTE, O. N., N. ROSENBERG, M. PASKIND, A. SHIELDS, and D. BALTIMORE. 1978. Identification of an Abelson murine leukemia virus-encoded protein present in transformed fibroblast and lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**:2488.

ARTICLE IV

THE GENOMES OF AVIAN MYELOBLASTOSIS VIRUSES AMV AND E26 :  
INSERTION OF RELATED SPECIFIC GENE SEQUENCES AT DIFFERENT LOCI.

M.ROUSSEL, D.LEPRINCE, A.BEGUE, H.BEUG\* AND D.STEHELIN.  
INSERM U 126. Oncologie Moléculaire, Institut Pasteur, 15 rue Guérin,  
59045 LILLE France.

\* Institut für Virusforschung, Deutsches Krebsforschungszentrum.  
Im Neuenheimer Feld 280, D 6900. HEIDELBERG. FRG.

Running title : Avian myeloblastosis viruses AMV and E26.

## ABSTRACT

The RNA genomes of two replication-defective avian myeloblastosis virus (AMV and E26) were analyzed by liquid and solid phase hybridization techniques performed with radiolabeled DNA transcripts representing different portions of the retro viral genomes. Both viral RNAs contain segments of helper virus genomes linked to AMV-specific sequences unshared by the helper viruses. These specific sequences have previously been shown to be of cellular origin (20)

. AMV virions contain 34S RNA representing myeloblast-associated viruses (MAV-1 and MAV-2) as well as a 32S RNA species containing the AMV-specific sequences. Cells productively or nonproductively transformed by AMV express the AMV related messenger RNA corresponding in size to the full-length 32S AMV genome ; in addition, a 20S subgenomic mRNA containing AMV-specific sequences is readily detected in AMV transformants and can be packaged into the virion. Cloned chicken fibroblasts productively infected with fresh plasma from AMV-sickened birds express also the 32S and 20S RNA molecules although the relative production of the subgenomic RNA species is comparatively diminished.

By contrast, cells nonproductively transformed by E26, and virions rescued from such cells, contain two RNA species of 30S and 28S which are detected with radio-labeled AMV-specific DNA transcripts. No subgenomic mRNA molecules analogous to the 20S AMV RNA were detected. Our results suggest that AMV-specific sequences have been recombined near the 3' end of AMV (probably in the env gene) and near the 5' end of E26 (in the gag gene). Thus, portions of the same transforming gene can recombine with helper virus genomes in two different sites.

INTRODUCTION

The BAI-A strain of avian myeloblastosis virus (AMV) causes acute myeloblastic leukemia within a short period of latency when innoculated into young chickens (2 ; 15) . In vitro, the virus can infect several types of cells, but apparently transforms only target cells of the myeloid lineage giving rise to myeloblast-like transformed cells (7 ; 15 ; 16)

. AMV is replication-defective and can be propagated only in pseudotypes formed by helper viruses like the replication-competent avian leukosis viruses (ALVs) (15)

. Stocks of standard AMV (strain BAI-A) isolated from the plasma of leukemic birds contain at least three different viruses which differ in their biological properties ; these include the authentic myeloblast transforming agent (AMV) as well as at least two helper viruses, the myeloblastosis associated viruses MAV-1 and MAV-2 (19 ; 22).

Among the known avian leukemia viruses, only one other isolate (the E26 strain) produces acute myeloblastosis (3) E26 is replication-defective but unlike AMV can transform both fibroplastic and hematopoietic cells in vitro (9) Both AMV and E26 are genetic recombinants containing portions of helper ALV viruses linked to additional sequences transduced from the DNA of normal chickens (20) . The latter sequences (designated myb) are not detected in the analogous recombinant genomes of other avian acute leukemia viruses, which produce erythroblastosis or myelocytomatosis, and therefore are likely to confer the property of myeloblast transformation.

To date, little is known about the genomic structure of these viruses, especially E26. We have now determined the sizes of AMV and



E26 genomes and measured the complexities of the intracellular messenger RNA species which appear in cells transformed by both isolates. Our studies show that AMV-specific sequences are organized differently within the two myeloblast transforming agents, and suggest that expression of putative transforming elements can be independently regulated by different viral genes.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses : Primary chicken embryo fibroblasts (CEF) were obtained from 11 day old C/E embryos of the Brown Leghorn flock. Productively and nonproductively transformed myeloblasts isolated after infection with the AMV complex and E26 (RAV-2) were prepared as described (3).

A nonproductively transformed AMV myeloblast clone (5YS) (17) was kindly provided by C.Moscovici. Plasma from AMV-infected birds was obtained from J.Beard (AMV-A and B) and selected pseudotypes, from R.Ishizaki (AMV-A) and from L.Gazzolo (AMV-B). We also used the myeloblastosis associated viruses MAV-1 (subgroup A) and MAV-2 (subgroup B) originally isolated by end point dilution from the latter two pseudotypes, as well as the replication competent strains td-Pr B and td-Pr C obtained originally from R.Junghans and P.K.Vogt, respectively. Plasma from E26 infected birds was from T.Graf and H.Beug, as well as the A-14 clone of chicken myeloblast productively transformed in vitro with E26 (RAV-2).

RNA extraction : For liquid hybridization analyses and synthesis of complementary DNA transcripts (cDNA), viral and cellular RNAs were prepared as previously described (24). For solid phase hybridization procedures, plasma from chickens infected with either AMV or E26 was diluted in 10 volumes of physiological saline, clarified by centrifugation (1000 xg for 10min), and virions were pelleted at 25,000 RPM for 45 min in a Beckman SW 27 rotor. The virions were disrupted in 0,02 M Tris HCL, pH 7.4, containing 0,6M NaCl 0.01 M EDTA and 0,5 % SDS and polyA-containing RNA was recovered by chromatography on oligo-dT-cellulose columns (Collaborative Research. Type IV) as described by Verma (28).

Cellular RNA was extracted from infected myeloblasts, concentrated under ethanol, dissolved, and chromatographed twice on oligo-dT-cellulose as above.

Molecular hybridization analyses : Liquid hybridization was performed as described ( 24 ) . For solid-phase analytic

procedures, RNA was denatured in glyoxal (13) , electro phoretically separated in agarose gels, and immobilized on DBM paper prior to hybridization to (<sup>32</sup>P)-labeled cDNA ( 1 ) . Northern blots were washed according to Wen Yang (personal communication) and hybrids scored by autoradiography.

Preparation of specific cDNA transcripts : Radiolabeled cDNA transcripts were synthesized in exogenous reactions using a 50-70S RNA template (AMV strain BAI-A), calf thymus primer, and purified AMV polymerase as previously described ( 26 ; 27 ) . After sonication, (10 mn, 75 watts, Branson Sonifier with small sonotrode, 4°), cDNA of 4-6S in size was selected by sedimentation in alkaline sucrose<sup>gradients</sup> and annealed with an excess of purified 70S RNA from ALV (td PrB) under conditions of low stringency (60° C, 1.2M NaCl, final Crt=25 mole-sec/l). The products were adsorbed to hydroxyapatite in 10 mM phosphate buffer, pH 6.8, containing 1.5 M NaCl (50° C), and single stranded DNA was eluted by a linear gradient of phosphate (0.1 M to 0.2 M) containing 1.5 M NaCl. This procedure effectively removed sequences related to td PrB RNA in a single step. The unhybridized cDNA (10-20% yield) was annealed to purified 70S RNA from MAV-2 (final Crt = 10 mole-sec/l), and reselected on hydroxyapatite as above. The residual single stranded DNA was then rehybridized under stringent conditions (68°C, 0.6 M NaCl) to 50-70S RNA from AMV at a limited Crt (1.0 mole-sec/l) to recover hybridizing sequences specific to the AMV genome. AMV-specific hybrids

100 µg/ml of proteinase K for 15 minutes at 37°C, and extracted with phenol. Viral RNA in the recovered duplexes was eliminated by alkaline hydrolysis (37°C, 0.6 M NaOH, 16 hours), and the AMV specific cDNA (denoted cDNA<sub>amv</sub>) was neutralized and concentrated under ethanol. DNA transcripts specific for the MAV-2 genome (cDNA<sub>mav</sub>) were obtained by recovering with 0.4 M phosphate the duplexes retained on hydroxyapatite in the second selection step. Concentrated duplexes were treated with S1 and hydrolyzed as described for the cDNA<sub>amv</sub>. The final yield of cDNA<sub>amv</sub> and cDNA<sub>mav</sub> transcripts were 2 % and 0.4 % of the starting radio-labeled cDNA and the complexities of these probes as determined by cDNA excess hybridization techniques (29) modified by S.Saule (in preparation) ca. 2000 and 1000 nucleotides respectively. Radiolabeled DNA transcripts complementary to different portions of the td-Pr B genome were prepared by analogous methods (S.Saule and D.Stehelin in preparation). Transcripts representing the complete td-Pr B genome (cDNA<sub>rep</sub>) and the viral env gene (cDNA<sub>env</sub>) were prepared as described (26). After a positive selection with RNA from the Bryan strain (env<sup>-</sup>) of Rous sarcoma virus, DNA:RNA duplexes containing DNA complementary to the gag, pol, and c-regions (cDNA<sub>gag-pol-c</sub>) were hydrolyzed in alkali, and the cDNA complementary to the c-region was removed by hybridization to 10S polyA- containing RNA of td-Pr B selected on a sucrose gradient. DNA complementary to gag sequences was then selected by hybridization to the RNA of cells nonproductively transformed with the myelocytomatosis virus MC-29 (4) that contains most of the gag sequences but no pol sequences (25). The unhybridized single-stranded DNA (designated cDNA<sub>pol</sub>) and the duplexed DNA (containing cDNA<sub>gag</sub>) were recovered on hydroxyapatite and treated as described above.

The complexities of cDNA<sub>gag</sub>, cDNA<sub>pol</sub>, cDNA<sub>env</sub>, and cDNA<sub>c-region</sub> were estimated to be 2000, 3000, 2200, and 330 nucleotides, respectively

Genetic content of the AMV and E26 genomes :

The RNA of myeloblasts nonproductively transformed with AMV was analyzed by hybridization with cDNA transcripts representing different portions of the ALV genome (Figure 1A). Transcripts complementary to the complete td-Pr B genome (cDNA<sub>rep</sub>) hybridized to a final extent of only 50 % with the RNA of these cells. A similar plateau value (59 %) was obtained using cDNA<sub>gag-pol-c</sub> representing the gag, pol, and c-regions of td-Pr B, while no significant hybridization was obtained with cDNA<sub>env</sub>. Thus, while AMV lacks a significant portion of the sequences present in td-Pr B RNA, it appears to retain viral sequences derived from the gag and pol genes.

In addition to sequences homologous to those of ALV, myeloblasts transformed by AMV express two other subsets of sequences (Figure 1A). These include the AMV-specific sequences which are also represented in the DNA of normal uninfected chicken cells (5 ; 20)

as well as sequences shared with the myeloblastosis-associated viruses, MAV-1 and MAV-2. The cDNA<sub>mav</sub> hybridizes to completion with RNA from cells infected with MAV-1 and MAV-2 but to less than 5 % with viral RNAs from Rous sarcoma virus (nd Pr B or nd Pr C) or the Rous-associated viruses (RAV-0, RAV-1 or RAV-2) - (data not shown). Kinetic analyses indicated that the Crt 1/2 values obtained with cDNA<sub>amv</sub> and cDNA<sub>mav</sub> were approximately two-fold lower than those obtained with the ALV-specific probes (see below).

The results of similar experiments performed with the RNA of myeloblasts nonproductively transformed with E26 were different from those obtained with AMV-transformed cells in several respects (Figure 1B)



First, the final extents of hybridization obtained with cDNA<sub>rep</sub> (35 %) and cDNA<sub>gag-pol-c</sub> (13 %) were comparatively lower, while cDNA<sub>env</sub> hybridized to a plateau value of 60 %. Thus unlike AMV, E26 appears to have lost the majority of the gag-pol sequences, but has retained some sequences related to the env gene. Second, although cDNA<sub>amv</sub> hybridized with the RNA of E26-transformed myeloblasts, only two-thirds of the AMV-specific sequences were detected. Finally, cDNA<sub>mav</sub> failed to hybridize to the RNA of these cells. Taken together, the above results suggest that while E26 and AMV share ca. two-thirds of the AMV-specific sequences, the two viruses appear to represent independent recombinants containing distinctly different portions of helper viral genomes. Further structural data were obtained at plateau hybridizations (Crt  $\geq$  5) with probes representing different viral sequences and are summarized in Table 1. From these experiments we estimate that the AMV genome contains a complete gag gene, over one-half of ALV-related pol sequences, all of the AMV-specific sequences ( 2000 nucleotides), and an additional 600 nucleotides specifically derived from MAV. By contrast, E26 appears to lack a majority of gag and all of pol but retains partial ALV-related env sequences and the majority of AMV-specific sequences ( 1350 nucleotides).

Size of the genome of AMV :

Virions purified from the plasma of chickens sickened with the AMV complex were disrupted and the poly-A containing RNA, selected on poly-dT-cellulose, was subjected to agarose gel electrophoresis under denaturing conditions, followed by northern blotting. Results on Figure 2 (panel A) show two viral RNA species. RNA molecules of 34S and 32S could be detected using either (<sup>32</sup>P)-labeled cDNA<sub>rep</sub> or cDNA<sub>mav</sub>. By contrast, only the 32S species hybridized to (<sup>32</sup>P) cDNA<sub>amv</sub>. These results indicate that the 34S RNA represents the genomes of the helper viruses while the 32S species represents the genome of the replication-defective AMV.

Two intracellular specific mRNAs in AMV infected cells.

Similar experiments were performed with cellular RNA. An analysis of intracellular poly A-containing RNA from AMV-transformed non producer (NP) myeloblasts (Figure 2, panel B) confirmed and extended our findings. Using cDNA<sub>rep</sub>, only a 32S RNA species was detected, consistent with the conclusion that the 34S RNA molecules isolated from infectious virions, represent helper genomes absent in NP cells. As expected, the 32S RNA was readily visualized after hybridization with cDNA<sub>amv</sub>. In addition, a smaller poly A-containing RNA species (20S) was detected with the cDNA<sub>amv</sub> (as a strong spot, panel B) as well as with MAV-specific cDNA (data not shown) but not with cDNA<sub>rep</sub>.

The detection of such an abundant subgenomic mRNA in AMV-transformed nonproducer cells is consistent with the somewhat lower Crt 1/2 values obtained with cDNA<sub>amv</sub> and cDNA<sub>may</sub> as compared with the values obtained with td-Pr B cDNA<sub>rep</sub> in Figure 1A.

Since AMV contains apparently a complete gac gene, we tested the possibility of AMV particles being produced by the "NP" 5YS myeloblasts. Indeed, this was the case and a northern blot performed on this virus, showed both the 32S and 20S RNAs into the virion (data not shown). We have no obvious explanation for the fact that AMV prepared from plasma does not show the 20S band in our hands despite repeated experiments. Productively transformed myeloblasts (panel C) and chicken embryo fibroblasts infected with AMV (panel D) also contained the two AMV-related 32S and 20S RNA molecules. The <sup>32</sup>P cDNAs used here were from another batch less successfully selected. Thus, in addition, these blots show the 34S helper viral RNA species and also some other minor bands. A comparison of the intensities of bands obtained with productively transformed myeloblasts and productively infected but apparently nontransformed fibroblasts suggested that the ratio of 20S to 32S RNA was greater

Genomic and intracellular E26 related RNAs

A similar approach was used to investigate the viral RNAs corresponding to E26. Figure 3 shows comparative solid phase hybridization analyses performed with the RNA of E26. Virions purified from the plasma of chickens with E26 (RAV-2)-induced myeloblastosis and blotted as described for AMV contained a single 34S RNA band corresponding to the helper viral genome (panel A), as detected with cDNA<sub>rep</sub>. Liquid hybridization analyses performed with this viral RNA preparation showed that helper viral sequences were present in a one hundred fold excess over sequences detected with cDNA<sub>amv</sub>. Thus, RNA species representing replication-defective E26 genomes could not be readily detected using td Pr B cDNA<sub>rep</sub>. However, when the same blot was hybridized to <sup>32</sup>P cDNA<sub>amv</sub>, two additional E26 specific bands of 30S and 28S species were seen in addition to the 34S helper genome still visible because of it's vast excess.

We also analyzed the cellular poly A-containing RNA purified from E26 (RAV-2) infected myeloblasts productively transformed *in vitro*. The northern blots in panel B show again the helper band with cDNA<sub>rep</sub>, and the two E26 specific bands at 30S and 28S (faint) with cDNA<sub>amv</sub> (the absence of the 34S band indicates that the helper is not in vast excess in these cells). In conclusion, again two viral RNAs are found in the E26 virion as well as in E26 infected and transformed myeloblasts

The seven leukemia virus strains of chickens now under intense investigation(10;25) have been classified into three different groups based on their propensity to transform different hematopoietic target cells ( 8 ). Of these, two independent isolates, AMV and E26, transform myeloblasts in vitro and induce myeloblastosis in vivo. To date, the structures of the AMV and specially the E26 genomes have been poorly characterized. Using AMV-specific cDNA, it was shown that each of these viruses contains a related subset of sequences, (myb), derived from normal chicken cells which appear to be responsible for myeloblast transforming activity. (20 ). It seemed likely that the genome of E26 would differ from that of AMV since E26 is also capable of transforming quail fibroblasts whereas AMV is not (9 ).

In the present study, AMV-specific cDNA (cDNA<sub>amv</sub>) was used to detect the AMV genome in different virus stocks and in AMV-infected cells. Full-length AMV RNA was found to be 32S in size, corresponding to a maximal complexity of approximately 7400 nucleotides. This value is in agreement with Chen et al (1980) and with a recent estimate of the size of putative AMV linear DNA intermediates (4.9 megadaltons) formed in cells acutely infected with the AMV complex, considering that the viral DNA is expected to differ in length from AMV RNA by the presence of an additional terminally redundant sequence of approximately 300-350 bases (23). The 32S RNA molecules were detected in myeloblasts productively and nonproductively transformed by AMV, in untransformed AMV (MAV)-infected fibroblasts, and in virions isolated from the plasma of AMV sickened chickens. In addition, a polyA-containing 20S RNA species (complexity 2500 nucleotides) was detected in AMV-infected cells suggesting that the AMV-specific sequences are localized in the 3'one-third of the AMV genome. This 20S RNA is

packaged into virions produced by myeloblasts, but unexpectedly we were unable to detect it in virions from the plasma of AMV sickened chickens, a finding that remains to be understood. The 20S species has also been seen by Gonda and Bishop (personal communication), but not by Chen et al. ( 5 ), who used 60-70S viral RNA in their experiments. This would suggest that the 20S RNA is not found in the 60-70S RNA complex and is lost upon purification.

AMV, MAV-1, and MAV-2 also contain another subset of specific sequences which were not detected in different strains of Rous sarcoma or Rous-associated helper viruses. The presence of 600 bases of "MAV-specific" sequences in the AMV genome leads us to postulate that AMV is a genetic recombinant formed with MAV (or a MAV-like virus) rather than with a Rous-associated helper virus like RAV1 or RAV2. Since both MAV-1 and MAV-2 contain a full complement of MAV-specific sequences ( 1000 bases), it is not possible to identify which helper virus in the AMV stock served as the parental virus in the events leading to the formation of AMV.

The presence of MAV-specific sequences in the 20S RNA species detected in AMV-infected cells shows that these are also localized in the 3' one-third of the AMV and probably MAV genomes. These results agree with those of Neiman and coworkers who originally demonstrated that the RNA genome of MAV2 differs from those of ALVs only at the extreme 3' termini (18 ). We therefore favor the interpretation that MAV-specific sequences are located distal to AMV-specific sequences at the extreme 3' end of AMV RNA. It would be interesting to determine whether or not the presence of MAV specific sequences correlates with the ability of MAV-1 and MAV2 to induce osteopetrosis in chicken.

Based on these findings, it would be expected that sequences in the 5' two-thirds of the AMV genome would be derived from the MAV helper



nonproductively transformed by AMV showed that sequences found at the 5' end of helper virus genomes are conserved in AMV. These include the complete gag gene and at least a major portion of pol sequences. By contrast, AMV lacks detectable ALV-related env sequences.

Reproducible data were obtained by blotting studies which showed that subgenomic 20S AMV RNA could not be detected using PrBtd cDNA<sub>rep</sub> transcripts although full length 32S AMV RNA was readily scored. This is consistent with the hypothesis of 20S RNA being a spliced messenger RNA that could have the leader 5' sequences linked to AMV-specific and MAV-specific sequences, no env related sequences and the 3'c and poly A stretch (structure : 5' - (myb-MAV)-c-poly A-3'). The calculated complexity of such a molecule is consistent with the 20S size found experimentally.

..Based on measurements of the complexity of the various cDNA probes used, we can account for ca. 6800 out of 7400 nucleotides in the AMV genome. The discrepancy of 600 nucleotides presumably reflects the selection techniques used in preparing the different cDNA transcripts. It therefore seems most likely that the order of genes in AMV RNA is 5' gag-pol-(myb-MAV)c-poly A-3' where the AMV-specific sequences (myb) have recombined at the level of the env region.

Unlike AMV, E26 lacks the majority of the gag gene and all detectable ALV-related pol sequences but retains a major portion of the ALV env gene. The inability to detect cDNA<sub>MAV</sub>-related sequences in E26 also suggests that the helper viral sequences represented in these genomes are derived from a non-MAV helper, presumably a "standard" ALV like virus. Again, the gels show a subgenomic 28S polyadenylated RNA present in infected cells as well as in the virus prepared from myeloblasts and here also, unlike for AMV, in the plasma from E26 sickened birds.

. This species that is detected by cDNA<sub>amv</sub>, has not been characterized further but could correspond to a spliced mRNA.

Although we estimate the maximal complexity of E26 RNA to be  $\sim 6200$  bases, corresponding to the larger (30S) RNA species detected in E26 virions and in infected cells, we can only account for up to 4400 nucleotides with the cDNA transcripts employed in the present studies. The discrepancy of at least 1800 nucleotides cannot be explained by technical considerations and must reflect the presence of unknown sequences (noted "Y") in E26 RNA unrelated to any of the sequences characterized so far in avian retroviruses. These Y sequences could be of cellular origin ; in this case, it would be interesting to know if they are located next to the cellular myb (c-myb) sequences or if they originated from another domain of cellular DNA, involving thus two distinct recombination events for the formation of the E26 virus. The function of these Y sequences remains unknown, but it is tempting to speculate that they could account for the fact that E26, but not AMV, can transform quail fibroblasts (9).

From our data, the possible structure of the E26 30S RNA could be 5'-gag- (myb-Y)-env-c-polyA-3', but we cannot exclude a different gene order. The E26 subgenomic 28S RNA could then account for a complexity corresponding to the spliced structure 5'- (myb-Y)-env-c-polyA-3'.

Not much is known so far about the products of the different viral mRNAs corresponding to AMV and E26. For AMV, there is apparently no gag-onc fusion protein made in the infected cell (Hayman and Graf, personal communications), but a Pr 76 gag product that could account for the fact that AMV is in fact produced (but not infectious) in the culture fluids of so-called non producer cells (observation of the authors). Thus, it is likely that the putative transforming protein is made from the 20S mRNA, but no clean translation patterns have as yet been obtained in vitro. In this respect, AMV would then be analogous to Moloney MSV (6), or to spleen focus forming virus (21). For E26, the picture is not much clearer. As for other acutely transforming leukemia

Hayman, personal communication), that could represent the product of the 30S mRNA and would correspond to both myb and Y sequences. Indeed, the putative product of the 28S subgenomic mRNA of E26 has not been identified. The existence of such a second mRNA could correspond to the requirement of a different reading frame to produce a biologically active Y product.

Despite all these uncertainties, it is clear that AMV and E26 represent two different viruses that have coopted at least partially related portions of the same cellular gene (c-myb) and recombined these with helper viral sequences in different ways. If this is the gene involved in the induction of myeloblastosis, we can conclude that the product of this gene can be active as a non-gag protein in AMV and also as a gag-onc fusion protein in E26. But it is striking to note the presence for both viruses of a second set of nucleotide sequences (MYV-sequences in AMV, and Y sequences in E26). This could be a coincidence of no biological significance. But it could also mean that indeed two genes are required to induce myeloblastosis. If true, it may then be wondered if AMV and E26 have strictly the same target cells in the induction of the myeloid disease.

ACKNOWLEDGMENTS

- 16 -

We thank Drs T.Graf, C.Moscovici for providing cells, Drs J.Beard, L.Gazzolo, R.Ishizaki, R.Junghans and P.Vogt for providing viruses, C.Lagrou and M.B.Raes for technical assistance, Drs S.Saule, A.Sergeant and C.J.Sherr for helpful corrections and discussions.

AMV polymerase, PR-RSV B and chicken plasma were kindly provided to us through 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 (77-7-1978) and the Pasteur Institute of Lille.

- 1 - Alwine, J.C., Kemp, J.K. and Stark, G.R. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl - paper and hybridization with DNA probes. Proc. Natn. Acad Sci. U.S.A. 74 : 5350
- 2 - Beard, J.W. 1963. Avian virus growths and their ethiological agents. Adv. Cancer Res. 7 : 1-27
- 3 - Beug, H., v. Kirchbach, A., Doderlein, G., Conscience, J.F. and Graf, T. 1979. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. Cell 18 : 375-390
- 4 - Bister, K., Hayman, M.J. and Vogt, P.K. 1977. The defectiveness of avian myelocytomatosis virus MC29 : isolation of long term non producer cultures and analysis of virus specific polypeptide synthesis. Virology 82 : 431-448
- 5 - Chen, J.H., Moscovici, M.G. and Moscovici, C. 1980. Isolation of complementary DNA unique to the genome of avian myelocytomatosis virus (AMV). Virology 103 : 112-122
- 6 - Donoghue, D.J., Sharp, P.A. and Weinberg, R.A. 1979. An MSV-specific subgenomic mRNA in MSV-transformed G8-124 cells. Cell 17 : 53-63
- 7 - Gazzolo, L., Moscovici, C. and Moscovici, M.G. 1979. Response of hemopoietic cells to avian acute leukemia viruses : effects on the differentiation of the target cells. Cell 16 : 627-638
- 8 - Graf, T. and Beug, H. 1978. Avian leukemia viruses. Interaction with their target cells in vivo and in vitro. Biochim. Biophys Acta 516 : 269-299
- 9 - Graf, T., Oker-Blom, N., Todorov, T.T. and Beug, H. 1979. Transforming capacities and defectiveness of avian leukemia viruses OK10 and E26. Virology 99 : 431-436.



- 10 - Graf, T., Beug, H., v; Kirchbach, A and Hayman, M.J. 1980. Three new types of viral oncogenes in DLVs : biological, genetical and immunochemical evidence. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 44 (in the press).
- 11 - Hayward, W.S. 1977. Size and genetic content of viral RNAs in avian oncovirus-infected cells. J. Virol. 24 : 47-63
- 12 - Leong, J.A., Garapin, A.C., Jackson, J., Fanshier, L., Levinson, W. and Bishop, J.M. 1972. Virus specific ribonucleic acid in cells producing Rous sarcoma virus : detection and characterization. J. Virol. 9 : 891-902
- 13 - Mc Master, G.K. and Carmichael, G.G. 1977. Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 : 4835-4838
- 14 - Moscovici, C. 1975. Leukemic transformation with avian myeloblastosis virus : Present status. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 71 : 79-101
- 15 - Moscovici, C., Gazzolo, L. and Moscovici, M.G. 1975. Focus assay and defectiveness of avian myeloblastosis virus. Virology 68 : 173-181
- 16 - Moscovici, C., Gazzolo, L. and Moscovici, M.G. 1978. Avian acute leukemia viruses : transforming ability in vitro. Microbiologica 1 : 1-13
- 17 - Moscovici, M.G. and Moscovici, C. 1979. AMV-induced transformation of hemopoietic cells : growth patterns of producers and non producers. Symposium in Erythropoiesis and differentiation in friend leukemia cells. Urbino Italy 10-14 October 1979.
- 18 - Neiman, P.E. 1978. Mapping by competitive hybridization of sequences which differ between endogenous and exogenous chicken leukosis viruses. Virology 85 : 9-16

- 19 - Ogura, H., Gelderblom, H. and Bauer, H. 1974. Isolation of avian nephroblastoma virus from avian myeloblastosis virus by the infectious DNA technique. *Intervirology* 4 : 69-76
- 20 - Roussel, M., Saule, S., Lagrou, C., Rommens, C., Beug, H., Graf, T. and Stehelin, D. 1979. Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature (London)* 281 : 452-455
- 21 - Ruscetti, S., Troxler, D., Linemeyer, D. and Scolnick, E. 1980. Three laboratory strains of SFFV : comparison of their genomes and translational products. *J. Virol.* 33 : 140-151
- 22 - Smith, R.E. and Moscovici, C. 1969. The oncogenic effects of non transforming viruses from AMV. *Cancer Res.* 29 : 1356-1366
- 23 - Souza, L.M., Komaromy, M.C. and Baluda, M.A. 1980. Identification of a proviral genome associated with avian myeloblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 : 3004-3008
- 24 - Stehelin, D. and Graf, T. 1978. Avian myelocytomatosis and erythroblastosis viruses lack the transforming gene src of avian sarcoma viruses. *Cell* 13, 745-750
- 25 - Stehelin, D., Saule, S., Roussel, M., Lagrou, C. and Rommens, C. 1980 Three new types of viral oncogenes in DLVs : viral nucleotide sequences correlating with distinct phenotypes of virus-transformed cells. *Cold Spring Harbor Symp on Quant. Biol* 44 : (in the press).
- 26 - Tal, J., Fujita, D.J., Kawai, S., Varmus, H.E. and Bishop, J.M. 1977 Purification of DNA complementary to the env gene of ASV and analysis of relationship among the env genes of ALVs. *J. Virol.* 21 : 497-505.
- 27 - Taylor, J.M., Illmensee, R. and Summers, J. 1976. Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase. *Biochim. Biophys*

28 - Verma, I.M. 1978. Genome organization of RNA tumor viruses :

In vitro synthesis of full genome-length single-stranded  
and double-stranded viral RNA transcripts. J. Virol 26 : 615-629

29 - Young, B.D., Harrison, P.R., Gilmour, R.S., Birmie, G.D., Annahell, S.,  
Humphries, S. and Paul, J. 1974. Kinetic studies of gene frequency  
II Complexity of globin complementary DNA and its hybridization  
characteristics. J.Mol.Biol. 84 : 555-568

| RNA tested      | HYBRIDIZATION <sup>a</sup> (% S1 resistance) with <sup>3</sup> H : |                           |                           |                            |                           |                           |
|-----------------|--|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                 | cDNA <u>gag</u><br><sup>b</sup><br>(2000)                          | cDNA <u>pol</u><br>(3000) | cDNA <u>env</u><br>(2200) | cDNA " <u>c</u> "<br>(330) | cDNA <u>amv</u><br>(2000) | cDNA <u>mav</u><br>(1000) |
| td Pr B (virus) | 100 <sup>c</sup>   | 100                       | 100                       | 100                        | <3                        | <3                        |
| AMV (NP cell)   | 100  | 60                        | <3                        | 35                         | 100                       | 60                        |
| E26 (NP cell)   | 27   | <3                        | 60                        | NT <sup>d</sup>            | 68                        | <3                        |

a) Hybridizations were performed in stringent conditions (NaCl 0.6 N, 68°) as described in the methods section. Plateau values are at Crts of  $\geq 10 \text{ Mxsec}^{-1}$  for td Pr B and at  $10^4 \text{ Mxsec}^{-1}$  for cell RNAs. c) Percent annealings were standardized to 100 % for homologous hybrids. Complexities of the probes are given in nucleotides in parenthesis under each cDNA. d) NT = not tested.



**Fig. 1** Genetic content of AMV and E26.

Total RNA extracted from in-vitro transformed AMV myeloblasts (panel a, pool of multiple clones) or E26 myeloblasts (panel b, single clone A14) was hybridized to different cDNAs by varying RNA concentrations. Hybrids were formed in stringent conditions (0.6 N NaCl) and assayed with S1 nuclease as described previously (24). Symbols are : cDNA<sub>rep</sub> (○) ; cDNA<sub>env</sub> (△) ; cDNA<sub>gag-pol-c</sub> (◻) ; cDNA<sub>amv</sub> (●) and cDNA<sub>mav</sub> (■).

**Fig. 2** RNA blots of AMV in the plasma or in infected cells.

Total RNAs extracted and poly-A selected were separated on agarose gels, transferred to activated DBM paper and hybridized with (<sup>32</sup>P) cDNA probes (cDNA<sub>rep</sub>, cDNA<sub>amv</sub>, cDNA<sub>mav</sub>) as described in the methods section. Gels were standardized with ribosomal and viral markers.

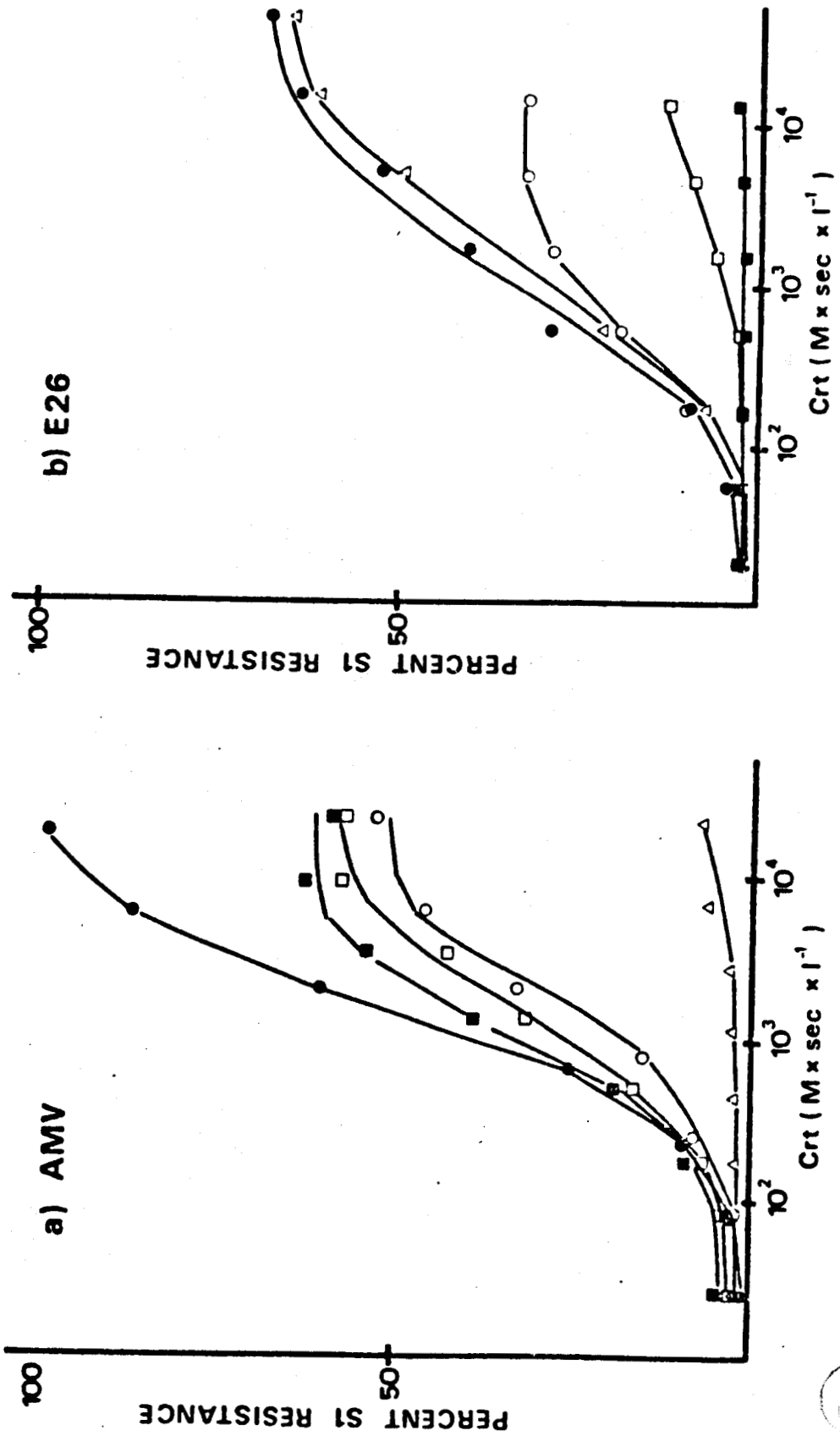
A : viral RNA extracted from plasma of AMV sickened chickens ; B : cellular RNA in AMV transformed, non-producer chicken myeloblasts 5 Y S ; C : cellular RNA from AMV in-vivo transformed producer myeloblasts ; D : cellular RNA from chicken fibroblasts infected with the AMV complex from chicken plasma.

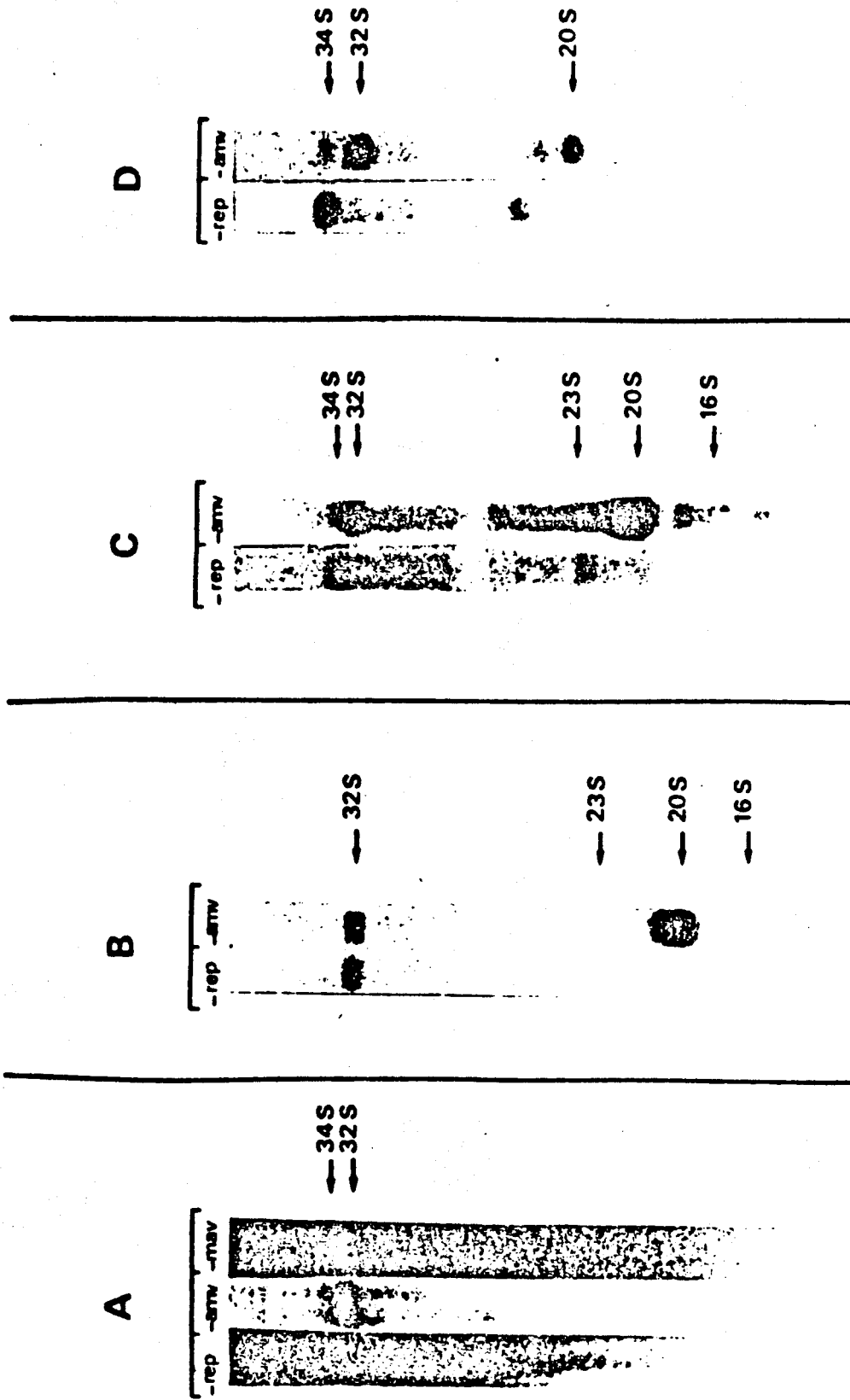
**Fig. 3** RNA blots of E26 in the plasma or in infected cells.

Total RNAs extracted and poly-A selected were treated as described for figure 2. A : E26 (RAV-2) RNA from the plasma of E26 sickened chickens ; B : RNA extracted from E26 (RAV-2) in-vitro transformed chicken myeloblasts (clone A 14).

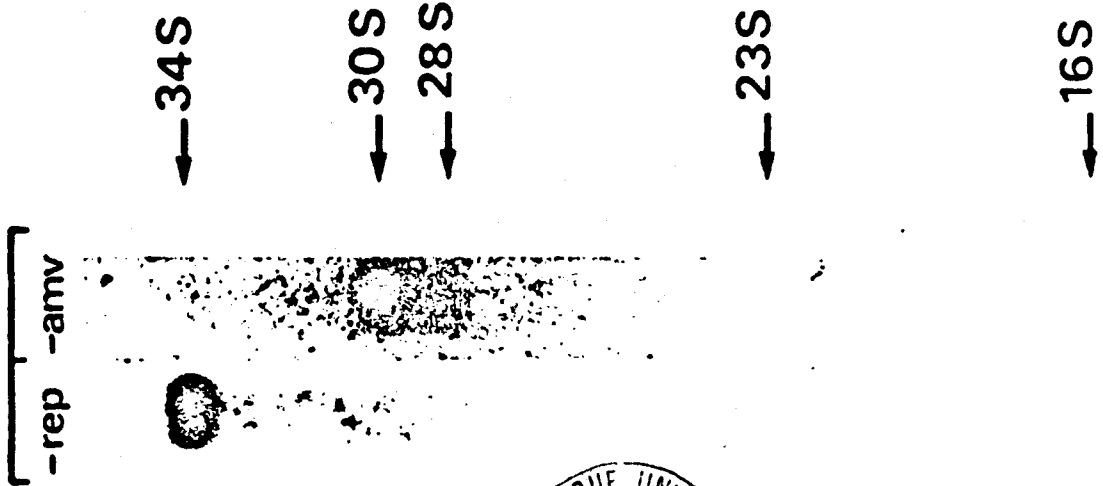


FIG 1

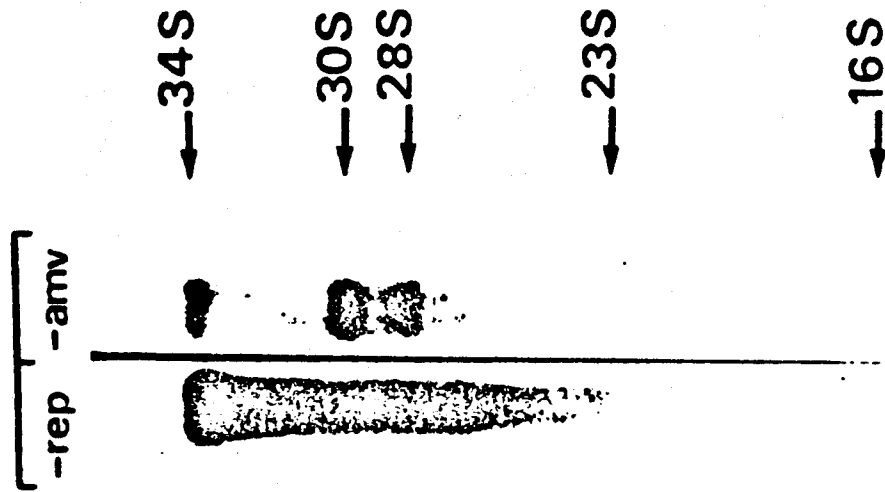




B



A



## R É S U M É

Les travaux décrits dans cette thèse comportent deux parties.

L'auteur montre d'abord que le rétrovirus endogène du poulet (RAV-0), que l'on croyait présent dans toutes les espèces du genre Gallus, n'existe pas dans le génome des espèces exotiques Gallus Sonnerati, Varius et Lafayettei, bien que des cellules de tels poulets soient hautement susceptibles à l'infection par le virus RAV-0. Ces séquences ne jouent donc pas de rôle essentiel dans le développement de ces différentes espèces aviaires, ainsi que cela avait été proposé par d'autres auteurs.

Dans une seconde partie, l'auteur démontre que les rétrovirus des leucémies aiguës aviaires comportent au moins trois gènes oncogènes distincts responsables de leur pouvoir transformant. Il démontre ensuite que ces gènes viraux sont en fait des gènes cellulaires transduits par des rétrovirus, que ces gènes cellulaires sont stablement conservés au cours de la phylogénie des vertébrés supérieurs, et qu'ils se retrouvent même dans les chromosomes des mammifères, y compris chez l'homme.

Ces travaux ont constitué un apport conceptuel important concernant les mécanismes de cancérogénèse, en montrant que des gènes cellulaires normaux, transduits par des virus-vecteurs et réinsérés par infection dans la cellule hôte, ont acquis un puissant pouvoir cancérogène qui suffit à l'initiation et au maintien de la transformation.

## M O T S C L E F S

- VIRUS AVIAIRE / VIRUS ONCOGENE
- VIRUS ONCOGENE / VIRUS AVIAIRE
- VIRUS ONCOGENE / LEUCEMIE AIGUË
- LEUCEMIE AIGUË / VIRUS ONCOGENE
- HYBRIDATION MOLECULAIRE