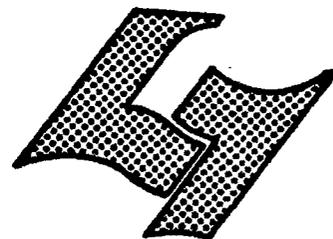


UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON-I  
43. Boulevard du 11 Novembre 1918  
69621 VILLEURBANNE



# Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées

## informatique documentaire



### \* NOTE DE SYNTHÈSE

Réalisée à la demande de Monsieur BLANCHET,  
Professeur au Département de Biologie Générale  
Appliquée à l'Université Claude Bernard - LYON I.

**MECANISMES DE L'ONCOGENESE DES VIRUS  
DES LEUCEMIES AVIAIRES ET MURINES**

**AUTEUR :** Catherine EXCOFFON

**DATE :** Octobre 1982

DESS  
1982  
2  
A

<b><u>INTRODUCTION</u></b>		<b>1</b>
<b>CHAPITRE I</b>	<b><u>RECHERCHE DOCUMENTAIRE AUTOMATISEE</u></b>	
	Stratégie de recherche	2
	Interrogation à partir du terminal	7
	Conclusion.	16
<b>CHAPITRE II</b>	<b><u>NOTE DE SYNTHESE</u></b>	<b>17</b>
	<b>1 - <u>Principales caractéristiques des Rétrovirus</u></b>	<b>18</b>
	1. Homogénéité structurale	18
	2. Génome	18
	3. Intermédiaire DNA intégré	19
	4. Transcriptase réverse virale	20
	5. Etudes préliminaires de la transcription de l'ADN viral	22
	6. Pouvoir transformant	25
	7. Mécanisme de l'oncogénèse : hypothèses.	31
	<b>2 - <u>Mécanisme de l'intégration de l'ADN viral : données récentes</u></b>	<b>34</b>
	1. Etude des intermédiaires DNA viraux non intégrés	35
	A. Mise en évidence de deux types d'intermédiaires	35
	B. Enzymes de restriction	39
	C. Intermédiaire linéaire cytoplasmique	39
	D. Intermédiaire circulaire nucléaire.	52
	2. Etude du DNA viral intégré	53
	A. Analyse du provirus ASV	53
	B. Sites d'intégration des virus M-MuLV	55
	C. Interprétation.	57
	<b>3 - <u>Etude des LTR</u></b>	<b>60</b>
	1. Technologie des DNA recombinants	60
	2. Clonage et analyse de la séquence nucléotidique des LTR.	64
	<b>4 - <u>Mécanisme de l'oncogénèse des virus des leucoses aviaires (ALV)</u></b>	<b>78</b>
	1. Structure du provirus ALV	78
	2. Rôle de la LTR dans l'oncogénèse ALV	78
	3. Analyse des DNA et RNA spécifiques des tumeurs induites par ALV	80
	4. Mécanisme de l'oncogénèse induit par ALV.	84
<b>CHAPITRE III</b>	<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b>87</b>

A la différence des autres virus tumoraux à ARN, les virus qui induisent des leucoses chez le poulet ou leucémies chez la souris, ne possèdent apparemment pas "d'oncogène" ou "gène transformant".

Par quel mécanisme alors, ces virus produisent-ils, des tumeurs cancéreuses ?

Il semblerait que l'intégration de l'ADN viral en un site spécifique de l'ADN de la cellule hôte infectée, provoque l'expression d'un gène cellulaire adjacent, normalement réprimé pendant la vie adulte et qui n'aurait fonctionné que pendant la vie embryonnaire ou post-embryonnaire. Son expression entraînerait alors, un dérèglement cellulaire à l'origine du développement de la leucémie.

De récentes techniques de la biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence la Répétition d'une Longue séquence nucléotidique Terminale (LTR) de part et d'autre de l'ADN viral intégré ou non. Celle-ci, contiendrait le promoteur de la transcription des gènes viraux et pourrait aussi, à partir du même promoteur situé dans l'autre LTR, initier la transcription d'une séquence de l'ADN cellulaire.

Ce mécanisme d'oncogénèse déclenché par cette seule séquence virale non codante, expliquerait pourquoi l'origine virale, pourtant probable, de la leucémie humaine, n'ait pu encore être démontrée.

Il aurait aussi des conséquences importantes pour les mécanismes de carcinogénèse non virale.

CHAPITRE I

RECHERCHE DOCUMENTAIRE

AUTOMATISEE

\* \*

\*

Une recherche rétrospective sur les virus des leucémies animales et en particulier le mécanisme d'oncogénèse qu'ils déclenchent m'a été proposée par Monsieur BLANCHET.

Une présentation orale du sujet de sa part et un article sur les tumeurs induites par les virus des leucoses aviaires (Neel B.G. et al, 1981) ont constitué le point de départ de ma note de synthèse (cf. introduction).

Afin de rassembler rapidement une documentation la plus complète possible sur le sujet, la recherche documentaire a été effectuée grâce à l'interrogation, à partir d'un terminal, de bases de données bibliographiques biomédicales. (Janvier 1982). Etant donné le coût de telles interrogations, une bonne stratégie de recherche est indispensable.

## STRATEGIE DE RECHERCHE

### FORMULATION DE LA QUESTION

Parmi les nombreuses références bibliographiques recensées dans la base interrogée, il s'agit d'extraire toutes celles ayant trait aux documents qui traitent des tumeurs induites par les virus des leucémies animales et du mécanisme de l'oncogénèse de ces virus.

"Tumeur", "oncogénèse", sont des mots très généraux, peut être même, non significatifs dans une base spécialisée sur le cancer. La plupart des documents de la base de données doivent les contenir et il est peu probable qu'ils aient été retenus comme mots clés dans leur indexation.

- Le sujet porte en fait sur l'étude des virus qui induisent ces tumeurs. Il faut donc chercher à définir l'ensemble de ces virus. C'est la première difficulté rencontrée car leur classification a évolué au fur et à mesure de l'avancement des recherches.

./...

Les virus des leucémies animales ne possèdent apparemment pas d'oncogène et ne sont infectieux que de façon chronique, mais ces caractéristiques ne les ont pas vraiment distingués de l'ensemble des virus oncogènes à RNA dont le prototype est le virus du sarcome de Roux (R.S.V.).

Ces virus tumoraux anciennement leucovirus sont appelés aujourd'hui Rétrovirus. Les virus des leucémies et sarcomes aviaires et murins constituent à l'intérieur de cette famille, les Oncornavirus.

Quels mots-clés choisir pour rassembler les documents concernant les virus des leucémies ?

Enumérer un à un tous ces virus sur le terminal tels qu'ils sont recensés dans les lexiques ou thésaurus est une mauvaise solution : d'une part ces virus sont nombreux et on risque d'en oublier, ils sont longs à écrire (ex : virus leucose aviaire, virus leucémie murine Moloney ...), et l'interrogation devient coûteuse ; d'autre part, on excluerait des documents de base sur les retrovirus aviaires en général ou sur le virus du sarcome de Roux par exemple.

Une exclusion du type ONCORNAVIRUS SAUF VIRUS DES SARCOMES en utilisant l'opérateur booléen SAUF est donc impensable en raison de l'interdépendance des études menées sur ces différents types de virus.

En fait, la seule solution est de recourir aux termes plus généraux, Rétrovirus ou Oncornavirus en sachant que l'on obtiendra de nombreux documents concernant le virus des sarcomes ou carcinomes en plus de ceux recherchés.

L'utilisation de l'un de ces termes est d'ailleurs obligatoire dans le cas où il existe un thésaurus.

- Le mécanisme de l'oncogénèse particulier aux virus des leucémies a été déduit en réalité du mécanisme d'intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte et notamment de l'étude des DNA intermédiaires viraux produits avant l'intégration.

./...

Ces études ont conduit à la découverte de séquences nucléotidiques répétées de part et d'autre de l'ADN viral, du même type que celles trouvées dans les éléments transposables de l'ADN des cellules eucaryotes ou procaryotes.

## RECHERCHE DES DESCRIPTEURS

### - Interrogation de la base de données : PASCAL

La prise de conscience de la nécessité de rechercher des descripteurs précis a résulté d'une première interrogation succincte, effectuée en travaux pratiques, lors de l'enseignement de l'interrogation de bases de données bibliographiques.

Cette interrogation fut une étape dans l'établissement de ma stratégie de recherche et ne fait pas partie de l'interrogation proprement dite.

Sur le serveur alors en ligne, celui de l'Agence Spatiale Européenne (A.S.E.) et parmi les bases de données qu'il propose, deux étaient intéressantes pour le sujet : BIOSIS et PASCAL.

Pour une première tentative, mon choix s'est porté sur la base PASCAL, parce qu'elle est produite par INFORMASCIENCE, le centre de documentation scientifique et technique du CNRS, parce qu'elle fait une large part à la littérature européenne et qu'enfin la consultation peut se faire aussi bien en langage libre qu'à l'aide de descripteurs contrôlés rassemblés dans un lexique.

Pour la recherche des articles sur les virus à ARN tumoraux qui s'intègrent sous forme de provirus, les ensembles sélectionnés ont été :

(Le langage d'interrogation de l'A.S.E. étant le langage QUEST).

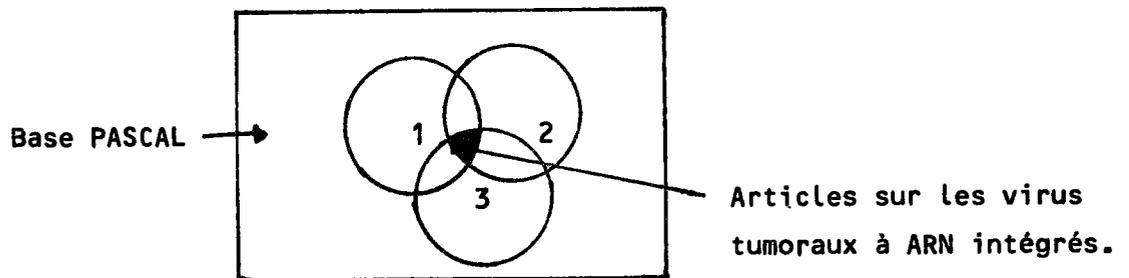
./...

- 1) S TUMEUR ? ;
- 2) S VIRUS A ARN ;
- 3) S PROVIRUS ;

et en posant la question sous la forme logique :

- 4)  $C 1 * 2 * 3$  ;

19 références d'articles ont été obtenues.



Résultats : 15 références correspondaient à des articles parus entre 1973 et 1976 et 4 seulement entre 1977 et 1980 (dont un en russe).

En fait, les articles qui semblaient les plus pertinents figuraient parmi les plus anciens, et ne pouvaient donc se rapporter aux très récentes études sur les Longues Répétitions Terminales (LTR) des provirus intégrés.

De plus, aucun article ne se référait spécifiquement à un virus des leucémies murines ou aviaires en dehors des articles attendus sur le RSV ou virus tumoraux aviaires en général, et à la seconde question posée, après la sélection de 2 autres ensembles :

- 5) S VIRUS LEUCOSE AVIAIRE ;
- 6) S VIRUS LEUCEMIE MOLONEY ;
- 7)  $C 1 * (5 + 6) * 3$  ;

Sur les 5 références obtenues, 2 seulement concernaient vraiment les virus des leucoses aviaires. (Neiman et al 1980, Neiman et al 1975).

./...

Les autres non pertinentes, traitaient des virus de la leucémie aviaire aiguë (DLV, virus de la myeloblastose, etc ...) et faisaient simplement référence aux virus recherchés.

Exemple :

"comparison of an avian osteopetrosis virus with an avian lymphomatosis virus by RNA - DNA hybridization" SMITH R.E. et AL 1976.

Il se dégage de cette interrogation que les études effectuées sur le mécanisme d'intégration des virus tumoraux à ARN ou sur leur forme provirale ont porté sur deux périodes de temps dont la limite approximative est 1977.

Avant d'envisager une restriction sur la date, il restait la possibilité de trouver des descripteurs plus appropriés.

L'analyse de la zone "mot-clé" des références obtenues montre que SITE D'INTEGRATION est préférable à PROVIRUS ou même INTEGRATION et INTEGRATION MOLECULAIRE.

- Consultation des bibliographies : Biological Abstracts (B.A.) et Index Medicus (I.M.)

La consultation manuelle de ces bibliographies scientifiques donne une idée, pour les articles qu'elles recensent, de l'indexation qui est faite et des descripteurs à utiliser.

Pour l'article de NEEL B.G. (1981), repéré dans l'index des auteurs des B.A., les principaux mots-clés retenus, sont : ONCORNAVIRUS, VIRAL INTEGRATION SITES, AVIAN LEUKOSIS VIRUS, PROMOTER INSERTION.

Les articles répertoriés dans la partie "SUBJECT" des I.M., le sont sous des listes de mots-clés.

Et sous chacun d'eux, existe une série de rubriques utiles pour étudier un sujet sous un ou deux points de vue et donc le délimiter.

Exemple :

LEUKOVIRUSES : Analysis  
-  
-  
Genetics  
Physiology ./. . . .

## STRATEGIE DE RECHERCHE

Sur l'ensemble des virus étudiés, il faut donc réunir tous les documents qui traitent des DNA intermédiaires, ou du site d'intégration viral, ou de la séquence nucléotidique des Longues Répétitions Terminales et éventuellement de l'insertion d'un promoteur ou des éléments transposables, soit :

- 1) Virus tumoraux à ARN 

{	Oncornavirus
	Leucovirus
	Rétrovirus
	Oncovirus.
- 2) DNA intermédiaire(s)
- 3) site(s) d'intégration
- 4) séquence nucléotidique et Longue Répétition Terminale
- 5) Insertion promoteur
- 6) Element(s) transposable(s).

Avec l'équation de recherche suivante :

- 7) 1 et (2 ou 3 ou 4 ou 5 ou 6).

## INTERROGATION A PARTIR DU TERMINAL

### - CHOIX DES BASES INTERROGEES

Il existe de nombreuses bases de données biomédicales automatisées. Cette recherche documentaire ne nécessitant pas l'exhaustivité à tout prix, mais plutôt une bonne sélection des articles existant sur le sujet, il était effectivement important de bien choisir les bases à interroger.

Une base spécialisée sur le cancer (CANCERNET, CANCER LINE) semblait à priori toute indiquée. En fait, le sujet proposé, "Mécanisme de l'oncogénèse des virus des leucémies aviaires et murines," est essentiellement un sujet de recherche fondamentale touchant à divers domaines de la biologie tels que virologie, microbiologie, génétique, biochimie, biologie moléculaire, ... d'où mon choix pour les bases de données suivantes :

./...

MEDLINE  
BIOSIS  
EXCERPTA MEDICA.

- INTERROGATIONS

L'interrogation des bases de données MEDLINE et EXCERPTA MEDICA a eu lieu à la Bibliothèque universitaire de médecine avec l'aide et les conseils de Mme LEFRANÇOIS, celle de la base BIOSIS à la Bibliothèque des sciences de la DOUA, en présence de Mr FRANCILLON.

MEDLINE

Les fichiers du système MEDLINE sont accessibles en conversationnel, à partir d'un terminal relié aux ordinateurs de la National Library of Medicine (N.L.M.) siégeant à Bethesda (U.S.A.) et par l'intermédiaire du réseau TYMNET.

Le programme d'interrogation fourni par la NLM est le logiciel ELHILL, adaptation du logiciel ORBIT.

La base de données MEDLINE couvre l'ensemble des disciplines médicales (clinique, pharmacologie, biochimie, ...) et sa mise à jour est mensuelle.

Le langage d'interrogation associe l'emploi d'un vocabulaire normalisé et d'un vocabulaire libre.

Il comprend les descripteurs d'un thésaurus, le Médical Subject Headings (MeSH), des descripteurs obligatoires (Check-tags) comme CHICK EMBRYO, MICE, RATS, HUMAN, IN VITRO, ..., des qualificatifs (Subheadings) qui peuvent être affiliés à certains descripteurs du thésaurus, et des mots naturels du titre ou des résumés des articles.

- Recherche ~~ON-LINE~~ *en ligne*

Sur 1980-1981 et l'année en cours.

./...

Etapas de Recherche	Descripteurs - Equation de recherche	Nombre de références obtenues
1	RETROVIRIDAE <u>OR</u> LEUKOVIRUSES <u>OR</u> LEUKEMOGENIC VIRUSES	1860
2	AN (analysis) <u>OR</u> GE (genetics) <u>OR</u> PH (Physiology)	86904
3	1 <u>AND</u> 2	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">1040</div> <u>ensemble de départ</u>
4	VIRAL (TW) <u>AND</u> INTEGRATION (TW) <u>AND</u> SITE (TW)	20
5	3 <u>AND</u> 4	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">12</div> <u>1ère question</u>
6	NUCLEOTIDE (TW) <u>AND</u> SEQUENCE (TW) <u>AND</u> LTR (TW)	654
7	3 <u>AND</u> 6	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">7</div> <u>2d question</u>
8	INSERTION (TW) <u>AND</u> PROMOTOR (TW)	0
9	3 <u>AND</u> TRANSPOS: (TW)	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">4</div> <u>3è question</u>
10	5 <u>OR</u> 7 <u>OR</u> 9	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">19</div> <u>références totales</u>

./...

Les références complètes des 19 articles comprenant un résumé, ont été demandées en différé (OFF LINE) après vérification de la pertinence des cinq premiers titres.

Pour obtenir les références remontant aux années précédentes (fichiers 1975, 1977, 1979), la stratégie de recherche doit être répétée en différé (utilisation de la procédure OFF SEARCH).

Résultats : 23 références dont une seule ne correspondant pas au sujet. Ce dernier document traite en effet des sites de reconnaissance de plusieurs endonucléases de restriction sur le DNA mitochondrial de cellules infectées par divers Rétrovirus.

Tous les articles obtenus sont récents : 19 ont été publiés en 1980 ou 1981, 3 en 1979 et 1 en 1978.

On peut donc noter une très bonne pertinence. Mais elle est sans doute due à une trop grande restriction et engendre probablement un lourd silence.

Les qualificatifs (Analysis) utilisés me semblent corrects puisqu'ils correspondent aux rubriques des Index Medicus repris dans la base MEDLINE, mais ils auraient dû être utilisés en fin de recherche si nécessaire et non d'entrée.

#### EXCERPTA MEDICA

Cette base de données reprend la bibliographie imprimée de même nom, qui comprend de nombreuses sections ; (cancer, Microbiology, Virology).

La forme automatisée permet d'obtenir très rapidement des articles traitant d'un même sujet, mais pouvant provenir de plusieurs sections, comme c'est le cas ici.

./...

Cette base de données est proposée par le serveur américain L.M.S. (Lockeed Missiles and Space Company) installé à Palo-Alto en Californie.

Ce serveur est accessible par les réseaux TRANSPAC puis TYMNET et le logiciel d'interrogation fourni est le logiciel DIALOG.

L'interrogation peut se faire à l'aide de termes contrôlés réunis dans le MALIMET (Master List of Medical Terms).

- Pour MEDLINE, le seul terme générique, RETROVIRIDAE, inscrit dans le MeSH suffit pour balayer tous les documents du fichier en cours et réunir tous ceux ayant trait à un rétrovirus en particulier. En réalité, comme je voulais poursuivre cette recherche sur les années antérieures, j'ai dû inscrire aussi sur le terminal, les anciens noms LEUKOVIRUSES et LEUKEMOGENIC VIRUSES afin que ma stratégie de recherche automatiquement réutilisée lors de la recherche rétrospective effectuée en différé (off search), reste valable.
- Dans le cas d'EXCERPTA MEDICA, il n'y a pas un terme générique qui recouvre les autres. Il faut donc les écrire tous.

La recherche "On line" peut s'effectuer sur deux fichiers séparément. Le plus récent porte sur les deux dernières années (1980-1981), le plus ancien remonte jusqu'en 1975 (1975-1979).

Pour éviter une interrogation trop restrictive, les termes LTR, TRANSPOS? (pour transposon ou élément transposable), n'ont pas été utilisés et même, INTEGRATION a remplacé INTEGRATION SITE sur le fichier le plus ancien.

./...

Interrogation du fichier récent

Numéro d'ensemble ou d'étape	Descripteurs	Nombre de références obtenues
1 2 3 4	RETROVIR? ONCOVIR? LEUKOVIR? ONCORNAVIR?	950 120 4 61
5	1 - 4 / <u>OR</u>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">981</span> <u>Ensemble de départ</u>
6 7	INTEGRATION SITE	722 5 437
8	5 <u>AND</u> 6 <u>AND</u> 7	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">15</span> <u>1ère question</u>
9	NUCLEOTID? (W) SEQUENCE	314
10	5 <u>AND</u> 9	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">21</span> <u>2de question</u>
11	8 <u>OR</u> 10	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">32</span>

./....

Résultats : 32 références obtenues dont 28 semblent intéressantes pour le sujet. La pertinence reste bonne mais si l'interrogation est effectivement moins restrictive, il ne semble pas que l'on ait éliminé tout le silence.

Sur le fichier le plus ancien (1975-1979), parmi les 63 références acquises, 35 seulement seront retenues après analyse des titres et résumés, les autres étant ou trop anciennes, ou trop générales.

### BIOSIS

C'est la principale base de données dans le domaine des sciences biologiques. Elle regroupe surtout les articles de recherche fondamentale recensés dans les Biological Abstracts et BioResearch Index. Elle couvre en particulier, les divers domaines de Bactériologie, Génétique, Immunologie, Virologie, ...

Deux serveurs proposent cette base de données :

- L'E.S.A. (avec le logiciel QUEST) le serveur européen situé près de Rome.
- TELESYSTEMES (avec le logiciel QUESTEL), le serveur français situé près de Nice.

L'interrogation peut se faire à l'aide de mots du titre ou des mots clés rassemblés dans le MASTER INDEX. Il existe aussi des "Concept Code" (CC) et Biosystematic Code (BC) ; ils nécessitent cependant, une certaine pratique.

Exemple de :

- Concept Code : CC 31500 (GENETICS)  
CC 24007 (CARCINOGENS ...)
- Biosystematic Code : BC 02240 (RETROVIRIDAE).

./...

Pour cette interrogation, c'est le serveur européen qui a été utilisé. La connection s'est faite par l'intermédiaire du réseau TRANSPAC puis EURONET.

La stratégie de recherche définie préalablement avec M. BLANCHET reprend celle de Medline en ajoutant le descripteur : DNA INTER-MEDIATES, pour obtenir des références à partir de 1974-1975. Une restriction sur la date n'est donc pas envisagée.

./...

*En ligne*  
INTERROGATION ON LINE: 1 seul fichier (1973 1981).

Numero d'ensemble ou d'étape	Descripteurs-Equations de recherche	Nombre de références obtenues
	RETROVIRIDAE LEUKOVIR? ONCOVIR? ONCORNAVIR?	13 0 84 10611
1		<u>10636</u> <u>Ensemble de départ</u>
2	INTEGRATION (W) SITE?	55
3	1 <u>AND</u> 2	<u>26</u> <u>1ère question</u>
4	NUCLEOTIDE (W) SEQUENCE?	1246
5	LTR	0
6	LONG (W) TERMINAL? (W) REPEAT?	11
7	1 * (4 + 6)	94
8	NUCLEOTIDE (W) SEQUENCE / T I	979
9	1 * (8 + 6)	<u>85</u> <u>2de question</u>
10	DNA (W) INTERMEDIATE?	32
11	1 * 10	<u>16</u> <u>3ème question</u>
12	TRANSPOS?	1412
13	1 * 12	<u>14</u> <u>4ème question</u>
14	3 + 9 + 11 + 13	<u>124</u> <u>références totales</u>

Résultats : De nombreux documents sont intéressants pour le sujet et sont en majorité récents (1978 - 1981).

Cela peut s'expliquer d'une part, par une stratégie de recherche plus complète et d'autre part, par une base de données plus appropriée que les précédentes.

Il est à remarquer cependant qu'il n'est pas possible d'interroger la base Biosis en inscrivant directement LTR sur le terminal comme cela l'a été pour Medline. L'obligation d'utiliser "LONG (W) TERMINAL? (W) REPEAT?" augmente encore la durée de l'interrogation déjà trop longue.

### CONCLUSION

En comparant les résultats obtenus à partir des trois bases de données interrogées, on note qu'une quinzaine de références sont communes aux trois. Ces recoupements ne sont pas surprenants à priori, puisque ces bases recensent des articles parus dans les mêmes périodiques, pour les mêmes domaines d'intérêt.

Ces articles ont été sélectionnés en priorité pour la synthèse ainsi que ceux obtenus à partir de MEDLINE.

Les résumés des articles obtenus à partir d'EXCERPTA MEDICA permettent une seconde sélection.

Par contre, il fut plus difficile de sélectionner à partir des titres des articles obtenus avec l'interrogation de la base BIOSIS.

Un autre critère de sélection fut l'accessibilité à ces documents. Vu la liste importante, seuls ceux directement recueillis auprès des bibliothèques de médecine, des sciences et de l'INSA, ont été ensuite retenus.

## CHAPITRE II

### NOTE DE SYNTHESE

\* \*

\*

Le cancer est une maladie au niveau cellulaire ; une seule cellule, si elle est transformée par un agent cancérigène (radiations, produits chimiques ou virus) peut vaincre toutes les défenses de l'organisme et s'y multiplier sans contrôle. Cette cellule transmet alors de façon héréditaire, à sa descendance les propriétés nouvellement acquises.

La recherche des mécanismes impliqués dans la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse ou mécanismes de l'oncogénèse est en plein développement et les récents progrès obtenus dans ce domaine sont dûs en grande partie à l'étude des virus oncogènes à ARN encore appelés Retrovirus.

Ces virus provoquent principalement des leucémies et des sarcomes chez une grande variété de vertébrés et constituent ainsi des modèles expérimentaux pour les principaux cancers humains.

Si leur rôle dans l'oncogénèse n'est apparu en fait que récemment, ils ont suscité depuis 20 ans, de nombreux travaux en relation avec leur mode de répllication. Les virus les plus étudiés se multiplient chez le poulet, tel le virus du sarcome de Rous (R.S.V.) ou chez la souris comme le virus de la leucémie de Rauscher et le virus de la tumeur mammaire. Dans l'ensemble les résultats obtenus pour un virus sont interchangeableables avec ceux obtenus pour tous les autres Retrovirus.

(Watson J.D. 1978, Mammette A. 1982).

./...

# I - PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES RETROVIRUS

## 1 - HOMOGENEITE STRUCTURALE

Ils présentent d'abord une grande homogénéité structurale : observée au microscope électronique, pour la première fois en 1960, la particule virale ou "particule C" de Bernhard comprend un nucléoïde sphérique (core central), constitué du génome associé à quelques protéines, entouré d'une membrane lipidique interne et d'une enveloppe externe.

## 2 - LE GENOME

Le génome de ces virus est constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire dont le coefficient de sédimentation est de 70 S correspondant à un poids moléculaire élevé de  $10^7$  daltons.

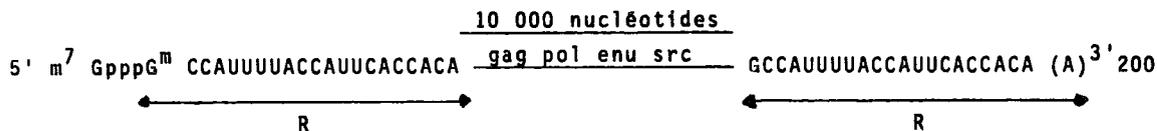
Cet ARN simple brin, est en réalité diploïde ; il peut être dissocié par chauffage en deux sous unités identiques dont le coefficient de sédimentation est de 30 à 40 S, ce qui correspond à environ 10 000 nucléotides et donc un nombre limité de gènes.

Ces molécules ( 35 S) sont liées par des liaisons hydrogène avec plusieurs molécules de tRNA (4 S) et rRNA (5 S).

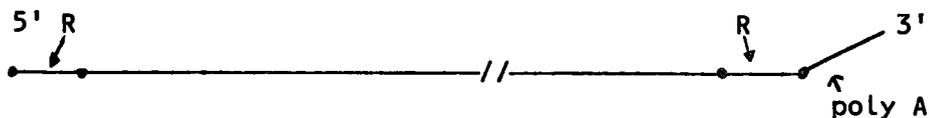
Le RNA (35 S) est caractérisé aussi par la présence d'une séquence polyadénylique (poly A) à son extrémité 3' et par une séquence de tête (dite de "capping") 5' m<sup>7</sup>G ppp G m à l'extrémité 5'.

Ces deux caractéristiques essentielles des RNA messagers des cellules eucaryotes rappellent que le génome des Rétrovirus sert aussi de messenger dans la biosynthèse des protéines spécifiques virales.

L'ARN viral présente enfin la répétition d'une vingtaine de nucléotides à ses extrémités 3' et 5'. Cette redondance (R) est encore appelée "courte répétition terminale" (STR) selon les auteurs. (Shine et al.1977, Swartz et al.1977, Haseltine et al.1977).



Génome du virus du sarcome aviaire de souche  
Prague C (extrémités 5', 3' détaillées)



Représentation schématique de l'ARN génomique  
(35 S) des Retrovirus.

### 3 - INTERMEDIAIRE DNA INTEGRE : PROVIRUS DE TEMIN (Témin 1976)

Le point essentiel de la biologie de ces Oncornavirus est leur incapacité à tuer les cellules qu'ils infectent. Ils établissent avec elles une association très intime correspondant à une intégration du génome cellulaire.

Cette propriété fondamentale repose sur plusieurs faits expérimentaux :

En 1963, TEMIN H. observe que la répllication du virus du sarcome de Rous (RSV) dans les cellules infectées in vitro est bloquée par l'actinomycine D ; or cette substance est un inhibiteur de la synthèse du DNA. TEMIN propose donc l'hypothèse selon laquelle le RNA infectieux serait utilisé comme matrice pour la fabrication de molécules de DNA qui seraient à leur tour intégrées à l'état de provirus dans le génome de la cellule hôte et c'est sur ce DNA proviral intégré que seraient alors transcrits les molécules de RNA virales de la descendance.

./...

Ce modèle fut confirmé par la découverte en 1970 par TEMIN et MIZUTANI d'une part et D. BALTIMORE d'autre part, d'une DNA polymérase présente dans les virions matures de différents virus sarcomatogènes, et capable de diriger l'incorporation de deoxynucléosides triphosphate à partir du génome viral (RNA 35 S).

4 - TRANSCRIPTASE REVERSE VIRALE (Verma et al. 1977, Haseltine et al. 1977).

Cette transcriptase réverse étudiée chez les virus aviaires et murins présente deux activités enzymatiques différentes :

- une activité de synthèse (DNA polymérase RNA dépendante et DNA polymérase DNA dépendante) et,
- une activité de dégradation (ribonuclease H qui dégrade le brin RNA dans les hybrides RNA-DNA).

L'enzyme est constituée de deux sous-unités protéiques  $\alpha$  et  $\beta$  chez les virus aviaires mais une seule de ces sous-unités ( $\alpha$ ) a pu être mise en évidence chez les virus murins.

. Pour l'enzyme du virus de la myeloblastose aviaire :

- la sous-unité  $\alpha$  a un poids moléculaire (PM) de 60 000 daltons. Elle est responsable des deux activités enzymatiques.
- la sous-unité  $\beta$  a un PM de 90 000 daltons et comporte toute la séquence de la sous-unité  $\alpha$ , plus une autre fraction protéique. Elle jouerait un rôle important dans l'interaction de la transcriptase avec un système matrice-amorce.

En effet, comme toutes les DNA-polymérases la transcriptase réverse a besoin d'une courte amorce pour initier la chaîne du DNA complémentaire (Harada et al. 1975).

./...

In vitro on peut utiliser une amorce oligo dT complémentaire au segment nucléotidique poly-A de l'extrémité 3', mais aussi un tRNA (4S).

In vivo cette amorce est une molécule de tRNA (4S). Il s'agit du tRNA<sup>trp</sup> dans le cas des virus aviaires : car si on incube à 35° le tRNA<sup>trp</sup> et le RNA viral (35S) en absence de la transcriptase, le complexe amorce-matrice ne se forme pas, alors qu'en présence de l'enzyme, le complexe est obtenu et la synthèse peut démarrer.

La découverte de mutants viraux dont l'activité DNA polymérisique et la capacité à se lier au tRNA sont thermosensibles ainsi que celle d'un mutant du RSV déficient en DNA polymérase et dans lequel on ne trouve pas de tRNA<sup>trp</sup> associé au génome viral, ont démontré que la première étape de la répllication du génome rétroviral correspond à la formation d'un complexe transcriptase tRNA<sup>trp</sup>.

La transcriptase aurait un rôle de déroulase vis à vis de l'extrémité 3' OH du tRNA rendant possible la complémentarité des bases entre l'amorce tRNA et matrice RNA.

- Dans les virus murins cette enzyme est semble-t'il monomérique et a un PM de 70 000 daltons. Mais elle ne forme pas de complexes stables avec les tRNA et utilise mal une matrice virale in vitro. Il se peut donc qu'elle soit dimérique in vivo et que la sous-unité  $\beta$  soit perdue au cours de sa purification.

La transcription du RNA du virus de la leucémie murine exécutée dans des concentrations de limitation en substrat d NTP donne lieu à plusieurs bandes de migration sur un gel de polyacrylamide à 10 % (la bande principale correspondant au brin de DNA complémentaire naissant).

./...

Après traitement par l'alcali chaque fraction prélevée à partir de ces bandes migre plus rapidement sur un nouveau gel et la différence de taille entre les fractions traitées et fractions non traitées correspond à une molécule de tRNA de 70 à 80 nucléotides, taille approximative du tRNA de la proline (Van Beveren et al 1980).

L'amorce tRNA utilisée par certains virus murins est donc un tRNA<sup>pro</sup> : 19 nucléotides à l'extrémité 3' de ce tRNA sont liés au génome viral (Harada et al.1979).

Pour un autre virus murin, le virus des tumeurs mammaires, (M.MTV) l'amorce est un tRNA<sup>lys</sup> (Majors 1981).

Cette transcriptase virale a permis pour la première fois à DUESBERG et CANAANI en 1970 d'obtenir une copie complète du génome viral 35 S, sous forme de DNA complémentaire.

Elle est devenue depuis un outil précieux pour la synthèse de copies de DNA spécifiques de ces virus.

Ces copies appelées "cDNA" constituent de véritables sondes permettant de déceler n'importe quel gène ou génome viral dans les DNA cellulaires et sont très utilisées dans les expériences d'hybridation et de clonage moléculaire.

## 5 - ETUDES PRELIMINAIRES DE LA TRANSCRIPTION DE L'ARN VIRAL

### Synthèse du DNA "strong-stop"

La transcription du génome RSV peut être initiée in vitro à partir d'un tRNA<sup>trp</sup> amorce. Celui-ci se fixe par son bras 3'OH (-A (OH)CC) en s'appariant à 15-20 bases nucléotidiques du RNA viral génomique près de l'extrémité 5'. (Taylor J.M. et al.1975, Haseltine et al.77, Coffin et al.1977, Shine et al.1977).

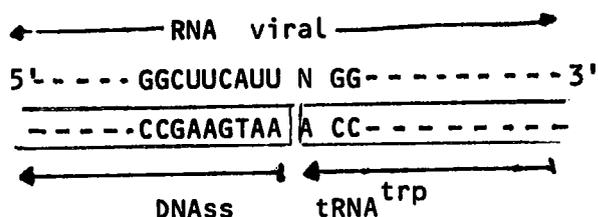
./...

La synthèse exécutée avec une concentration en dNTP limitante démarre en direction de l'extrémité 5' du génome et s'arrête lorsqu'elle l'atteint.

Le produit de transcription principal obtenu est un brin complémentaire d'ADN de 101 nucléotides appelé DNA strong stop (DNAss). Il représente donc les premières séquences transcrites du génome à partir du site de fixation du tRNA amorce jusqu'au nucléotide CAP 5' du RNA viral.

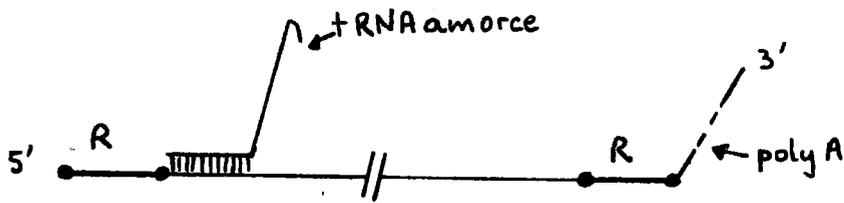
Le tRNA amorce est lié par covalence à ce DNAss.

La séquence nucléotidique au site d'initiation de la transcription a d'abord été établie pour les virus aviaires. Le premier nucléotide additionné dans le cas du RSV est un dA (Coffin et al. 1977).

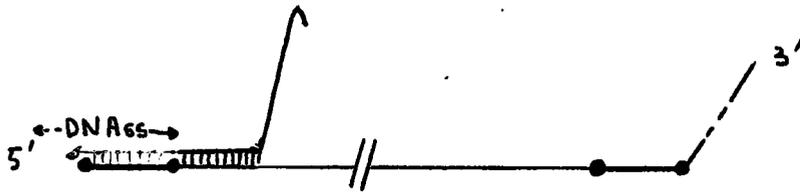


Séquence nucléotidique du RNA des virus aviaires au site d'initiation de la synthèse de DNA.

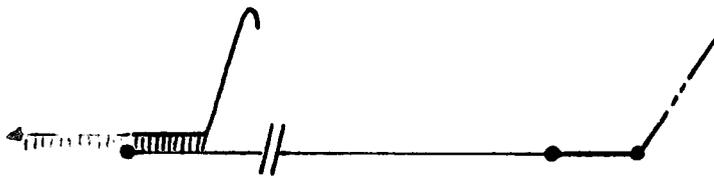
La synthèse du DNA complémentaire d'un virus de leucémie murine de Moloney (M. MuLV) avec une concentration limitante en dATP radioactif, permet de caractériser de la même façon la molécule strong stop correspondant à la bande de migration majeure sur le gel de polyacrylamide. Une fraction de chaque bande de migration après traitement par alcali pour éliminer le tRNA amorce, est reprise dans une électrophorèse sur papier pour analyse. Les quatre bandes sont radioactives à leur extrémité indiquant que la synthèse a bien débuté par addition d'un résidu dA à l'extrémité CCA-OH du tRNA<sup>Pro</sup>.



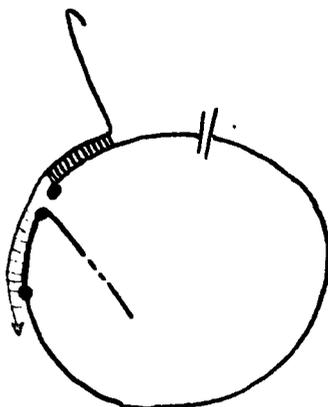
a - fixation du tRNA amorce sur l'ARN viral.



b - Synthèse de DNAss.



c - Dégradation de la séquence R 5' par la transcriptase.



d - Saut de la transcriptase de l'extrémité 5' à l'extrémité 3'.

Modèle de la transcription réverse (Taylor 76)

### Transcription du génome complet : hypothèse de Taylor

Les études in vitro de la réverse transcription ont permis de proposer une première hypothèse pour le mécanisme de la transcription du génome viral complet (Taylor J.M. et al.1976).

Une fois la molécule "strong-stop" synthétisée, il y aurait digestion, grâce à l'activité RNase de la transcriptase, de la séquence R (ou STR) 5' qui vient d'être transcrite. La partie du DNA complémentaire à cette séquence, serait alors libre et donc capable de s'apparier avec l'autre séquence R (ou STR) présente à l'extrémité 3' de l'ARN viral. La transcription se poursuivrait cette fois de l'extrémité 3' du génome en direction de l'extrémité 5' jusqu'à son point de départ (site de fixation du tRNA amorce).

## 6 - POUVOIR TRANSFORMANT

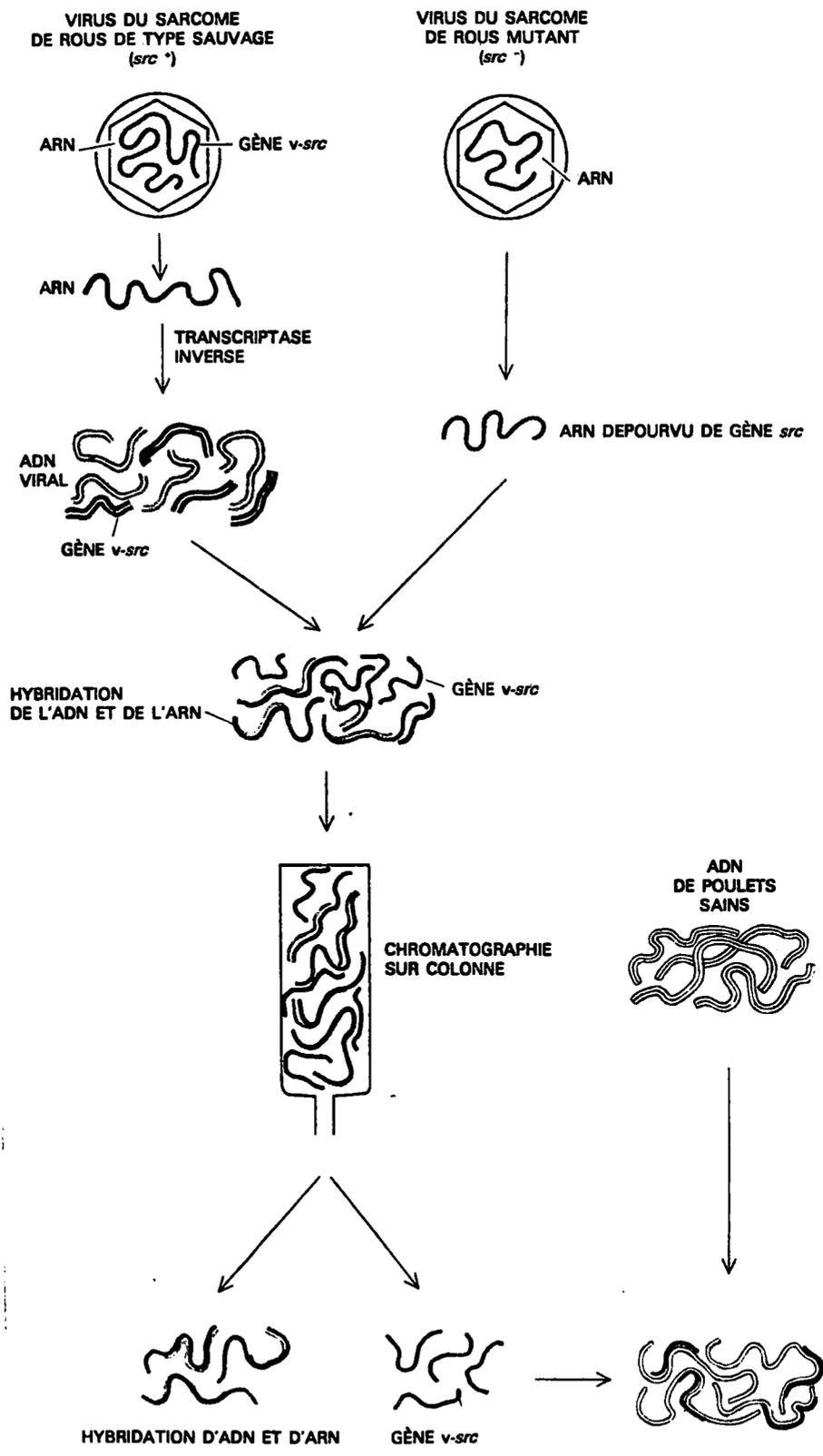
### Mise en évidence (Sharp 1979).

- La plupart des virus oncogènes possèdent la propriété de transformer des cellules cibles en culture, ce qui d'ailleurs a facilité leur étude.
- En 1970, Steven Martin identifie des mutants thermosensibles qui affectent la capacité d'un virus du sarcome de Rous à transformer les cellules en culture mais ne l'empêchent pas de se reproduire. Un gène viral, l'oncogène, est donc nécessairement responsable de cette transformation et il paraît nécessaire pour l'entretien de la néoplasie.

### Oncogène viral et contrepartie cellulaire (Manteuil-Brutlag 1975).

- En 1973, Vogt et Duesberg après avoir analysé la mobilité électrophorétique de différents rétrovirus aviaires observent que le RNA 35 S des sarcomes migrent plus rapidement que celui des virus leucémogènes.

./...



Isolement et caractérisation du gène "src" et de sa contre-partie  
cellulaire "c-*src*" grâce à une sonde radioactive  
(cDNA spécifique du RSV)  
(extrait de Bishop 1982)

Des mutants du RSV défectifs pour la transformation migrent à la même vitesse que les virus des leucémies. L'incapacité de ces mutants "td" à transformer des cellules infectées résulte en fait d'une délétion du génome RSV sauvage.

- En 1975, Stehelin et al utilisent la transcriptase réverse pour obtenir le cDNA complémentaire du génome 35 S d'un virus sarcomatogène aviaire (Pr -C -ASV). Après hybridation de cette copie marquée radioactivement au RNA d'un virus défectif (td - Pr-C-ASV), ils isolent les séquences non appariées par chromatographie différentielle sur hydroxyapatite. Les copies cDNA sarc obtenues correspondent à la délétion d'environ 16 % du génome viral.
- Tous les virus des sarcomes aviaires transformants étudiés possèdent cette séquence dans leur génome dont l'ensemble est désigné sous le nom de gene sarc ou "src".
- Les virus des leucoses aviaires (ALV) ou même, les virus ALV endogènes qui existent à l'état latent dans les cellules normales de poulet mais non oncogéniques, et les mutants "td" du RSV, ne possèdent pas ce gène "src". Il en est de même pour les virus des leucémies et sarcomes murins.
- Cependant, l'hybridation du DNA src avec le DNA de cellules de poulets non infectés a montré qu'une à deux copies complètes de l'oncogène viral "src" sont présentes par cellule et les DNA provenant d'autres espèces aviaires très différentes contiennent tous au moins une partie de cet oncogène spécifique du RSV.

"src" a donc une contrepartie homologue cellulaire "c-src".

De l'ADN voisin de celui de "src" a été découvert aussi chez les poissons, et mammifères, et il semble que tous les vertébrés possèdent un gène apparenté au gène "src".

./...

- Ces données viendraient confirmer la théorie de l'oncogène de Hueber et Todaro selon laquelle les oncogènes des Rétrovirus constitueraient une partie du génome de toutes les cellules des vertébrés acquise par ces virus probablement à la suite d'infection virales tôt dans l'évolution. Ces oncogènes viraux seraient réprimés en permanence dans la cellule mais pourraient être dérèprimés ou réactivés sous l'action d'un mutagène et traduits en une "protéine transformante" capable de transformer une cellule normale en une cellule cancéreuse (Larsen et al. 1974).

La comparaison du génome viral d'un mutant "td" du RSV à celui d'un virus complet, permet de situer ce gène à l'extrémité du génome (RNA 35 S).

La plupart des Rétrovirus, ceux dont l'activité transformante est testée in vitro, ont un gène transformant spécifique du génome viral (Sheiness et al 1980). Plus de 10 de tels oncogènes viraux ont été précisés ainsi que leur contreparties cellulaires : ainsi, les gènes "v-mos" et "c-mos" du virus du sarcome murin de Moloney (Mo MSU) (Van Beveren et al 1981), ou les candidats "onc" pour les virus des leucémies aiguës aviaires (DLU, AEV et AMV) (Bishop et al.1979, Sheiness et al.1980).

#### Expression de l'oncogène viral

Lorsque le Rétrovirus est porteur d'un oncogène, l'expression de ce gène provoque la transformation cellulaire in vitro et la néoplasie in vivo.

En raison de son pouvoir de transformer très rapidement des fibroblastes in vitro (moins de 24 h) le RSV a été le plus étudié et le mécanisme d'oncogénèse de ce virus est actuellement le mieux connu.

Grâce à des anticorps produits par des lapins infectés par le RSV, la protéine enzymatique codée par le gène "src" et synthétisée par la cellule hôte, a pu être identifiée (Bishop et al.1979, Bishop 1982).

Il s'agit d'une protéine Kinase de Poids Moléculaire de 60 000 daltons désignée pp 60 vsrc. Elle agirait en phosphorylant les protéines dans les plaques d'adhésion de la membrane plasmique de la cellule hôte entraînant leur destruction, ce qui expliquerait peut être la facilité avec laquelle la plupart des cellules cancéreuses se détachent de leur tissu d'origine et prolifèrent à d'autres endroits formant des métastases. Il n'est pas encore défini l'importance de l'action de cette protéine dans le comportement désordonné des cellules cancéreuses.

De même, le produit du gène transformant "v-mos" de Mo MSV, est une petite protéine de 374 acides aminés, dont la séquence présente une grande homologie avec celle de pp 60 v-src (Van Beveren et al.1981).

Le gène viral transformant peut être exprimé, soit comme un gène viral indépendant, soit comme un produit qui interagit avec les protéines structurales virales.

#### Deux types de virus oncogènes (Neel et al.1981).

En dépit d'efforts intensifs, aucun gène transformant n'a été identifié chez certains Rétrovirus qui provoquent cependant des cancers graves, tels leucémies et lymphomes chez le poulet et la souris.

Le mécanisme d'oncogénèse par expression de l'oncogène rétroviral ne peut s'appliquer à ces virus et à priori il s'agit d'un mécanisme très différent (Neel et al.1981).

On regroupe donc les Rétrovirus en deux grandes classes, suivant leurs propriétés et le mécanisme d'oncogénèse qu'ils induisent.

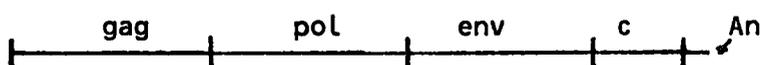
1 - Les virus "aigus" induisent rapidement (2 à 4 semaines après l'infection) chez l'animal hôte susceptible, des tumeurs cancéreuses avec un rendement voisin de 100 %. Ils possèdent tous la propriété de transformer des cellules appropriées en milieu de culture.

Diagrammes représentant l'agencement des gènes viraux du  
génomme des Rétrovirus aviaires (Bishop et al 1979).

L'oncogène "src" et les candidats "onc" apparaissent comme des inser-  
tions dans le génome de ALV.

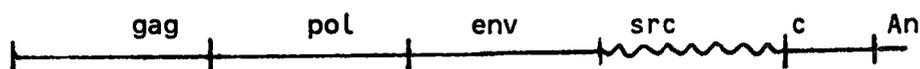
Chaque insertion peut être dérivée d'un locus génétique normal du gé-  
nome des vertébrés.

- 1 Virus "chroniques" : Virus des leucoses aviaires (ALV)

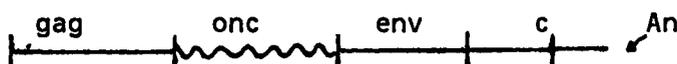


- 2 Virus "aigus" :

Virus des sarcomes aviaires (ASV)



Virus de la leucémie aigue aviaire (DLV)



Ils comprennent les virus à répllication compétente, comme le virus du sarcome de Rous (RSV) ou à répllication déféctive comme les virus du sarcome de Fujinami, les virus des sarcomes murins et felins ou virus de la leucémie aviaire déféctive (DLV) et virus de la leucémie Abelson.

- 2 - Les virus dits chroniques induisent des néoplasies seulement après une longue période de latence (4 à 12 mois après l'infection) et avec un rendement faible (20 à 60 %). Ils ne transforment pas de cellules cibles en culture, leur pouvoir oncogénique ne peut donc être testé in vitro. Ils incluent, en particulier les virus des leucoses aviaires (ALV) et les virus des leucémies murines MuLV.

Les génomes des deux types de virus "aigus" et "chroniques" possèdent en commun les gènes qui codent pour les fonctions répllicatives et structurales du virus : "gag" code pour les protéines structurales du virion, "pol" porte le message pour la transcriptase réverse et "env" code pour les glycoprotéines de l'enveloppe.

Ils possèdent également en commun une région génétique "c" près de l'extrémité 3' du RNA viral qui ne paraît coder pour aucune protéine et dont la fonction n'est pas complètement connue.

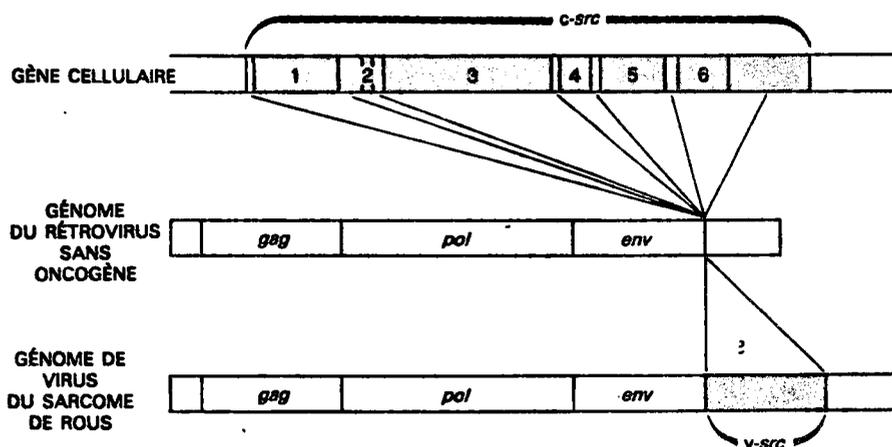
Les virus aigus possèdent un gène supplémentaire, l'oncogène viral, responsable de la transformation maligne de la cellule hôte ("v.src", "onc", par exemple).

#### 7 - MECANISMES DE L'ONCOGENESE : HYPOTHESES

(Bishop 1982) - (Bishop et al.1979) - (Neel et al.1981).

- En réalité, les oncogènes viraux sont des insertions dans le génome des Rétrovirus. Ils sont de simples gènes cellulaires modifiés et recueillis chez les animaux dans lesquels se répliquent les virus.

./...



Extrait de Bishop 1982.

Le gène cellulaire "c-src" se compose d'exons (en couleur) et d'introns (en gris). Il a été autrefois recueilli par un rétrovirus : les introns ont été supprimés et les exons après excision-encollage se sont insérés dans le génome viral pré-existant pour donner le génome rétroviral transformant complet.

- Ceci a été mis en évidence par des micrographies électroniques d'un brin d'ADN viral contenant le gène src hybridé à un brin d'ADN de poulet portant la version cellulaire c-src. Il en a résulté une molécule hybride d'ADN bicaténaire présentant 6 boucles monocaténaires provenant du brin d'ADN cellulaire contenant "c src". Ces boucles correspondent aux séquences intermédiaires non transcrites (introns) des DNA des cellules eucaryotes, situées entre des séquences codantes (exons) pour une même protéine.
- Cette configuration en mosaïque des gènes des cellules eucaryotes ne se rencontre jamais chez les Rétrovirus et prouve que le gène cellulaire "c src" est originaire de la cellule et n'y a pas été introduit par un Rétrovirus.
- Les versions "c src" rencontrées chez les Vertébrés à l'exclusion des introns sont toutes étroitement apparentées au gène viral v src et très voisines les unes des autres.

Ces gènes cellulaires sont donc hautement conservés et semblent donc importants pour l'équilibre de l'espèce dans laquelle ils persistent.

- Non seulement présents dans toutes les cellules des vertébrés, ils s'y sont aussi révélés actifs :

Un m RNA spécifique de "c-src" détecté grâce à la sonde radioactive cDNAsrc, et une protéine (pp60c src) identique à pp60v src sont en effet synthétisés dans les cellules saines en faible quantité.

Il en est de même pour tous les homologues cellulaires des gènes transformants étudiés.

Dans tous les cas, ces gènes cellulaires sont exprimés à des taux faibles ou même indétectables dans les cellules normales et leurs homologues viraux sont exprimés à des taux très élevés dans les cellules transformées, infectées (Neel et al. 1981).

./...

HANAFUSA et al.(1977), montrèrent même que des mutants "td" du RSV ne contenant qu'une faible partie du gène "src", peuvent se combiner avec "c-src", pour générer un virus transformant. Cette expérience suggère que des gènes cellulaires normaux peuvent provoquer des sarcomes s'ils sont exprimés à des taux élevés.

Si les oncogènes viraux sont de simples copies de gènes cellulaires normaux, pourquoi provoquent-ils des cancers dans les cellules infectées alors que leur homologue cellulaire est normalement inoffensif ?

Deux hypothèses s'affrontent habituellement :

- \* Dans l'hypothèse mutationnelle, les oncogènes viraux diffèrent sensiblement de leurs ancêtres cellulaires, à la suite de mutations introduites lorsque les gènes cellulaires furent copiés et intégrés par le génome rétroviral, et les deux protéines enzymatiques produites auraient des effets très différents sur le comportement cellulaire.
- \* Dans l'hypothèse de la surproduction, l'oncogène viral saturerait la cellule en produisant en abondance une protéine normale, ce qui provoquerait le dérèglement cellulaire.

## II - MECANISME D'INTEGRATION DE L'ADN PROVIRAL : DONNEES RECENTES

Le mécanisme d'oncogénèse par expression d'un gène viral ne peut s'appliquer aux virus chroniques dépourvus semble-t-il de tels oncogènes. Dans le cas de ces virus, il semble que l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN cellulaire, en un site spécifique, provoque l'activation et l'expression d'un gène cellulaire adjacent, normalement réprimé ou faiblement actif.

./...

Ces investigations découlent en fait, des données récentes obtenues sur la répllication des Rétrovirus, grâce à l'apparition de nouvelles techniques de la biologie moléculaire.

La répllication intracellulaire des Rétrovirus, implique, rappelons le :

- la transcription du RNA viral en un intermédiaire DNA bicaténaire,
- l'intégration de cet intermédiaire dans l'ADN de la cellule hôte,
- et sa transcription ultérieure par la RNA polymérase II cellulaire. (Weinberg 1977).

Les principaux types de RNA spécifiques du virus sont sans doute synthétisés à partir d'une seule matrice d'ADN viral intégré dans les cellules hôtes permissives ou non et l'intégration semble obligatoirement requise pour obtenir une matrice fiable (Bishop 1978).

L'étude des précurseurs du provirus intégré a constitué une étape essentielle dans la compréhension du mécanisme d'intégration de l'ADN rétroviral.

## 1 - ETUDE DES INTERMEDIAIRES DNA VIRAUX NON INTEGRES

### A - Mise en évidence de deux types d'intermédiaires non intégrés

18 h après l'infection de cellules tumorales de cailles (QT6) avec le Pr-GASV plusieurs copies de DNA viral non intégrées sont synthétisées dans le cytoplasme de la cellule hôte par la transcriptase réverse virale.

Le produit de synthèse est une molécule duplex constituée d'un brin de polarité négative de 8 à 10 kilobases nucléotidiques (8 à 10 K.b.) et de brins courts de 0,3 à 3 K.b. de même polarité (positive) que le RNA viral 35 S (Varmus et al.1978).

./...

Les premières analyses de DNA viraux non intégrés par sédimentation dans des gradients de densité au CsCl identifièrent un DNA circulaire fermé par covalence exclusivement dans le noyau de la cellule hôte et des formes linéaires ou en cercles ouverts monomériques dans le cytoplasme et le noyau à la fois (Guntaka et al.1976).

La faible quantité de DNA viral disponible, moins de 10 copies de molécules de DNA intégrées ou non par cellule, fut longtemps un facteur limitant l'étude de ces intermédiaires.

Le développement de la méthode de Southern permit de contourner cet obstacle : après électrophorèse sur gel d'agarose, le DNA est transféré sur des filtres de nitrocellulose et est identifié par hybridation à une sonde radioactive (cDNA) spécifique du virus étudié (Southern 1975).

Ainsi en prélevant d'une part une fraction cytoplasmique et d'autre part la fraction du surnageant Hirt des noyaux, les deux intermédiaires viraux non intégrés ont été isolés puis caractérisés (Shank et al.1978).

- L'électrophorèse sur gel d'agarose de la fraction cytoplasmique révéla principalement un intermédiaire DNA viral dont la taille est proche de celle d'une copie de DNA complète linéaire d'une sous-unité du génome viral (le RNA 35 S).

Le clivage de ce duplex par l'endonucléase KpnI connue pour n'avoir qu'un site de reconnaissance sur ce DNA produit deux fragments de restriction (3,4 et 2,8 Mega-daltons ou Md) démontrant ainsi qu'il s'agit bien d'une molécule bicaténaire linéaire de même longueur qu'un RNA 35 S. Celle-ci présente comme lui des extrémités spécifiques 5' et 3'.

- L'électrophorèse sur gel d'agarose de la fraction nucléaire fournit trois types de molécules de DNA bicaténaire :

./...

1. Une molécule indissociable du DNA linéaire cytoplasmique (forme III).
2. Une molécule migrant plus rapidement, sans doute correspondant à une molécule circulaire fermée (forme I).
3. Enfin, une molécule migrant beaucoup plus lentement et correspondant semble-t-il à une molécule en cercle ouvert (forme II); plus quelques formes circulaires dimériques.

Ceci semble confirmé par des résultats complémentaires : après ultracentrifugation dans un gradient de densité ( $\text{CsCl} - \text{PI}_2$ ) on peut extraire la forme I. Elle fait apparaître lors d'une nouvelle électrophorèse sur gel d'agarose, deux bandes de migration correspondant à deux molécules différentes.

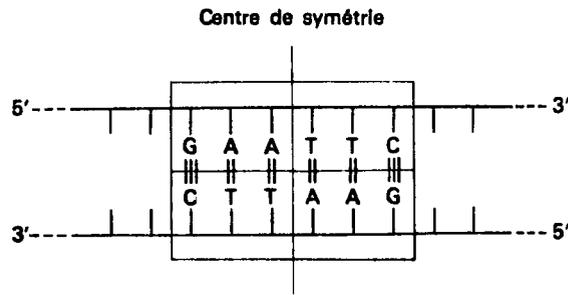
La molécule la plus lente semble être la forme II générée probablement à partir de la forme I, après coupures partielles lors du passage sur le gradient, tandis que la molécule la plus rapide correspond à la forme I.

En provoquant artificiellement des coupures partielles avec la DNase I en présence d' $\text{EtBr}_2$ , sur la molécule circulaire rapide (forme I), on obtient bien une molécule qui migre comme la forme II ; et si une coupure franche bicaténaire est effectuée avec l'endonucléase KpnI on obtient finalement, une molécule migrant comme la forme III linéaire.

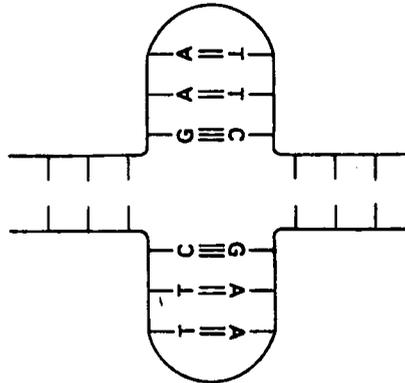
Shank et al ont ainsi isolé des intermédiaires DNA non intégrés de deux conformations différentes :

- Une linéaire dans le cytoplasme surtout,
- Une circulaire fermée par covalence dans le noyau. (Une troisième conformation en cercle ouvert peut être produite à partir des formes circulaires fermées).

./...



Possibilité de former une structure cruciforme



(Extrait de Russel J.P. 1981 p. 149.)

*Région de l'ADN présentant une séquence de paires de bases qui possède un centre de symétrie (palindrome). Cette séquence particulière est en fait le site de reconnaissance de l'endonucléase de restriction EcoRI.*

Caractéristiques de quelques enzymes de restriction

(Extrait de Russel J.P. 1981 p. 150)

Nom de l'enzyme	Séquence de reconnaissance et emplacement des coupures	
Bam HI	$  \begin{array}{ccccccc}  5' & G & \downarrow & G & A & } & T & C & C & 3' \\  3' & C & C & T & } & A & G & \uparrow & G & 5'  \end{array}  $	Centre de symétrie ~  Site de clivage →
Bgl III	$  \begin{array}{ccccccc}  5' & A & \downarrow & G & A & } & T & C & T & 3' \\  3' & T & C & T & } & A & G & \uparrow & A & 5'  \end{array}  $	
Hae III	$  \begin{array}{ccccccc}  5' & G & G & \downarrow & } & C & C & 3' \\  3' & C & C & \uparrow & } & G & G & 5'  \end{array}  $	

Les molécules clivées résultantes présentent :

- soit des extrémités monocaténares complémentaires (Bam HI et Eco RI),
- soit des extrémités bicaténares dites à "bouts carrés" (Hae III).

**B - Enzymes de restriction (Taylor et al.1978 ; Russel 1981).**

L'étude de ces intermédiaires a été entreprise grâce à l'utilisation devenue courante d'un type particulier d'endonucléases. On connaît maintenant une centaine de ces endonucléases ou enzymes de restriction extraites de divers microorganismes. Elles sont toutes capables de cliver les molécules d'ADN au niveau de séquences hexanucléotidiques spécifiques présentant un centre de symétrie et constituant ainsi des répétitions inversées de bases ou séquences palyndromiques.

Le nombre de coupures bicaténares effectuées par une endonucléase particulière dépend de la fréquence de cette séquence de reconnaissance sur la molécule d'ADN étudiée. Les fragments de restriction produits à la suite du clivage d'une molécule d'ADN par diverses endonucléases fournissent des renseignements sur l'agencement des séquences nucléotidiques sur cette molécule.

On établit ainsi une cartographie des sites de restriction de diverses enzymes sur une molécule donnée.

Quelques enzymes testées permettent même de différencier des DNA synthétisés par les cellules-hôtes après infection par différentes souches d'un même virus.

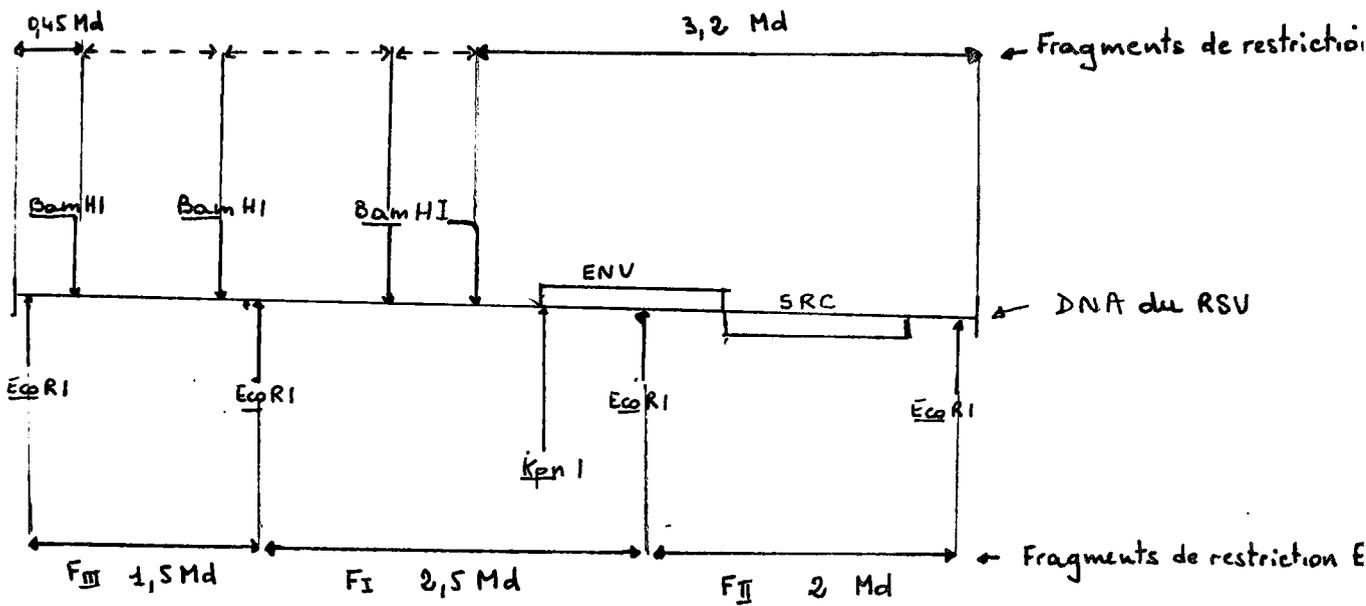
BamHI par exemple, permet de distinguer les DNA provenant de quatre souches différentes du ASV (Pr-A, Pr3, PrC et B<sub>77</sub>). (Shank et al.1977).

**C - Intermédiaire linéaire non intégré cytoplasmique**

**1. Etude : Analyses de restriction**

Les sites de restriction de 3 enzymes Eco RI, KpnI et BamHI ont d'abord été déterminés sur les DNA intermédiaires du ASV.

./...



Cartographie des sites de clivage de trois endonucléases  
(Eco RI, Bam HI et KpnI) dans l'ADN du ASV souche Pr-c.  
(Intermédiaire linéaire cytoplasmique)  
(extrait de Shank et al. 1978)

### Agencement des grands fragments Eco RI

- La digestion avec Eco RI des 2 formes linéaire et circulaire du DNA viral non intégré produit trois fragments :

FI = 2,5 Md  
FII = 2 Md  
FIII = 1,5 Md.

Il en résulte que la molécule linéaire possède un site Eco RI très près d'une (ou des deux) extrémités(s).

- Le DNA circulaire obtenu dans les cellules infectées par un mutant "td" du ASV (Pr-c) ne contenant plus le gène "src" et aussi digéré par Eco RI, fournit également les fragments FI et FIII mais FII est remplacé par un petit fragment 0,7 Md.

Les fragments FII et 0,7 Md contiennent donc les séquences complémentaires à celles de l'extrémité 3' du RNA viral.

Pour établir l'ordre relatif des 2 autres grands fragments Eco RI on analyse les produits obtenus après digestions séquentielles du DNA viral avec Eco RI et KpnI.

KpnI produit, on l'a vu, 2 fragments de restriction à partir de ce DNA ; elle clive aussi le fragment FI en deux autres fragments plus petits de 0,7 Md et 1,6 Md. Ceci permet d'agencer d'une seule manière les différents fragments Eco RI par rapport au génome viral (RNA 35 S). De 5' vers 3' on aura successivement les fragments 1,5 puis 2,5 puis 2 Md (FIII, FI, FII).

### Sites Eco RI aux deux extrémités de l'intermédiaire DNA cytoplasmique

Plusieurs expériences ont permis de conclure à l'existence de 2 sites de reconnaissance Eco RI situés à l'intérieur des 200 bases qui constituent les extrémités du DNA intermédiaire cytoplasmique.

DNA intermédiaire cytoplasmique



- La mise en évidence du site Eco RI situé dans l'extrémité droite du DNA intermédiaire viral a pu être faite à partir d'expériences de transcription de ce DNA in vitro (Taylor et al 1976) et par la démonstration que la région 3' du génome RNA code pour un site de reconnaissance Eco RI. Celui-ci serait situé 60 à 65 bases avant le poly A. (Hsu et al. 1978, Schwartz et al. 1978).

Varmus et al 1978, mettent en évidence l'existence de ce site dans le DNA intermédiaire transcrit in vivo.

- Pour tester la présence d'un site Eco RI près de l'extrémité gauche du DNA intermédiaire linéaire non intégré (in vivo), l'endonucléase Bam HI a été utilisée.

Bam HI clive ces DNA intermédiaires au niveau de 4 sites de reconnaissance ; elle fournit 5 fragments de restriction à partir du DNA linéaire viral et 4 à partir de la forme circulaire. Trois petits fragments sont communs aux 2 formes.

Le plus grand 3,2-Md et le plus petit 0,45 Md du DNA linéaire, forment un seul produit de digestion du DNA circulaire et constituent donc les fragments terminaux du DNA linéaire.

Une digestion séquentielle de celui-ci avec Bam HI puis Eco RI montre que le fragment 3,2 Md contient le fragment FII et dérive donc de l'extrémité 3' du DNA.

Le petit fragment (0,45 Md) dérivé alors de l'extrémité gauche est réduit en un fragment 0,3 Md démontrant ainsi l'existence d'un site de reconnaissance Eco RI à gauche. (Shank et al. 1978).

Les mêmes études de restriction de ces endonucléases ont été effectuées sur le DNA viral linéaire synthétisé in vitro (Taylor et al.1978) et l'absence apparente d'un site Eco RI à l'extrémité gauche de ce DNA suggère qu'il n'est pas identique au DNA viral linéaire présent dans les cellules infectées (Shank et al,1978).

Comparaison de L'intermédiaire DNA Linéaire au génome RNA :  
Répétitions naturelles aux deux extrémités du DNA

L'utilisation d'une dizaine d'autres endonucléases a permis de positionner les gènes env, sarc et la région c sur le DNA aux mêmes positions que sur le RNA.

On observe aussi une permutation d'une certaine de bases de l'extrémité 5' du RNA (génome) à l'extrémité 3' du DNA donnant une structure schématisée ainsi : -----3' 5' pour l'intermédiaire DNA linéaire à l'extrémité droite.

(3' désignant les 200 bases terminales de l'extrémité 3' du RNA précédent le polyA et 5' désignant la séquence des 101 bases comprises entre le site de fixation de l'amorce tRNA<sup>trp</sup> et l'extrémité 5' du RNA viral (Shank et al 1978).

Pour l'extrémité gauche du DNA linéaire, plusieurs structures possibles ont été prévues dépendantes de la capacité de la polymérase à transcrire la matrice RNA autour du site de fixation du tRNA<sup>trp</sup> amorce.

On s'attendait à deux structures possibles schématisées ainsi : soit 5' - - - - - 3' - 5'  
soit - - - - - 3' - 5'.

Les expériences menées pour caractériser la mobilité électrophorétique des DNA intermédiaires linéaires présents dans le cytoplasme des cellules QT6, un jour après l'infection par le ASV de souche Pr-C mettent en évidence une bande de migration centrée à 6,36 Md correspondant à un intermédiaire DNA plus grand que le transcript hypothétique attendu d'environ 5,85 Md (Hsu et al.1978).

De plus, l'endonucléase PvuI fait une seule coupe dans l'extrémité droite d'un même DNA intermédiaire synthétisé in vitro alors qu'elle en produit deux sur le DNA obtenu in vivo, la seconde ayant lieu dans l'extrémité gauche (Hsu et al. 1978).

La comparaison enfin, de la carte des sites de restriction des deux DNA obtenus in vivo et in vitro montrent que les séquences nucléotidiques additionnelles (0,5 Md) du DNA "in vivo" sont localisées à l'extrémité gauche de la molécule, et représentent une répétition des séquences de l'extrémité droite.

Canaani et al, avait montré auparavant qu'un court RNA viral contenant le poly A s'associe aux deux extrémités de la molécule de l'ADN linéaire généré par le virus du sarcome murin de Moloney (Hsu et al. 1978).

De même, les sondes spécifiques soit de l'extrémité 3' (cDNA3') soit de l'extrémité 5' (cDNA5') s'associent aux fragments de restriction terminaux 1,5 Md Eco RI et 0,45 Md Bam HI de l'extrémité gauche de ce même DNA linéaire synthétisé in vivo.

Les deux extrémités de ce DNA contiennent donc les séquences spécifiques des deux extrémités 3' et 5' du RNA viral. (Shank et al. 1978).

Comment ces séquences répétées 3' et 5' sont-elles ordonnées de part et d'autre de l'intermédiaire linéaire non intégré ?

Une première expérience (Shank et al 1978) a consisté à isoler les deux fragments Bam HI terminaux (3,6 Md à droite et 0,65 à 0,7 à gauche) générés à partir du DNA intermédiaire linéaire du Pr B-ASV et à tester la capacité de cDNA3' et cDNA5' à s'associer avec eux et avec chacun des fragments générés après digestion secondaire par Eco RI.

./...

Comme attendu, cDNA3' et cDNA5' s'associent toutes les deux au grand fragment de droite 3,6 Md Bam HI. Après digestion secondaire avec Eco RI on obtient deux fragments 3,5 et 0,15 Md Eco RI. Alors que cDNA3' s'associe aux deux fragments Eco RI générés, cDNA5' ne s'associe vraiment qu'au plus petit fragment 0,15 Md.

On répète alors les mêmes tests avec le fragment 0,65-0,7 Md gauche Bam HI. Il est détecté rapidement avec cDNA3', cDNA5' et cDNArep (copie du RNA 35 S entiers ; rep = répllication). Après digestion par Eco RI on obtient deux bandes dans le gel d'agarose correspondant à des fragments de taille 0,53 Md et 0,15 Md.

cDNA5' s'associe seulement au fragment 0,53 Md  
cDNA3' s'associe aux deux fragments.

Ces résultats et le fait que la molécule linéaire possède un site Eco RI à ses deux extrémités dans les séquences dérivées de la région 3' du RNA permettent de conclure que les séquences homologues des deux extrémités du DNA sont similairement ordonnées, et peuvent être schématisées ainsi :

3'-5' - - - - - 3'-5' (Shank et al.1978)

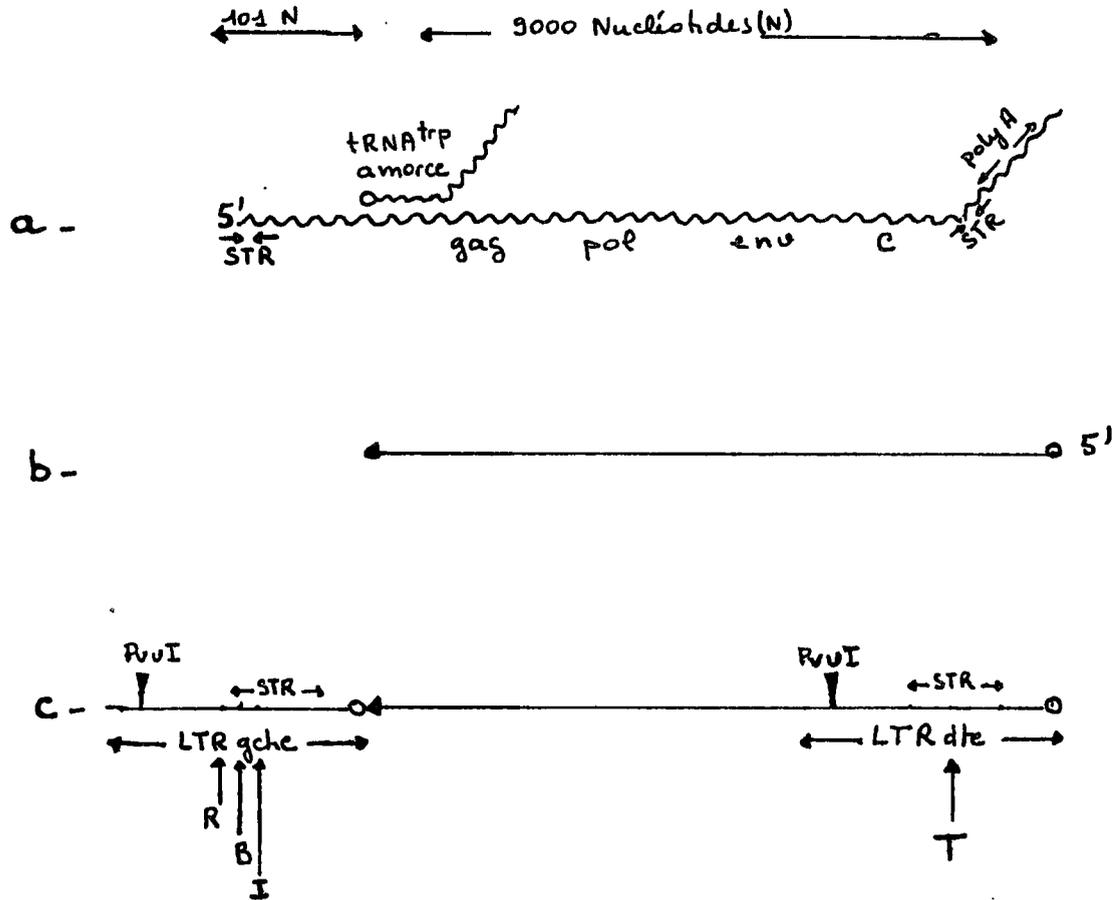
La capacité à circulariser ces DNA linéaires après digestion nucléasique montre aussi que cette répétition

est bien directe 3'-5' \_ \_ \_ 3'-5'  
plutôt qu'inversée 3'-5' \_ \_ \_ 5'-3' . (Hsu et al.1978).

De même la génération de fragments de digestion de tailles identiques (environ 300 nucléotides) par digestion du DNA linéaire avec les endonucléases Eco RI et PvuI qui clivent le DNA linéaire à différentes positions à l'intérieur de la séquence redondante, confirme ces résultats (Shank et al 1978).

./...

Transcription du génome du RSV  
(extrait de Sabran et al. 1979)



- a - Structure du RNA : La longueur des STR est de 16 à 21 nucléotides.
- b - transcript hypothétique attendu du RNA en DNA, ne comprenant pas le poly A 3' terminal et une copie de STR.
- c - Structure du DNA intermédiaire bicaténaire linéaire non intégré :  
La longueur des LTR est d'au moins 217 pb.  
I et T : sites possibles de l'initiation et la terminaison de la transcription.  
R et B : sites possibles respectifs de reconnaissance et de fixation de la RNA polymérase.

Les analyses du DNA viral linéaire non intégré de cellules infectées par virus murin des tumeurs mammaire (M. MTV) et par virus des leucémies murines MLV sont aussi en accord avec l'existence de répétition naturelle aux extrémités du DNA linéaire non intégré. Dans les deux cas, les réactifs d'hybridation spécifiques pour les deux extrémités du RNA ne permettent pas de distinguer entre les fragments dérivés de l'une ou de l'autre des extrémités du DNA.

2. Implications : Comment la LTR gauche est-elle générée après la transcription du génome ?

\* Etude chez le RSV : Shank et al. 1978, Hsu et al. 1978.

L'ordre apparent des séquences terminales de l'extrémité droite du DNA intermédiaire linéaire est en accord avec les précédentes études de transcription in vitro et in vivo.

En particulier, il correspond bien à la structure attendue pour le DNA, amorcée par le tRNA<sup>trp</sup> en direction de l'extrémité 5', prolongée après transfert de la polymérase virale de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' (excluant le poly A) du RNA 35S initial.

Cependant, si le "saut" de la polymérase se produit vers la région 3' terminale du RNA 35 S qui a initié la synthèse, celle-ci ne peut se poursuivre au delà du site de fixation du tRNA amorce pour générer la répétition terminale gauche directe observée du fait de la digestion préalable par la RNase des 16 à 21 bases d'une des copies de la redondance terminale du génome (R ou STR)(Hsu et al 1978).

Le transfert de la polymérase, pourrait s'effectuer de l'extrémité 5' de la sous-unité 35 S initiale à l'extrémité 3' de la seconde sous-unité 35 S et cela expliquerait pourquoi les génomes des Rétrovirus possèdent deux sous-unités 35 S liées par liaisons hydrogène.

./...

Après transfert sur la seconde sous-unité, la transcription continuerait en direction de l'extrémité 5' de cette sous-unité ; un second transfert de la polymérase se produirait ensuite vers l'extrémité 3' du 1er RNA 35 S jusqu'à la formation complète de la redondance gauche. La transcription initiale du DNA commençant à partir de la 1ère amorce tRNA provoquerait le déplacement de l'autre tRNA<sup>trp</sup>. Ce déplacement et l'utilisation d'un seul tRNA amorce sont les deux caractéristiques essentielles de ce modèle. (Hsu et al.1978).

Il présente cependant l'inconvénient de nécessiter deux transferts successifs de la polymérase sur deux matrices RNA 35 S différentes et surtout après le second transfert, celle-ci arrêterait la synthèse du DNA au milieu d'une séquence qu'elle a copié précédemment sans interruption apparente.

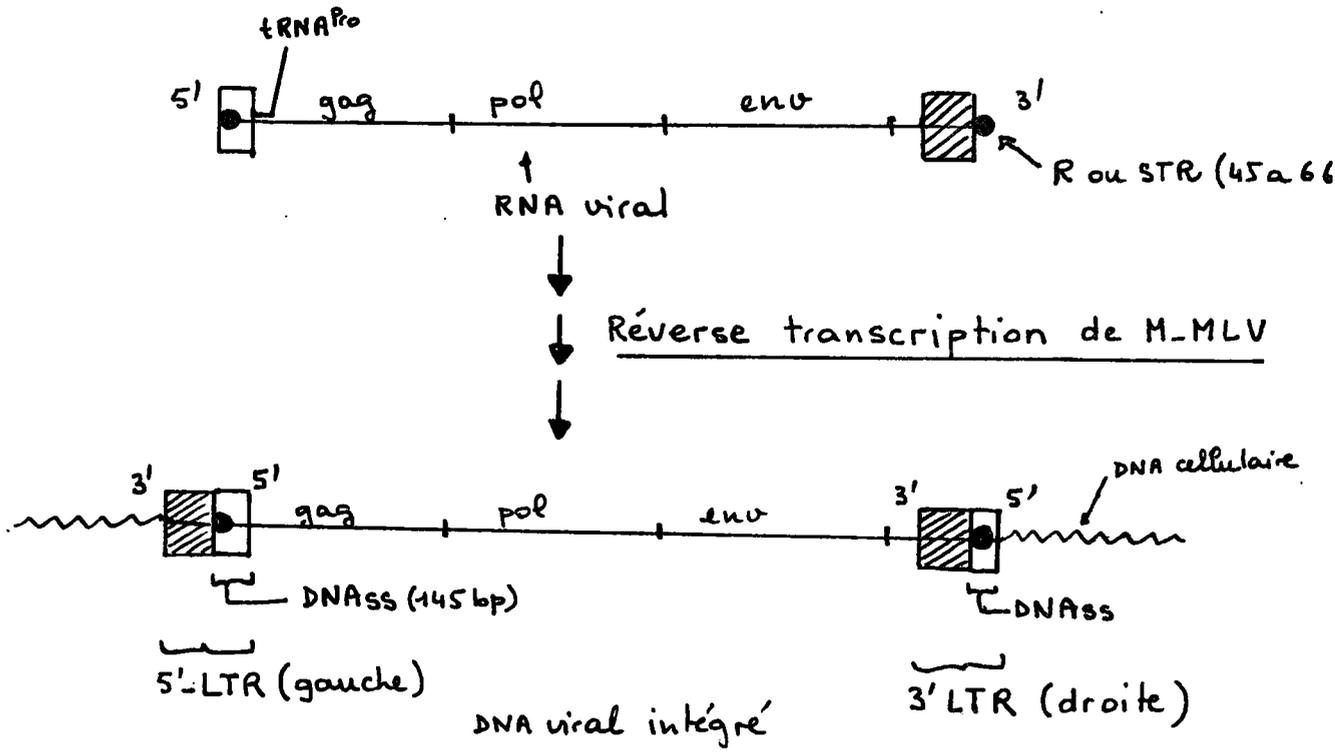
En fait, il semble plus probable que le second saut transcriptionnel s'effectue vers un DNA plutôt que vers une matrice RNA. (Shank et al.1978).

En effet, au cours de la synthèse du duplex linéaire cytoplasmique, les courts fragments d'ADN de polarité positive sont synthétisés au fur et à mesure que la chaîne moins s'allonge.

Ces brins (+) constitués de 300 bases environ et positionnés près de l'extrémité 5' du brin (-) naissant, contiennent des séquences des deux extrémités 3' et 5' du RNA. La complémentarité de base entre ce court fragment de DNA (+) et l'extrémité du DNA strong-stop (-) faciliterait le second "saut" de la polymérase et expliquerait l'arrêt de la transcription après les séquences 3' du fragment (+). (Shank et al.1978).

L'inhibition de la "complémentation" du DNA du virus de la leucémie murine par l'actinomycyne D semble confirmer que ce court fragment de DNA (+) serve de modèle pour la transcription de la Longue Répétition Terminale gauche (LTR).

./...



(extrait de Van Beveren et al. 1980)

\* Etude chez Le M-MLV (Van Beveren et al 1980)

Dans le cas du virus de la leucémie murine de Moloney (M-MLV) 19 nucléotides à l'extrémité 3' du tRNA<sup>Pro</sup> amorce sont liés par liaison hydrogène au RNA viral. Le 3' A-OH du tRNA<sup>Pro</sup> est localisé à 146 nucléotides de la séquence de tête, 5' CAP du RNA viral ; il forme une liaison phosphodiester avec le premier désoxynucléotide triphosphate et la synthèse du DNA complémentaire se poursuit jusqu'au nucléotide 5' du RNA viral. Le DNA strong-stop (DNAss) long de 145 nucléotides lié par covalence au tRNA<sup>Pro</sup> se dissocie et s'hybride à la séquence redondante terminale (R ou STR) de l'extrémité 3' du RNA viral. La synthèse du DNA procède alors de l'extrémité 3' du RNA vers l'extrémité 5'.

Un fragment de DNA long de 600 paires de bases (bp) de polarité opposée (+) peut être observé. après la synthèse de 0,5 à 1,0 kb du transcript cDNA (-).

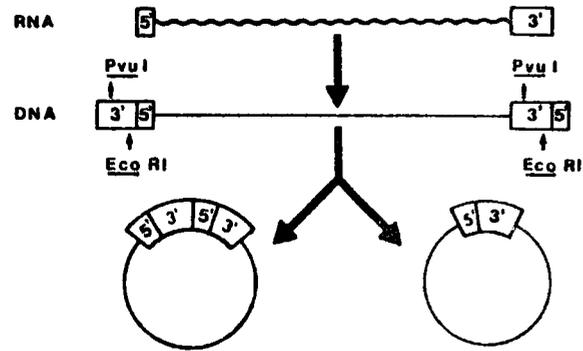
Le DNA bicaténaire synthétisé in vivo ou in vitro présente deux types de molécules :

- celles qui contiennent les séquences génomiques de l'extrémité 5' répétées à leur extrémité 3':(5' - - - 3'5'),
- et celles qui contiennent en plus les séquences génomiques 3' répétées à leur extrémité 5' - schématisées ainsi : (3'5' - - - - - 3'5').

./...

Représentation des précurseurs non intégrés  
du DNA du ASV.

(extrait de Shank et al 1978)



3' = représentation des 200 bp adjacentes au poly A non représenté.

5' = 101 bases de l'extrémité 5' du RNA viral.

Les sites Eco RI et PvuI sont indiqués.

D - Intermédiaire circulaire non intégré nucléaire (Shank et al.1978)

1. Deux tailles de DNA circulaire

Les analyses de restriction du DNA circulaire fermé monomérique de ASV ont montré que les fragments représentant la fusion des deux extrémités de la molécule linéaire, formaient souvent une double bande sur les gels d'agarose. Les molécules circulaires entières ou simplement digérées par l'endonucléase KpnI ne font pas apparaître ce doublet. Les deux fragments de jonction isolés grâce à l'endonucléase XhoI sont en fait sensiblement de même taille ; ils ne diffèrent que de 300 paires de bases. Cependant, ils mettent ainsi en évidence deux tailles de cercles fermés : les plus grands sont identiques au DNA linéaire non intégré et contiennent deux copies de la séquence répétée 3'-5', tandis que les plus courts, les plus nombreux, n'ont qu'une seule copie de cette LTR.

Les deux types du DNA circulaire chez le M.MTV ont été isolés plus facilement du fait d'une différence de taille plus importante (de 1 200 nucléotides).

De même, dans les cellules infectées par les virus des leucémies murines (MLV), les deux DNA circulaires diffèrent de 600 bp approximativement.

Ces deux classes de DNA circulaire ont encore été isolées pour d'autres virus aviaires tels les virus endogènes de poulet (RAV-0) ou un virus MC-29 de la myélocytomatose et son virus associé MC-AV.

2. Interprétation

Comme le DNA linéaire (ASV) cytoplasmique semble le précurseur du DNA circulaire fermé nucléaire, les cercles les plus courts résulteraient de délétions aux extrémités du DNA linéaire pendant la circularisation.

Et la présence d'une LTR aux extrémités permettrait à de telles délétions de se produire avec une haute fréquence de recombinaison intramoléculaire entre ses extrémités.

Pour ASV la longueur de la délétion serait égale à la LTR et si le modèle s'applique aux Rétrovirus en général les DNA linéaires de MLV et M.MTV auraient des LTR de 600 et 1 200 paires de bases, respectivement.

Comment le plus grand cercle résulte-t-il du DNA linéaire ?

Shank et al ont simplement constaté que la somme des petits fragments de restriction terminaux Eco RI du DNA linéaire est sensiblement égale en taille au fragment de jonction du DNA circulaire (180 + 150 = 320 pb).

2 - ETUDE DU DNA VIRAL INTEGRE DANS L'ADN CELLULAIRE

A - Analyse du provirus ASV

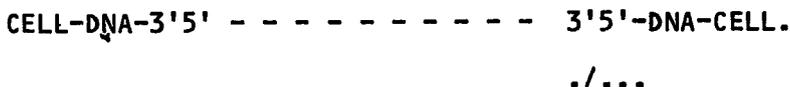
\* Expériences de Hugues et al. (1978) chez les mammifères

Pour obtenir des clones de cellules de mammifères, chaque clone dérivant d'une seule cellule infectée, une lignée homogène de cellules fibroblastiques de foie de rat (cellules NRK) est infectée avec le ASV de souche Schmidt Rupin D (SR-D-ASV).

Plusieurs jours après l'infection, 15 clones de cellules transformées sont sélectionnés pour l'analyse du DNA proviral, afin de déterminer son emplacement dans l'ADN cellulaire et sa structure.

- L'utilisation des endonucléases KpnI, Eco RI et Bam HI permet de montrer que le DNA proviral d'au moins 8 clones sur 15 est identique au DNA linéaire non intégré.

Le provirus peut donc être schématisé ainsi :



- Des provirus anormaux détectés dans les autres clones présentent de larges délétions de séquences nucléotidiques dans le génome viral mais les LTR paraissent conservées.
- 2 des 15 clones contiennent chacun deux provirus localisés à des sites distincts dans l'ADN de la cellule hôte : la digestion de ces clones par KpnI produit en effet quatre fragments de digestion. Or l'insertion du second provirus au même site que le premier, par recombinaison intramoléculaire, produirait 2 provirus en tandem sur ce DNA cellulaire et fournirait 3 fragments de digestion KpnI.

Enfin pour chaque provirus l'intégration fait intervenir des régions distinctes de l'ADN cellulaire, mises en évidence par la production de fragments de restriction Eco RI ou Bam HI comprenant des séquences nucléotidiques, du DNA cellulaire, très différentes pour chacun des clones.

\* Expériences de Sabran et al (1979), Taylor et al (1979) chez les oiseaux

De semblables études ont été menées sur le provirus ASV intégré dans l'ADN des fibroblastes transformés de poulets, canards et cailles.

Les cellules utilisées furent soit des cultures infectées en masse, soit des clones de cellules infectées, sélectionnés pour leur capacité à former des colonies dans l'agar.

L'intégration du DNA viral paraît également se produire à un site spécifique sur le génome viral mais à de nombreux sites dans l'ADN de la cellule hôte : en effet, l'endonucléase PvuI qui a normalement un site de reconnaissance dans les LTR libère un fragment de DNA proviral d'une unité de longueur de 9,5 kb. Celui-ci est une copie intégrale du RNA viral et il est flanqué par des répétitions terminales d'au moins 217 paires de bases, indiquant que les séquences virales ne sont pas permutées pendant l'intégration.

Ces données ne permettent pas cependant de savoir si toutes les bases des LTR du DNA non intégré sont conservées ou non dans le provirus.

D'autre part, pour chacun des 12 clones de cailles transformés étudiés, il fut possible de détecter rapidement après digestion par l'endonucléase KpnI des fragments de jonction DNA viral - DNA cellulaire uniques.

Mais le site d'intégration sur l'ADN cellulaire diffère là encore d'un clone à l'autre.

Pour chaque clone de poulet ou canard, une grande hétérogénéité apparût, probablement d'ue à des altérations après l'intégration (Sabran et al 1979).

Le provirus intégré, comme un élément transposable, pourrait aussi subir des transpositions, ou bien générer des insertions ou des délétions dans les séquences cellulaires adjacentes au site d'intégration (Taylor et al 1979).

#### B - Sites d'intégration des virus endogènes et exogènes de la leucémie murine de Moloney (M-MuLV) (Van der Putten et al 1979).

Des sondes spécifiques de virus de leucémies murines AKR et Moloney ont été préparées pour caractériser les sites d'intégration de ces virus dans les souris de lignées Balb/Mo et Balb/c.

La souris Balb/Mo porte sur le chromosome 6 de son génome au locus Mov 1, un M-MuLV, tel un virus endogène. Ce virus est transmis génétiquement des parents aux enfants et il peut être détecté après analyse de restriction dans un fragment Eco RI caractéristique de 16 Md.

Directement après la naissance des taux élevés de virions M-MuLV sont exprimés dans le sang et après un temps de latence de plusieurs mois, la souris développe une leucémie thymodépendante qui s'accompagne d'une amplification des séquences d'ADN spécifique du M-MuLV dans les tissus tumoraux.

./...

La souris de lignée Balb/c qui normalement ne développe spontanément cette leucémie que 2 ans après sa naissance, peut après infection néo-natale par un virus exogène M-MuLV se comporter comme une souris Balb/Mo. Mais aucun fragment de DNA Eco RI 16 Md n'est détecté dans l'ADN des tissus tumoraux.

Le site d'intégration du M-MuLV exogène qui a infecté la souris Balb/c à la naissance est donc différent de celui du M-MuLV "endogène" de la souris Balb/Mo.

D'autre part, les souris Balb/Mo et Balb/c contiennent aussi un virus endogène qui peut être reconnu par une sonde spécifique du virus de la leucémie murine AKR.

Un fragment de DNA Eco RI unique de 12 Md semble contenir ce provirus endogène type AKR présent dans les cellules tumorales et normales des deux lignées de souris. Ce provirus est donc comme le provirus M-MuLV "endogène", intégré à un seul site dans le génome des différentes souris.

La leucémogénèse dans Balb/Mo et Balb/c, qui a été infectée à la naissance par M-MuLV exogène, s'accompagne d'une réintégration des séquences virales du M-MuLV (3 à 4 copies au lieu d'une par génome) à de nombreux sites chromosomiaux différents dans les tissus tumoraux.

- Une partie des séquences virales réintégrées sont sous-génomiques.
- La séquence AKR n'est pas réintégrée à d'autres sites.
- Enfin, les copies acquises somatiquement ne s'intègrent ni au locus Mov I ni en tandem avec le provirus endogène type AKR.

Les mêmes résultats confirmant que de nombreux sites dans le génome de l'hôte peuvent accepter l'ADN proviral, ont été obtenus pour d'autres Rétrovirus (Ainsi le M-MTV, Cohen et al. 1979). Cependant, des expériences portant sur les fragments de digestion contenant du DNA viral infectieux ont révélé que ce DNA s'intègre à un seul ou quelques sites seulement dans les cellules infectées chroniquement.

## C - Interprétation

### 1. Sites d'intégration dans l'ADN cellulaire (Hugues et al 1978).

Une analyse mathématique des différents sites cellulaires impliqués dans l'intégration du provirus ASV permet de déduire qu'une quarantaine de régions de l'ADN des cellules tumorales des mammifères pouvait être concernée.

On ne peut cependant conclure que l'intégration se produise tout à fait au hasard.

Le nombre de sites observés serait en accord avec une intégration, soit au niveau d'une courte séquence définie de 10 à 15 nucléotides dont on trouve de nombreuses copies dans l'ADN des mammifères, soit au contraire, dans une des longues séquences nucléotidiques répétées également de nombreuses fois dans l'ADN des cellules eucaryotes.

Une autre interprétation aussi probable serait l'intégration dans une série de sites préférentiels différents les uns des autres comme cela se produit pour certains "éléments transposables" des bactéries. Ces éléments qui portent des gènes structuraux flanqués par des répétitions naturelles directes ou inversées, de séquences nucléotidiques non codantes, montrent une grande spécificité dans les événements de transposition.

Ainsi, l'élément Tg très proche du ASV (il présente une longue répétition directe à ses extrémités) manifeste une certaine spécificité pour les sites d'insertion du ASV dans l'ADN de la cellule hôte transformée.

### 2. Précurseur du DNA intégré ?

L'ADN proviral est colinéaire de l'ADN cytoplasmique linéaire non intégré incluant les séquences redondantes aux extrémités. Ceci est en accord avec un mécanisme d'intégration soit de la plus grande molécule circulaire nucléaire soit de la molécule linéaire cytoplasmique (Shank et al 1978).

./...

Mais on peut prévoir également pour les formes circulaires n'ayant qu'une seule copie de LTR, un mécanisme selon lequel la séquence répétée est générée pendant l'intégration comme c'est le cas pour les éléments transposables (Sabran et al. 1979).

On ne connaît pas en fait, le véritable précurseur immédiat du DNA viral intégré, mais il s'agit sûrement du DNA circulaire "double LTR" puisqu'il est infectieux, même à l'état libre, sous certaines conditions, et qu'il a été démontré qu'il pouvait être généré à partir du DNA linéaire (Shank et al. 1978). Ceci reste parfois revendiqué (Varmus et al. 1978).

### 3. Site d'intégration dans l'ADN viral

Une seule petite région du DNA viral apparaît dans tous les cas liée au DNA cellulaire. Le point d'attachement se ferait par l'intermédiaire de quelques bases seulement, des extrémités du DNA linéaire ou de la région de jonction de ces extrémités dans le DNA circulaire. Le maintien d'autre part des LTR dans le génome des mutants de délétion (Shank et al. 1978) indiquent qu'elles doivent jouer un rôle essentiel dans l'intégration du provirus, et bien que la fonction de ces séquences additionnelles n'a pas encore été déterminée à ce niveau, on peut penser qu'elles servent à initier, contrôler et terminer la transcription du provirus ou bien qu'elles peuvent contenir les signaux des étapes successives requises pour la production d'ARNm ou ARN viral à partir d'une seule matrice.

De telles fonctions attribuées à des séquences virales impliqueraient que le site d'intégration du provirus dans l'ADN cellulaire importerait peu pour l'expression des gènes viraux. (Hugues et al. 1978).

La transcription de l'ADN proviral en 1 RNA viral se ferait de la gauche vers la droite.

./...

A partir de la structure de ce RNA Viral on peut prévoir que la transcription se termine en T juste au delà de la STR après que le poly A soit additionné. De même, si aucun pré-mRNA n'est décelé, la transcription débiterait en I. Chez les procaryotes les séquences de DNA non transcrites en amont du site d'initiation contiennent les sites de reconnaissance et fixation de la RNA polymérase de provirus intégré qui contient 2 copies de LTR peut utiliser l'une d'elles pour fournir ces séquences essentielles non codantes. Sites de reconnaissance (R) et site de fixation (B) seraient donc situés dans la région 3' de la LTR gauche. (cf. schéma transcription du RSV (c), Sabran et al.1979).

Le DNA viral intégré flanqué des deux LTR est analogue aux "éléments transposables" des procaryotes : les répétitions directes de quelques "transposons" fonctionnent aussi dans l'initiation et la terminaison de la transcription et peuvent faciliter l'intégration et la transposition de l'élément.

Mais le provirus rappelle aussi certaines séquences de DNA de drosophile : il se peut que les gènes structuraux flanqués de LTR directes soient de plus grande importance dans l'organisation des génomes des cellules eucaryotes et procaryotes. (Sabran et al.1979).

#### 4. Mécanismes de réintégration des séquences virales (M-MuLV) dans la leucémogénèse.

L'amplification différentielle de séquences virales spécifiques pourrait être expliquée par une différence du site d'intégration de ces virus dans l'ADN de la cellule hôte ; l'activité de ces provirus serait gouvernée par les séquences cellulaires adjacentes.

D'autre part, les provirus incomplets (de Moloney) supplémentaires présents dans les tissus tumoraux pourraient être dus à la réinfection de la cellule par un virus contenant au moins l'information partielle de M-MuLV, ou par un virus recombinant intégré puisque de tels recombinants entre virus de Moloney et autres virus ont été isolés à partir de lymphomes de souris Balb/Mo. (Van der Putten 1979).

### III - ETUDE DES LTR

#### 1 - TECHNOLOGIE DES DNA RECOMBINANTS (Kourilsky 1980, Russel 1981)

Récemment, les chercheurs ont mis au point des méthodes expérimentales permettant de fabriquer de l'ADN recombiné en tube à essai. Il en a résulté un essor considérable de la recherche dans divers domaines et en particulier celui de l'étude de la structure et de l'expression des gènes.

Au départ de cette technique, il faut disposer de deux molécules d'ADN différentes :

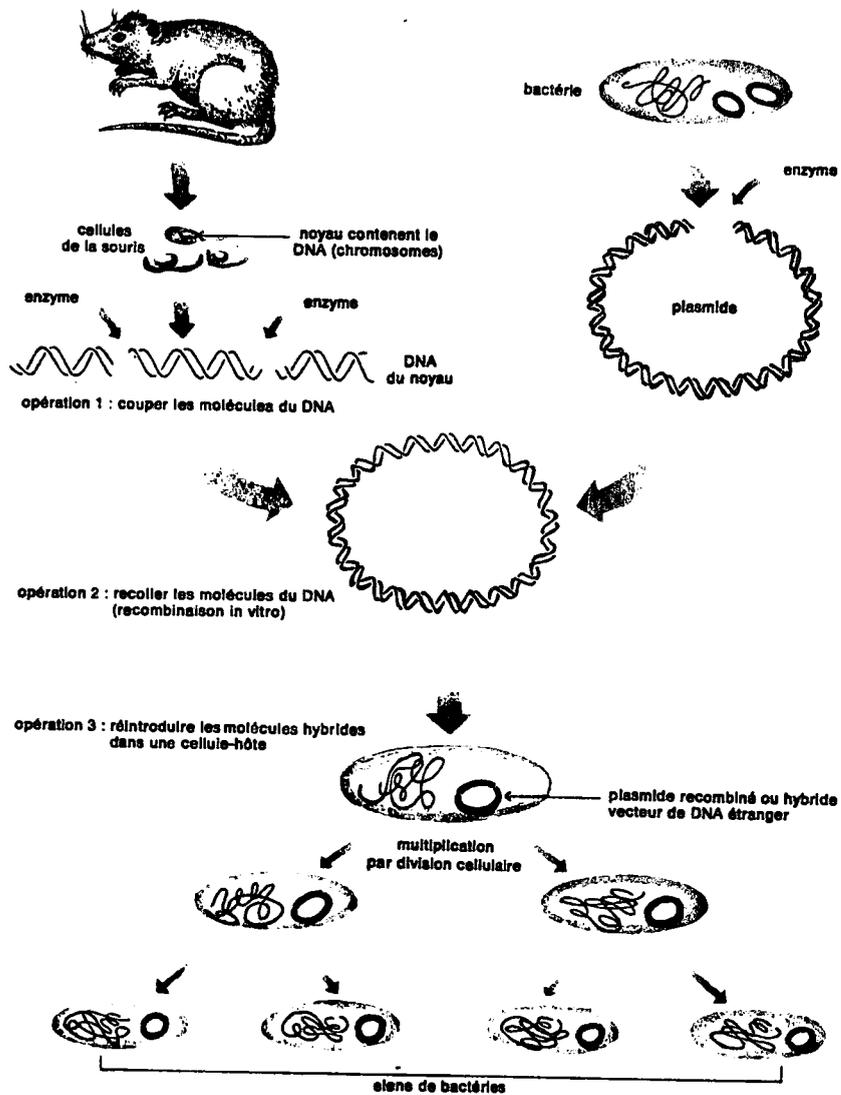
- La première, la molécule que l'on désire étudier, est digérée par une enzyme de restriction sélectionnée en vue d'obtenir des fragments d'ADN bien définis.
- La seconde, une petite molécule d'ADN particulière, (plasmide ou ADN viral) doit véhiculer un des fragments précédemment obtenus. Pour cela, le plasmide est ouvert en un site unique par la même endonucléase.

Il existe ensuite, deux méthodes pour épisser le segment d'ADN dans le vecteur :

Si l'enzyme de restriction fait des coupures en chicane sur l'ADN bicaténaire étudié et sur le plasmide, il y a obtention par simple complémentarité des extrémités monocaténares complémentaires (méthode des extrémités cohésives) d'une molécule d'ADN circulaire de plus grand diamètre que le plasmide initial, et une polynucléotide ligase stabilise ensuite cette molécule hybride par formation de 4 liaisons covalentes.

La probabilité pour obtenir cette molécule chimérique reste faible cependant et certaines endonucléases d'autre part, donnent des fragments de restriction à "bouts carrés".

./...



### 3 opérations fondamentales :

- 1 - Fragmentation des molécules d'ADN de 2 origines différentes
  - la molécule étudiée
  - la molécule vecteur.
- 2 - Collage (épissage) d'un fragment d'ADN désiré dans le vecteur. On obtient une molécule d'ADN recombinée (hybride ou chimère).
- 3 - Introduction de la molécule hybride résultante dans la bactérie hôte. La multiplication bactérienne entraîne du même coup l'amplification, c'est-à-dire le clonage de la molécule recombinée (on parle de clonage moléculaire).

On utilise alors la méthode d'addition d'extrémités complémentaires synthétiques qui consiste à allonger les chaînes du fragment d'ADN à chaque extrémité 3' par un homopolymère synthétique, poly dA, tandis que les extrémités 3' des brins d'ADN du plasmide sont allongées par un bras poly dT de même longueur.

Le mélange en solution des deux types de molécules en présence de la ligase conduit à la formation d'ADN circulaire recombiné avec une plus grande probabilité.

Une fois recombiné, le vecteur doit être capable de se répliquer normalement dans une cellule hôte assurant du même coup, la répllication du fragment d'ADN étudié.

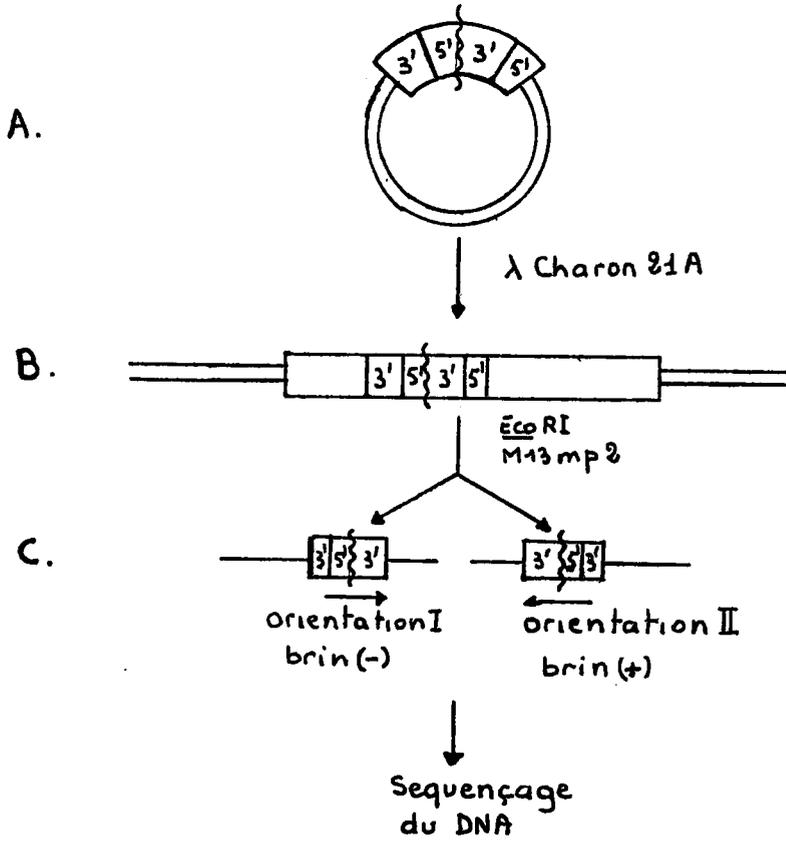
Le plasmide, par exemple, petite molécule d'ADN circulaire bicaténaire extrachromosomique se réplique de façon autonome dans la bactérie. En plus des gènes nécessaires à sa répllication, il ne contient que quelques gènes, tels des gènes de résistance à certains antibiotiques. Il possède d'autre part, une densité de flottaison très différente de celle du chromosome bactérien, ce qui rend son extraction aisée.

Au cours de l'expérience, le plasmide est donc extrait de la bactérie hôte, ouvert par l'endonucléase, recombiné avec le fragment d'ADN désiré et réintroduit dans une bactérie hôte préalablement perméabilisée. (sa présence dans la bactérie pouvant être révélée par l'apparition de la résistance à un antibiotique).

Le plasmide recombiné, se réplique alors normalement dans la bactérie pendant que celle-ci croit et se divise. La colonie bactérienne résultante, ou clone, héberge ainsi à l'intérieur de chaque bactérie, le fragment d'ADN désiré que l'on dit avoir "cloné".

La mise en culture de cette colonie permet l'obtention d'une grande quantité de ce DNA à l'état pur ce qui est impossible en utilisant les techniques physicochimiques classiques.

./...



Stratégie de clonage pour l'analyse de la séquence  
des LTR des clones λ RAV2 et λ SRBtd  
(extrait de Ju et al.1980)

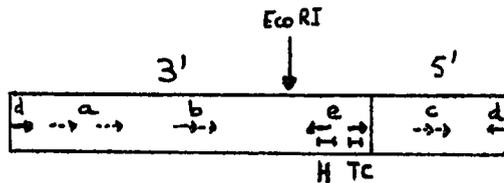


schéma de la LTR de λ RAV 2-2

Les homologies de séquences nucléotidiques à l'intérieur  
de la LTR sont indiquées.  
(extrait de Ju et al.1980)

Pour isoler un gène précis dans l'ADN d'un organisme supérieur (la souris par exemple), on extrait l'ADN total contenu dans les différents tissus de l'animal, et après digestion par plusieurs endonucléases conjointement, on obtient par exemple, un million de fragments d'ADN.

Chacun d'eux étant alors cloné, le problème se pose alors de sélectionner, parmi le million de clones obtenus, celui qui contient le gène désiré.

Si l'on dispose d'une catégorie cellulaire de l'animal synthétisant en abondance l'ARN messager spécifique du gène recherché, on pourra en réaliser une copie sous forme cDNA. Ce cDNA à son tour cloné pourra après purification, être employé comme sonde. Il y aura alors hybridation entre cette sonde radioactive et le clone désiré, ainsi repéré.

Grâce à cette technologie, on a pu séquencer ultérieurement les régions intéressantes de l'ADN et en particulier, les LTR de différents Rétrovirus intégrés ou non.

## 2 - CLONAGE ET ANALYSE DE LA SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE DES LTR

Quelques formes non intégrées et toutes les formes intégrées du DNA rétroviral contiennent des LTR. Celles-ci jouent sans doute un rôle essentiel dans l'intégration et la répllication du provirus mais peuvent aussi avoir une incidence sur le génome de la cellule hôte.

### A - Séquence de LTR obtenue à partir du clonage du DNA viral circulaire de différents Rétrovirus aviaires

#### a - Etude de JU G. et SKALKA A.M. (1980)

Les DNA circulaires viraux (A) comprenant deux copies de la LTR sont digérés par une enzyme de restriction, n'ayant qu'un seul site de reconnaissance sur la molécule, afin de la linéariser.

Ces DNA sont ensuite épissés dans le vecteur  $\lambda$ Charon 21A et clonés.

Les clones recombinants sélectionnés (B) comprennent l'insert viral avec les deux LTR arrangées en tandem ( $\rightarrow\leftarrow$ ) Après digestion avec l'endonucléase Eco RI, qui a un site de clivage dans la région 3' de chaque LTR, on obtient, le fragment correspondant à la région de jonction des 2 LTR.

Ce petit fragment Eco RI qui contient l'équivalent des séquences d'une LTR (bien qu'en ordre permuté) est ensuite isolé et inséré dans le phage M 13 mp 2 de DNA monocaténaire.

Les deux types de clones M 13 mp 2 recombinants (C) qui ont inséré soit le brin - du fragment Eco RI soit le brin + sont isolés et chaque unité de répétition est alors séquencée à partir du site Eco RI.

La LTR de 6 de tels clones a été étudiée indépendamment. Une séquence nucléotidique complète est montrée à partir du clone  $\lambda$  RAV 2-2. Elle comprend 348 nucléotides ; les limites des régions 3' et 5' furent déterminées par comparaison avec des séquences connues des extrémités 3' et 5' du RNA viral.

La région spécifique 3' comprend 247 nucléotides tandis que la région 5' comprend les 101 nucléotides de la molécule "strong-stop" aux positions 247 à 348. (cf schéma de la LTR de  $\lambda$  RAV 2-2).

Les LTR spécifiques de deux autres clones ne diffèrent que par des insertions ou substitutions de quelques bases seulement. Par contre les 3 autres clones ont des LTR plus petites présentant des délétions importantes, de 89 à 161 paires de bases, toutes localisées au début de la région 3' (exactement à la jonction entre les LTR).

./...

Dans les 6 LTR étudiées, il y a conservation des 60 derniers nucléotides de la région 3' et des 101 nucléotides de la région 5'.

La séquence du clone  $\lambda$  RAV 2-2 est aussi comparée à celle d'une extrémité du provirus Schmidt Ruppin D. Il y a homologie de séquences des positions 30 à 346. Cependant le provirus ne contient pas les 2 premières bases TT (aux positions 347 et 348) du cDNAss transcrit à partir du tRNA<sup>trp</sup>.

Ces deux nucléotides sont pourtant présents dans le DNA viral intégré.

La présence des 101 nucléotides du DNAss dans la LTR du DNA circulaire implique que la circularisation du DNA linéaire se fait par fusion des extrémités sans aucune perte de nucléotides. Alors que la perte de 2 nucléotides aux extrémités du provirus serait une conséquence de son intégration dans l'ADN cellulaire.

Afin de comprendre l'analogie existante entre le provirus flanqué de ses 2 LTR et certains éléments transposables, la séquence de  $\lambda$  RAV 2-2 a été comparée à celles de plusieurs éléments génétiques.

Cette analyse, faite à l'aide de l'ordinateur, met aussi en évidence plusieurs répétitions de séquences nucléotidiques à l'intérieur de la LTR.

Ainsi sont définies : (cf schéma de la LTR de  $\lambda$  RAV 2-2) :

- 3 petites répétitions directes (a, b, c) dont deux sont situées dans la région 3' et une dans la région 5' ;
- 1 répétition inversée complémentaire (d) de 10 à 15 nucléotides aux extrémités de la LTR ;
- Enfin une autre répétition inversée (e) localisée entre le site Eco RI de la région 3' et le site CAP 5'.

./...

Ces répétitions sont souvent instables et une recombinaison homologue entre les domaines répétés d'une répétition directe peut provoquer la séquence d'une des séquences répétées.

La répétition inversée (e) située dans la région 3' habituellement conservée, présente des homologues de séquences avec les éléments transposables "copia" de la drosophile et Ty 1 de la levure.

Elle contient aussi les deux séquences régulatrices présumées :

- la partie droite de la répétition contient la séquence AATAAA (positions 241 à 246) qui semble être le signal de polyadénylation et d'arrêt de transcription.
- la partie gauche, serait le centre d'une autre séquence riche en A + T (positions 212 à 224) ressemblant à la boîte de Hogness, séquence définie pour d'autres eucaryotes comme le site promoteur possible de la RNA polymérase II cellulaire, et dont le rôle serait de définir un site unique de démarrage de la transcription.

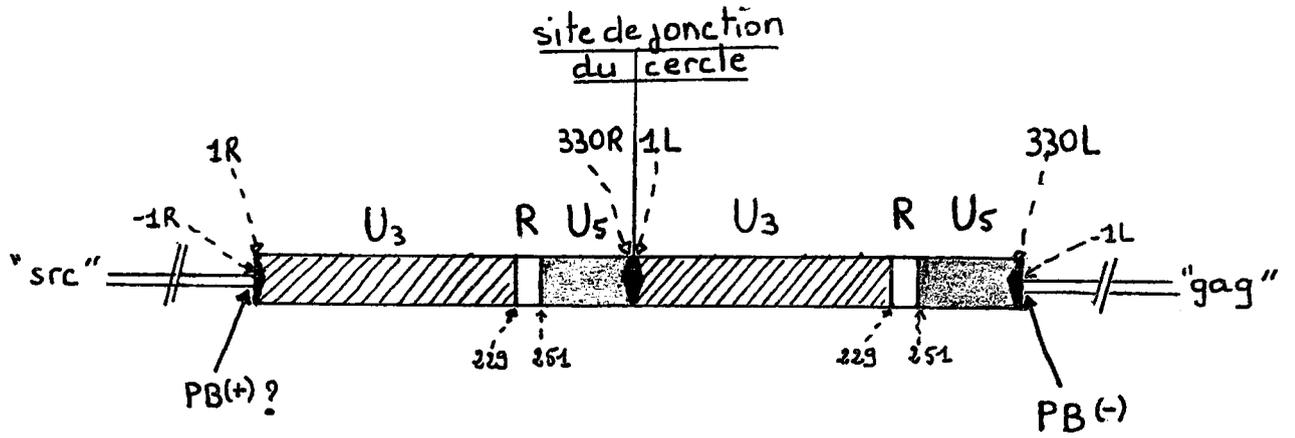
Les répétitions inversées trouvées aux extrémités de la LTR sont également présentes aux extrémités de la plupart des éléments transposables procaryotes et aux extrémités des répétitions directes de l'élément transposable de la drosophile par exemple.

La LTR des Rétrovirus jouent probablement un rôle dans la régulation de l'expression des gènes.

Les analogies de structure avec les éléments transposables telles que ; extrémités avec répétitions complémentaires inversées, formation d'une délétion adjacente aux extrémités et séquences homologues, impliquent que la LTR peut promouvoir l'intégration et probablement la transposition par des mécanismes similaires à ceux affectant les éléments transposables.

./...

Diagramme de la région du site de jonction du cercle  
du clone SRA 2  
(Swanstrom et al. 1981)



PB : site de fixation de l'amorce

b - Etude de SWANSTROM R. et al., (1981)

La séquence nucléotidique de la région du cercle comprenant les 2 LTR et les séquences virales adjacentes de part et d'autre a été déterminée.

Le DNA circulaire provient de cellules infectées par le ASV de souche Schmidt Ruppin A. et les clones sélectionnés avec les 2 LTR sont les clones SRA 1 et SRA 2.

La séquence de SRA 2 montre que le site de jonction du cercle est le centre d'une répétition directe tandem de 330 paires de bases représentant probablement la fusion des extrémités du DNA linéaire.

Une copie du domaine répété (numérotée 1 R → 330 R) est la copie proche du gène "src" et représente sans doute la LTR droite du DNA linéaire ; l'autre copie proche du gène "gag" (numérotée de 1 L à 330 L) serait la LTR gauche.

Chaque LTR contient à ses extrémités une répétition inversée imparfaite de 15 nucléotides (1-15, 315-330). Le DNA viral ASV est donc structuré comme certains éléments transposables.

Chaque LTR est composé de séquences uniques, provenant des extrémités du RNA, notées U5 (positions 251-330) et U3 (p. 1 à 229) jointes par une des 2 séquences R (230-250) du génome viral.

Les régions non répétées de part et d'autre des LTR représentent probablement les séquences relatives aux amorces pour le brin (-) et le brin (+) de l'ADN :

- les 18 nucléotides complémentaires du bras 3'OH du tRNA<sup>trp</sup>, amorce du DNAss<sup>-</sup>, sont bien présents dans les séquences virales de "gag" (-1L → -18L) juste à la limite avec la LTR gauche.

- Inversement la limite gauche de la LTR droite près du gène "src" pourrait représenter le site d'initiation de la synthèse du second brin (+) d'ADN viral. La séquence voisine de ce site (extrémité du gène src) contient en effet 11 purines consécutives (-1R → -11R) qui constitueraient une partie de l'amorce encore non identifiée du DNA strong stop (+).

Chaque LTR du RSV contient aussi les signaux impliqués dans le contrôle de la transcription. 2 régions caractéristiques riches en purines sont situées dans la région U3 proche de R.

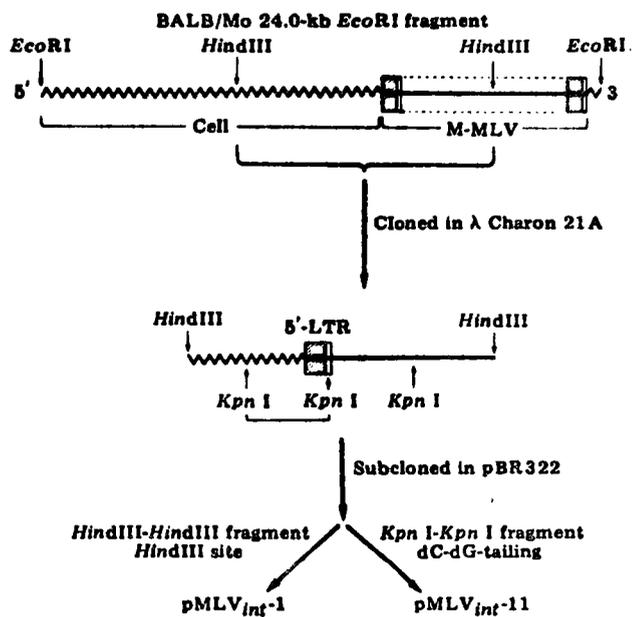
La première (TATTTAA) située à 24-30 nucléotides en amont du site de démarrage de la synthèse de mRNA viral serait la région où se fixe la RNA polymérase II, la seconde (AATAAAC) aux positions 223-229 contiguë à R serait le signal pour l'arrêt de la transcription.

Une comparaison des séquences au site de jonction des deux clones SRA1 et SRA2 indique que la circularisation du DNA linéaire peut en fait se produire par différents mécanismes.

Alors que la fusion des LTR se fait sans perte d'information pour SRA2, il y a au contraire délétion de 63 nucléotides au site de jonction du cercle de SRA1. 2 paires de bases sont perdues dans la région U5 et les 61 autres le sont dans la région U3.

Le DNA linéaire aurait donc intégré (avec perte de 2 paires de bases), 61 paires de bases provenant de l'autre extrémité.

Shoemaker et al.(1980) ont aussi mis en évidence des molécules circulaires du DNA du M-MLV contenant des réarrangements suite à l'intégration d'une région de la molécule dans une autre région.



Clonage moléculaire de p MLV int -1 et p MLV int -11,  
contenant la LTR 5' de M.MLV  
(Van Beveren et al.1980)

Les molécules de DNA circulaires doivent donc constituer *in vivo*, une population hétérogène de structures survenues par différents mécanismes.

B - Séquence nucléotidique des LTR 3' et 5' du provirus de la Leucémie murine de Moloney (M-MLV)

Les deux LTR ont été étudiées séparément puis comparées. La LTR 5' a été isolée à partir d'un DNA de M-MLV cloné moléculairement (Van Beveren et al.1980), alors que la LTR 3' a été obtenue à partir d'un DNA de M-MLV cloné, reconstruit *in vitro* (Sutcliffe et al.1980).

- . La LTR 5' est contenue dans un fragment caractéristique 24K.b. Eco RI du génome endogène du foie de souris Balb/Mo. Ce fragment est scindé par l'endonucléase Hind III qui n'a qu'un site de clivage dans le génome M-MLV. Le produit Hind III obtenu (9 K.b.) est cloné dans le phage  $\lambda$  Charon 21-A puis sous-cloné dans le plasmide pBr 322.

Le plasmide recombinant pMLV int<sup>-1</sup> contient une séquence virale de 5,3 k.b. soit la moitié 5' du DNA proviral et une séquence cellulaire adjacente de 3,7 K.b.

Le DNA cloné est ensuite digéré avec l'endonucléase KpnI et les 2 fragments KpnI obtenus sont séparés sur gel d'agarose. Le fragment 2,35 K.b. contenant les séquences virales et cellulaires est sous-cloné dans pBR 322 et constitue le second clone p MLV int<sup>-11</sup> étudié. (cf. clonage moléculaire de la LTR 5' de M-MLV).

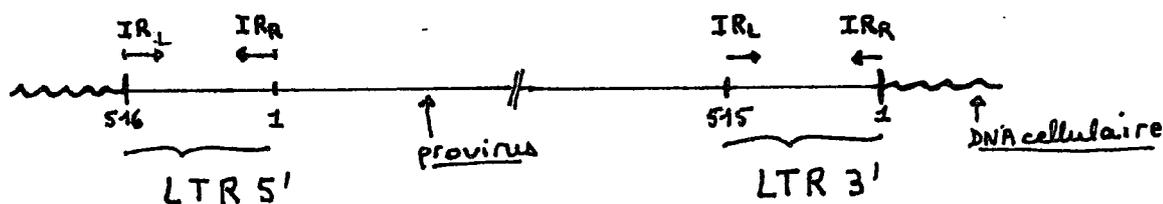
- . La LTR 3' fut isolée à partir du clonage dans le plasmide p BR 322 d'un cDNA spécifique du M-MLV, synthétisé *in vitro* par la transcriptase réverse. Les profils de restriction des plasmides recombinants furent comparés à ceux du cDNA de M-MLV synthétisés *in vitro* et du plasmide p BR 322. Un clone p MLV - 201 censé contenir le saut moléculaire 5'  $\rightarrow$  3' effectué par la réverse transcriptase fut choisi pour l'analyse de la séquence et la séquence nucléotidique fut déterminée par la méthode de dégradation chimique.

Résultats :

- Le plasmide recombinant p MLV-201 s'hybride avec une sonde radioactive, spécifique du M-MLV et de fait commence vers une extrémité, avec la séquence "strong-stop" de Moloney indiquant que le DNA cloné était à l'origine amorcé par le tRNA<sup>Pro</sup>. La séquence nucléotidique de l'insert viral, (long de 1108 nucléotides) commence avec 143 paires de bases correspondant au DNAss : la 143ème base (c) est complémentaire de la base G méthyl du site CAP 5' du génome viral.

Il manque dans ce DNA cloné, les deux premières bases (AA) liées au tRNA<sup>Pro</sup> amorce et présentes dans la LTR 5'. Les analyses de restriction mettent en évidence que les nucléotides 144 à 1108 sont copiés en utilisant l'extrémité 3' du génome comme matrice et fournissent donc la preuve du "saut moléculaire" de la transcriptase réverse de l'extrémité 5' du génome vers son extrémité 3' afin de copier le génome entier.

- Une comparaison des séquences nucléotidiques des LTR 3' et 5' définit la taille de la répétition à 515 paires de bases.



145 nucléotides représentent la séquence entre le nucléotide CAP 5' du génome viral et l'extrémité 3' OH du tRNA<sup>Pro</sup>.

A l'une et l'autre extrémité de cette répétition, il existe une courte répétition inversée de 11 paires de bases appelées IR<sub>R</sub> et IR<sub>L</sub> pour les répétitions inversées droite et gauche.

./...

De telles répétitions, et la perte du dinucléotide A-A aux extrémités du provirus sont réminiscentes des séquences d'insertion bactériennes et le corps du virus, flanqué de ces deux éléments d'insertion identiques, serait analogue à un "transposon" (Van Beveren et al 1980).

Ce modèle "transposon" du M.MLV prédit :

- de multiples sites d'intégration dans l'ADN cellulaire,
  - une duplication des séquences cellulaires aux deux extrémités à la fois du DNA viral et,
  - l'identification dans le DNA de cellules non infectées de l'unique séquence cellulaire qui subit la duplication après l'insertion du DNA de M.MLV.
- . Les deux LTR 5' et 3' font apparaître les séquences CAATAAAA (LTR 5') et CAAAAAAA (LTR 3') divergeant sensiblement de la "boite de Hogness" mais situées au même emplacement, 24 à 31 nucléotides avant le site CAP 5' (positions 143 ou 145) et seraient donc le promoteur présumé de la synthèse des RNA de M.MLV.
- De même, une autre séquence CAATAAA rappelle les séquences AAATAAA de signal de polyadénylation et d'arrêt de transcription des rétrovirus aviaires. Elle est située 46 à 52 nucléotides après le site CAP.
- Une séquence particulière, localisée à la limite gauche de la LTR 3' et dans le corps du virus (dans le gène "env"), forme une structure en queues et boucles semblable à celle de l'origine de la répllication du bactériophage monocaténaire. A l'étape de la transcription par la transcriptase réverse, le brin (-) d'ADN répliqué est monocaténaire (la RNase H ayant digéré la matrice RNA) et se comporterait comme ces petits phages.

./...

L'analogie mettrait le début de la synthèse du second brin à la position 560. Cependant, la LTR générée permet de situer le site d'initiation à la position 515. Un RNA amorce semblable à celui utilisé dans la réplication G4 serait synthétisé de novo dans la courte séquence comprise entre les positions 560 et 515, et le produit stable débiterait à la position 515.

- Cette séquence se prolonge en direction de la LTR 3' et code (des positions 562 à 880) pour une petite protéine probablement impliquée dans la leucémogénèse. Cette séquence codante est provisoirement nommée le gène R car c'est le gène situé le plus à droite sur le DNA viral. Le produit du gène R possède une région très hydrophobe et a sans doute une fonction membranaire, ce qui pourrait expliquer la prolifération sélective de certains types de cellules différenciées. Les virus de FRIEND et MMTV codent probablement dans la même région que le gène R pour des protéines semblables de spécificités différentes.

L'expression du gène "R" est en étroite relation avec celle du gène "env" voisin qui code pour les protéines gp 70 et p 15 E. Il y aurait coordination en particulier entre gp 70 et le produit du gène R.

Cela pourrait être, une interaction simple (gp 70 - protéine "R"), ou bien certaines substitutions de séquences dans la région MCF du gène "env" modulant l'expression du gène "R" par la synthèse de différents mRNA, ou encore la molécule gp 70 modifiée développant le champ d'action de différents virus relativement bénins autrement. (Sutcliffe et al 1980).

- C - Séquence nucléotidique des jonctions DNA cellulaire - DNA proviral du virus de la tumeur mammaire de la souris (M.MTV)  
(Majors et al 1981).

Les provirus clonés provenant de cellules de rats infectés avec le M.MTV présentent les mêmes caractéristiques structurales que les éléments transposables :

./...

De courtes répétitions inversées de 6 paires de bases terminent les 2 LTR du DNA proviral, et de courtes séquences (5 à 6 paires de bases) du DNA cellulaire sont dupliquées pendant l'intégration et sont situées de part et d'autre du provirus ; ces répétitions cellulaires proviennent d'une seule région de l'ADN de la cellule non infectée, et leur séquence est très différente d'un provirus à l'autre.

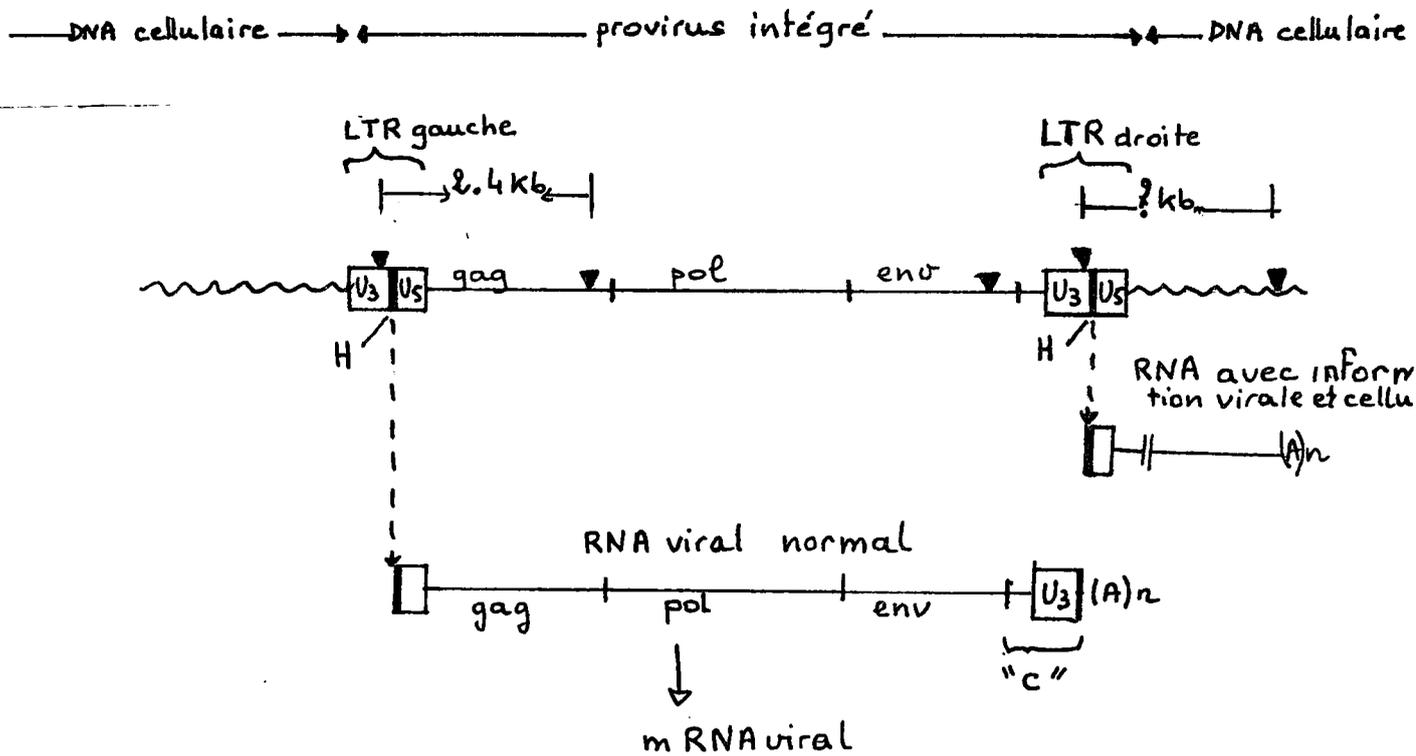
Cette duplication de séquence cellulaire suggère que la première étape dans le processus d'intégration est l'introduction d'une coupure dans le DNA de la cellule hôte, par une enzyme peu spécifique.

Le mécanisme d'intégration chez les Rétrovirus joint un site précis du DNA viral à des sites variés du DNA cellulaire.

Cependant, on ne possède encore aucune information concernant la possibilité que les Rétrovirus pourraient être réintégrés à de nombreux sites dans les génomes hôtes par d'autres moyens que la transcription en RNA puis la réverse transcription ultérieure et la réintégration.

Un mécanisme commun à l'intégration provirale et à la transposition de certaines séquences d'insertion des cellules eucaryotes et procaryotes est encore incertain. (Majors et al 1981).

Structure et produits de transcription  
du provirus ALV intégré  
(Neel et al. 1981)



▼ Représente les sites de clivage de l'endonucléase Eco RI.

2 types de m RNA viraux peuvent être synthétisés :

- 1 - A partir de la LTR gauche, il y a synthèse du m RNA viral normal.
- 2 - A partir de la LTR droite, il y a synthèse d'un RNA contenant des séquences virales et des séquences cellulaires.

#### IV - MECANISME DE L'ONCOGENESE DES VIRUS DES LEUCOSES AVIAIRES (ALV) (Neiman et al 1980, Neel et al 1981)

##### 1 - STRUCTURE DU PROVIRUS ALV

Le provirus ALV présente une répétition directe (LTR) de 300 nucléotides de part et d'autre des gènes viraux.

U3 est l'unique séquence dérivée de l'extrémité 3' et

U5 est celle dérivée de l'extrémité 5'.

Entre U3 et U5, il y a la courte redondance terminale (de 20 nucléotides environ) du RNA 35 S.

Le cDNass est la sonde complémentaire des 101 premiers nucléotides du RNA viral. Elle comprend la séquence R + U5.

H désigne la "Boite de Hogness", séquence riche en base A + T, située 25 à 30 nucléotides avant le site CAP 5' du RNA et correspond au promoteur présumé de la transcription du provirus en RNA viral.

I désigne le site d'initiation de la synthèse du mRNA viral.

##### 2 - ROLE DE LA LTR DANS L'ONCOGENESE ALV

Les virus des leucoses aviaires (ALV) qui incluent les virus associés de Rous (RAV) et les mutants "td" du RSV, sont des virus chroniques qui produisent en général des lymphomes de cellules B disséminantes prenant origine dans la bourse de Fabricius des poulets infectés (Neiman et al. 1980).

A l'opposé de ces virus qui sont exogènes à l'hôte, le virus endogène RAV-0, dont la séquence nucléotidique ne diffère sensiblement de celle de ALV exogène que dans les régions "env" et "c", n'est pas oncogénique.

./...

"c" seulement, semble impliquée dans l'oncogénèse. L'extrémité de cette région du génome contient une partie de la LTR droite du provirus intégré : les séquences U3 et R.

L'analyse de la séquence de la LTR a montré que le promoteur possible de la RNA polymérase II des eucaryotes se trouve dans la séquence U3, environ 25 nucléotides avant le début de la séquence R, où est initiée la transcription du provirus.

En principe, l'initiation de la synthèse du m RNA normal apparaît à l'intérieur de la LTR gauche, mais puisque la même séquence est répétée à l'extrémité droite du provirus, il est concevable que l'initiation puisse aussi se faire à droite.

La transcription initiée à droite pourrait alors se prolonger dans le DNA de la cellule-hôte générant ainsi un "transcript" contenant des informations à la fois virales et cellulaires.

Une population hétérogène de telles molécules de RNA existe dans les cultures de cellules infectées en masse, tandis qu'une population homogène de ces RNA est apparue dans quelques clones de cellules de mammifères (Quintrell et al.1980).

L'intégration provirale dans une population de cellules infectées en masse paraît se faire au hasard, ou bien en de nombreux sites différents (Hugues et al 1978, Quintrell et al 1980). Si toutefois le provirus s'intègre à côté d'une "contrepartie endogène" d'un "gène transformant" viral, l'initiation de la transcription à partir du promoteur viral de la LTR droite, conduirait à l'expression accrue de cet "oncogène" cellulaire, et il en résulterait la néoplasie.

Ceci définit le modèle du mécanisme de l'oncogénèse par insertion d'un promoteur. (Neel et al.1981, Payne et al.1980).

./...

### 3 - ANALYSE DES DNA et RNA SPECIFIQUES DES TUMEURS INDUITES PAR ALV

Des poulets de 2 à 7 jours infectés par 4 souches différentes de ALV développent des tumeurs 4 à 6 mois après l'infection avec un rendement de 40 %.

Dans le but d'élucider le mécanisme de l'oncogénèse par ALV, les DNA et RNA spécifiques du virus furent analysés.

#### \* Méthode d'analyse du DNA proviral

Les DNA spécifiques du virus furent extraits des lymphomes de la bourse, du foie et des reins, de 3 oiseaux différents (Neel et al 1981). Ils furent ensuite digérés par l'endonucléase Eco RI, séparés sur gel d'agarose et transférés sur filtres de nitrocellulose selon la technique de Southern.

- Les 2 fragments de restriction provenant des extrémités du provirus ALV contiennent la séquence "strong-stop" correspondant au 101 premiers nucléotides (R + U5) du génome viral. Ils peuvent être identifiés par hybridation à une sonde cDNA strong-stop (cDNAss) radioactive spécifique de ALV.
- Le fragment de l'extrémité gauche (comprenant 2,4 kilo-bases) contient en plus une partie du gène "gag" viral. C'est donc un fragment interne du virus et il apparaîtra aussi bien dans une population de cellules infectées en masse que dans une population clonale. Il peut aussi être détecté par une sonde représentative du génome viral (cDNA rep).
- Le fragment de l'extrémité droite appelé "fragment de jonction", puisqu'il contient à la fois du DNA viral et du DNA cellulaire, ne contient que 2 % du génome viral. Il n'est donc pas détecté avec la sonde cDNArep, et il ne le sera avec la sonde cDNAss que si le site d'intégration du provirus dans l'ADN de la cellule hôte est le même pour la majorité des cellules de la tumeur, formant ainsi un fragment de jonction de taille unique, isolable.

En comparant les échantillons d'hybridation avec cDNAss et cDNArep, on peut identifier ces fragments de jonction. Leur taille dépend du site d'intégration du provirus dans l'ADN cellulaire ; elle sert de base pour comparer les sites d'intégration du virus dans les différentes tumeurs.

\* Méthode d'analyse du RNA viral

Les cellules de poulet non néoplasiques, infectées par ALV, contiennent normalement deux types de molécules avec le poly A : 1 RNA 35 S d'une longueur de génome et un RNA sous-génomique (RNA 21 S) contenant seulement les régions "env", "c" et le poly A. (Hayward 1977).

Le modèle d'oncogénèse par insertion d'un promoteur suppose l'existence d'un nouveau type de RNA (cf schéma de la structure du provirus) initié à partir d'un promoteur viral et contenant des informations à la fois virales et cellulaires. Les 101 premiers nucléotides d'un RNA initié à partir du promoteur gauche ou droit, sont codés dans les LTR. En utilisant une sonde complémentaire cDNAss on peut identifier n'importe quel RNA initié à partir d'un promoteur viral.

Les transcripts initiés dans la LTR gauche peuvent aussi être détectés par une sonde cDNArep spécifique du génome ALV.

Les transcripts initiés dans la LTR droite ne contenant comme information virale que la séquence strong-stop (soit 1,2 % du génome) ne sont détectés que par cDNAss.

Toutes les molécules de RNA qui, dans les cellules tumorales s'hybrideront à la sonde cDNAss et non à la sonde cDNArep correspondront à ce nouveau type de RNA viral.

./...

\* Résultats

Il manque dans certaines tumeurs le fragment Eco RI 2,4 kb provenant de l'extrémité gauche du provirus, ainsi que les m RNA viraux "normaux" 35 S et 21 S : Les gènes viraux produits ne sont donc pas exigés pour l'entretien de la transformation néoplasique (Neel et al.1981, Payne et al.1981).

Un "fragment de jonction" est identifié dans toutes les tumeurs : toutes les tumeurs contiennent donc au moins une copie de LTR.

Des "fragments de jonction" distincts ne devraient pas être détectés dans une population de cellules infectées au hasard puisque l'intégration du provirus peut se faire en de nombreux sites différents.

Or des "fragments de jonction" distincts ont été détectés dans les différentes tumeurs et même toutes les tumeurs d'un oiseau contenaient le même fragment de jonction : Les tumeurs primaires et secondaires sont donc clonales et descendent d'une seule cellule infectée. L'initiation de la transformation serait probablement un événement rare, ce qui expliquerait que la leucémie apparaisse si longtemps après l'infection lorsqu'elle apparaît, ou qu'elle n'apparaisse même pas du tout chez l'oiseau pourtant infecté.

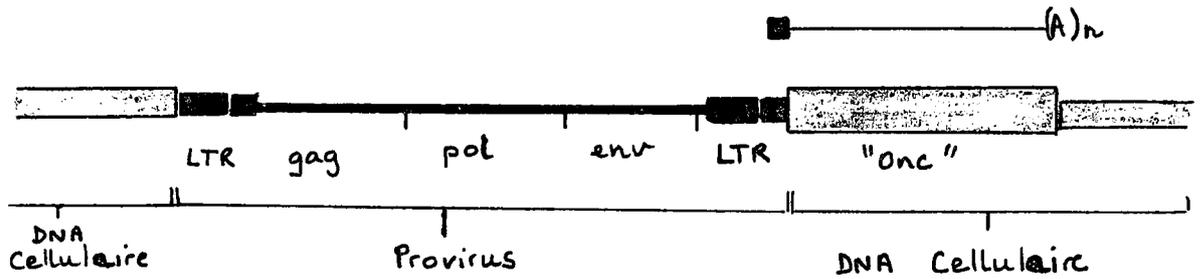
Les analyses de restriction avec deux endonucléases conjointement révèlent que les mêmes "fragments de jonction" sont présents dans les tumeurs de différents oiseaux : les provirus sont donc intégrés à côté d'un nombre limité de gènes cellulaires.

Enfin, les cellules des tumeurs lymphoïdes synthétisent un nouveau RNA viral distinct (2,5 kb ou 2,9 kb) constitué de séquences virales (strong-stop) liées par covalence à des séquences cellulaires. Ces nouveaux RNA sont exprimés à des taux élevés dans les cellules tumorales. Ces taux sont 30 à 100 fois plus élevés que les taux d'expression des virus transformants dans les cellules non infectées. (Hayward 1977, Sheiness et al 1979).

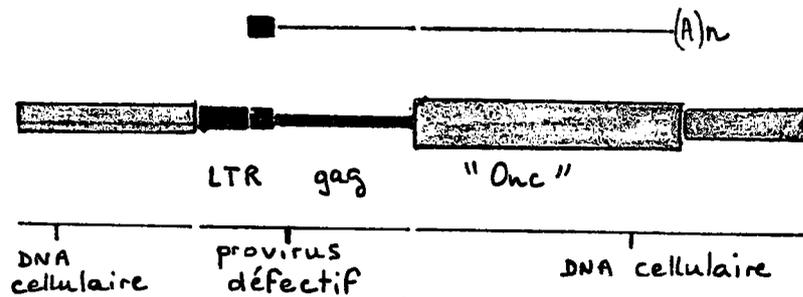
./...

Modèle du mécanisme de l'oncogénèse  
par insertion d'un promoteur  
(Neel et al 1981)

a -



b -



a - Initiation de la synthèse du RNA à partir de la LTR droite d'un provirus ALV entier.

b - Initiation possible de la synthèse du RNA à partir de la LTR gauche d'un provirus défectif.

#### 4 - MECANISME DE L'ONCOGENESE INDUIT PAR ALV

L'oncogénèse par ALV requiert l'intégration provirale à côté d'un gène cellulaire spécifique et sa transcription à partir d'un promoteur viral. Il en résulte une nette amplification de l'expression de ce gène cellulaire.

La principale preuve apportée à ce modèle est l'identification dans 85 % des lymphomes étudiés, du gène cellulaire induit, "onc" qui est la version endogène de l'oncogène du virus de la leucémie aigüe (DLV - MC 29).

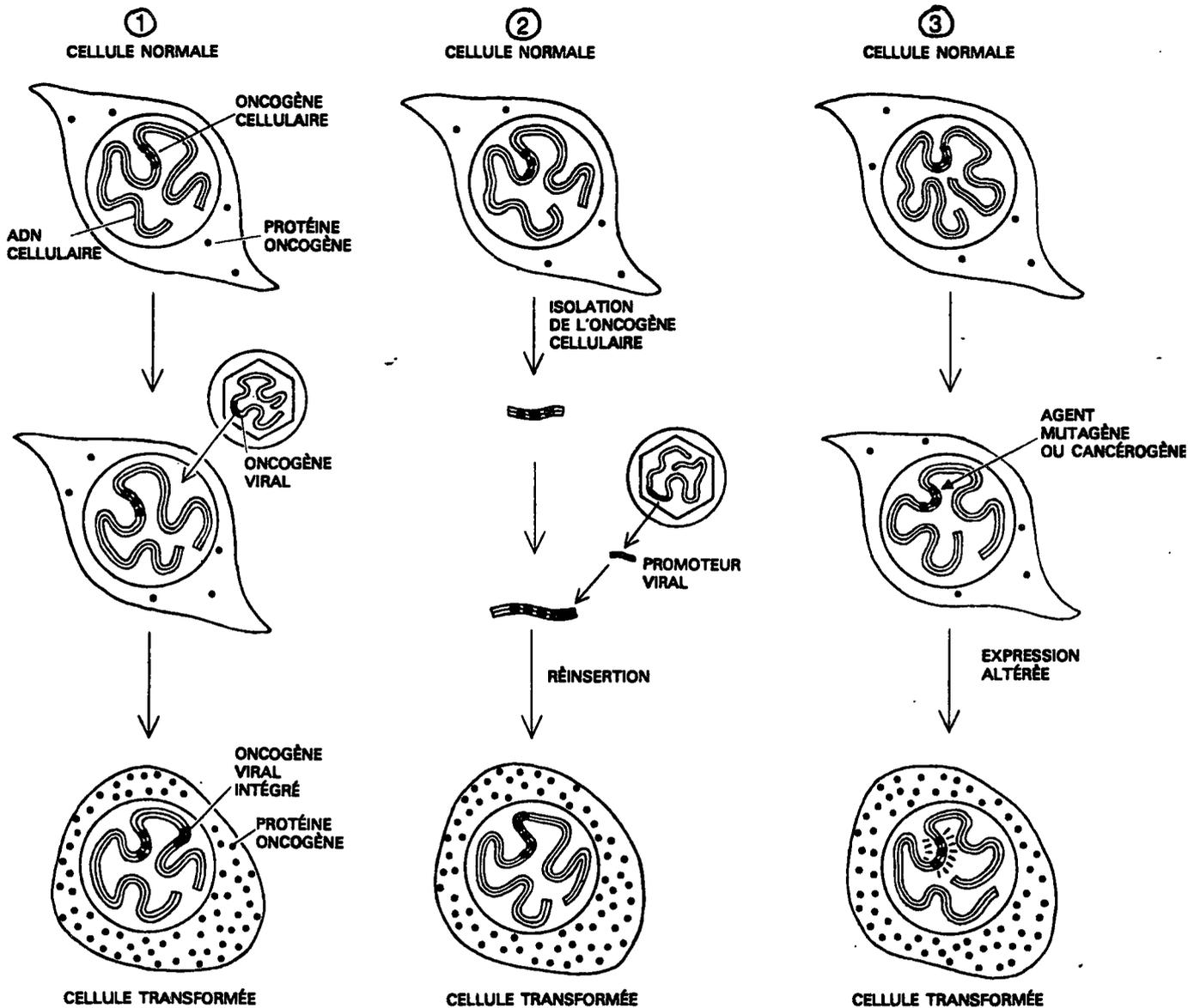
Le mécanisme le plus probable reste l'initiation de la LTR droite (figure a) mais elle pourrait s'effectuer dans la LTR gauche d'un provirus défectueux avec splicing du reste des séquences virales (figure b).

De nombreux virus défectifs sont présents dans les tumeurs ; il se peut qu'ils jouent un rôle dans l'oncogénèse.

Par exemple, les cellules tumorales contenant des provirus largement défectifs n'auraient pas d'antigènes viraux exprimés à leur surface et échapperaient ainsi à tout contrôle du système immunitaire, ou bien il serait important que la LTR gauche soit transcriptionnellement inactive pour que l'initiation du promoteur droit soit possible.

Ce mécanisme explique l'absence de gène transformant chez ALV et la longue période de latence avant l'apparition de la leucémie.

D'autres expériences sont venues confirmer ce modèle ; en particulier, la greffe d'une LTR (clonée moléculairement) à l'oncogène viral "mos" du M.MSV et à sa version cellulaire "c-mos" respectivement, provoque une amplification de la néoplasie dans les cellules surinfectées. Les m RNA contenant les informations mos et c-mos sont détectés dans les cellules réceptrices transformées (Blair et al. 1980, Oskarsson et al. 1980).



L'hypothèse de la surproduction (Bishop 1982)

L'oncogène cellulaire dirige la synthèse de la quantité de protéine normale nécessaire à la croissance normale et la transformation en cellule cancéreuse résulte de la surproduction de la protéine normale.

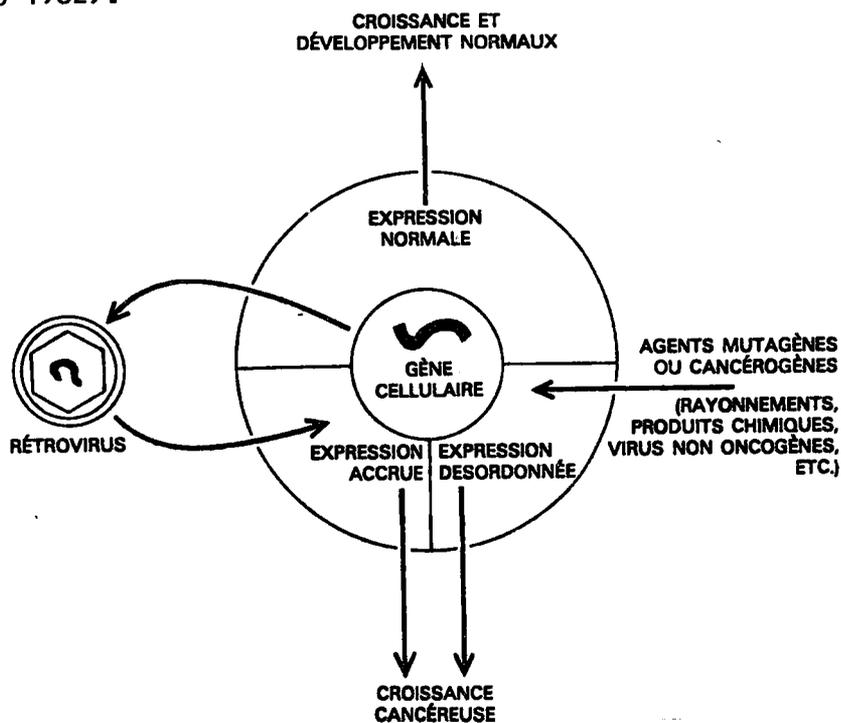
- 1 - surproduction dirigée par l'oncogène viral sous contrôle viral.
- 2 - l'oncogène cellulaire possède cependant, un potentiel tumorigène.
- 3 - la surproduction provoquée par d'autres agents que les Rétrovirus.

Ce modèle d'oncogénèse par insertion d'un promoteur correspondant à l'activation d'un gène cellulaire particulier et à son expression accrue est en faveur de la thèse de la surproduction au détriment de la thèse mutationnelle.

Les "oncogènes cellulaires" pourraient être même des éléments du génome cellulaire normal dont l'activité serait libérée ou augmentée sous l'effet de différents cancérrogènes ou mutagènes. Ces gènes seraient responsables du comportement désordonné des cellules cancéreuses.

Dans cette hypothèse, les "gènes du cancer" seraient en fait des gènes normaux et indispensables mais déréglés plutôt que des gènes étrangers à la cellule.

Quelques uns de ces gènes au moins ont pu apparaître chez les Rétrovirus où ils ont été identifiés, manipulés et caractérisés. (Bishop 1982).



Théorie unificatrice de l'oncogénèse :  
Concept de gènes du cancer (Bishop 1982)

L'élément central est un groupe de gènes cellulaires nécessaire à la croissance et au développement normaux. Transplantés dans le génome d'un Rétrovirus, ces gènes deviennent des oncogènes. Un cancer peut apparaître si le gène cellulaire subit l'action d'un des divers mutagènes ou autres cancérrogènes.

### III - BIBLIOGRAPHIE

#### A - ARTICLES DE PÉRIODIQUES :

CLASSEMENT PAR LISTE ALPHABÉTIQUE DES NOMS  
D'AUTEURS.

#### B - QUELQUES OUVRAGES GÉNÉRAUX :

MÊME CLASSEMENT.

A - ARTICLES DE PÉRIODIQUES

AKIYAMA Y., VOGT P.K. (1979). Integration of different sarcoma virus genomes into host DNA. Evidence against tandem arrangement and for shared integration site.

In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 76, p 2465-2469.

ALI M., BALUDA M.A. (1974). Synthesis of avian oncornavirus DNA in infected chicken cells.

In J. Virol. vol 13, p 1005-1013.

BACHELER L.T., FAN H. (1979). Multiple integration sites for Moloney murine leukemia virus in productively infected mouse fibroblasts.

In J. Virol. vol 30, p 657-667.

BACHELER L.T., FAN H. (1980). Integrated Moloney murine leukemia virus DNA studied by using complementary DNA which does not recognize endogenous related sequences.

In J. Virol. vol 33, p 1074-1082.

BATTULA N., TEMIN H.M. (1978). Sites of integration of infectious DNA of avian reticuloendotheliosis viruses in different avian cellular DNAs.

In Cell vol 13, p 387-398.

BENZ E.W., WYDRO R.M., NADAL-GINARD B., DINA D. (1980). Moloney murine sarcoma proviral DNA is a transcriptional unit.

In Nature vol 288, p 665-669.

BERGMANN D.G., SOUZA L.M., BALUDA M.A. (1980). Characterization of avian myeloblastosis associated virus DNA intermediates.

In J. Virol. vol 34, p 366-372.

BILLETER M.A., PARSONS J.T., COFFIN J.M. (1974). The nucleotide sequence complexity of avian tumor virus RNA.

In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 71, p 3560-3564.

- BISHOP J.M., JACKSON N., LEVINSON W.E., MEDEIROS E., QUINTRELL N., VARMUS H.E. (1973). The presence and expression of RNA tumor virus genes in normal and infected cells : detection by molecular hybridization.  
In Amer. J. Clin. Pathol. vol 60, p 31-43.
- BISHOP J.M., DENG C.T., FARAS A.J. (1975). Transcription of Rous sarcoma virus genome in vitro and in vivo.  
In Bibl. Haemat. vol 40, p 517-523.
- BISHOP J.M. (1978). Retroviruses.  
In Ann. Rev. Biochem. vol 47, p 35-38.
- BISHOP J.M., COURTNEIDGE S.A., LEVINSON A.D., OPPERMANN H., QUINTRELL N., SHEINESS D.K., WEISS S.R., VARMUS H.E. (1979). Origin and function of avian retrovirus transforming genes.  
In Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. viral oncogenes. vol 44 (2), p 919-929.
- BISHOP J.M. (1982). Les oncogènes.  
In Pour la Science n° 55 p 28-41.
- BREINDL M., DOEHMER J., WILLECKE K., DAUSMAN J., JAENISCH R. (1979). Germ line integration of Moloney leukemia virus identification of the chromosomal integration site.  
In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 76, p 1938-1942.
- CHANG H.W., GARON C.F., CHANG E.H., LOWRY D.R., HAGER G.L., SCOLNICK E.M., REPASKE R., MARTIN M.A. (1980). Molecular cloning of the Harvey sarcoma virus circular DNA intermediates 2. further structural analyses.  
In J. Virol. vol 33, p 845-855.
- CHATTOPADHYAY S.K., ROWE W.P., LEVINE A.S. (1976). Quantitative studies of integration of murine leukemia virus after exogenous infection.  
In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 73, p 4095-4099.
- COHEN J.C., SHANK P.R., MORRIS V.L., CARDIFF R., VARMUS H.E. (1979). Integration of the DNA of mouse mammary tumor virus in virus-infected and normal and neoplastic tissue of the mouse.  
In Cell vol 16, p 333-346.

- COFFIN J.M., HASELTINE W.A. (1977). Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus RNA at the initiation site of DNA synthesis. The 102 nd nucleotide is uridine.  
In J. Mol. Biol. vol 117, p 805-814.
- COFFIN J.M., HAGEMAN T.C., MAXAM A.M., HASELTINE W.A. (1978). Structure of the genome of Moloney murine leukemia virus : a terminally redundant sequence.  
In Cell vol 13, p 761-773.
- COLLINS C.J., PARSONS J.T. (1977). Integration of avian sarcoma virus DNA sequences in transformed mammalian cells.  
In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 74, p 4301-4305.
- COLLINS C.J., BOETTIGER D., GREEN T.L. et al (1980). Arrangement of integrated avian sarcoma virus DNA sequences within the cellular genomes of transformed and revertant mammalian cells.  
In J. Virol. vol 33, p 760-768.
- COPELAND N.G., JENKINS N.A., COOPER G.M. (1981). Integration of Rous sarcoma virus DNA during transfection.  
In Cell vol 23, p 51-60.
- CORDELL B., STAVNEZER E., FRIEDRICH R., BISHOP J.M., GOODMAN H.M. (1976). Nucleotide sequence that binds primer for DNA synthesis to the avian sarcoma virus genome.  
In J. Virol. vol 19, p 548-558.
- CZERNILOFSKY A.P., DELORBE W., SWANSTROM R. et al (1980). The nucleotide sequence of an untranslated but conserved domain at the 3' end of the avian sarcoma virus genome.  
In Nucleic Acids Res. vol 8, p 2967-2984.
- CZERNILOFSKY A.P., LEVINSON A.D., VARMUS H.E. et al (1980). Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (sre) and proposed amino-acid sequence for gene product.  
In Nature vol 287, p 198-203.

- CZERNILOFSKY A.P., TISCHER E., DELORBE B., VARMUS H., GOODMAN H., BISHOP J.M. (1980). The src gene of avian sarcoma virus nucleotides sequence of the gene and its flanking regions in the viral genome.  
In Eur. J. Cell. Biol. vol 22 p 521.
- DAHLBERG J.E., HARADA F., SAWYER R.C. (1975). Structure and properties of an RNA primer for initiation of Rous sarcoma virus DNA synthesis in vitro.  
In Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. vol 39, p 925.
- DARLIX J.L., BROMLEY P.A., SPAHR P.F. (1977). New procédure for the direct analysis of in vitro reverse transcription of Rous sarcoma virus RNA.  
In J. Virol. vol 22, p 118-129.
- DASTOOR M.N., SHOYAB M., BALUDA M.A. (1977). Variations in integration site of avian oncornaviruses in different hosts.  
In J. Virol. vol 21, p 541-547.
- DHAR R., MC CLEMENTS W.L., ENGQUIST L.W., VANDE WOUDE G.F. (1980). Nucleotide sequence of integrated Moloney sarcoma pro virus long terminal repeats and their host and viral junctions.  
In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 77, p 3937-3941.
- DICKSON C., SMITH R., PETERS G. (1981). In vitro synthesis of poly peptides encoded by the long terminal repeat region of mouse mammary tumor virus DNA.  
In Nature vol 291, p 511-513.
- DONEHOWER L.A., HUANG A.L., HAGER G.L. (1981). Regulatory and coding potential of the mouse mammary tumor virus long terminal redundancy.  
In J. Virol. vol 37, p 226-238.
- DUBELCCO R. (1974). The last twelve years.  
In Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. vol 39, p 1-7.
- EIDEN J.J., BOLOGNESI D.P., LANGLOIS A.J., NICHOLS J.L. (1975). The initial nucleotide sequence of DNA transcribed from avian myeloblastosis virus 70 S RNA by RNA dependant DNA polymerase.  
In Virology vol 65, p 163-172.

EVANS R.M., BALUDA M.A., SHOYAB M. (1974). Differences between the integrations of avian myeloblastosis virus DNA in leukemia cells and of endogenous viral DNA in normal chicken cells.

In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 71, p 3152-3156.

FRIEDRICH R., KUNG H.J., BAKER B., VARMUS H.E., GOODMAN H.M., BISHOP J.M. (1977). Characterization of DNA complementary to nucleotide sequences at the 5-prime terminus of the avian sarcoma virus genome.

In Virology vol 79, p 198-215.

GAFNER J., PHILIPSEN P. (1980). The yeast transposon Ty1 generates duplications of target DNA on insertion.

In Nature vol 286, p 414-418.

GILMER T.M., PARSONS J.T. (1979). Analysis of cellular integration sites in avian sarcoma virus infected duck embryo cells.

In J. Virol. vol 32, p 762-769.

GROUNDINE M., WEINTRAUB H. (1980). Activation of cellular genes by avian RNA tumor viruses.

In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 77, p 5351-5354.

GUNTAKA R.V. (1978). Structure of avian tumor virus DNA intermediates.

In Biochem. Biophys. Res. Commun. vol 82, p 335-341.

HAASE A.T., STOWRING L., VENTURA P., TRAYNOR B., JOHNSON K., SWOVELAND P., SMITH M., BRITTEN-DARNALL M., FARAS A., et al (1977). Role of DNA intermediates in persistent infections caused by RNA viruses.

In American Society for Microbiology vol 1977, p 478-483.

HAGER G.L., CHANG E.H., CHAN H.W., GARON C.F., ISRAEL M.A., MARTIN M.A., SCOLNICK E.M., LOWY D.R. (1979). Molecular cloning of the Harvey sarcoma virus closed circular DNA intermediates initial structural and biological characterization.

In J. Virol vol 31, p 795-809.

HANAFUSA H., HALPERN C.C., BUCHHAGEN D.L., KAWAI S. (1977). Recovery of avian sarcoma virus from tumors induced by transformation defective mutants.

In J. Exp. Med. vol 146, p 1735-1747.

HARADA F., SAWYER R.C., DAHLBERG J.E. (1975). A primer RNA for initiation of in vitro Rous sarcoma virus DNA synthesis nucleotide sequence and amino-acid acceptor activity.

In J. Biol. Chem. vol 250, p 3487-3497.

HARADA F., PETERS G.G., DAHLBERG J.E. (1979). The primer transfer RNA for Moloney murine leukemia virus DNA synthesis nucleotide sequence and amino acylation of proline transfer RNA.

In J. Biol. Chem. vol 254, p 10979-10985.

HASELTINE W.A., MAXAM A.M., GILBERT W. (1977). Rous sarcoma virus genome is terminally redundant : the 5' sequence.

In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 74, p 989-993.

HAYWARD W.S. and HANAFUSA H. (1973). Detection of avian tumor virus RNA in uninfected chicken embryo cells.

In J. Virol vol 11, p 157-167.

HAYWARD W.S. (1977). Size and genetic content of viral RNAs in avian onco-virus-infected cells.

In J. Virol vol 24, p 47-63.

HILL M., HILLOVA J. (1974). RNA and DNA forms of the genetic material of C type viruses and the integrated state of the DNA form in the cellular chromosome.

In Biochim. Biophys. Acta vol 355, p (7-48).

HISHINUMA F., DE BONA P.J., ASTRIN S., SKALKA A.M. (1981). Nucleotide sequence of acceptor site and termini of integrated avian endogenous provirus ev 1 : integration creates a 6 bp repeat of host DNA.

In Cell vol 23, p 155-164.

HUGUES S.H., VOGT P.K., STUBBLEFIELD E., ROBINSON H., BISHOP J.M., VARMUS H.E. (1980). Organisation of endogenous and exogenous viral and linked non-viral sequences.

In Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. vol 0, p P 1077-1090.

- HUGUES S.H., MUTSCHLER A., BISHOP J.M., VARMUS H.E. (1981). A rous sarcoma virus provirus is flanked by short direct repeats of a cellular DNA sequence present in only one copy prior to integration.  
In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 78, p 4299-4303.
- HUGUES S.H., VOGT P.K., STUBBLEFIELD E., et al (1981). Integration of avian sarcoma virus DNA in chicken cells.
- HUMPHRIES E.H., ALLEN R., GLOVER C. (1981). Clonal analysis of the integration and expression of endogenous avian retroviral DNA acquired by exogenous viral infection.  
In J. Virol. vol 39, p 584-596.
- HSU T.W., SABRAN J.L., MARK G.E., GUNTAKA R.V., TAYLOR J.M. (1978). Analysis of unintegrated avian RNA tumor virus double stranded DNA intermediates.  
In J of Virol. vol 28, p 810-818.
- HSU T.W., GUNTAKA R.V., TAYLOR J.M. (1978). Specific site of action for single strand nuclease on the double stranded circular DNA intermediates of an avian RNA tumor virus.
- JAENISCH R. (1976). Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus.  
In Bibl. Haemat. vol 43, p 484-487.
- JAHNER D., JAENISCH R. (1980). Integration of Moloney leukaemia virus into the germ line of mice : correlation between site of integration and virus activation.  
In Nature vol 287, p 456-458.
- JAHNER D., STUHLMANN H., JAENISCH R. (1980). Conformation of free and of integrated Moloney leukemia virus proviral DNA in pré leukemic and leukemic BALB-M0 mice.  
In Virology vol 101, p 111-123.
- JU G., SKALKA A.M. (1980). Nucleotide sequence analysis of the long terminal repeat (LTR) of avian retroviruses : structural similarities with transposable elements.  
In Cell vol 22, p 379-386.

KAKEFUDA T., LOVINGER G.G., GILDEN R.V., HATANAKA M. (1977). Electron microscopic studies of circular DNA in mouse embryo fibroblasts infected by Rauscher leukemia virus.

In J. Virol. vol 21, p 792-795.

KESHET E., TEMIN H.M. (1978). Sites of integration of reticuloendotheliosis virus DNA in chicken DNA.

In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 75, p 3372-3376.

KESHET E., SHAUL Y. (1981). Terminal direct repeats in a retrovirus-like repeated mouse gene family.

In Nature vol 289, p 83-85.

KHOURY A.T., HANAFUSA H. (1976). Synthesis and integration of viral DNA in chicken cells at different times after infection with various multiplicities of avian oncornavirus.

KOURILSKY P. (1980). Le génie génétique.

In La Recherche (Avril 1980) n° 110 p 391-402.

LARSEN C.J., TAVITIAN A. (1974). Données actuelles sur l'état intégré des virus leucémogènes et sarcomatogène.

In Actual. Hematol. vol 8, p 271-277.

LEVIS R., DUNSMUIR P., RUBIN G.M. (1980). Terminal repeats of the drosophila-melanogaster transposable element copia nucleotide sequence and genomic organization.

In Cell vol 21, p 581-588.

LOVINGER G.G., SCHOCHETMAN G. (1980). 5' terminal nucleotide sequences of type C retroviruses features common to noncoding sequences of eucaryotic messenger RNA species.

In Cell vol 20, p 441-450.

LOVINGER G.G., SCHOCHETMAN G. (1979). 5 terminal nucleotide sequences of the Rauscher leukemia virus and gibbon ape leukemia virus genomes exhibit a high degree of correspondence.

In J. Virol. vol 32, p 803-811.

- LOVINGER G.G., SCHOCHETMAN G. (1980). Relationships among type C retroviruses based on 5' terminal nucleotide sequences.  
In J. Supramol. Struct. vol 9, p 235.
- LOWY D.R., RANDS E., CHATTOPADHYAY S.K., HAGER G.L. (1980). Structure and infectivity of integrated murine leukemia virus DNA.  
In Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. vol 0, p P 1143-1152.
- MAJORS J.E., VARMUS H.E. (1981). Nucleotide sequences at host-proviral junctions for mouse mammary tumour virus.  
In Nature vol 22, p 253-258.
- MANTEUIL-BRUTLAG S. (1975). Le gène "sarc".  
In Biochimie vol 57, p 1113-1116.
- MC CLEMENTS W.L., ENQUIST L.W., OSKARSSON M., SULLIVAN M., VANDE-WOUDE G.F. (1980). Frequent site specific deletion of coliphage lambda murine sarcoma virus recombinants and its use in the identification of a retrovirus integration site.  
In J. Virol. vol 35, p 488-497.
- MEKLER L.B. (1975). On the problem of oncogene of tumour viruses.  
In Acta Virol. vol 19, p 501-508.
- MONTAGNIER L., VIGIER P. (1973). Infections DNA intermediate of an oncogenic RNA virus.  
In Medical Journal Su vol 1973, p 212-217.
- NEEL B.G., HAYWARD W.S., ROBINSON H.L., FANG J., ASTRIN S.M. (1981). Avian leukosis virus induced tumors have common pro viral integration sites and synthesize discrete new RNA species oncogenesis by promoter insertion.  
In Cell Vol 23, p 323-334.
- NEYMAN P.E., PURCHASE (H.G.), OKAZAKI W. (1975). Chicken leukosis virus genome sequences in DNA from normal chick cells and virus-induced bursal lymphomas.  
In Cell vol 4, p 311-319.

NEYMAN P., PAYNE L.N., WEISS R.A. (1980). Viral DNA in bursal lymphomas induced by avian leukosis viruses.

In J. Virol. vol 34, p 178-186.

NEYMAN P., BEEMON K., LUCE J.A. (1981). Independent recombination between avian leukosis virus terminal sequences and host DNA in virus induced proliferative disease.

In Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol 78, p 1896-1900.

OU C-Y., KIGGANS J.O. J.R., YANG D.M., DOHERTY D.G., YANG W.K. (1980). Physical maps of DNA intermediates of N tropic and B tropic murine leukemia viruses.

In Fed. Proc. vol 39, p 64.

OSKARSSON M., Mc CLEMENTS W.L., BLAIR D.G., MAIZEL J.V., VANDE WOUDE G.F. (1980). Properties of a normal mouse cell DNA sequence (sarc) homologous to the src sequence of Moloney sarcoma virus.

In Science vol 207, p 1222-1224.

PANG R.H.L., PHILLIPS L.A. (1975). Nucleotide sequences in the RNA of mammalian leukemia and sarcoma viruses.

In Biochem. Biophys. Res. Commun vol 67, p 508-517.

PAYNE G.S., COURTNEIDGE S.A., CRITTENDEN L.B., FADLY A.M., BISHOP J.M., 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.

In Cell vol 23, p 311-322.

QUINTRELL N., VARMUS H.E., BISHOP J.M., NICHOLSON M.O., MCALLISTER R.M. (1974). Homologies among the nucleotide sequences of the genomes of C type viruses.

In Virology vol 58, p 568-575.

QUINTRELL N., HUGUES S.H., VARMUS H.E., BISHOP J.M. (1980). Structure of viral DNA and RNA in mammalian cells infected with avian sarcoma virus.

In J. Mol. Biol. vol 143, p 363-393.

- RASSART E., DESGROSEILLERS L., JOLICOEUR P. (1981). Molecular cloning of B tropic and N tropic endogenous BALB-C murine leukemia virus circular DNA intermediates isolation and characterization of infectious recombinant clones.  
In J. Virol. vol 39, p 162-171.
- RANDS E., LOWY D.R., LANDER M.R., CHATTOPADHYAY S.K. (1981). Restriction endo-nuclease mapping of ecotropic murine leukemia viral DNA size and sequence heterogeneity of the long terminal repeat.  
In Virology vol 108, p 445-452.
- REDDY E.P., SMITH M.J., CANAANI E., ROBBINS K.C., TRONICK S.R., ZAIN S., AARONSON S.A. (1980). Nucleotide sequence analysis of the transforming region and large terminal redundancies of Moloney murine sarcoma virus.  
In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 77, p 5234-5238.
- RINGOLD G.M., BLAIR P.B., BISHOP J.M., VARMUS H.E. (1976). Nucleotide sequence homologies among mouse mammary tumor viruses.  
In Virology vol 70, p 550-553.
- RINGOLD G.M., SHANK P.R., VARMUS H.E., RING J., YAMAMOTO K.R. (1979). Integration and transcription of mouse mammary tumor virus DNA in rat hepatoma cells.
- RUDDLE N.H., CONTA B.S., LEINWAND L. et al (1978). Assignment of the receptor for ecotropic murine leukemia virus to mouse chromosome 5.
- SABRAN J.L., HSU T.W., YEATER C., KAJI A., MASON W.S., TAYLOR J.M. (1979). Analysis of integrated avian RNA tumor virus DNA in transformed chicken, duck and quail fibroblasts.  
In J. Virol. vol 29, p 170-178.
- SCHWARTZ D.E., TIZARD R.J., GILBERT W. (1980). The nucleotide sequence of Rous sarcoma virus.  
In J. Supramol. Struct. vol 9, p 234.
- SCHWARTZ D.E., ZAMECNIK P.C., WEITH H.L. (1977). Rous sarcoma virus genome is terminally redundant : the 3' sequence.  
In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 74, p 994-998.

- SHARP P.A. (1979). Summary : Molecular Biology of viral oncogènes.  
In Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. vol 44, p 1305-1322.
- SHEINESS D., BISHOP J.M. (1979). DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus.  
In J. Virol. vol 31, p 514-521.
- SHEINESS D., BISTER K., MOSCOVICI C., FANSHIER L., GONDA T., BISHOP J.M. (1980). Avian retroviruses that cause carcinome and leukemia identification of nucleotide sequences associated with pathogenicity.  
In J. Virol. vol 33, p 962-968.
- SHIMOTOHNO K., TEMIN H.M. (1980). No apparent nucleotide sequence specificity in cellular DNA juxtaposed to retrovirus pro viruses.  
In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 77, p 7357-7361.
- SHINE J., CZERNILOFSKY A.P., FRIEDRICH R., BISHOP J.M., GOODMAN H.M. (1977). Nucleotide sequence at the 5-prime terminus of the avian sarcoma virus genome.  
In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 74, p 1473-1477.
- SHOEMAKER C., GOFF S., GILBOA E., PASKIND M., MITRA S.W., BALTIMORE D. (1980). Structure of a cloned circular Moloney murine leukemia virus DNA molecule containing an inverted segment : implications for retrovirus integration.  
In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 77, p 3932-3936.
- SHOEMAKER C., HOFFMAN J., GOFF S.P., BALTIMORE D. (1981). Intramolécular integration within Moloney murine leukemia virus DNA.  
In J. Virol. vol 40, p 164-172.
- SHOYAB M., DASTOOR M.N., BALUDA M.A. (1976). Evidence of tandem integration of avian myeloblastosis virus DNA with endogenous provirus in leukemic chicken cells.  
In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 73, p 1749-1753.

SHOYAB M., BALUDA M.A. (1976). Riba-nucleotide sequence homology among avian oncornaviruses.

In J. Virol. vol 17, p 106-113.

SOUTHERN E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

In J. Mol. Biol. vol 98, p 503-517.

SPECTOR D.H., VARMUS H.E., BISHOP J.M. (1978). Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates.

In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 75, p 4102-4106.

STEFFEN D., WEINBERG R.A. (1978). The integrated genome of murine leukemia virus.

In Cell vol 15, p 1003-1010.

STEHELIN D., GUNTAKA R.V., VARMUS H.E., BISHOP J.M. (1976). Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses.

In J. Molecular Biology vol 101, p 349-365.

STEHELIN D., SAULE S., ROUSSEL M., SERGEANT A., LAGROU C., ROMMENS C., RAES M.B. (1980). 3 new types of viral oncogenes in defective avian leukemia viruses. 1. specific nucleotide sequences of cellular origin correlate with specific transformation.

In Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. vol 0, p 1215-1224.

SUTCLIFFE J.G., SHINNICK T.M., VERMA I.M., LERNER R.A. (1980). Nucleotide sequence of Moloney leukemia virus : 3' end reveals details of replications, analogy to bacterial transposons, and an unexpected gene.

In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 77, p 3302-3306.

SUTCLIFFE J.G., SHINNICK T.M., LERNER R.A. (1980). Moloney murine leukemia virus is a transposon : nucleotide sequence analysis identifies genes and replication details.

In Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. vol 45, p 707-710.

SUTCLIFFE J.G., SHINNICK T.M., GREEN N., LIU F.T., NIMAN H.L., LERNER R.A. (1980). Chemical analysis of a polypeptide predicted from nucleotide sequence allows detection of a new retroviral gene product.

In Nature vol 287, p 801-805.

SWANSTROM R., DELORBE W.J., BISHOP J.M., VARMUS H.E. (1981). Nucleotide sequence of cloned unintegrated avian sarcoma virus DNA : viral DNA contains direct and inverted repeats similar to those in transposable elements.

In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 78, p 124-128.

TAKANO T., HATANAKA M. (1974). DNA RNA hybrid in cells infected by murine leukemia virus.

In Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. vol 39, p 1009-1014.

TAL J., KUNG H.J., VARMUS H.E., BISHOP J.M. (1977). Characterization of DNA complementary to nucleotide sequences adjacent to poly Adenylate at the 3-prime terminus of the avian sarcoma virus genome.

In Virology vol 79, p 183-197.

TAYLOR J.M., ILLMENSEE R. (1975). Site on the RNA of an avian sarcoma virus at which primer is bound.

In J. Virol. vol 16, p 553-558.

TAYLOR J.M., ILLMENSEE R., SUMMERS J. (1976). Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase.

In Biochim. Biophys. Acta vol 442, p 324-330.

TAYLOR J.M., HSU T.W., LAI M.M.C. (1978). Restriction enzymes sites on the avian RNA tumor virus genome.

In J. Virol. vol 6, p 479-484.

TAYLOR J.M., HSU T.W., YEATER C., MASON W.S. (1979). Synthesis and integration of avian sarcoma virus DNA.

In Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. vol 44, p 1091-1096.

- TAYLOR J.M. (1979). DNA intermediates of avian RNA tumor viruses.  
In Current Topics in Microbiology and Immunology vol 0, p P 23-42.
- TAYLOR J.M. (1980). The synthesis and integration of retro-virus DNA intermediates.  
In In Vitro vol 16, p 223.
- TEMIN H.M. (1976). The DNA provirus hypothesis. The establishment and implications of RNA directed DNA synthesis.  
In Science vol 192, p 1075-1080.
- TEMIN H.M. (1980). Origin of retroviruses from cellular movable genetic elements.  
In Cell vol 21, p 599-600.
- TEREBA A., CRITTENDEN L.B., ASTRIN S.M. (1981). Chromosomal localization of 3 endogenous retrovirus loci associated with virus production in white leghorn chickens.  
In J. Virol. vol 39, p 282-289.
- TRONICK S.R., CABRADILLA C.D., AARONSON S.A., HASELTINE W.A. (1978). 5-prime terminal nucleotide sequences of mammalian type C helper viruses are conserved in the genomes of replication defective mammalian transforming viruses.  
In J. Virol. vol 26, p 570-576.
- TSURUO T., BALUDA M.A. (1977). Integration of proviral DNA in chicken cells infected with Schmidt-Ruppin Rous sarcoma virus is not enhanced by DNA repair.  
In J. Virol. vol 23, p 533-542.
- VAN BEVEREN C., GODDARD J.G., BERNS A., VERMA J.M. (1980). Structure of Moloney murine leukemia viral DNA : nucleotide sequence of the 5' long terminal repeat and adjacent cellular sequences.  
In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 77, p 3307-3311.
- VAN DER PUTTEN H., TERWINDT E., BERNS A., JAENISCH R. (1979). The integration sites of endogenous and exogenous Moloney murine leukemia virus.  
In Cell vol 18, p 109-116.

VANDE WOUDE G.F., OSKARSSON M., MC CLEMENTS W.L., ENQUIST L.W., BLAIR D.G., FISCHINGER P.J., MAIZEL J.V., SULLIVAN M. (1980). Characterization of integrated Moloney sarcoma pro-viruses and flanking host sequences cloned in bacteriophage Lambda.

In Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. vol 0, pP 735-746.

VARMUS H.E., GUNTAKA R.V., FAN W.J.W. et al (1974). Synthesis of viral DNA in the cytoplasm of duck embryo fibroblasts and in enucleated cells after infection by avian sarcoma virus.

In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 71, p 3874-3878.

VARMUS H.E., STAVNEZER J., MEDEIROS E., BISHOP J.M. (1975). Detection and characterization of RNA tumor virus specific DNA in cells.

In Bibl. Haemat. vol 40, p 451-461.

VARMUS H.E., SHANK P.R. (1976). Unintegrated viral DNA is synthesized in the cytoplasm of avian sarcoma virus-transformed duck cells by viral DNA polymerase.

In J. Virol. vol 18, p 567.

VERMA I.M. (1977). The reverse transcriptase.

In Biochim. Biophys. Acta vol 473, p 1-38.

WANG L.H., DUESBERG P.H., ROBINS T. et al (1977). The terminal oligonucleotides of avian tumor virus RNAs are genetically linked.

In Virology vol 82, p 472-492.

WEINBERG R.A. (1977). Structure of the intermediates leading to the integrated provirus.

In Biochim. Biophys. Acta vol 473, p 39-55.

WEISSMANN C., PARSONS J.T., COFFIN J.W. et al (1974). Studies on the structure and synthesis of Rous sarcoma virus RNA.

In Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. vol 39, p 1043-7056.

YAMAMOTO T., TYAGI J.S., FAGAN J.B. et al (1980). Molecular mechanism for the capture and excision of the transforming gene of avian sarcoma virus as suggested by analysis of recombinant clones.

In J. Virol. vol 35, p 436-443.

YAMAMOTO T., JAY G., PASTAN I. (1980). Unusual features in the nucleotide sequence of a cDNA clone derived from the common region of avian sarcoma virus messenger RNA.

In Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 77, p 176-180.

YANG W.K., D'AURIOL L., YANG D.M., KIGGANS JO JR, OU C.Y., PERIES J., EMANOIL-RAVICOVITCH R. (1980). Restricted infectivity of ecotropic type C retro viruses in mouse terato carcinoma cell studies on viral DNA intermediates.

In J. Supramol. Struct. vol 14, p 223-232.

B - OUVRAGES

COURS DE L'INSTITUT PASTEUR. Les virus.

Paris : Ediscience/Mc Graw-Hill, 1976.

GOLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY. Viral oncogènes.

USA : Gold Spring Harbor N.Y., 1980.

MAMMETTE A. Virologie médicale à l'usage des étudiants en médecine.

Lille : Editions Grouan & Roques, 10<sup>e</sup> édition 1982.

RUSSEL Peters J. Cours de génétique de la biologie moléculaire aux lois de Mendel.

Paris : MEDSI, Médecine et sciences internationales, 1981.

WATSON James D. Biologie moléculaire du gène.

Paris : Inter Editions, 3<sup>e</sup> édition 1978.

