

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IDENTIFICATION DE SITES COMMUNS
D'INTÉGRATION
DU RÉTROVIRUS RADLV/VL₃
DANS LE GÉNOME DE SOURIS LEUCÉMIQUES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
PIOTR BAŃSKI

FÉVRIER 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Docteur Éric Rassart de m'avoir permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire. Cette expérience m'a permis de voir que la biologie moléculaire me passionne et que la recherche est quelque chose que je voudrai poursuivre durant bien des années encore.

Merci également à Elsy Édouard, dont l'aide sera inoubliable. Je dois de plus remercier Séverine Landais et Philippe Legault pour leur aide et leurs judicieux conseils tout au long de ce projet, ainsi que Yan Boucher, mon stagiaire, qui m'a permis d'analyser plus de tumeurs et d'obtenir des résultats intéressants. Je tiens également à remercier le Docteur Anton Berns (Institut du Cancer, division de la génétique moléculaire et centre de la génétique médicale, Hollande) pour m'avoir fourni les protocoles qui m'ont permis de démarrer mon projet de maîtrise.

Pour terminer, je voudrais saluer et remercier toutes les personnes que j'ai eu la chance de croiser dans le laboratoire du Docteur Rassart; étudiantEs, plus particulièrement Louis-Charles Jr. Levros, stagiaires et technicienNEs, qui ont rendu cette expérience plus agréable.

Table des matières

Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des annexes	x
Liste des abréviations	xi
Résumé	xv
Introduction	1
CHAPITRE I : État des connaissances	5
1.1 Les cancers	5
1.2 La leucémie	5
1.3 Les souris et le cancer	6
1.4 Les rétrovirus	6
1.4.1 L'infection et la réplication.....	7
1.4.2 Structures et composantes d'un rétrovirus	9
1.4.3 Le génome rétroviral.....	10
1.4.4 La transcription de l'ARN en ADN	12
1.5 Le RadLV	12
1.5.1 Le RadLV/VL ₃ V-13.....	13
1.6 Les rétrovirus et le cancer	13
1.7 Techniques de détections des intégrations rétrovirales	16
1.8 Les gènes affectés	16
1.8.1 Myc	18

1.8.2 Notch1	19
1.8.3 Pim1	21
1.8.4 Vin1	22
1.8.5 Kis1	23
1.8.6 Kis2	23
1.9 Hypothèse.....	24
CHAPITRE II : Matériel et méthodes	25
2.1 La splinkerette.....	25
2.2 Les souris infectées	27
2.3 Extraction d'ADN génomique	28
2.4 Digestion de l'ADN génomique	29
2.5 Ligation ADN-splinkerette	30
2.6 Les réactions en chaîne de la polymérase.....	32
2.6.1 Première PCR.....	32
2.6.2 PCR nichée.....	33
2.7 Migration pour élution.....	34
2.8 Éluion des bandes amplifiées.....	34
2.9 Insertion dans le vecteur.....	35
2.10 Transformation bactérienne et clonage.....	36
2.11 Minipréparation d'ADN plasmidique (Minipreps).....	36
2.12 Séquençage	37
2.13 Alignement des séquences.....	37
2.14 Travail supplémentaire.....	38
2.14.1 Transfert par la méthode Southern.....	38
2.14.2 Sondes radioactives.....	38
2.14.3 Oligonucléotides radiomarqués.....	40

2.14.4 L'hybridation	40
2.14.5 Technique des billes magnétiques.....	41
2.14.6 Récupération des colonnes.....	42
2.14.7 Autres précisions.....	42
CHAPITRE III : Résultats	44
3.1 Mise au point	45
3.2 Gradients de température d'appariement	47
3.3 Hybridation du gradient de température de la première PCR	48
3.4 Gradient MgCl₂	49
3.5 Gel d'éluion	50
3.5.1 Résultats de l'éluion.....	51
3.6 Gel de plusieurs tumeurs	52
3.6.1 Hybridation de plusieurs tumeurs	54
3.7 PCR pour hybridation avec la sonde Amorce Splink2	55
3.7.1 Hybridation avec la sonde Amorce Splink2	57
3.8 Sites d'intégration répertoriés	57
CHAPITRE IV : Discussion	61
4.1 Sites d'intégration sur le chromosome 7, position F2	72
4.2 Sites d'intégrations sur le chromosome 11, position A2	74
4.3 Oncogènes connus relevés	76
4.3.1 Rasgrp1	77
4.3.2 Rorc	77
4.3.3 Lef1	78
4.3.4 Gfi1	79
4.3.5 Ncor2.....	80
4.3.6 Scarb1.....	81

4.3.7 Lfng	81
4.3.8 Mad	82
4.3.9 Myb	83
4.3.10 Ahi1	84
4.3.11 Supt4h	85
4.3.12 Bzrap1	86
4.3.13 Sept9.....	86
4.3.14 Fos	87
4.3.15 Jundm2	88
4.3.16 Ccnd3	89
4.3.17 Bcl2l1	89
4.3.18 Gpc3	90
Conclusion	92
Annexes	95
Références	115

Liste des figures

Figure 1 :	Représentation simplifiée et générale de l'infection et de la multiplication des rétrovirus.....	8
Figure 2 :	Génome et protéines rétrovirales.....	9
Figure 3 :	Transcription de l'ARN rétroviral en ADN suite à une infection d'une cellule hôte.....	11
Figure 4 :	Structure détaillée de la splinkerette.....	27
Figure 5 :	ADN génomique de la lignée BL/VL ₃ contenant 9 intégrations rétrovirales, digéré par l'enzyme de restriction EcoR I, transféré par la méthode Southern et hybridé par une sonde radioactive.....	44
Figure 6 :	Gel d'agarose présentant le résultat obtenu sur de l'ADN de clones bactériens comportant le RadLV/VL ₃ suite à l'application de la technique des splinkerettes.....	46
Figure 7 :	Première PCR avec gradient de température d'appariement sur de l'ADN génomique de la lignée BL/VL ₃	47
Figure 8 :	PCR nichée avec gradient de température d'appariement effectué suite à l'application de la technique des splinkerettes sur l'ADN de la lignée cellulaire BL/VL ₃	48
Figure 9 :	Hybridation radioactive d'une première PCR avec un gradient de température d'appariement.....	49
Figure 10 :	Première PCR exécutée avec un gradient de MgCl ₂ pour mettre au point la technique des splinkerettes.....	50
Figure 11 :	Gel d'élution contenant 5 PCR nichées dans un puits triple fait sur la tumeur 110.3.....	51
Figure 12 :	Rendement de l'élution de la tumeur 110.3.....	52
Figure 13 :	Représentation des premières PCR et des PCR nichées sur la lignée BL/VL ₃ et les tumeurs K24.1, 132.2, 140.4 et 132.8....	53

Figure 14 :	Hybridation radioactive des tumeurs de la figure 13.....	54
Figure 15 :	Gel d'agarose montrant la différence entre un ADN de souris non infectée et l'ADN tumoral.....	56
Figure 16 :	Hybridation radioactive d'une membrane de nylon ayant servi au transfert de l'ADN de la figure 15.....	57

Liste des tableaux

Tableau I :	Liste des sites d'intégrations répertoriés lors de ce projet.....59
--------------------	---

Liste des annexes

Annexe A :	Principe de la <i>Inverse-PCR</i>	95
Annexe B :	Principe de la PCR par vectorette et par splinkerette.....	96
Annexe C :	Principe de la <i>Alu-PCR</i>	97
Annexe D :	Principe de la <i>Capture PCR</i>	98
Annexe E :	Principe de la <i>panhandle PCR</i>	99
Annexe F :	Principe de la <i>Restriction-Site PCR</i>	100
Annexe G :	Principe de la <i>targeted gene-walking PCR</i>	101
Annexe H :	Résumé des techniques employées pour la recherche de sites communs d'intégration.....	102
Annexe I :	Exemples de résultats obtenus lors de la recherche de sites communs d'intégration chez des souris BXH2 et AKXD.....	103
Annexe J :	Sites communs d'intégration retrouvés par Mikkers <i>et al.</i> 2002.....	105
Annexe K :	Schéma des étapes principales de la technique des splinkerettes.....	107
Annexe L :	Vecteur pDrive.....	108
Annexe M :	Sites d'appariement du rétrovirus RadLV/VL ₃ entier dans le génome de la souris.....	109
Annexe N :	Tableau récapitulatif des résultats bruts de l'ensemble des bandes séquencées.....	110

Liste des abréviations

A :	adénine
AAA :	queue poly-adénine
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADN (-) :	acide désoxyribonucléique de polarité négative
ADN (+) :	acide désoxyribonucléique de polarité positive
$\alpha^{32}\text{P}$ -ATP :	ion phosphore de l'adénosine triphosphate à la position alpha
ALV :	<i>avian leukosis virus</i>
AML :	<i>acute myeloid leukemia</i>
AP-1 :	<i>activating protein-1</i>
ARN :	acide ribonucléique
ARN (+) :	acide ribonucléique de polarité positive
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ARNt :	acide ribonucléique de transfert
ARN _t ^{Pro} :	acide ribonucléique de transfert proline
ATP :	adénosine triphosphate
ATPase :	adénosine triphosphatase
BDA :	<i>boomerang desoxyribonucleic acid amplification</i>
BFLS :	<i>Börjeson-Forssman-Lechmann syndrome</i>
BSA :	<i>bovine serum albumin</i>
BWS :	<i>Beckwith-Wiedemann syndrome</i>
C :	cytosine
CA :	capside
CAEV :	<i>caprine arthritis-encephalitis virus</i>
CAP :	structure en coiffe des acides ribonucléiques
Ci :	Curie
c-Jun :	oncogène Jun cellulaire
c-Fos :	oncogène Fos cellulaire
c-Myb :	oncogène Myb cellulaire
c-Myc :	oncogène Myc cellulaire
c-onc :	oncogène cellulaire
CPCR :	<i>capture polymerase chain reaction</i>
CpG :	douplet de base cytosine et guanine
CPM :	coup par minute
°C :	degré Celsius
DH5 α :	DH5 alpha
DLS :	<i>dimer-linkage structure</i>
DNase :	désoxyribonucléase
dNTP :	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
D.O. :	densité optique

Dr :	docteur
DTT :	dithiothréitol
EDTA :	acide éthylènediaminetétraacétique
<i>env</i> :	gène de l'enveloppe
EST :	<i>expressed sequence tagged</i>
FBJ :	<i>Finkel-Biskis-Jenkins virus</i>
FBR :	<i>Finkel-Biskis-Reilly virus</i>
FBR-MuSV :	<i>Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus</i>
FFU :	<i>Focus-Forming Units</i>
FS :	site de changement de cadre de lecture
G :	guanine
G1 :	<i>gap 1</i>
<i>gag</i> :	gène de la capside
γ :	gamma
GRIPS :	<i>glypican-related integral membrane heparan sulfate proteoglycans</i>
GTP :	guanine triphosphate
HBV :	hépadnavirus
HCl :	chlorure d'hydrogène
HMG :	<i>high-mobility group</i>
HPV :	papillomavirus
IGF-II :	<i>insulin-like growth factor II</i>
IPCR :	<i>inverse polymerase chain reaction</i>
IL :	interleukine
IN :	intégrase
kpb :	kilopaire de bases
λ :	lambda
LB :	luria broth
LTR :	<i>long terminal repeat</i>
M :	medium (tampon)
M :	molaire
MA :	matrice
MCF :	<i>mink cell focus-forming virus</i>
MgCl ₂ :	chlorure de magnésium
mg :	milligramme
mL :	millilitre
mM :	millimolaire
μ Ci :	micro Curie
μ g :	micro gramme
μ L :	micro litre
Mb :	mégabase
MLV :	<i>murine leukemia virus</i>
MuLV :	<i>murine leukemia virus</i>
MMTV :	<i>mouse mammary tumor virus</i>

MoMuLV:	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
Na :	sodium
NaCl :	chlorure de sodium
NaOH :	hydroxyde de sodium
NaOAc :	acétate de sodium
NC :	nucléocapside
NEB :	<i>New England Biolabs Inc.</i>
ng :	nanogramme
nm :	nanomètre
oligo :	oligonucléotide
PA :	signal de polyadénylation
pb :	paire de bases
PBS :	<i>primer binding site</i>
PCR :	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGFB :	<i>platelet-derived growth factor B chain</i>
PEST :	domaine riche en résidus proline, glutamate, sérine et thréonine
pH :	<i>potential of hydrogen</i>
PHD :	<i>plant homology domain</i>
<i>pol</i> :	gène de la transcriptase inverse et de l'intégrase
PPT :	<i>polypurine tract</i>
PR :	protéase
pre-TCR :	<i>pre T cell receptor</i>
<i>pro</i> :	gène de la protéase
PVP :	polyvinylpyrrolidone
Ψ :	psi
PSM :	<i>presomitic mesoderm</i>
R :	séquence répétée
RadLV :	<i>radiation leukemia virus</i>
RNAse H :	ribonucléase H
rpm :	rotation par minute
RS-PCR :	<i>restriction-site polymerase chain reaction</i>
RT :	transcriptase inverse
S :	synthèse
SA :	site accepteur d'épissage
SD :	site donneur d'épissage
SDS :	sodium dodecyl sulfate
SSC :	chlorure de sodium et citrate de sodium
SU :	glycoprotéine de la surface de l'enveloppe virale
T :	thymus
TAE :	<i>tris - acetic acid – EDTA</i>
TBLV :	<i>type B leukemogenic virus</i>
TCF :	<i>t-cell factor</i>

TM :	protéine transmembranaire de l'enveloppe virale
T _m :	<i>melting point temperature</i>
Tris :	<i>1,3-Propanediol, 2-amino-2-(hydroxymethyl)</i>
U ₃ :	séquence unique en 3'
U ₅ :	séquence unique en 5'
UQÀM :	université du Québec à Montréal
UV :	ultra-violet
V :	volt
v/v :	volume/volume
VIH :	virus de l'immunodéficience humaine
v-onc :	oncogène viral
v-Myc :	oncogène Myc viral
X-Gal :	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

Résumé

Le RadLV/VL₃ clone V-13 est un rétrovirus murin thymotrope, non défectif, fortement leucémogène et écotrope. Il induit des lymphomes des cellules T en s'intégrant dans le génome de l'hôte. Le virus peut causer une tumeur en modifiant le fonctionnement des gènes près desquels il s'est intégré. Ces intégrations, si retrouvées au même endroit dans plus d'une tumeur, définissent un site commun d'intégration. Ce projet a pour but de trouver un ou des nouveaux sites d'intégration du rétrovirus RadLV/VL₃ clone V-13. Pour ce faire, un oligonucléotide de séquence connue, nommé splinkerette, a été utilisé. L'ADN d'une souris tumorale est coupée puis une splinkerette y est ligasée. Ceci permet d'amplifier, par des réactions de PCR, les régions flanquantes aux intégrations rétrovirales. Une fois clonées, les produits des PCR sont séquencés, permettant de situer les intégrations dans le génome de la souris, qui est disponible dans les banques de données. Il est ainsi possible de repérer les gènes à proximité de l'intégration rétrovirale. Certains gènes d'intérêt ont déjà été retrouvés grâce à cette technique pour d'autres rétrovirus. Dans le cas du RadLV/VL₃, parmi une vingtaine de tumeurs et environ 70 bandes analysées, les gènes Notch1, Rasgrp1, Rorc, Lef1, Gfi1, Ncor2, Scarb1, Lfng, Mad, Myb, Ahi1, Supt4h, Bzap1, Sept9, Fos, Jundm2, Myc, Pim1, Cnd3, Bcl2l1 et Gpc3 ont été trouvés. Plusieurs de ces oncogènes n'ont jamais été associés au rétrovirus RadLV/VL₃. Deux régions potentiellement oncogéniques sur les chromosomes 7 et 11 ont été identifiées. La compréhension du fonctionnement des oncogènes permettra d'empêcher leur expression aberrante, ou d'utiliser des rétrovirus comme vecteurs dans la thérapie génique afin de corriger l'expression de gènes mutés.

Mots clés : ADN, clonage, leucémie, oncogène, PCR, RadLV/VL₃, rétrovirus, séquençage, site commun d'intégration, sonde radioactive, splinkerette, tumeur.

Introduction

L'évolution du règne animal a mené à la conception d'êtres vivants hypercomplexes et adaptés à l'environnement par leur taille et leurs caractéristiques physiques. Effectivement, Pellegrini *et al.* (1998) stipulent que le nombre de cellules dans un organisme donné est une balance nette de la division et de la mort cellulaire qui est régulée par des systèmes complexes et très organisés. Il n'en demeure pas moins que la complexité du fonctionnement du métabolisme et des cellules des organismes vivants présentent des failles (Lewin 1997). Il est même possible de dire que plus les organismes sont complexes, plus ils peuvent être sujets à des erreurs de fonctionnement. Le développement des cancers en est l'exemple parfait.

Les dysfonctionnements cellulaires et les cancers font partie de la vie de tous les animaux. Ils relèvent de mutations accumulées au cours du temps à l'intérieur d'une cellule. Trois changements importants ont lieu lorsqu'une cellule devient tumorale. Il s'agit de l'immortalisation, la transformation et la métastase. Par définition, l'immortalisation confère à la cellule le pouvoir de se diviser indéfiniment. Pour ce qui est de la transformation, il s'agit du phénomène par lequel les cellules deviennent indépendantes des systèmes de contrôle de leur prolifération. Enfin, la métastase se définit comme un état où la cellule acquiert la capacité d'envahir les tissus du corps et d'y former des colonies (Lewin 1997). Les cellules cancéreuses, si non éliminées, continuent à envahir l'organisme et les tumeurs qui en découlent dérèglent le fonctionnement normal des tissus, menant ainsi à la mort.

Le développement d'un cancer repose sur plusieurs mécanismes et événements devant se produire selon des étapes précises. Une cellule tumorale doit avoir subi des dérèglements au niveau des gènes. Les cellules possèdent des gènes qui, lorsque mal gérés, entraînent le développement des cancers. Ces gènes se nomment les proto-oncogènes et ils sont regroupés en 5 classes. La classe I regroupe

les facteurs de croissance, qui peuvent devenir non spécifiques à leurs récepteurs ou qui peuvent être exprimés constitutivement. La classe II est celle des récepteurs, soit des molécules à la surface de la membrane cellulaire ou celles à la surface du noyau. Des récepteurs modifiés peuvent continuellement envoyer des signaux vers l'intérieur de la cellule, même en absence de ligand. La classe III correspond aux transducteurs intracellulaires (protéines kinases) qui peuvent également être actifs continuellement et stimuler le développement des cellules. La classe IV est celle des facteurs de transcription nucléaires qui peuvent entraîner la transcription de gènes de manière continue ou incontrôlée. La dernière, la classe V, implique les protéines régissant le cycle cellulaire. Une mutation ou une modification dans l'expression de ces protéines engendre un développement cellulaire chaotique et une multiplication cellulaire incontrôlée (Lodish & Darnell 1997) si le système immunitaire (immunité naturelle anti-tumorale) ne réussit pas à contrôler ces cellules (Révillard 1994).

Bien qu'un nombre important d'agents biologiques, chimiques et physiques puisse être impliqué dans l'apparition d'une croissance néoplasique (Hiatt *et al.* 1977), les virus et leur implication dans les cancers demeurent très étudiés. Plusieurs virus humains peuvent être impliqués dans le développement de tumeurs. Parmi ceux-ci, il y a les virus à ADN tels que : les Hépadnavirus (le HBV par exemple) affectant le foie; les Papillomavirus (HPV) entraînant la formation de verrues; les Herpesvirus causant divers lymphomes et carcinomes (Baumann *et al.* 2001). Le HTLV-1 (*Human T-Cell Lymphotropic Virus 1*), un rétrovirus, peut causer des cancers de manière indirecte.

Le premier lien entre le développement d'un cancer suite à une infection virale était fait en 1908 (Ellerman & Bang 1908). Il s'agissait d'un virus aviaire (ALV : *Avian Leukosis Virus*) (Coffin *et al.* 1997). Ce virus causait une sorte de leucémie/lymphome chez le poulet (Hu *et al.* 2004). Par contre, la première particule rétrovirale fut isolée par Peyton Rous (1911). Ce virus formait des sarcomes chez le

poulet, nommés sarcomes de Rous. D'autres virus, comme par exemple les rétrovirus leucémogènes murins (MuLV ou MLV : *Murine Leukemia Virus*) entraînent également le développement de cancers (Sitbon *et al.* 2001). Suivant ces études, et sachant que les rétrovirus entrent dans le génome de leur hôte, les chercheurs ont voulu savoir quels gènes sont affectés par le rétrovirus intégré pour qu'une tumeur se développe. Pour ce faire, il fallait définir cette intégration rétrovirale. Il s'avère que la probabilité qu'un rétrovirus s'intègre 2 fois non loin d'un même site dans le génome de 2 tumeurs différentes est très faible. Une telle intégration permet d'affirmer que le site en question est un site commun d'intégration. Plus précisément, certains auteurs mentionnent que le ciblage du même gène dans plusieurs tumeurs indépendantes donne une information évidente sur l'implication de ce gène dans l'oncogénèse (Chattopadhyay *et al.* 1981; Kim *et al.* 2003; Li *et al.* 1999; Neel *et al.* 1981; Nusse & Varmus 1982; Rosenberg & Jolicoeur 1997). De là, les chercheurs ont réussi à trouver des sites communs d'intégration qui ont permis d'identifier des gènes d'intérêts dans le développement de cancers, soit des oncogènes. De plus, les intégrations rétrovirales peuvent avoir des effets sur des gènes à de très grandes distances (Bartholomew *et al.* 1991; Denicourt *et al.* 2003; Hansen & Justice 1999; Lammie *et al.* 1992; Landais *et al.* 2005 (en soumission); Sola *et al.* 1988; Tschlis *et al.* 1989, 1990; Varmus 1982).

Le travail qui suit porte sur la leucémie murine causée par un rétrovirus, soit le RadLV/VL₃ clone V-13. Il s'agit du *Radiation Leukemia Virus*, membre de la famille des MuLV. Le premier RadLV fut isolé par Kaplan en 1964 (Rassart *et al.* 1986). Le but du projet était de trouver des nouveaux sites d'intégration de ce virus dans les génomes de souris leucémiques. Selon les résultats récents obtenus par Lambert *et al.* (1999), Quantin (2002) et Landais *et al.* (2005) (en soumission) concernant la découverte de nouveaux sites communs d'intégration virale des rétrovirus RadLV, il devrait être possible, par la méthode des splinkerettes, de trouver de nouveaux sites communs d'intégration. Les avantages de cette techniques sont

qu'elle permet de cibler un grand nombre d'intégrations lors d'une même PCR, c'est une version améliorée de la technique des vectorettes qui évite des appariements non spécifiques lors des PCR, et elle est conçue de sorte à ne pas nécessiter d'étapes de clonage.

Trois sites communs d'intégration ont été mis en évidence par la technique de réaction de polymérase en chaîne inverse, soit IPCR (*Inverse Polymerase Chain Reaction*) pour le RadLV/VL₃ : c-Myc, Pim1 et Notch1 (Quantin 2002). De plus, Tremblay *et al.* (1992) ont identifié le proto-oncogène Vin1. Les sites communs d'intégration Kis1 et Kis2 furent également trouvés lors de travaux effectués sur le RadLV/VL₃ (Lambert *et al.* 1999; Landais *et al.* 2005 (en soumission); Quantin 2002). Comparée aux autres méthodes employées, l'approche des splinkerettes utilisée au cours de ce projet a permis de travailler plus rapidement, d'analyser un plus grand nombre de tumeurs et de sites d'intégration et, par le fait même, d'augmenter les chances d'identifier un site commun d'intégration (Mikkers *et al.* 2002). Vingt et une tumeurs furent analysées dans le cadre de ce projet et plus de 100 séquences furent obtenues. Les avancées scientifiques telles que la disponibilité du génome murin sur <http://www.ensembl.org> et sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ont permis de situer les fragments d'ADN séquencés dans le génome de la souris. Nos travaux et ceux de Mikkers *et al.* (2002) démontrent que la technique des splinkerettes est une méthode très efficace.

CHAPITRE I

État des connaissances

1.1 Les cancers

Les cancers peuvent provenir de diverses sources. L'alimentation et l'exposition à divers agents mutagènes tels les radiations sont probablement les principales sources de développement des cancers. Certains virus peuvent également entraîner le développement d'un cancer. Une définition simplifiée de cancer pourrait se lire comme suit : maladie caractérisée par une croissance excessive et anormale de cellules de certains tissus. Un virus est une particule infectieuse causant des maladies, nécessitant une cellule hôte pour sa réplication et contenant soit de l'ADN soit de l'ARN comme matériel génétique (Sheeler & Bianchi 1987). Il est important d'ajouter que les cancers sont des maladies provenant de plusieurs mutations qui ont lieu à l'intérieur d'une même cellule. Il ne s'agit donc pas d'un évènement isolé, mais d'un agencement d'évènements qui ne tuent pas la cellule en cause, mais qui lui confèrent des propriétés menant à un développement incontrôlé.

1.2 La leucémie

La leucémie est un cancer malin de la moelle osseuse et du sang. Il s'agit d'une maladie où il y a prolifération anarchique des cellules sanguines. Dans la majorité des cas, des symptômes d'anémie vont être visibles chez l'individu malade après un certain temps, dû à un manque de globules rouges. Les gens atteints de leucémie vont également être plus susceptibles d'avoir des hémorragies par manque de plaquettes sanguines, et d'avoir des infections plus graves dû à un mauvais fonctionnement des globules blancs. Chaque type de cellule touché correspond à une

leucémie différente. Malgré que la majorité des leucémies affecte les gens de 67 ans et plus, les enfants de 0 à 19 ans peuvent également être affectés. Dans les faits, 30% des cancers chez les jeunes entre 0 et 19 ans sont des leucémies (*The Leukemia and Lymphoma Society* 2004).

1.3 Les souris et le cancer

Les souris demeurent des modèles d'études très intéressants dans la recherche de techniques et médicaments servant à contrer les cancers. Dès le début des années 1930, les souris de laboratoire étaient sélectionnées selon une forte incidence de leucémies spontanées qui se présentaient plus de 6 mois après la naissance. C'est seulement entre 1955 et 1960 qu'il a été possible d'obtenir des isolats viraux plus infectieux. Ces isolats étaient obtenus après irradiations et expositions des souris à des agents carcinogènes. Les nouvelles particules virales obtenues pouvaient entraîner la formation de leucémies 2 à 3 mois après inoculation des souris (Sitbon *et al.* 2001).

1.4 Les rétrovirus

Des tests génétiques ont montré que des séquences rétrovirales font partie de tous les génomes de mammifères (Rassart & Jolicoeur 1982; Sitbon *et al.* 2001; Todaro & Huebner 1972). Plusieurs copies de MuLV peuvent même être détectées dans une souris saine par des techniques de biologie moléculaire (Chattopadhyay *et al.* 1974; Gelb *et al.* 1973; Rassart & Jolicoeur 1982). Ces séquences peuvent correspondre autant à un génome entier de rétrovirus (situation rare) qu'à des portions de génomes rétroviraux. Ces virus incorporés dans le génome sont transmis de façon verticale, soit de descendant à descendant, principe différent de la transmission horizontale où les infections se font d'un individu à l'autre (Sitbon *et al.* 2001). Il

s'agit donc de rétrovirus endogènes et exogènes, respectivement, et ces deux types peuvent engendrer le développement d'une tumeur.

1.4.1 L'infection et la réplication

L'intégration du génome viral dans le noyau n'est pas une étape simple et inévitable (Odawara *et al.* 1998). La figure 1 représente d'une manière simplifiée l'infection et la réplication rétrovirale suite à son intégration au génome. Le principe de fonctionnement des rétrovirus repose sur l'attachement à la cellule cible par des récepteurs membranaires spécifiques au type cellulaire et la fusion des membranes rétrovirale et cellulaire. Ceci entraîne le passage de la capsid renfermant le matériel génétique vers l'intérieur de la cellule et la dissociation de la capsid. La transcription inverse est exécutée par la transcriptase inverse, qui transforme l'ARN simple brin en ADN simple brin, puis en double brin. L'intégration de cet ADN dans le noyau de la cellule se fait par l'intégrase. Il faut mentionner que l'intégration au génome cellulaire se fait lors de la phase mitotique de la cellule, suite à la rupture de la membrane nucléaire (Sitbon *et al.* 2001). L'association de complexes de pré-intégration des MLV avec le noyau de la cellule hôte est dépendante de la rupture de la membrane nucléaire lors de la mitose. L'infection par les MLV ne peut donc être complétée qu'après la division cellulaire. Il n'y a donc pas de réelle entrée du virus dans le noyau de la cellule hôte. Lors d'une infection massive, les cellules cibles ne se retrouvent qu'avec une à dix copies du génome rétroviral intégré dans l'ADN génomique. Il est de plus intéressant de mentionner que l'infection même peut être significativement réduite si la cellule exprime les glycoprotéines d'enveloppe d'un premier MLV (enveloppe efférente) et que l'enveloppe d'un second MLV reconnaît le même récepteur (Bouille *et al.* 1995; Daniel *et al.* 1999). Il s'agit d'un phénomène appelé « interférence ».

Finalement, il y a réplication du rétrovirus (transcription et traduction), suivant une période de latence ou non, par un rapatriement de la machinerie cellulaire en faveur du rétrovirus. Les protéines rétrovirales sont ensuite réarrangées pour former des rétrovirus entiers qui peuvent quitter la cellule par bourgeonnement ou par lyse de la membrane cellulaire. Les rétrovirus quittent donc la cellule hôte en entourant leur capsid d'une membrane cellulaire portant des protéines virales qui, entre autres, confèrent au virus la capacité d'infecter d'autres cellules du même type (Sitbon *et al.* 2001). Ce sont donc des virus enveloppés.

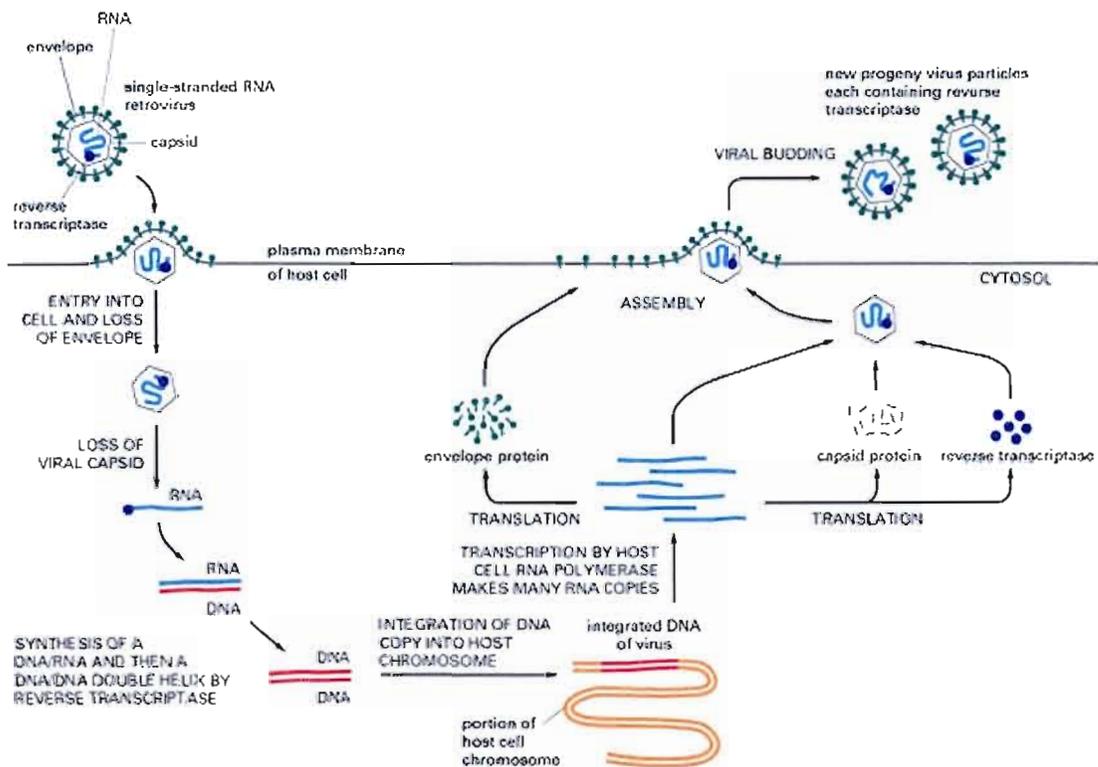


Figure 1 : Représentation schématisée des étapes d'infection, d'intégration et de réplication d'un rétrovirus dans une cellule. (Tiré de Rassart 2004 http://www.unites.uqam.ca/biologie_moleculaire/images/retro.html).

1.4.2 Structure et composantes d'un rétrovirus

Les rétrovirus sont des particules inertes nécessitant le métabolisme d'une cellule hôte pour se multiplier. Ce sont des virus à ARN d'une grosseur de 80 à 100 nm. Leur surface correspond à une enveloppe lipidique. Leur ARN est un dimère d'une longueur de 7 à 12 kilopaires de bases. Il est linéaire, simple brin, non segmenté et de polarité positive (Coffin *et al.* 1997) (Figure 2). Le dimère est formé grâce à un appariement entre les deux brins d'ARN sur une courte séquence nommée DLS (*Dimer-Linkage Structure*) (Sitbon *et al.* 2001).

Organisation structurale d'un rétrovirus

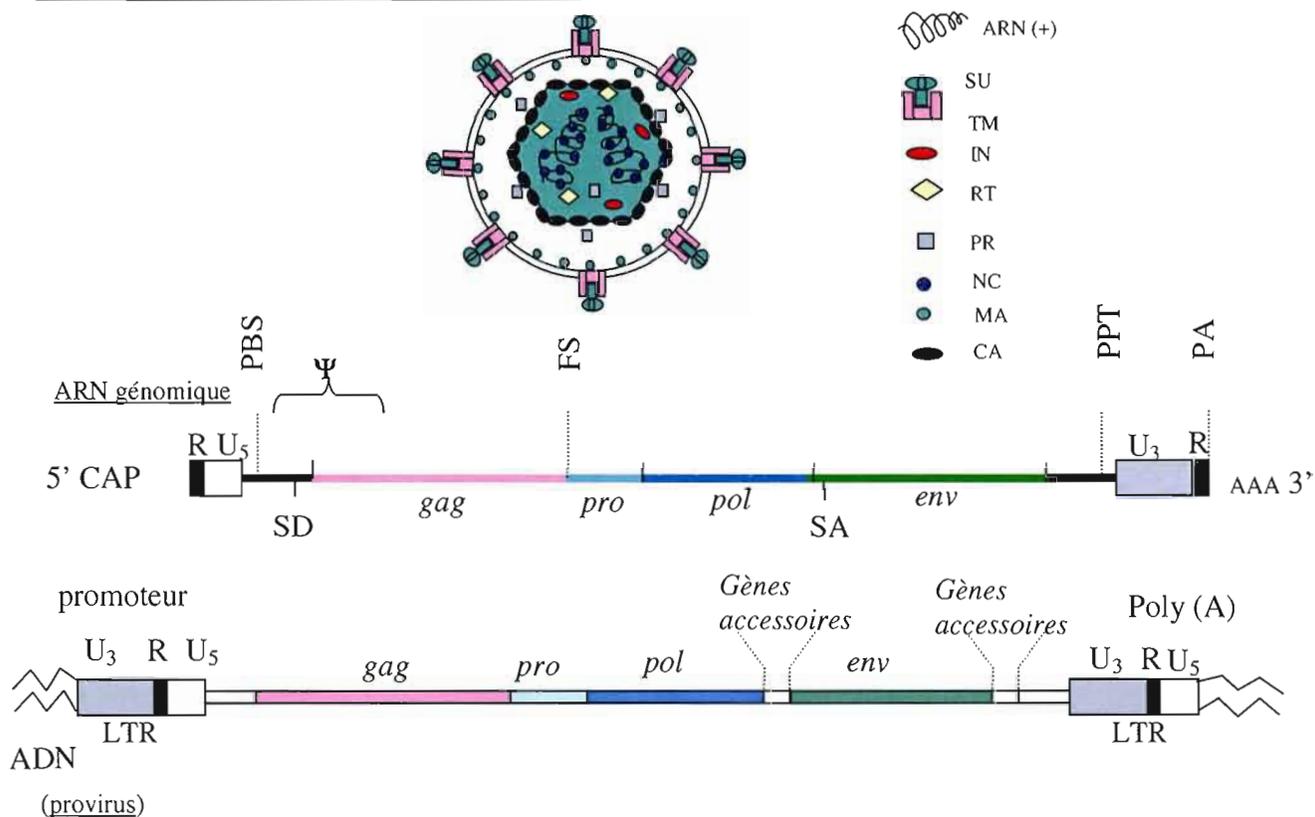


Figure 2 : Représentation schématique d'un rétrovirus. SU : glycoprotéine de surface; TM : protéine transmembranaire; IN : intégrase; RT : transcriptase inverse; PR : protéase; NC : nucléocapside; MA : matrice; CA : capsid; SD : site donneur d'épissage; FS : site de changement de cadre de lecture; SA : site accepteur d'épissage; PA : signal de polyadénylation. (Tiré de Coffin *et al.* 1997).

1.4.3 Le génome rétroviral

Le matériel génétique des rétrovirus peut être analysé sous sa forme d'ARN génomique ou sous sa forme d'ADN intégré (provirus) (Figure 2). Dans le cas de l'ADN, il est composé de LTR (*Long Terminal Repeats* ou longues séquences répétées) identiques aux deux extrémités du brin. Chaque LTR a une longueur d'environ 600 nucléotides et est composée d'une région U_3 (*Unique 3'* : contient les séquences promotrices-amplificatrices qui contrôlent la transcription de l'ARN; certains rétrovirus peuvent avoir des séquences codantes dans cette région), d'une région R (*Repeat* : se trouve entre U_3 et U_5 , cette courte séquence contient les limites de l'initiation de la transcription de l'ARN, et de la polyadénylation), ainsi que d'une région U_5 (*Unique 5'* : se situe entre la région R et la séquence PBS (figure 3)). Entre les deux LTR se trouvent les gènes responsables de l'infectivité, ceux codant des enzymes et ceux des protéines de structure. Le gène *gag* code pour les protéines formant la matrice, la capsid et les structures des nucléoprotéines. Le gène *pol* code pour la transcriptase inverse, qui transcrit l'ARN en ADN, ainsi que pour l'intégrase qui permet l'intégration du rétrovirus dans l'ADN de l'hôte. Finalement, il y a le gène *env*, codant pour les protéines de l'enveloppe virale. Un domaine codant la protéase, le gène *pro*, est également présent chez tous les rétrovirus. Ce domaine se trouve entre le domaine *gag* et *pol* (Coffin *et al.* 1997).

La LTR en 5' est suivie immédiatement d'une région non codante nommée *Leader* qui débute par une séquence de 18 nucléotides constituant le PBS (*Primer Binding Site*). Le PBS sert de site de liaison à un ARN de transfert proline (ARN_t^{Pro}). L' ARN_t^{Pro} est utilisé comme amorce pour la transcription inverse. À environ 200 nucléotides du PBS, sur le *Leader*, se trouve le site donneur d'épissage suivi de la séquence Ψ (psi). Celle-ci englobe la DLS et permet l'encapsidation de l'ARN viral non épissé dans les particules en formation. En aval des domaines *gag*, *pol* et *env*, et

immédiatement en amont de U₃ de la LTR 3', se trouve la séquence PPT (*Polypurine Tract*), constituée généralement de 13 purines (Figure 3 A) (Coffin *et al.* 1997). Cette séquence joue un rôle important pour la rétrotranscription.

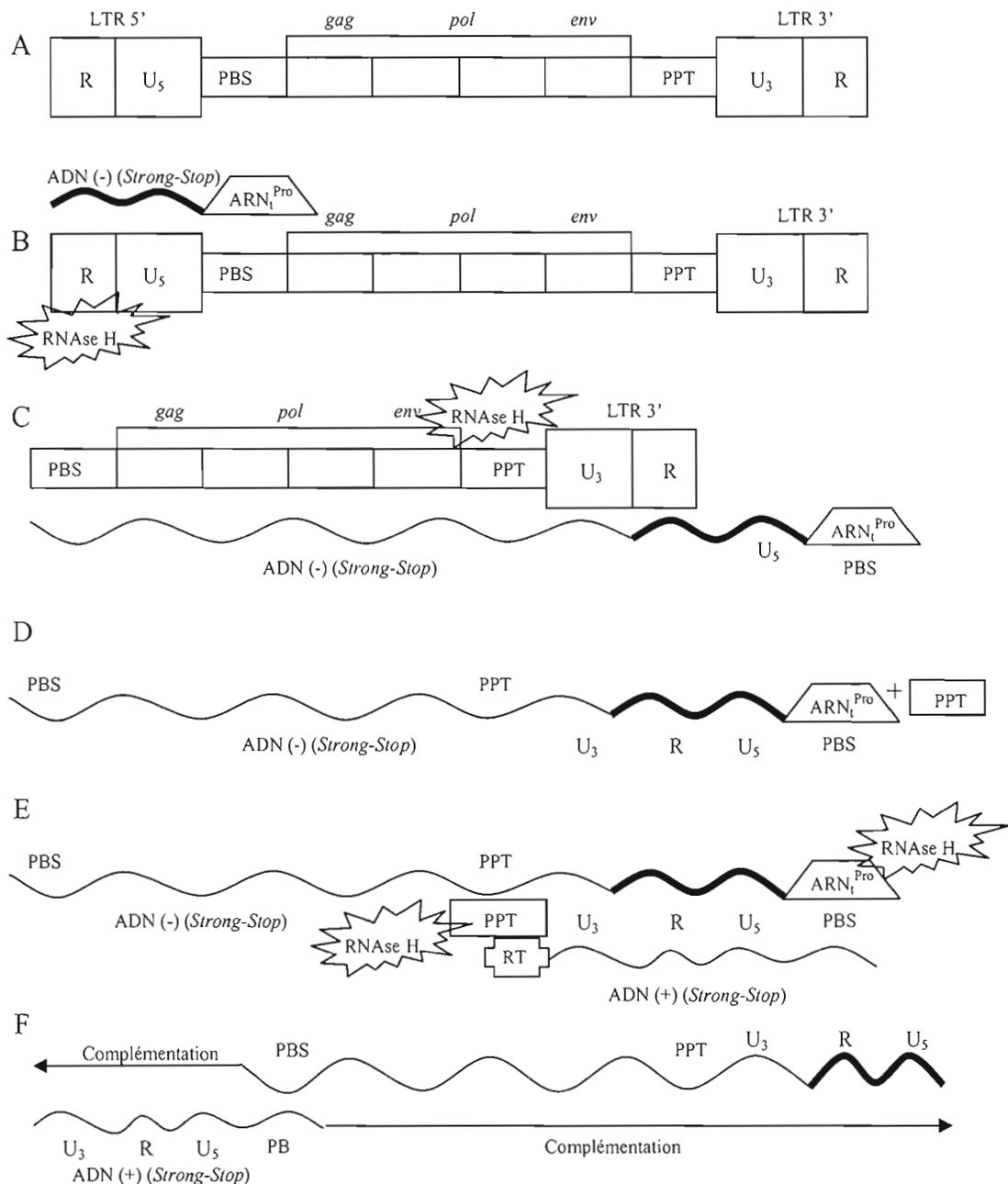


Figure 3 : Représentation des étapes de transcription inverse de l'ARN rétroviral en ADN pouvant s'intégrer au génome de l'hôte. Les explications se trouvent dans le texte. (Basé sur Hughes *et al.* 1978; McNabb 2001; Shank *et al.* 1978).

1.4.4 La transcription de l'ARN en ADN

La transcription démarre au site PBS par appariement de l'ARN_t^{Pro}. Ainsi, la synthèse du brin d'ADN (-) d'environ 150 nucléotides se fait jusqu'à R en 5' du génome. Il s'agit du brin ADN *Strong-Stop* (-). La RNase H, concomitante à la transcriptase inverse, dégrade la matrice (Figure 3 B). Ce brin va sauter à la séquence R de la LTR 3' et poursuivre sa polymérisation jusqu'à la séquence PBS. Au fur et à mesure de ces étapes, l'ARN servant de matrice continue d'être dégradé par la RNase H (Figure 3 C). La séquence PPT, étant résistante à la RNase, servira d'amorce pour l'ADN *Strong-Stop* (+) (Figure 3 D et E). Un deuxième saut des deux brins leur permet de se lier au niveau de la séquence PBS, formant ainsi l'amorce et la matrice pour poursuivre et terminer la transcription inverse. Le résultat final est un ADN double brin de 9 kb, selon le rétrovirus, borné des deux LTR identiques (Figure 3 F). Une fois transcrit, l'ARN entier va soit être épissé comme les ARN cellulaires, soit être transporté dans le cytoplasme où il sera directement traduit. Certains de ces ARN rétroviraux pleine longueur seront par contre dimérisés et encapsidés dans de nouvelles particules virales en formation (Sitbon *et al.* 2001).

1.5 Le RadLV

Depuis maintenant très longtemps, il est reconnu que des doses fractionnées de rayons X peuvent engendrer des lymphomes de cellules T (Declève *et al.* 1974, 1978; Haran-Ghera & Peled 1979; Kaplan 1964, 1967; Liebermann *et al.* 1978; Rassart *et al.* 1986). Des expériences chez les souris C57BL/6 irradiées ont permis d'extraire des rétrovirus faiblement leucémogènes des lymphomes obtenus (Gross 1970; Latarjet & Duplan 1962; Rassart *et al.* 1986). C'est ainsi que le RadLV (*Radiation Leukemia Virus*) fut associé aux lymphomes de cellules T causés par des rayons X.

1.5.1 Le RadLV/VL₃ V-13

Le premier RadLV isolé par Kaplan (1964) était faiblement leucémogène, thymotrope, non déficient et écotrope (Lambert *et al.* 1999; Latarjet *et al.* 1962; Lieberman *et al.* 1959, 1977; Rassart *et al.* 1983). Le RadLV/VL₃ est un rétrovirus dont le génome d'ARN fait 8318 nucléotides (Merregaert *et al.* 1987). Son génome d'ADN non intégré complet fait 8394 nucléotides (Merregaert *et al.* 1987). Ses LTR se situent de 1 à 637 nucléotides en 5' et de 7812 à 8394 nucléotides en 3'. Ses gènes *gag*, *pol* et une majorité de son gène *env* sont similaires aux régions homologues du MuLV de Akv (Janowski *et al.* 1986). Son génome entier, ainsi que tous ses détails, sont disponibles sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Suite à des réinfections par RadLV faites en série sur des souris C57BL/Ka nouveau-nées, il fut possible d'obtenir un virus, cette fois, fortement leucémogène (Declève *et al.* 1974, 1978; Kaplan 1964, 1967; Rassart *et al.* 1986). À partir des tumeurs obtenues par le rétrovirus fortement leucémogène, des lignées cellulaires furent établies. Une d'entre elles fut nommée BL/VL₃ (Janowski *et al.* 1985; Lieberman *et al.* 1979; Rassart *et al.* 1986). Cette lignée cellulaire contient au moins 9 intégrations rétrovirales de RadLV/VL₃ (Rassart *et al.* 1986). Le clone V-13 de RadLV/VL₃ est produit par la lignée BL/VL₃ (Janowski *et al.* 1985) et correspond à une de ces 9 intégrations (Rassart *et al.* 1986).

1.6 Les rétrovirus et le cancer

C'est par leur capacité à s'intégrer au génome de la cellule hôte que les rétrovirus peuvent engendrer des cancers. L'activation de certains gènes, soient les proto-oncogènes, en oncogènes cellulaires par des intégrations rétrovirales, demeure une étape cruciale dans le développement d'un cancer (Kung *et al.* 1991; Peters 1990; Tremblay *et al.* 1992). Certains rétrovirus murins peuvent être porteurs d'oncogènes.

Grâce aux recherches de Gross (1970), il a été possible de vérifier que la composante virale responsable de l'effet oncogène le plus rapide est toujours un rétrovirus défectif issu de recombinaisons avec des séquences génomiques cellulaires. Les virus défectifs capables d'engendrer rapidement des tumeurs sont issus de mutations et de recombinaisons avec des oncogènes de la cellule hôte. Les oncogènes viraux sont désignés v-onc, alors que les gènes cellulaires correspondants sont nommés c-onc (Sitbon *et al.* 1997). De plus, les rétrovirus défectifs ne peuvent se répliquer ou ne peuvent former de particules virales que si leur génome est complété par des composantes d'autres virus complets, capable de se répliquer. Ces virus nécessitent donc des virus auxiliaires, qui fournissent les éléments manquants nécessaires au fonctionnement complet de la particule virale, soit la possibilité de quitter la cellule hôte et d'infecter de nouvelles cellules (Coffin *et al.* 1997). Les MLV qui ne portent pas d'oncogènes forment généralement des leucémies monoclonales, qui n'apparaissent qu'après une latence de plusieurs mois, comparé à quelques semaines pour celles qui sont induites par les virus porteurs d'oncogènes (Sitbon *et al.* 2001).

En plus d'introduire des v-onc aux cellules qu'ils infectent, les rétrovirus peuvent avoir des effets mutagènes se présentant sous diverses formes. La simple intégration rétrovirale à proximité d'un proto-oncogène peut en modifier l'expression suite à une modification de son cadre de lecture. Les LTR des rétrovirus jouent les rôles prédominants dans la tumorigenèse. Par contre, certaines tumeurs peuvent également se développer à partir des séquences codantes des autres régions virales (Rassart *et al.* 1996). Effectivement, plusieurs auteurs stipulent que des séquences différentes dans les diverses portions du génome rétroviral, comme dans la région U₃ de la LTR, sont en relation avec le potentiel leucémogène des rétrovirus (Buchhagen *et al.* 1980; Chattopadhyay *et al.* 1982; Datta *et al.* 1983; Desgroseillers & Jolicoeur 1984; Lung *et al.* 1983; Pedersen *et al.* 1981; Thomas & Coffin 1982; Villemur *et al.* 1983).

Les LTR sont impliqués dans la transcription virale, mais ils possèdent également un pouvoir promoteur. Le promoteur est constitué d'une boîte CAAAT et TATA situées respectivement à environ -80 et -30 nucléotides du début de la région R. Le promoteur, ainsi que les séquences activatrices (*enhancers*, 20 à 70 nucléotides) de la transcription situées dans la région U₃, peuvent tous jouer des rôles d'activateurs de proto-oncogènes (Sitbon *et al.* 2001). De plus, les LTR confèrent à l'ADN rétroviral la possibilité de se déplacer à l'intérieur du génome par transposition. Ceci a pour effet de modifier l'expression de gènes additionnels dans d'autres endroits du génome. Les LTR sont en fait des séquences d'insertions encadrées par des répétitions inversées (Cooper 1999). Ces séquences d'insertion peuvent être aussi simples que des cadres ouverts de lecture présents en une ou deux copies (Brown *et al.* 1997; Haren *et al.* 1999).

Les rétrovirus peuvent avoir plusieurs effets sur les gènes comme par exemple la capacité de modifier le cadre de lecture de proto-oncogènes ou d'ajouter des oncogènes dans la cellule hôte ce qui a pour effet de modifier l'expression normale des gènes. Les mécanismes de mutagenèse de ces intégrations sont très nombreux et ils entraînent la modulation de l'expression des gènes eucaryotes à tous les niveaux transcriptionnels et post-transcriptionnels (Sitbon *et al.* 2001; Van Lohuizen & Berns 1990). Par contre, trois mécanismes principaux peuvent être retenus. Le premier est l'activation de promoteurs de proto-oncogènes par les portions amplificatrices des LTR. L'intégration peut, dans ce cas, être en amont ou en aval du gène et l'ADN proviral peut ici être orienté dans les deux sens. La deuxième situation correspond à l'initiation de la transcription du proto-oncogène à partir du promoteur LTR viral. Ici, l'ADN proviral doit être en amont de l'oncogène ou entre deux exons (modification des sites d'épissage). Le troisième mécanisme, nommé « de terminaison », se présente lorsque le provirus est situé dans un exon du proto-oncogène ou à l'extrémité 3' du gène réarrangé. Il en découle un arrêt prématuré de la

transcription du gène menant à une délétion ou à une substitution de la suite du gène par des séquences rétrovirales (Sitbon *et al.* 2001).

1.7 Techniques de détections des intégrations rétrovirales

Plusieurs techniques ont été utilisées pour trouver des intégrations rétrovirales dans les génomes de tumeurs. Hui *et al.* (1998) en nomment plusieurs dans leur travail. Les plus utilisées demeurent néanmoins la technique des IPCR (*Inverse-PCR*) (Annexe A), des vectorettes (Annexe B) (Arnold & Hodgson 1991) et des splinkerettes (Annexe B) (technique améliorée des vectorettes) (Devon *et al.* 1995). Une technique améliorée des splinkerettes serait la technique des blockerettes (Lenvik *et al.* 2002). Il reste également les techniques suivantes : *Alu-PCR* (Annexe C); BDA (*Boomerang DNA Amplification*); CPCPR (*Capture PCR*) (Annexe D); *panhandle PCR* (Annexe E); RS-PCR (*Restriction-Site PCR*) (Annexe F) et *targeted gene-walking PCR* (Annexe G) (Hui *et al.* 1998). Un résumé de ces techniques se trouve à l'annexe H.

1.8 Les gènes affectés

Malgré la longueur phénoménale du génome des mammifères, il s'est avéré que les tumeurs induites par les rétrovirus présentent des intégrations rétrovirales préférentielles à proximité de certains gènes et ce, de tumeur en tumeur. Plusieurs travaux (Denicourt *et al.* 1999, 2003; Hansen & Justice 1999; Hwang *et al.* 2002; Joosten *et al.* 2002; Kim *et al.* 2003; Lambert *et al.* 1999; Li *et al.* 1999; Lund *et al.* 2002; Mikkers *et al.* 2002; Quantin 2002 ; Suzuki *et al.* 2002) ont permis d'identifier des sites communs d'intégration rétrovirale par diverses techniques (Hui *et al.* 1998). Ces sites sont retrouvés préférentiellement dans les génomes à proximité ou dans des gènes. Ces gènes, le plus souvent impliqués dans la prolifération ou la différenciation

cellulaire, sont nommés proto-oncogènes. Il est à noter que le terme « site préférentiel » n'est pas vraiment approprié. Effectivement, les intégrations se font au hasard et les sites retrouvés plus fréquemment dans les différentes tumeurs reposent sur un avantage sélectif des cellules (Kupiec & Sonigo 2001), notamment de prolifération, qu'ils confèrent à certains types cellulaires (Sitbon *et al.* 2001). Lorsque deux tumeurs ont une intégration virale à un même site spécifique, cet endroit est considéré comme étant un site commun d'intégration. Les régions où il y a une intégration sont dites réarrangées et l'intégration se fait, à l'origine, sur un seul des deux allèles (Sitbon *et al.* 2001).

L'énumération de tous les sites communs d'intégration répertoriés se résumerait en une liste de plusieurs pages. Une telle liste en relation avec les cancers murins se trouve sur le site <http://rtcgd.ncifcrf.gov/> (Akagi *et al.* 2003). Même si une liste des sites communs d'intégration retrouvés par l'équipe de Suzuki *et al.* (2002) est faite, il est possible de dénombrer 149 sites communs d'intégration (Annexe I). D'autres, comme Mikkers *et al.* (2002), réussissent à positionner 477 intégrations rétrovirales. Bien entendu, plusieurs de ces sites sont uniques, mais 52 d'entre eux correspondent à des sites communs d'intégration (Annexe J) (Mikkers *et al.* 2002).

Plusieurs facteurs semblent influencer la fréquence des intégrations rétrovirales dans un locus cible (Tremblay *et al.* 1996). Le virus (Cuypers *et al.* 1984; Peters 1990; Silver & Kozak 1986; Villemur *et al.* 1987) ou la souris (Cuypers *et al.* 1984; Peters 1990; Silver & Kozak 1986), les souches utilisées, le stade du développement tumoral au moment de l'analyse (O'Donnell *et al.* 1985) et vraisemblablement le pouvoir des intégrations rétrovirales d'activer indépendamment plusieurs gènes distincts du génome de la souris entraînant des effets similaires ou des effets de coopération (Tremblay *et al.* 1992), sont tous des facteurs connus.

Dans le cas de RadLV/VL₃, plusieurs sites d'intégrations ont déjà été trouvés. Parmi ces derniers, les sites Kis1 (pour *Kaplan RadLV Integration Site 1*) (Lambert *et al.* 1999), c-Myc (Tremblay *et al.* 1992, Landais *et al.* 2005 (en soumission)), Vin1, (Tremblay *et al.* 1992), Pim1 et Notch1 (Quantin 2002, Tremblay *et al.* 1992) ont été trouvés par la technique IPCR (Li *et al.* 1999).

1.8.1 Myc

Myc (*Myelocytomatosis Oncogene* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=17869)) est un gène codant une protéine liant des séquences spécifiques de l'ADN (Jonkers & Berns 1995). Il s'agit d'un facteur de transcription. Myc se trouve sur le chromosome 15 de la souris à la position D3 entre 62.19 Mb et 62.20 Mb environ (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=15&vc_start=62292267&vc_end=62294846&highlight=BLAST_NE:BLA_icKFWTZlr!!20040927). Chez l'homme, il se trouve à la position 8q24.12-q24.13 (Suzuki *et al.* 2002). Quantin (2002) a démontré que 14.2% des tumeurs analysées contiennent une intégration de RadLV/VL₃ dans l'oncogène c-Myc. Tremblay *et al.* (1992) ont déterminé que c-Myc était réarrangé dans 20% des tumeurs causées par le même rétrovirus. Par contre, comme le mentionne Lambert *et al.* (1999), Janowski *et al.* (1986) ont démontré que c-Myc était réarrangé dans seulement 10% des thymomes engendrées par le RadLV/VL₃ chez le rat. La protéine issue de ce gène contient un domaine liant l'ADN en plus d'un domaine transcriptionnel trans-activant, ainsi que des domaines de dimérisation agissant de paire avec des hétérodimères (Marcu *et al.* 1992). Des insertions de promoteurs retrouvées près de ce gène résultent en la production de hauts niveaux de protéine Myc normale (Kung *et al.* 1991). Sørensen *et al.* (1996) mentionnent que les intégrations du rétrovirus murin SL3-3 près de c-Myc se font presque toujours dans le sens inverse de la transcription du gène (Corcoran *et al.* 1984; Kung *et al.* 1991; Li *et al.* 1984; O'Donnell *et al.* 1985). Dans leur article, Chin *et al.* (1995) mentionnent

que Myc a des effets positifs sur la croissance cellulaire et l'expression des gènes. Il semble avoir des rôles régulateurs qui dérivent de ses propriétés biochimiques et biologiques. Il agit comme un facteur de transcription spécifique à des séquences données et peut stimuler la transcription de gènes nécessaires à la transformation néoplasique (Kato *et al.* 1990; Kretzner *et al.* 1992). Les gènes régulés par Myc sont ceux de la synthèse de l'ADN (Bello-Fernandez *et al.* 1993) et ceux régulant le cycle cellulaire (Jansen-Durr *et al.* 1993), soulignant encore davantage le fait que c-Myc soit impliqué dans la promotion de la croissance cellulaire. Ils mentionnent également que le dérèglement du fonctionnement de c-Myc est associé à un retard prononcé de la croissance et de nombreux défauts congénitaux aux niveaux des organes et des structures embryonnaires (Davis *et al.* 1993). En résumé, c-Myc joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire, le métabolisme, l'apoptose, la différenciation, l'adhésion cellulaire, la tumorigenèse et participe à la régulation de l'homéostasie hématopoïétique (Hoffman *et al.* 2002).

1.8.2 Notch1

Notch1 (*Notch Gene Homolog 1* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=18128)) est un gène qui appartient à la famille de gène *Notch/lin12*. Chez la souris, ce gène se trouve sur le chromosome 2 à la position A3 entre 26.42 Mb et 26.46 Mb (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=2&vc_start=26765222&vc_end=26767487&highlight=BLAST_NEW:BLA_2YPhYKcBe!!20040830) et à la position 9q34.3 chez l'humain (Suzuki *et al.* 2002). Girard *et al.* (1996) ont déterminé que Notch1 est réarrangé dans 52% des tumeurs engendrées par des MuLV de Moloney chez des souris MMTV^D/Myc transgéniques. Par contre, RadLV/VL₃ semble réarranger Notch1 dans seulement 16.16% des tumeurs (Quantin 2002). Cette famille de gène, présente chez plusieurs espèces, code pour des protéines transmembranaires de grandes tailles qui sont soupçonnées de fonctionner comme des récepteurs

transmettant des signaux qui déterminent le sort d'une cellule (Artavanis-Tsakonas *et al.* 1995; Aster & Pear 2001; Girard & Jolicoeur 1998; Yanagawa *et al.* 2000). De plus, Notch1 semble être impliqué dans des mécanismes de différenciation et transformation cellulaire, dans le cas de démence et de crises cardiaques (Artavanis-Tsakonas *et al.* 1995; Blaumueller & Artavanis-Tsakonas 1997; Campos-Ortega 1996; Greenwald 1994; Gridley 1996; Hoemann *et al.* 2000). La portion extracellulaire de la protéine Notch1 est composée de plusieurs répétitions EGF. Cette portion semble être le médiateur pour les interactions entre le récepteur et le ligand (Fehon *et al.* 1990; Lindsell *et al.* 1995) alors que le domaine intracellulaire comporte 6 copies d'un motif cdc10/SW16/ankyrine. Ce domaine est responsable de la transmission du signal vers le noyau (Fortini & Artavanis-Tsakonas 1994; Hsieh *et al.* 1996; Jarriault *et al.* 1995; Lu & Lux 1996; Kopan *et al.* 1996). Notch1 joue également un rôle très important dans la formation des cellules sanguines et plus particulièrement dans le développement de cellules T (Kojika & Griffin, 2001; Pui *et al.* 1999). En 1996, Girard *et al.* (1996) montrent que le provirus MuLV de Moloney (MoMuLV) semble activer Notch1 par insertion de promoteur ou d'amplificateur (donc en amont ou en aval du gène respectivement). Cela entraîne une surexpression de Notch1 tronquée de la majeure partie de la séquence codant pour le domaine extracellulaire. Par contre, dans certaines tumeurs, la protéine Notch1 complète était également retrouvée (Girard *et al.* 1996). Il fut également vérifié que le RadLV/VL₃ s'intègre dans Notch1 (Landais *et al.* 2005 (en soumission); Quantin 2002). Le MMTV, qui entraîne des leucémies de type T, s'intègre également dans Notch1 (Yanagawa *et al.* 2000). Il est important de mentionner que deux types d'intégrations rétrovirales furent trouvés. Le type I correspond à une intégration en amont de la séquence codant pour la région transmembranaire de Notch1, produisant ainsi 2 types d'ARN mutants. Les intégrations sont de type sens et antisens. Le type II correspond à une intégration entraînant la synthèse d'autres protéines, mais cette fois-ci, les intégrations ne sont que de type sens (Hoemann *et al.* 2000). Autant les intégrations de type I que celles de type II provoquent la formation de protéines mutantes pouvant

avoir une certaine action dans la formation de tumeurs. Les effets produits peuvent augmenter la fonction de signalisation de Notch1 intracellulaire, alors que les protéines de type I et II sécrétées peuvent agir de manière différentielle avec les ligands de Notch1 et en affecter leur signalisation (Hoemann *et al.* 2000). Il semblerait que l'élément le plus important dans la formation de tumeur serait les intégrations de types II. Celles-ci entraînent la formation d'une protéine tronquée du côté C-terminal. Cette coupure entraîne la perte du domaine PEST (domaine riche en résidus proline (P), glutamate (E), sérine (S), thréonine (T)), donnant naissance à un récepteur Notch1 mutant actif. Les mêmes auteurs suggèrent que Notch1 mutant et c-Myc peuvent interagir dans le processus de tumorigenèse (Hoemann *et al.* 2000).

1.8.3 Pim1

Le gène Pim1 (*Proviral Integration Site 1* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=18712)) est impliqué dans le développement de leucémies de cellules T (Tremblay *et al.* 1992). Ce gène se trouve sur le chromosome 17 entre 28.09 Mb et 28.10 Mb à la position B1 chez la souris (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=17&vc_start=27998014&vc_end=28000713&highlight=BLAST_NEW:BLA_CFrmMIXJE!!20040913). Chez l'humain, il se trouve à la position 6p21.2 (Selten *et al.* 1986). Pim1 est réarrangé dans 18% des leucémies de cellules T engendrées par le RadLV/VL₃ chez la lignée BL/VL₃ (Tremblay *et al.* 1992). La protéine kinase sérine/thréonine Pim1 est reconnue pour être fréquemment activée dans les lymphomes des cellules T engendrés par les MuLV de Moloney (Rassart *et al.* 1996; Selten *et al.* 1986). Il a été démontré que Pim1 est le principal collaborateur de c-Myc dans l'induction de la lymphomagenèse chez la souris (Möröy *et al.* 1991; Van Lohuizen *et al.* 1989; Verbeek *et al.* 1991). Denicourt *et al.* (1999), croient que l'association de c-Myc et de Pim1 joue également un rôle dans la leucémogénèse myéloïde suite à leurs recherches sur le MuLV Graffi.

1.8.4 Vin1

Vin1 a été classifié comme un gène impliqué dans la tumorigenèse par Tremblay *et al.* (1992). De plus, il semble qu'il s'agisse d'un nouvel oncogène conservé chez plusieurs espèces de mammifères, se trouvant sur le chromosome 6 de la souris entre raf et K-ras-2 et étant associé à la cycline D2 (le gène *Ccnd2* pour *Cyclin D2*) (Hanna *et al.* 1993; Quantin 2002; Tremblay *et al.* 1992). Chez l'humain, CCND2 est situé sur le chromosome 12 à la position 12p13. Vin1 est réarrangé dans seulement 2% à 5% des leucémies chez le rat et la souris, respectivement (Tremblay *et al.* 1992). Les cyclines sont impliquées dans le cycle cellulaire. La cycline D2 joue un rôle dans le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire (Ajchenbaum *et al.* 1993). De plus, l'ARNm de ce gène a été trouvé dans les poumons, le thymus, le cerveau, la rate, le foie et les reins de jeunes souris adultes (Tremblay *et al.* 1992). Les intégrations rétrovirales furent découvertes sur une distance de 30 kpb autour de Vin1. Il s'agit d'un phénomène pouvant se reproduire extrêmement rarement selon les tests statistiques, soit 10^{-10} fois pour les intégrations aléatoires (Peters 1990). Dans une autre étude, les provirus intégrés à l'intérieur du locus Vin1 étaient intégrés à l'intérieur d'un fragment de 4 kpb, tous dans le même sens de transcription et dans une région présentant les caractéristiques d'un îlot riche en CpG. Ces îlots se trouvent préférentiellement à proximité des régions promotrices ou aux extrémités 5' de certains gènes (Bird 1986; Gardiner-Garden & Frommer 1987; Lindsay & Bird 1987; Rappold *et al.* 1987). Dans le cas du rétrovirus Graffi, le site commun d'intégration *Gris1* fut identifié à 70-80 kpb du gène *Ccnd2* dans 13% des tumeurs (Denicourt *et al.* 2003). De plus, une des tumeurs ayant un réarrangement dans le locus Vin1 chez le rat avait également un réarrangement dans le locus *Pim1*, ce qui suggère peut-être un effet synergique des deux intégrations lors de la formation des tumeurs (Tremblay *et al.* 1992).

1.8.5 Kis1

Kis1 a été localisé sur le chromosome 2 chez *Mus musculus*. Chez l'homme, il est possible de trouver une séquence homologue à Kis1 située à la position 20q (Lambert *et al.* 1999). Lambert *et al.* (1999) ont démontré que Kis1 est réarrangé dans 25% des tumeurs causées par RadLV/VL₃. Les réarrangements dans la région Kis1 semblent être le résultat d'intégrations rétrovirales dans une très petite région de l'ADN. Toutes les intégrations ont la même orientation, soit celle du RadLV/VL₃ clone V-43 original. Des tests ont pu démontrer que les masses tumorales ayant un réarrangement au niveau de Kis1 semblent être monoclonales (Lambert *et al.* 1999). Dans le cas des tumeurs engendrées par des intégrations de RadLV, la clonalité tumorale a déjà été vérifiée (Ben-David *et al.* 1987; Rassart *et al.* 1986; Tremblay *et al.* 1992). Par contre, une minorité des cellules présente une intégration dans cette région. Cela laisse croire que les cellules portant l'intégration sont un sous-clone de la masse tumorale (Lambert *et al.* 1999).

1.8.6 Kis2

Kis2 (*Kaplan Integration Site 2*) fut récemment associé au développement de tumeurs engendrées par des intégrations de RadLV/VL₃ (Landais *et al.* 2005 (en soumission)). Ce gène se trouve sur le chromosome X de la souris, dans la région XA4. En plus de modifier l'expression du gène Kis2, les intégrations dans la région Kis2 affectent l'expression du gène Phf6 situé à environ 250 kpb de l'intégration. Une intégration des rétrovirus SL3-3 et MoMuLV dans la région Kis2 fut déjà associée à des leucémies de type T (Sørensen *et al.* 1996). Le gène Kis2 code pour 5 ARN non codant différents (Landais *et al.* 2005 (en soumission)), alors que le gène Phf6 code pour une protéine de 365 acides aminés. Cette protéine contient deux doigts PHD (*Plant Homology Domain*) et elle fut associée au syndrome humain Börjeson-Forssman-Lechmann (BFLS : OMIM 301900) (Lower *et al.* 2002).

1.9 Hypothèse

Les avancées médicales permettent de plus en plus d'éliminer ou du moins de contrôler la progression des cancers qui demeurent une cause importante de décès. Malgré que nous ne soyons qu'au début de la victoire sur cette maladie, l'association des infections virales avec le développement des cancers sont des nouveaux éléments à étudier. L'analyse des sites communs d'intégrations, la découverte et la compréhension du fonctionnement des oncogènes permettront peut-être de protéger les sites d'intérêts ou de repérer plus facilement les mutations dans le génome. Cela fait de cette connaissance une technique de pointe en thérapie génique, tels que la nanotechnologie ou des vecteurs viraux ciblant les gènes mutés, qui serviront certainement à juguler le cancer.

Près de 90% des intégrations rétrovirales de RadLV/VL₃ furent trouvées. Il ne reste donc pas plus de 10% d'intégrations de RadLV/VL₃ à trouver. Cette valeur peut être cependant modifiée dans le cas de tumeurs clonales et dans le cas où plusieurs oncogènes jouent des rôles clé dans la formation de la tumeur. La technique des splinkerettes employée dans la méthodologie de ce projet devrait permettre de mettre en évidence un grand nombre de sites d'intégration du virus et de trouver, dans les leucémies murines, un ou des nouveaux sites communs d'intégration du rétrovirus RadLV/VL₃ clone V-13.

CHAPITRE II

Matériel et méthodes

Le chapitre qui suit a été écrit de façon très détaillée. Une grande partie de ce travail consistait, malgré tout, à mettre au point et à appliquer la technique des splinkerettes pour retrouver des sites communs d'intégrations de RadLV/VL₃. Il s'est avéré que les conditions de fonctionnalité de la technique sont très rigoureuses et tous les détails mentionnés ici devraient permettre de reproduire les résultats facilement. Par contre, chaque étape peut très probablement être améliorée et devra être rajustée selon le matériel à analyser et les produits employés. Un résumé des manipulations tournant autour de la splinkerette est présenté à l'annexe K.

2.1 La splinkerette

La splinkerette (Figure 4) est un oligonucléotide de séquence connue servant, lors d'une PCR, à amplifier un fragment d'ADN de séquence inconnue. Cette forme d'oligonucléotide permet de réduire les appariements erronés lors des cycles d'une PCR, comparés à l'ancien système, soit celui des vectorettes (Annexe B) (Devon *et al.* 1995). Les séquences d'ADN utilisées pour l'élaboration de la splinkerette sont les suivantes : 5'-CAT GGG CTA AAG AGG ACT AAT AAC AAG CGT GGC TGA ATG AGA CTG GTG TCG ACA CTA GTG G-3' (Splinkerette CAEV; oligo #628) et 5'-GAT CCC ACT AGT GTC GAC ACC AGT CTC TAA TTT TTT TTT TCA AAA AAA-3' (Splinkerette Hair Pin; oligo #589) (BioCorps, Montréal, Canada). Ces séquences correspondent respectivement à la portion droite et à la portion de boucle en épingle à cheveux de la splinkerette. La portion droite de la splinkerette est faite à partir d'une portion du virus d'arthrite et d'encéphalite de chèvre (*Caprine Arthritis-Encephalitis Virus* : CAEV). Cette séquence fut choisie après des tests d'alignements et de criblages contre les banques de données NCBI et ENSEMBL. Il s'est avéré qu'il

s'agit d'une séquence qui a très peu d'homologie avec le génome de *Mus musculus*. Cette portion de la splinkerette sert également d'amorce, soit, dans l'ordre 5' vers 3': 5'-CAT GGG CTA AAG AGG ACT AAT AAC AAG-3' (Amorce CAEV; oligo #627) (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Canada), ainsi que : 5'-GTG GCT GAA TGA GAC TGG TGT CGA C-3' (Amorce Splink2; oligo #591) (BioCorps, Montréal, Canada). Cette dernière peut servir pour une PCR nichée. La splinkerette est assemblée avec 150 pmoles de la portion droite et avec 150 pmoles de la portion boucle en épingle à cheveux. Le volume final est de 100 µL de tampon M (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM dithiothréitol, 500 mM NaCl) (*General Electric Healthcare*, Baie d'Urfée, Canada) à une concentration de 0,5X. La réaction d'appariement se fait dans une machine PCR *Eppendorf Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Westbury, USA). Le programme utilisé est le suivant : 3 minutes à 95°C, et baisse de 1°C à toutes les 15 secondes jusqu'à la température de 22°C (Mikkers *et al.* 2002), puis finalement, la réaction est baissée à une température de 4°C. La splinkerette peut être ensuite gardée à -20°C pendant plusieurs semaines ou même quelques mois. L'extrémité 3' de la splinkerette, sous sa forme finale, correspond au site de restriction de l'enzyme BamH I. La splinkerette ne doit comporter aucun site de restriction de BamH I autre que sur son extrémité 3'. Une partie de la séquence de la splinkerette ainsi que le protocole détaillé employé pour l'utilisation de celle-ci a été gracieusement fourni par le Dr. Anton Berns (Institut du Cancer, division de la génétique moléculaire et centre de la génétique médicale, Hollande) (Mikkers *et al.* 2002).

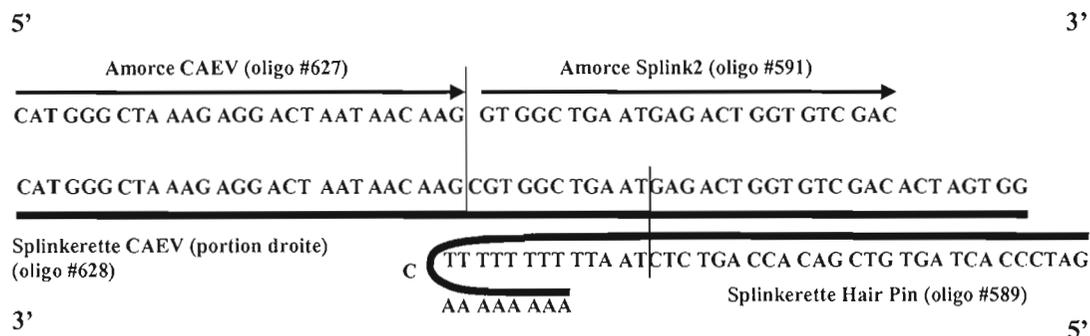


Figure 4 : Représentation de la splinkerette utilisée, sous sa forme finale double-brin (traits gras), avec les amorces respectives ainsi qu'avec les séquences de ses diverses portions (Mikkers *et al.* 2002).

2.2 Les souris infectées

Des souris de diverses souches sont infectées par injection intrapéritonéale de 0,15 mL d'une culture pure du rétrovirus RadLV/VL₃ clone V-13. Ceci correspond environ à 1×10^6 FFU/mL (*Focus-Forming Units*). Les souches de *Mus musculus* utilisées sont les SIM.R, Balb/C, C57BL/6. Ces étapes sont effectuées à l'animalerie (UQÁM, Montréal, Canada). Lorsque les souris présentent des symptômes avancés de maladie (tumeurs visibles, déplacements pénibles, faiblesse), elles sont sacrifiées. Les organes des souris sont extraits. Il s'agit des ganglions, du thymus, de la rate, du foie, des reins et du cerveau. Les organes retenus pour la suite des étapes sont ceux présentant une anomalie ou une taille exagérée. Il s'agit le plus souvent du thymus, de la rate et des ganglions; le foie, les reins et le cerveau servant de contrôles. Les organes extraits sont immédiatement mis sur glace sèche et entreposés à -80°C .

2.3 Extraction d'ADN génomique

Les organes extraits sont coupés et homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur Dounce dans 10 à 20 mL d'une solution tampon (50 mM Tris pH 7.8, 20 mM EDTA et 150 mM NaCl). Ensuite, les cellules sont traitées à la pronase (200 µg/mL) (Boehringer Ingelheim Corp., Ridgefield, USA). Du SDS à une concentration finale entre 0.6% et 1% est ajouté à la solution. La suspension cellulaire est maintenue à 37°C pendant 16 à 24 heures. Le lysat obtenu est purifié afin d'en éliminer les protéines et les débris cellulaires pour n'obtenir que l'ADN. Ceci est fait par une double extraction au phénol 1X à 55°C (Anachemia Science, Lachine, Canada), par deux extractions au chloroforme (Anachemia Science, Lachine, Canada) contenant de l'alcool isoamylique 4% v/v (Anachemia Science, Lachine, Canada) est ajouté au chloroforme. Deux volumes d'éthanol 100% (Anachemia Science, Lachine, Canada) sont ensuite lentement ajoutés au mélange afin de précipiter l'ADN qui est récupéré rapidement et resuspendu dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 8.5 pendant 16 heures à 4°C dans un volume de 1 à 4 mL (Sambrook *et al.* 1989) et aliquoté pour entreposage (Rassart *et al.* 1983) à -20°C.

L'ADN est ensuite dosé et sa pureté est évaluée au spectrophotomètre. Pour la pureté de l'ADN, un ratio de la densité optique (D.O.) de 260 nm sur 280 nm est calculé. Le résultat d'un ADN exempt d'impuretés et de protéines devrait se situer entre 1,7 et 2,0. Pour le dosage, le calcul employé est le suivant :

$$(\text{D.O. à } 260 \text{ nm} - \text{D.O. à } 280 \text{ nm}) / 0.01 * \text{facteur de dilution} = \mu\text{g/mL d'ADN}$$

Une D.O. de 1 à 260 nm correspond à environ 50 µg d'ADN/mL (Sambrook *et al.* 1989). Les organes et l'ADN utilisés dans ce projet dataient même de plusieurs années. Afin de vérifier son état physique, l'ADN dosé fut observé suite à une

électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Le gel était fait à partir du tampon TAE à une concentration finale 1X. L'ADN fut chargé dans une concentration finale de 1X de bleu de chargement, migré à 100 V dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris base; 1,142 mL acide acétique glacial; 1mM EDTA; pH 8.5). Le gel fut coloré pendant 10-15 minutes au bromure d'éthidium (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) 1X (0,5 µg/mL) contenant du tampon TAE 1X et décoloré à l'eau distillée 5-10 minutes (procédure standard). Un ADN dégradé se présente sous forme de traînée (Sambrook & Russell 2001).

2.4 Digestion de l'ADN génomique

L'ADN était ensuite digéré par une première enzyme. Cette enzyme était choisie en fonction du site de restriction complémentaire se trouvant sur la splinkerette. L'enzyme devait également couper souvent dans le génome de la souris et être non sensible à la méthylation afin de s'assurer d'une meilleure efficacité de digestion de l'ADN génomique utilisé. L'enzyme choisie fut BamH I (*New England Biolabs Inc.*, Pickering, Canada), qui coupe environ à toutes les 4000 pb dans le génome de la souris. Une enzyme qui coupe souvent dans l'ADN de souris permet de produire des fragments d'ADN très courts flanquant le rétrovirus, permettant ainsi de mieux cibler et d'amplifier ce fragment par PCR. Cette enzyme doit également faire des fragments cohésifs qui pourront s'apparier à la séquence complémentaire de la splinkerette à l'étape suivante (ligation ADN-splinkerette). Le site de restriction de BamH I est 5'-...G\GATCC...-3'; cette enzyme fait donc des bouts cohésifs (*New England Biolabs Inc.*, Pickering, Canada). Un critère très important est qu'elle ne coupe pas dans les LTR de l'ADN proviral intégré car ils sont nécessaires lors des PCR. BamH I coupe aux positions 3243, 3549 et 6542 dans le RadLV/VL₃ (Janowski *et al.* 1985; <http://www.neb.com>). Deux µg d'ADN sont prélevés et soumis à une digestion d'un minimum de 16 heures dans le tampon NEBuffer BamH I à 1X finale

(10 mM Tris- HCl; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM dithiothréitol; pH 7.9 à 25°C). Cette digestion se fait à une température de 37°C dans un incubateur. Cinq unités d'enzymes sont utilisées par µg d'ADN à digérer. Après la digestion, une électrophorèse sur gel d'agarose est faite selon la procédure standard et l'efficacité de la digestion est vérifiée. Selon la fiche technique (*New England Biolabs Inc.*, Pickering, Canada), l'enzyme BamH I n'est pas inactivable à la chaleur. Il faut donc procéder à une purification sur colonne qui enlève les enzymes de restriction avant de procéder à l'étape de la ligation. Pour ce faire, une colonne de purification de PCR (*PCR Purification Kit*, Qiagen, Mississauga, Canada) est utilisée selon le protocole fourni par la compagnie.

2.5 Ligation ADN-splinkerette

La splinkerette et l'ADN sont ensuite ligasés, dans un ratio moléculaire 10:1 respectivement, aux sites engendrés par la digestion BamH I de l'étape précédente. Pour ce calcul, la formule suivante fut utilisée :

$$\frac{(\text{facteur ratio}) * \text{pb de splinkerette} * \text{ng d'ADN}}{\text{pb ADN}} = \text{ng de splinkerettes}$$

(*Invitrogen Life Technologies*).

La réaction de ligation se faisait dans le plus petit volume possible. L'enzyme employée fut la T4 DNA ligase (*New England Biolabs Inc*, Pickering, Canada) dans le tampon de ligation fourni par la compagnie *New England Biolabs Inc.*, à une concentration finale de 1X (*T4 DNA ligase reaction buffer* : 50 mM Tris-HCl; 10mM MgCl₂, 1mM ATP; 10 mM dithiothréitol; 25 µg/mL BSA; pH 7.5 à 25°C). Dix unités d'enzymes par réaction de 1 µg d'ADN digéré à ligaser avec la splinkerette suffisent.

Cette réaction dure 16 heures à une température de 16°C dans un incubateur. L'arrêt de la réaction se fait selon les indications de la compagnie *New England Biolabs Inc.* pour l'enzyme correspondante.

Suite à la ligation, une étape de précipitation de l'ADN à l'éthanol permet d'éliminer les sels. Il s'agit d'ajouter 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M (0,3 M NaOAc final) à l'échantillon et d'ajouter 2 volumes d'éthanol 100% gardé à -20°C. Le tout est ensuite mis sur glace sèche ou à -80°C pendant 10 à 15 minutes et s'en suit une centrifugation de 15 minutes à vitesse maximale, soit 15 000 rpm. Le culot est finalement resuspendu dans 500 µL d'éthanol 70%, centrifugé 5 minutes à 15 000 rpm et séché (Sambrook *et al.* 1989).

L'enzyme Nae I (New England Biolabs Inc., Pickering, Canada) est ensuite utilisée afin d'empêcher l'amplification de la portion 3' du rétrovirus (Annexe K). Ceci permet d'optimiser la réaction de PCR en ciblant la Taq polymérase et les dNTP sur les portions d'intérêts à amplifier. Nae I fut choisie de manière à ce qu'elle coupe entre la LTR en 5' et la splinkerette ligasée en 3' de celle-ci, dans le rétrovirus, à la position 3243; Nae I coupe donc aux positions 266, 4269 et 5633 (Janowski *et al.* 1985; <http://www.neb.com>). Son site de reconnaissance est : 5'-...GCC|GGC...-3'; elle fait donc des fragments sans bouts collants (New England Biolabs Inc., Pickering, Canada). Un critère de sélection très important de cette enzyme est qu'elle ne coupe pas dans les LTR, car ils sont nécessaires lors des PCR (*National Center for Biotechnology Information*). De plus, elle ne doit pas couper entre la LTR en 3' et la splinkerette ligasée à l'ADN flanquant; c'est donc une enzyme qui ne coupe pas souvent dans le génome de *Mus musculus* et qui a un site de restriction complexe. Le milieu réactionnel de cette digestion fut fait dans un volume total de 50 µL. Le tampon employé est celui recommandé par la compagnie New England Biolabs Inc. à une concentration finale de 1X (NEBuffer 1 : 10 mM bis-Tris-Propane-HCl; 10 mM

MgCl₂; 1 mM dithiothréitol; pH 7.0 à 25°C), et 5 unités d'enzyme furent utilisées pour digérer 1 µg d'ADN ligasé aux splinkerettes. La réaction se fait à 37°C pendant 2 heures et l'arrêt de la réaction se fait à 65°C pendant 20 minutes (New England Biolabs Inc., Pickering, Canada).

2.6 Les réactions en chaîne de la polymérase

2.6.1 Première PCR

Les étapes des réactions PCR qui suivent doivent être faites dans des conditions stériles. Elles demandent beaucoup d'ajustements selon le type d'amorce utilisée. Il en sera question au troisième chapitre, dans la section des résultats et de la discussion. Tout d'abord, entre 100 µg et 200 µg d'ADN de l'étape précédente sont utilisés pour la première PCR. La réaction se fait dans un volume final de 50 µL, avec un kit PCR (*Taq PCR Core Kit*, Qiagen, Mississauga, Canada). Le tampon PCR est ajouté à une concentration finale de 1X. Seulement 2.5 unités de la Taq polymérase suffisent par réaction. Dans la réaction PCR, 10 pmoles de chaque amorce sont utilisées. Les deux amorces utilisées sont l'amorce CAEV (oligo #627) du côté de la splinkerette, ainsi que l'amorce PB/U₃ (5'- CTC ACA AGT TAC AAA GAA GTT TAG TTA AAG GCT G-3'; oligo #587) du côté de la LTR rétrovirale entre 7896 et 7929 dans le RadLV/VL₃ (Janowski *et al.* 1985; <http://www.neb.com>). Les dNTP sont utilisés à raison de 2 µL par réaction (200 µM). Dans le cas présent, une concentration finale de 3.5 mM MgCl₂ fut utilisée. Le milieu réactif est complété avec de l'eau ultra pure. Le programme pour la première PCR est le suivant :

- 94°C pendant 1 minute.
- 68°C pendant 30 secondes.

(Fait 2 fois)

- 94°C pendant 15 secondes.
 - 57.8°C pendant 30 secondes.
 - 72°C pendant 3.5 minutes.
- (Fait 27 fois)
- 94°C pendant 15 secondes.
 - 57.8°C pendant 30 secondes.
 - 72°C pendant 3.5 minutes.
 - 72°C pendant 5 minutes.

Après la première PCR, l'échantillon est analysé par une électrophorèse sur gel faite selon la procédure standard. Si la PCR permet d'observer une traînée ou même des bandes, l'échantillon est passé sur une colonne de purification de PCR (*PCR Purification Kit*, Qiagen, Mississauga, Canada), selon la procédure fournie par la compagnie. Le volume obtenu est d'environ 50 µL.

2.6.2 PCR nichée

La deuxième réaction de polymérase en chaîne est faite à partir de 2 µL prélevés de la première PCR purifiée. Toutes les étapes de cette PCR nichée sont faites de la même façon qu'à l'étape précédente. Il faut cependant remplacer l'amorce PB/U₃ (oligo #587) par l'amorce 5'-AGA GTG ATT GAC TGC CCA GC-3' (U5VL13; oligo #440) (*Invitrogen Life Technologies*, Burlington, Canada). Cette amorce s'apparie à la LTR de RadLV/VL₃ clone V-13 dans la région U₅, 10 pb avant la répétition inversée à la position 8359 à 8378 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Une autre amorce fut également synthétisée pour la PCR nichée : PU₃ (5'-TGG GCC CCG GCT CCG TTA GAC ATA-3'; oligo #624; située à la position 7977 à 8000 du RadLV/VL₃ clone V-13 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)). La technique ne fut cependant pas mise au point pour l'oligo #624. La PCR nichée dans ce cas-ci se fait d'un seul côté, soit du côté de la LTR rétrovirale. Cependant, l'amorce splink2 (oligo

#591) demeure disponible pour optimiser la réaction nichée de l'autre côté, soit du côté de la splinkerette. Suite à la PCR nichée, un premier gel d'agarose est fait afin de vérifier si la réaction a bien fonctionné. Ce gel, contrairement à la procédure standard mentionnée précédemment, est fait de 1.75% d'agarose.

2.7 Migration pour élution

En général, selon l'efficacité de la réaction PCR nichée, plusieurs tubes de PCR sont refaits pour augmenter la quantité d'ADN afin de faciliter le clonage subséquent. Ces réactions sont faites à partir d'une solution stock contenant tous les réactifs d'un volume permettant l'obtention de 5 à 10 tubes, selon l'efficacité vérifiée précédemment. Les réactions de ces tubes doivent être vérifiées séparément avant qu'ils ne soient mis en commun. Le volume final obtenu doit être diminué au *speed-vack* jusqu'à 40 ou 60 μL . La procédure standard de l'électrophorèse est utilisée pour observer le résultat. Cependant, le gel est fait à 1.75% d'agarose et la migration se fait 12-16 heures à 40 V. Un marqueur de poids moléculaire en échelle de 100 pb (*General Electric Healthcare*, Baie d'Urfée, Canada) et un marqueur fait du phage λ (Lambda) digéré par Hind III sont mis également sur le gel (1 μg de chaque environ). Les tailles des fragments obtenus sont 23 130 b, 9416 b, 6557 b, 4361 b, 2322 b, 2027 b, 564 b, 125 b. La coloration au bromure d'éthidium peut être de 20-30 minutes et la décoloration de 15-20 minutes.

2.8 Élution des bandes amplifiées

Il est impératif de travailler rapidement aux rayons UV afin de ne pas dégrader le matériel génétique, qui devra être cloné et séquencé. De plus, une exposition prolongée du gel aux UV entraîne une perte de la luminosité du bromure d'éthidium intercalé entre les bases azotées de l'ADN (Sambrook *et al.* 1989). Il faut

exécuter les étapes suivantes de manière à ne pas contaminer le gel ni les bandes découpées. Entre chacune des manipulations, il faut laver la pince et la lame de rasoir à l'eau ultra pure.

La première étape consiste à faire une photo claire du gel avec les bandes obtenues et les marqueurs bien visibles. Cela permet de déterminer le poids des fragments obtenus, élément crucial lors du clonage. Ensuite, chaque bande est découpée et déposée dans des eppendorfs individuels bien identifiés. Afin d'en extraire l'ADN, un kit d'élution est utilisé (*Qiaex II Gel Extraction Kit*, Qiagen, Mississauga, Canada) selon le protocole fourni par la compagnie. Par contre, l'étape finale (l'élution de l'ADN) peut être faite jusqu'à 4 fois afin d'augmenter le rendement. Afin de vérifier si l'élution a bien fonctionné, l'ADN est observé sur gel d'agarose 1.75% contenant un marqueur de poids moléculaire 100 pb (General Electric Healthcare, Baie d'Urfée, Canada), suite à une électrophorèse faite selon la procédure standard.

2.9 Insertion dans le vecteur

Les fragments d'ADN élués sont tous clonés dans le vecteur pDrive (Annexe L) selon la procédure fournie par le fabricant (*Qiagen PCR Cloning Kit*, Qiagen, Mississauga, Canada). Il est très important de bien doser l'ADN élué afin d'avoir un bon rendement de colonies positives lors de la mise en culture à l'étape suivante. En général, d'une élution efficace, 4 μ L d'ADN suffisent lors de la ligation au vecteur. La réaction de ligation se fait, comme indiqué par Qiagen, à 16°C pendant 2 heures dans un incubateur.

2.10 Transformation bactérienne et clonage

Le clonage se fait à l'aide de bactéries DH5 α compétentes (Sambrook *et al.* 1989). Avant de procéder à la transformation bactérienne, des milieux L-Agar sont préparés, contenant 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline final (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) et du X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside; Roche, Laval, Canada) à 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final. Toutes les étapes doivent se faire stérilement, à la flamme.

Les bactéries compétentes sont mises sur glace pour permettre leur décongélation graduelle. Par réaction de ligation de l'étape précédente (soit 10 μL), 100 μL de bactéries compétentes sont ajoutés. Les bactéries sont ensuite remises sur glace pendant 15 minutes. Le choc thermique qui suit dure 1 minute 30 secondes à 42°C ou 5 minutes à 37°C. Les bactéries sont remises sur glace pendant 5 minutes, puis 400 μL de L-Broth liquide leur sont ajoutés. Elles sont mises à l'incubateur agitant à 37°C pendant 30 minutes à 1.5 heure. Divers volumes de la suspension bactérienne sontensemencées sur les pétris qui sont mis à l'incubateur à 37°C pendant 12-16 heures.

2.11 Minipréparation d'ADN plasmidique (Minipreps)

Une colonie bleue et les colonies bactériennes blanches sont repiquées et remises en culture pendant 12 à 16 heures dans des milieux LB liquides contenant de l'ampicilline (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ces nouvelles cultures sont soumises au protocole du kit d'extraction de plasmides (*QIAprep Spin Miniprep Kit*, Qiagen, Mississauga, Canada). Le rendement des minipreps est vérifié suite à une électrophorèse sur gel d'agarose selon le protocole standard. Les minipreps sont soumises à une digestion par l'enzyme EcoR I (New England Biolabs Inc., Pickering, Canada) qui dure une heure à 37°C : 5 μL des minipreps sont digérés dans un volume final de 30 μL ,

contenant 1X de tampon EcoR I (NEBuffer EcoR I : 100 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 0.025% Triton; pH 7.5 à 25°C) de la même compagnie. Les minipreps digérées sont observées suite à une électrophorèse sur gel d'agarose 1.75% selon le protocole standard. Un marqueur de poids moléculaire 100 pb est nécessaire pour vérifier si les inserts et les vecteurs correspondent bien aux poids attendus selon les résultats de l'étape de l'élution de gel.

2.12 Séquençage

Les plasmides contenant les fragments d'intérêts sont envoyés au séquençage (Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill, Montréal). Les fragments de plus de 600 pb sont séquencés des deux côtés afin de vérifier si les 2 amorces utilisées à la PCR nichée sont présentes dans la séquence. Les amorces de séquençage sont choisies selon le vecteur de clonage utilisé. Dans le cas présent, il s'agit du vecteur pDrive (Annexe L) (*Qiagen PCR Cloning Kit*, Qiagen, Mississauga, Canada) et les amorces sont SP6 et T7.

2.13 Alignement des séquences

Des séquences obtenues, il est important d'enlever les portions de plasmide, de rétrovirus et de splinkerette. Ceci se fait sur le site internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> à l'aide des séquences connues d'amorces, de splinkerette et de rétrovirus. Le résultat final est criblé sur le site ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>). Lorsqu'un site est retrouvé plus d'une fois dans au moins deux tumeurs différentes et qu'il est non répertorié dans le *Retroviral Tagged Cancer Gene Database* (<http://www.rtcgd.ncifcrf.gov>; Akagi *et al.* 2004), il est primordial de le re-soumettre sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> afin de s'assurer qu'il est

réellement nouveau ou non associé à une intégration rétrovirale. D'autres recherches sont également de mise.

2.14 Travail supplémentaire

2.14.1 Transfert par la méthode Southern

Le transfert Southern (*Southern Blot*) permet de transférer l'ADN d'une migration d'ADN sur gel à une membrane de nylon (Sambrook *et al.* 1989; Southern 1975). Une photographie du gel contenant l'ADN amplifié (ADN cloné) par PCR est prise aux rayons UV. Le gel est déposé dans une solution de NaOH 0.4 M dans un bac à transfert, sur deux feuilles de papier Whatman (Whatman International Ltd., Maidstone, UK) placées sur des éponges. Une membrane de nylon (*Osmonics Inc., Fisher Scientific, Ottawa, Canada*) est mise directement sur le gel. Une ou 2 feuilles de papier Whatman (Whatman International Ltd., Maidstone, UK) sont encore placées sur la membrane et plusieurs couches de papier absorbant à transfert recouvrent le tout. Il faut s'assurer que le tampon de transfert ne puisse pas monter dans le papier absorbant à transfert sans devoir passer par infusion au travers du gel contenant l'ADN. Après au moins 4 heures de transfert, la membrane est enlevée et séchée. L'ADN est ensuite fixé de manière permanente à la membrane suite à une exposition de 3 minutes aux rayons UV (Sambrook *et al.* 1989).

2.14.2 Sondes radioactives

Des sondes radioactives furent également préparées afin de vérifier si les fragments d'ADN amplifiés lors de la première PCR et de la PCR nichée comportaient des portions de rétrovirus ou une portion de la splinkerette. Afin d'obtenir une sonde radioactive qui détecte les fragments d'ADN lors de la première

PCR, soit une sonde faite à partir de la portion U₃ des LTR de RadLV/VL₃, les étapes suivantes sont effectuées. Il s'agit d'abord de mettre en culture le clone U₃ VL₃ (laboratoire du Dr. Éric Rassart) et de soumettre la culture à un protocole de maxiprep (Sambrook *et al.* 1989). Le plasmide d'ADN obtenu est digéré par Hind III (New England Biolabs Inc., Pickering, Canada) selon le protocole fourni par la compagnie. Le fragment d'environ 300 pb qui en découle correspond à une portion U₃ du LTR rétrovirale de RadLV/VL₃, situé entre Pst I et Sac I (Rassart *et al.* 1988). Il faut faire l'élution de ce fragment comme mentionné à l'étape 2.8.

Une sonde U₃ radioactive est ensuite préparée. Vingt ng (2 µL) du fragment produit sont dénaturés à 100°C pendant 4 minutes dans un volume final de 8 µL d'eau dans un tube à bouchon vissé. À cet ADN sont ajoutés dans l'ordre, 30 µL d'un pool d'oligonucléotides (tampon de polymérisation : 0,25 mM dCTP, dGTP et dTTP, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 20 mM Tris-HCl pH 7.5 et 350 µg/mL d'oligohexamères) (General Electric Healthcare, Baie d'Urfée, Canada) auxquels 20 µCi (2 µL) de phosphore radiomarqué sont ajoutés ($\alpha^{32}\text{P}$ -dATP) (Perkin Elmer, Vaudreuil, Canada). Une unité du fragment Klenow de l'ADN polymérase I (General Electric Healthcare, Baie d'Urfée, Canada) est également ajoutée à l'ADN dénaturé (Sambrook *et al.* 1989). Après incubation de 15 minutes à 37°C, l'ADN est précipité à l'aide de 1 µg/mL d'ARNt et 300 mM d'acétate de sodium (NaOAc) final (2 µL sont prélevés à cette étape pour compte à l'appareil à scintillation (Wallac 1409; *Liquid Scintillation Counter*, LabX, Midland, Canada)), et deux volumes d'éthanol 100% gardé à -20°C sont ajoutés. Le tout est mis sur glace sèche pendant 15 minutes puis centrifugé à vitesse maximale pendant 15 minutes. Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu dans 100 µL d'eau. Il est de plus nécessaire d'ajouter 600 µL d'ADN de sperme de saumon (100 µg/mL) et de chauffer l'échantillon 5 minutes à 100°C avant l'hybridation. Les volumes peuvent être divisés en deux dans le cas d'ADN cloné. Le

compte de la sonde radioactive doit cependant être à un minimum de 10 millions CPM d'activité.

2.14.3 Oligonucléotides radiomarqués

Certains oligonucléotides peuvent être marqués radioactivement par la méthode de *Tailing* afin de repérer les fragments d'intérêts dans la PCR nichée. Pour y arriver, le protocole suivant fut appliqué. Un volume final de 12 μL d'eau doit contenir 50 ng d'ADN à radiomarquer. Cet ADN doit être chauffé 3 minutes à 65°C. Deux μL de tampon (1X final; 100 mM Na Cacodylate (faire attention : toxique!) pH 6.8; 8 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT; 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA) de l'enzyme transférase terminale (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase FPLCpure*; General Electric Healthcare, Baie d'Urfée, Canada) sont ajoutés. Ensuite, 5 μL de $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (Perkin Elmer, Vaudreuil, Canada) sont ajoutés, suivi de 15 unités de l'enzyme transférase terminale (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase FPLCpure*; General Electric Healthcare, Baie d'Urfée, Canada). La réaction est maintenue à 37°C pendant 30 minutes et arrêtée avec une solution finale de 10 mM EDTA. La suite du protocole est identique au protocole pour les sondes radioactives (Section 2.14.2).

2.14.4 L'hybridation

Le tampon d'hybridation pour l'ADN cloné est fait de 5X SSC (0.75 M NaCl; 75 mM citrate de sodium; 0.25 mM EDTA), 0.5% SDS, 5X Denhardt's (0.1% BSA; 0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone (PVP)) (Denhardt 1966), et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final d'ADN de sperme de saumon. La membrane de nylon (Osmonics Inc., Fisher Scientific) ayant servi lors du transfert Southern est d'abord incubée dans le tampon à une température de 65°C. Après 1 heure, le tampon est jeté et remplacé par du tampon frais, auquel la sonde est ajoutée. L'hybridation dure un minimum de 4

heures à 65°C. La membrane est ensuite lavée avec une solution de 2X SSC, 2 fois pendant 15 minutes à 42°C. Si ce traitement ne permet pas de diminuer le compte radioactif en dessous de 200 CPM, un dernier lavage de 15 minutes à 1 heure est fait dans une solution de 0.1X SSC - 0.1% SDS à 65°C. La membrane est ensuite mise au contact d'un film au phosphore (Kodak) entre 20 minutes et toute une nuit selon le compte de radioactivité puis le film est analysé au phosphorimager. La radioactivité est éliminée de la membrane par des nettoyages dans une solution bouillante de 0.1% SDS (Sambrook *et al.* 1989).

2.14.5 Technique des billes magnétiques

Une technique fut également essayée avec la technique des splinkerettes. Il s'agit de la technique des billes magnétiques liées à la streptavidine (Roche, Laval, Canada) et des oligonucléotides biotinylés en 5' (Sørensen *et al.* 1993). La technique repose sur le fait que la streptavidine a une très grande affinité pour la biotine. À l'aide d'un aimant, il est possible de purifier l'ADN biotinylé fixé à la streptavidine des billes magnétiques. Lors de la première PCR, des oligonucléotides PB/U₃ biotinylés (BioCorps, Montréal, Canada) furent employés. Ceci permet d'obtenir un produit PCR contenant des fragments d'ADN biotinylés. Le protocole employé fut celui des amplifications électives par la méthode de Sørensen *et al.* (1993). Toutes les étapes d'élutions sont faites en exposant les billes au champ magnétique d'un aimant (Dynal A.S., Lake Success, USA). Avant de commencer, il faut laver 20 µL de billes magnétiques liées à la streptavidine 3 fois avec 40 µL de tampon de liaison (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl). Les billes sont gardées dans 40 µL du tampon de liaison auquel 40 µL de la première PCR purifiée (Section 2.6.1) sont ajoutés. La purification de la PCR permet d'éviter que les amorces biotinylées en trop entrent en compétition avec les produits amplifiés pour la streptavidine des billes. La solution est incubée 10 minutes en étant agitée de temps en temps afin d'éviter la sédimentation des billes. Les billes doivent être lavées 2 fois avec 40 µL de tampon

de lavage (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA; 1 M NaCl). Après que le tampon soit retiré, 8 μ L de NaOH 100 mM sont ajoutées sur les billes. La solution est ensuite chauffée pendant 10 minutes à 95°C et le surnageant contenant le produit PCR pure est récupéré et neutralisé avec 4 μ L de 0.2 M HCl et 1 μ L de 1 M Tris-HCl. Le volume final est ajusté à 30 μ L avec de l'eau ultra pure. La procédure de la PCR nichée (Section 2.6.2) est ensuite appliquée.

2.14.6 Récupération des colonnes

Les colonnes servant aux minipreps peuvent être réutilisées entre 3 et 5 fois. Elles sont lavées une fois avec 500 μ L de tampon d'éluion, une fois avec 500 μ L d'eau ultra pure et une fois avec 500 μ L d'éthanol 100%, en respectant le protocole du kit d'extraction de plasmides (*QIAprep Spin Miniprep Kit*, Qiagen, Mississauga, Canada).

2.14.7 Autres précisions

Lors des colorations au bromure d'éthidium, il est important de s'assurer que celui-ci ne date pas plus de 1 ou 2 mois, selon son utilisation. La technique donnant des rendements de PCR variables, il est important d'être assuré que le bromure d'éthidium ne soit pas le facteur limitant de la visualisation des bandes sur gel d'agarose.

Le choix des amorces pour leur spécificité lors des PCR est primordial. De plus, des tests de température de fusion ou T_m (*Melting point temperature*) pour toutes les combinaisons d'amorce sont de mise. Évidemment, cela implique des gradients de température. La meilleure façon de procéder est de faire un gradient de température d'appariement et de cibler la meilleure réaction suite à une hybridation radioactive. La température de départ correspond environ à la température médiane

des T_m des oligonucléotides utilisés; les T_m étant fournis par la compagnie produisant les oligonucléotides. Un gradient de PCR de 10°C d'intervalle autour de cette température est fait (Sambrook & Russell 2001). Les réactions PCR sont également affectées par d'autres facteurs tels la concentration en $MgCl_2$. Des gradients de $MgCl_2$ doivent être faits à la température déterminée comme étant la meilleure. Les ajustements des autres paramètres doivent être faits jusqu'à ce que des bandes apparaissent sur gel d'agarose : les gradients d'ADN et divers temps d'élongation lors des PCR peuvent également augmenter l'efficacité d'amplification ou la spécificité de celle-ci.

Il est impératif de se souvenir que la technique des splinkerettes fut conçue pour éviter les étapes de clonage et de procéder à un séquençage direct après élution des bandes amplifiées par PCR (Mikkers *et al.* 2002) ce qui ne fut pas possible dans le cadre de ce projet.

CHAPITRE III

Résultats

Beaucoup de résultats furent obtenus lors de ce projet. Étant donné que le but premier de ce travail fut de trouver des sites communs d'intégration du rétrovirus RadLV/VL₃, ceux-ci furent identifiés, mais leurs analyses furent mises de côté. Les résultats qui seront présentés sont ceux qui pourraient servir à un travail ultérieur, donnant suite à ce projet. De plus, tous les résultats bruts seront également présentés.

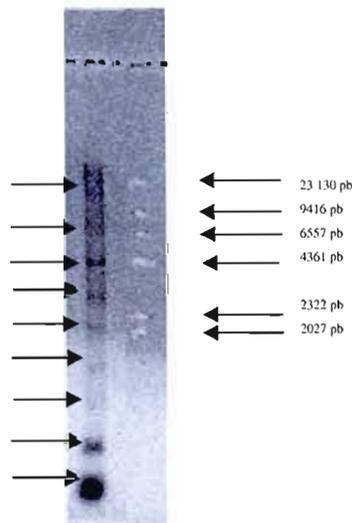


Figure 5 : Digestion de l'ADN génomique extrait de la lignée cellulaire BL/VL₃ comportant 9 intégrations du rétrovirus RadLV/VL₃ par l'enzyme EcoR I (NEB). Il s'agit d'un transfert Southern et d'une hybridation radioactive avec une sonde située dans la portion U₃ du LTR rétroviral. À droite se trouve un marqueur de poids moléculaire, soit l'ADN de phage λ digéré par Hind III.

La figure 5 représente une hybridation avec une sonde radioactive d'une digestion de l'ADN tumoral par EcoR I, qui permet d'observer les intégrations rétrovirales. La sonde radioactive provient de la portion U₃ du RadLV/VL₃ (section 2.14.2). Ici, la lignée cellulaire BL/VL₃ fut digérée afin de vérifier combien de bandes devraient être visibles suite aux PCR effectuées après l'application de la technique

des splinkerettes. Neuf bandes sont visibles et chacune de ces bandes correspond à un fragment d'ADN contenant deux portions U_3 de RadLV/VL₃. Le but des étapes qui suivent sera de retrouver ces 9 intégrations par la technique des splinkerettes.

3.1 Mise au point

Les premiers tests ont été faits sur un clone moléculaire de RadLV/VL₃ dérivé de la lignée BL/VL₃, soit le clone V-12. Ce clone comporte un RadLV/VL₃ ainsi que les portions d'ADN murin flanquant l'intégration (Rassart *et al.* 1986). Le résultat de la figure 6 démontre bien que la réaction PCR réalisée avec un gradient de température d'appariement a bien fonctionné, la température optimale étant de 63.6°C. La splinkerette utilisée ici fut exactement celle décrite dans l'article de Mikkers *et al.* (2002).

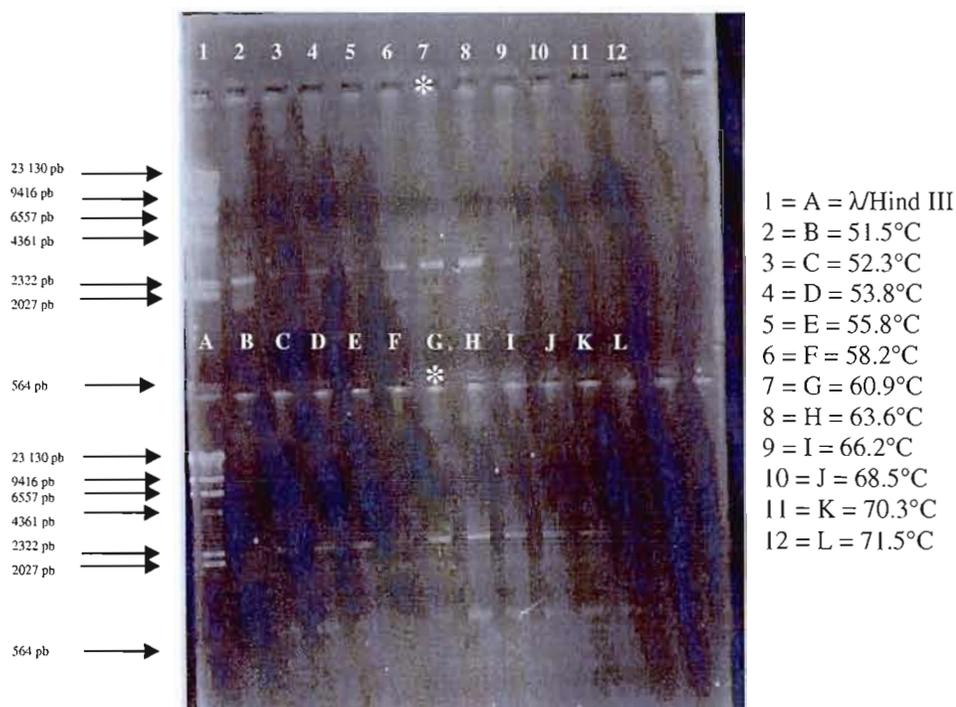


Figure 6 : Gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium présentant deux gradients de 10°C pour les températures d'appariement (T_m) lors de PCR. L'ADN matrice utilisé est le clone V-12 de RadLV/VL₃ soumis au protocole des splinkerettes employé par Mikkers *et al.* (2002). Le marqueur est un ADN de phage λ digéré par Hind III. * : indiquent les T_m optimales. Les puits 2 à 12 présentent les résultats de la PCR 1 (amorce PB/U₃ et amorce Splink1 (Mikkers *et al.* 2002)) et les puits B à L, ceux de la PCR nichée (amorce PU₃ : oligo #624 et amorce Splink2, oligo #591).

La figure 6 représente les résultats obtenus sur le clone V-12 de la lignée BL/VL₃ contenant des intégrations de RadLV (Rassart *et al.* 1986) suite à l'application de la technique des splinkerettes. Ce clone correspond à un RadLV flanqué par l'ADN génomique murin. Il s'agit d'un clone de 8.19 kpb. Le puits 2 présente une forte quantité d'ADN alors que le reste des puits démontrent bien le gradient en fonction des températures d'appariement. Effectivement, le rendement des PCR augmente jusqu'à une température de 63.6°C pour diminuer par la suite. La température optimale choisie est de 60.9°C.

3.2 Gradients de température d'appariement

Des gradients de températures d'appariement furent ensuite effectués afin de cibler la température optimale pour les réactions PCR sur de l'ADN génomique, soit de l'ADN de tumeur.

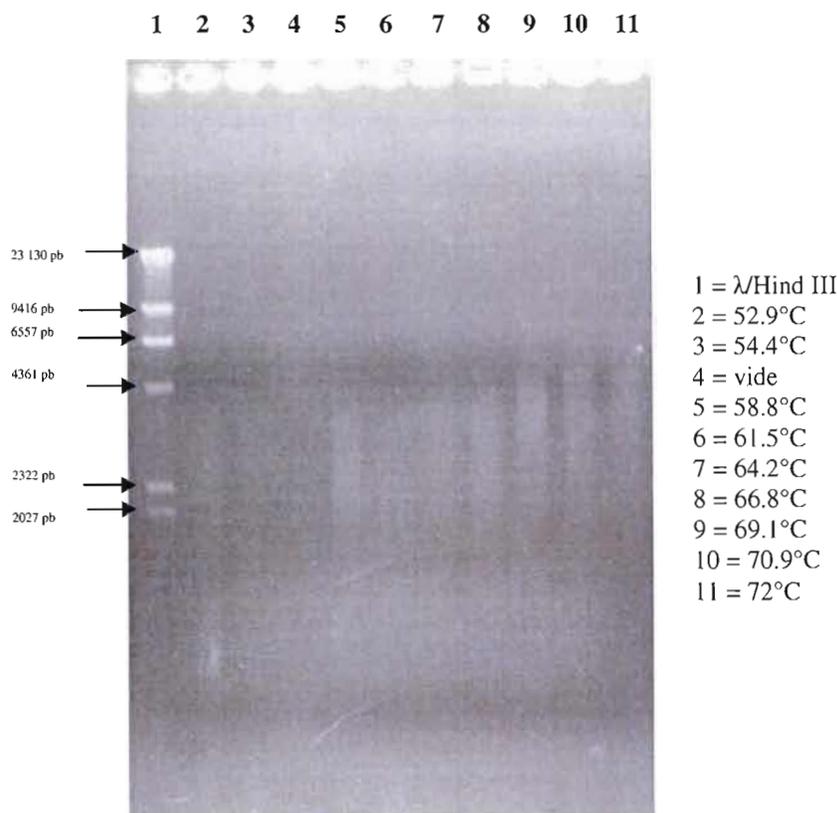


Figure 7 : Gradient de température d'une première PCR faite avec la splinkerette CAEV suite à une digestion de la lignée BL/VL₃ avec BamH I. La concentration en MgCl₂ n'est pas ajustée à cette étape.

À la figure 7, aucune bande n'est visible. Seulement des traînées peuvent être observées. Le rendement de la première PCR en fonction du gradient de température d'appariement n'est pas observable.

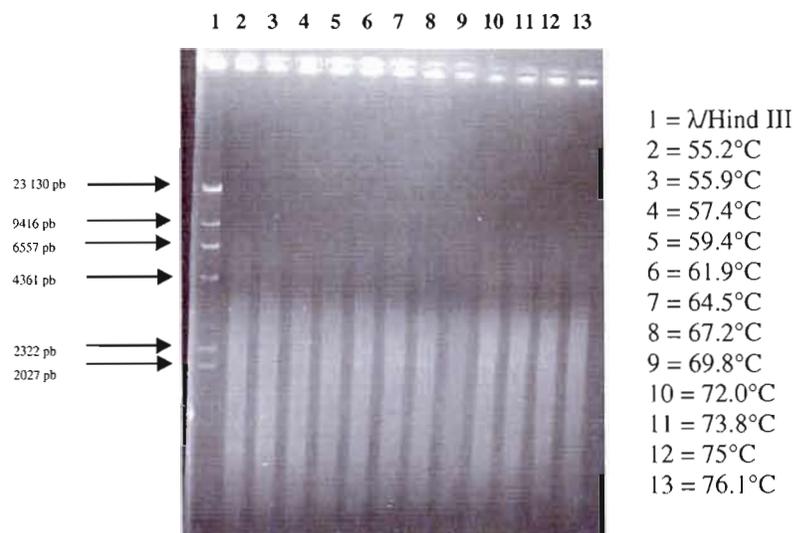


Figure 8 : Gradient de température d'une PCR nichée faite avec la splinkerette CAEV suite à une digestion de la lignée BL/VL₃ avec BamH I.

À la figure 8, aucune bande n'est visible. Seulement des traînées peuvent être observées. Aucun gradient de température d'appariement n'est observable. La concentration en MgCl₂ n'est pas ajustée à cette étape et cela doit être à l'origine de ce résultat.

3.3 Hybridation du gradient de température de la première PCR

Afin de vérifier si effectivement aucune intégration rétrovirale n'est amplifiée lors de la première PCR présentée ci-haut, une hybridation par une sonde radioactive spécifique au LTR du RadLV/VL₃ fut effectuée. La figure 9 représente un transfert Southern de la première PCR présentée à la figure 7.

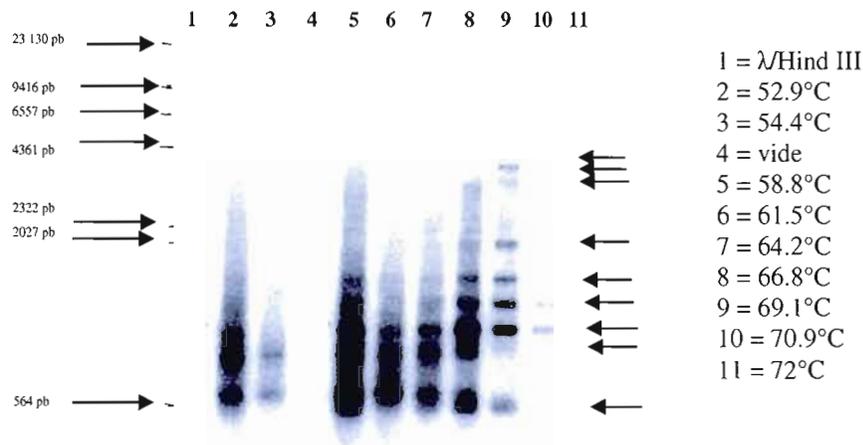


Figure 9 : Hybridation radioactive par une sonde U₃ du gel obtenu à la figure 7, soit une première PCR faite sur l'ADN de la lignée BL/VL₃ soumis au protocole des splinkerettes.

Dans la figure 9, des bandes sont bien visibles suite au Southern effectué à partir du gel à la figure 7. La température de 69.1°C donne des bandes distinctes alors qu'aux autres températures, les PCR donnent des traînées ou des bandes plus ou moins définies. Environ 9 bandes sont observables dans le puits 9, comme présenté à la figure 5. Aucun gradient n'est clairement observable en ce qui a trait au rendement des réactions PCR. La seule variation observable sur cette figure est la spécificité de la réaction, c'est-à-dire que les amorces s'apparient à des endroits différents selon la température de la réaction.

3.4 Gradient MgCl₂

La mise au point de la concentration en MgCl₂ est un élément qui peut influencer le rendement des réactions PCR. Sachant que les PCR permettent d'amplifier des intégrations rétrovirales, comme présenté à la figure 9 de

l'hybridation par une sonde radioactive, un gradient de concentration de $MgCl_2$ a été effectué.

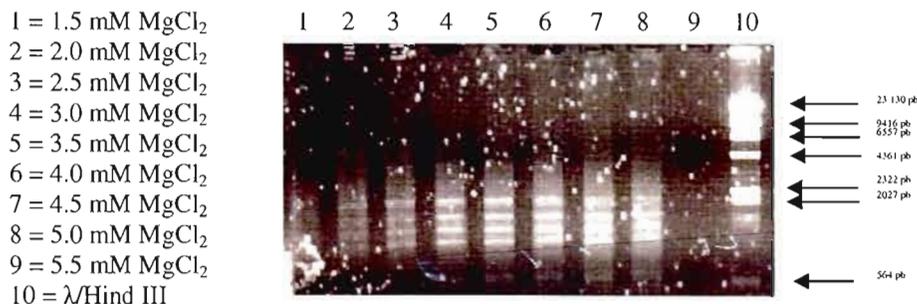


Figure 10 : Gradient de $MgCl_2$ à 57.8°C fait sur une première PCR faite avec de l'ADN de la lignée BL/VL₃ soumis au protocole des splinkerettes.

La figure 10 démontre bien que le $MgCl_2$ a un effet sur l'efficacité d'amplification d'une PCR. Le gradient est bien visible. Il est possible de voir que le $MgCl_2$ modifie l'efficacité d'amplification d'ADN lors d'une PCR. Le rendement des PCR augmente avec la concentration jusqu'à environ 4.5 mM de $MgCl_2$, pour ensuite redescendre. Le puits 5 présente les bandes les plus claires, tout en ayant le taux le moins élevé en traînée à l'arrière-plan. La concentration en $MgCl_2$ retenue pour la suite de ce projet fut donc de 3.5 mM, soit celle de la réaction observable au puits 5.

3.5 Gel d'éluion

Lorsque tous les paramètres des réactions PCR ont été mis au point, des gels permettant l'éluion des bandes amplifiées ont été effectués afin de pouvoir isoler les différents fragments d'ADN.

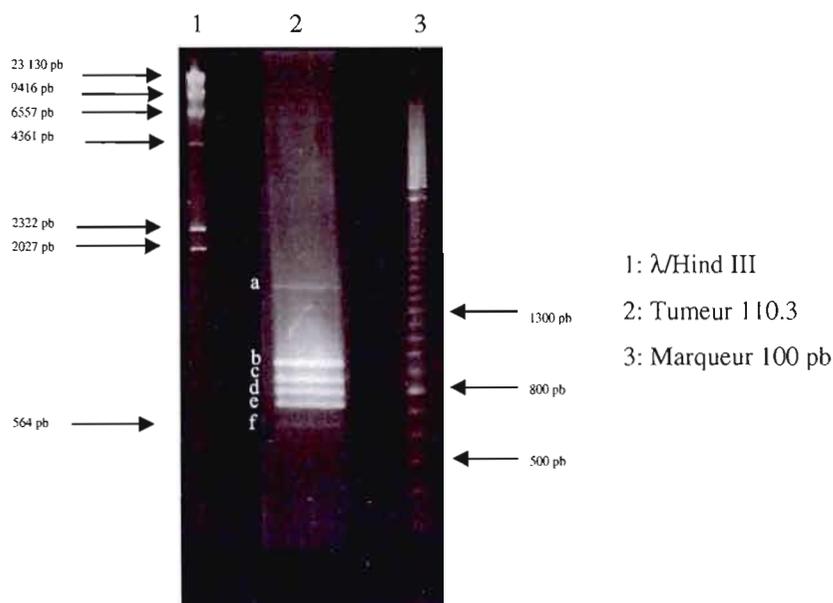


Figure 11 : Gel d'agarose 1.75%, migré à 40 volts pendant une nuit et coloré au bromure d'éthidium obtenu suite à 5 PCR nichées de la tumeur 110.3 migrées dans un même puits triple.

Une fois la mise au point de température optimale de réaction et des concentrations d'ADN et de $MgCl_2$ terminée, il est possible d'obtenir une PCR nichée comme celle présentée à la figure 11. La tumeur 110.3 donne 6 bandes amplifiées par PCR. Le marqueur de poids moléculaire 100 pb, ainsi que le phage Lambda digéré par Hind III donnent un aperçu de la taille des fragments.

3.5.1 Résultats de l'éluion

Chaque bande éluee doit être remise sur gel d'agarose afin de vérifier le rendement de l'éluion. De cette façon, il est possible de doser l'ADN et de procéder au clonage efficace des fragments d'ADN. L'observation des bandes éluee permet également de voir le taux de contamination des divers fragments d'ADN.

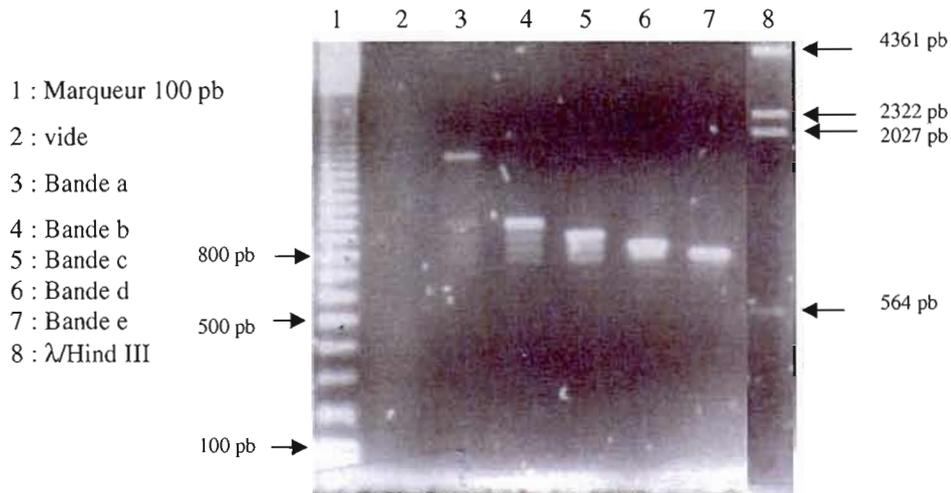


Figure 12 : Résultats de l'éluion des bandes amplifiées de la figure 11, sur gel d'agarose 1.75% présentant un marqueur de poids moléculaire 100 pb ainsi que l'ADN d'un phage Lambda digéré par Hind III.

Cette figure reprend les bandes visibles de la tumeur 110.3 de la figure 11. Les éluions des bandes sont toujours dépendantes de la quantité d'ADN amplifié. La figure 12 présente 5 des 6 bandes observables à la figure 11. Chaque puits semble également présenter les bandes des puits suivants de manière plus ou moins prononcée.

3.6 Gel de plusieurs tumeurs

Suite à l'analyse de plusieurs tumeurs par la technique des splinkerettes, il était intéressant d'observer le patron des bandes amplifiées en fonction de la souche de souris dont provenait la tumeur. Les figures 13 et 14 permettent de voir les différents patrons.

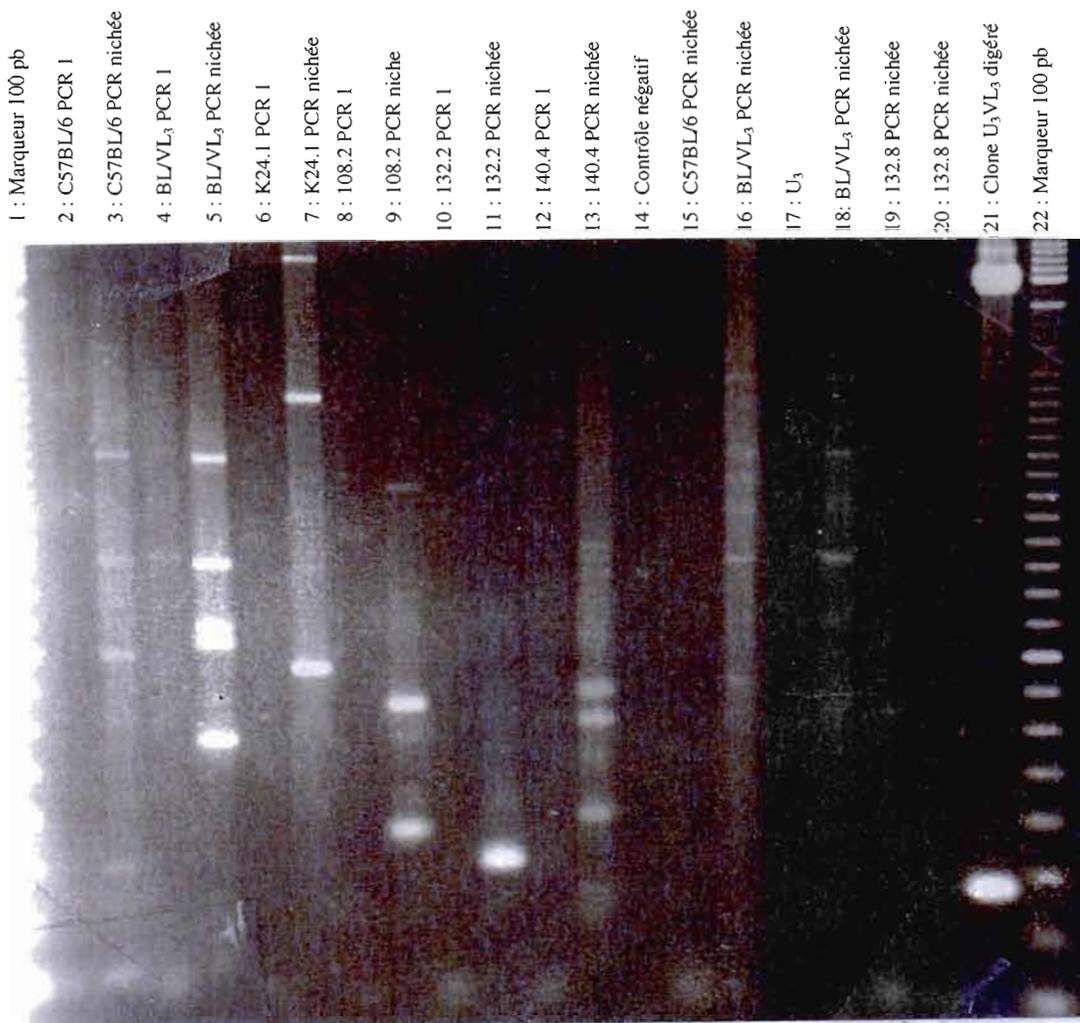


Figure 13 : Gel d'agarose 1.5% présentant les premières PCR et PCR nichées de plusieurs tumeurs ainsi que des échantillons C57BL/6 non infectés (puits 2, 3 et 18) et des échantillons BL/VL₃ contrôles (puits 4, 5, 16 et 18). Le puits 14 est une PCR faite sans matrice d'ADN; les puits 15 et 16 sont faits avec la splinkerette de Mikkers *et al.* (2002); le puits 17 comporte une portion U₃ du RadLV/VL₃ (sonde U₃); le puits 21 contient la digestion du clone U₃VL₃ portant une partie du LTR rétroviral de RadLV/VL₃ (sonde U₃). Les tumeurs K24.1, 132.2, 140.4 et 132.8 viennent de souris SIM.R alors que les autres viennent des souris C57BL/6.

3.6.1 Hybridation de plusieurs tumeurs

- 1 : Marqueur 100 pb
- 2 : C57BL/6 PCR 1
- 3 : C57BL/6 PCR nichée
- 4 : BL/VL₃ PCR 1
- 5 : BL/VL₃ PCR nichée
- 6 : K24.1 PCR 1
- 7 : K24.1 PCR nichée
- 8 : 108.2 PCR 1
- 9 : 108.2 PCR niche
- 10 : 132.2 PCR 1
- 11 : 132.2 PCR nichée
- 12 : 140.4 PCR 1
- 13 : 140.4 PCR nichée
- 14 : Contrôle négatif
- 15 : C57BL/6 PCR nichée
- 16 : BL/VL₃ PCR nichée
- 17 : U₃
- 18 : BL/VL₃ PCR nichée
- 19 : 132.8 PCR nichée
- 20 : 132.8 PCR nichée
- 21 : Clone U₃VL₃ digéré
- 22 : Marqueur 100 pb

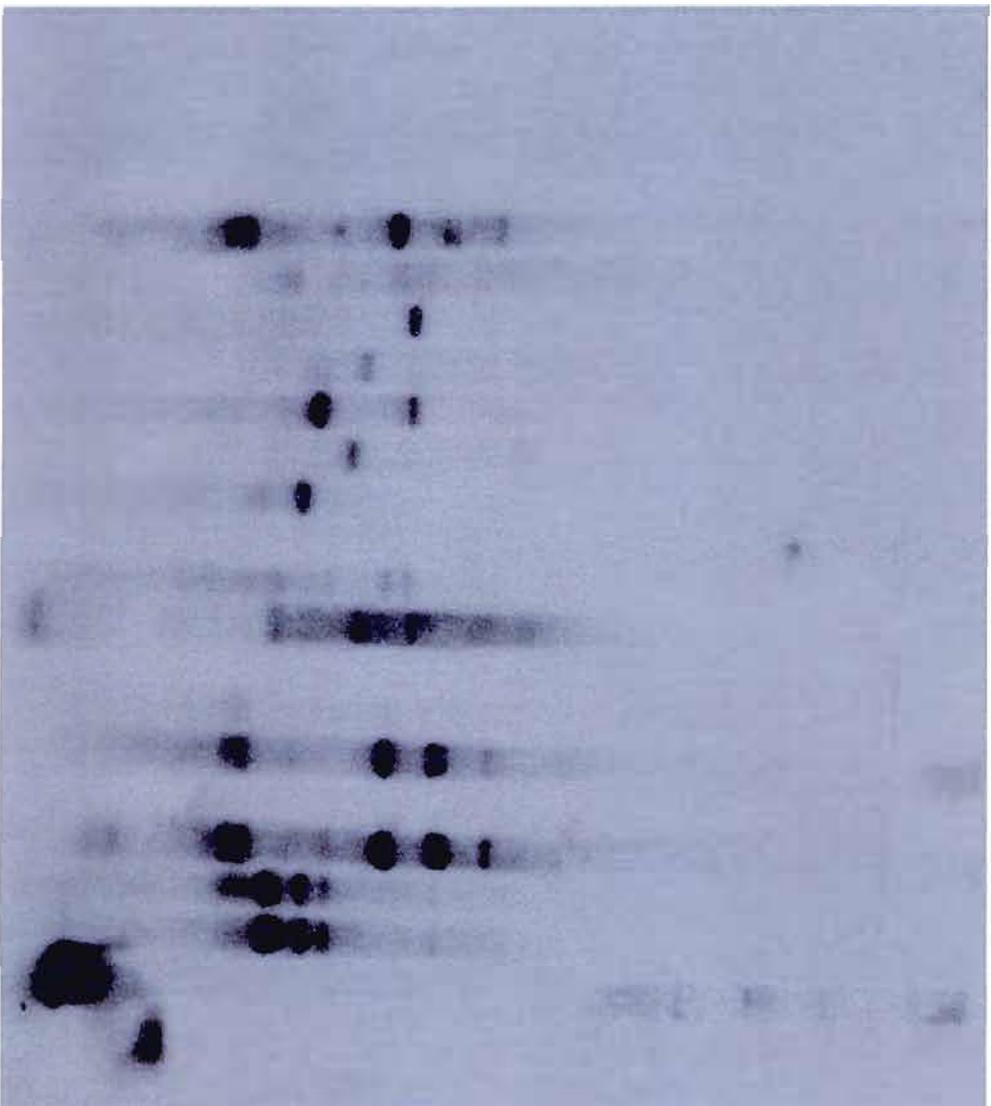


Figure 14 : Hybridation par une sonde U₃ radioactive des tumeurs de la figure 13. Les tumeurs K24.1, 132.2, 140.4 et 132.8 viennent de souris SIM.R alors que les autres viennent des souris C57BL/6.

Les figures 13 et 14 représentent un gel d'agarose et l'hybridation de ce gel avec une sonde radioactive obtenue de la portion U₃ du RadLV/VL₃, respectivement. Les tumeurs K24.1, 132.2, 140.4, 132.8 viennent de souris SIM.R alors que tous les autres échantillons proviennent de la lignée C57BL/6. Sur le gel d'agarose, les premières PCR sont visibles pour 3 échantillons seulement, soit aux puits 4, 5 et 6. Les PCR nichées n'ont pas toutes le même patron. L'hybridation radioactive de la figure 14 présente majoritairement des bandes plus définies pour les premières PCR que pour les PCR nichées. Les puits des échantillons de C57BL/6 ne présentent aucune hybridation.

3.7 PCR pour hybridation avec la sonde Amorce Splink2

Des tests ont été faits afin de vérifier s'il est possible de créer une sonde radioactive universelle pour les premières PCR ainsi que pour les PCR nichées. Les figures 15 et 16 présentent les résultats obtenus.

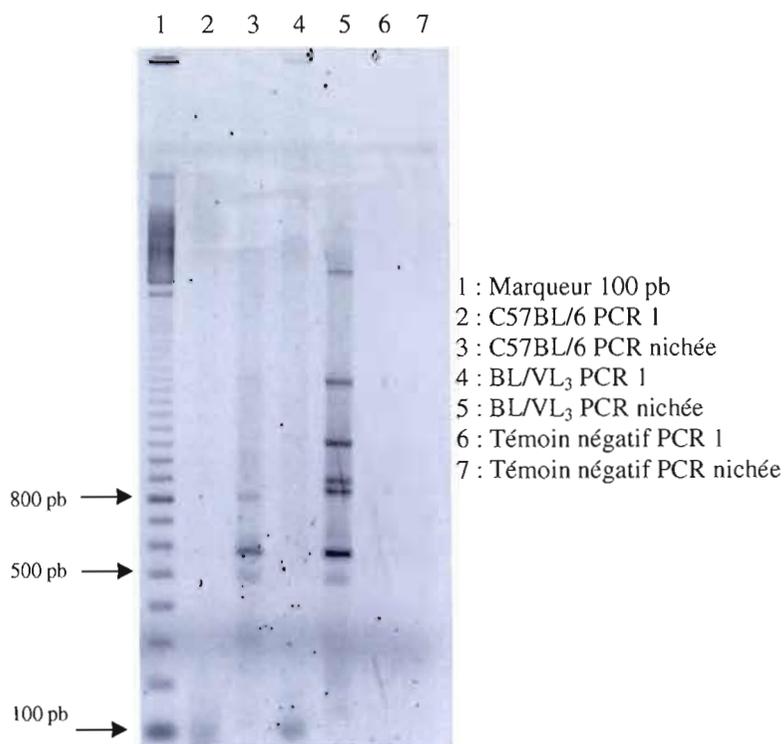


Figure 15 : Gel d'agarose présentant le marqueur de poids moléculaire de 100 pb, le contrôle négatif (souris C57BL/6 non infectée par RadLV/VL₃), les intégrations rétrovirales de la lignée BL/VL₃, ainsi que les témoins négatifs (absence de matrice d'ADN) soumis au protocole des splinkerettes.

La figure 15 démontre des amplifications lors des PCR nichées autant pour la souche de souris C57BL/6 non infectée par le RadLV/VL₃ que pour la lignée cellulaire BL/VL₃ contenant 9 intégrations rétrovirales. Aucune bande n'est visible dans les puits des témoins négatifs. Ceux-ci sont faits dans les mêmes conditions de PCR que les autres échantillons, mais ils ne contiennent aucune matrice d'ADN.

3.7.1 Hybridation avec la sonde Amorce Splink2

1 2 3 4 5 6 7



1 : Marqueur 100 pb
 2 : C57BL/6 PCR 1
 3 : C57BL/6 PCR nichée
 4 : BL/VL₃ PCR 1
 5 : BL/VL₃ PCR nichée
 6 : Témoin négatif PCR 1
 7 : Témoin négatif PCR nichée

Figure 16 : Hybridation du gel d'agarose de la figure 15 avec un oligonucléotide radiomarqué au $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP, soit l'amorce Splink2 (oligo #591).

Le gel de la figure 15 fut transféré par Southern et hybridé. La figure 16 représente l'hybridation radioactive des PCR de la figure 15 avec une sonde radioactive provenant d'une section de la splinkerette (amorce Splink2, oligo #591). À la figure 16, il est possible de voir que les hybridations des PCR nichées sont plus prononcées que celles des premières PCR. De grandes traînées sont également visibles à l'arrière-plan des puits. Les témoins négatifs comportent tous les éléments pour une réaction PCR, sauf la matrice d'ADN. Les bandes des PCR de la figure 15 sont plus nombreuses que celles de la figure 16.

3.8 Sites d'intégration répertoriés

Le tableau I qui suit est un résumé de toutes les bandes amplifiées par PCR, clonées, séquencées et positionnées dans le génome de *Mus musculus* sur

<http://www.ensembl.org>. Le nombre total de séquences présentées ici est 70 et ces séquences correspondent aux PCR faites sur 19 tumeurs. Les caractères verts indiquent le site même d'intégration. Les caractères rouges indiquent les oncogènes connus. Les caractères mauves indiquent que l'intégration est située dans l'oncogène nommé et les caractères gras indiquent toutes les tumeurs qui présentaient un site commun d'intégration retrouvé au cours de ce travail. La tumeur, le chromosome et la position approximative sont indiqués également. Le terme *random* dans la colonne des chromosomes indique que la séquence retrouvée possède des caractéristiques de la séquence du chromosome nommé mais que sa position exacte demeure incertaine. La colonne des gènes présente le gène en amont du site d'intégration, le site d'intégration ainsi que le gène en aval du site d'intégration trouvé. Les tumeurs C57BLVL3 1.1, C57BLVL3 1.2, 108.2, 137.2 proviennent de souris de souche C57BL/6, les tumeurs K24.1, K31.3, K31.4, K31.5, K31.7, 110.2, 110.3, 110.4, 132.1, 132.2, 132.3, 132.8, 140.4, 151.2, 151.3 proviennent de souris de souche SIM.R. Les couleurs à l'arrière-plan des lignes et la légende permettent de voir combien d'intégrations ont été trouvées pour une même tumeur. Deux sites d'intérêt se trouvent sur le chromosome 7 (tumeurs 110.2, 151.2 et K31.7) et 11 (tumeurs 132.3 et 132.8).

Tableau I : Tumeurs, positions chromosomiques et gènes retrouvés lors de la recherche de sites communs d'intégration de RadLV/VL₃ clone V-13. **Caractères verts** : indiquent le site d'intégration. **Caractères rouges** : indiquent les oncogènes connus. **Caractères mauves** : indiquent le site d'intégration dans un oncogène connu. **Caractères gras** : indiquent tous les sites communs d'intégrations trouvés dans le cadre de ce projet.

Tumeur	Chromosome	Position	Site	Gènes
K31.4	2	A2	17.46 Mb	O08905 + Neb1 + Q8BWC6
137.2	2	A3	26.46 Mb	Novel + Notch1 + Egf17
137.2	2	E5	117.185 Mb	Rasgrp1 + Thbs1 + * + Fsp1
151.2	2 random	H1	152.86 Mb	Cox4i2 + Bcl2l1 + Tpx2
140.4	3	F2	94.36 Mb	NM_025416 + Rorc + Novel
132.1	3	F3	94.37 Mb	NM_025416 + Rorc + Novel
110.4	3	H1	131.53 Mb	Pseudo + * + Pseudo + Lef1
151.2	4	A2	11.67 Mb	Pseudo + Gem + * + Cdh17
110.4	4	D1	121.605 Mb	Novel + Hey1 + Pseudo + Pabpc4
110.3	5	E5	105.14 Mb	Novel + * + Gfi1 + Novel + Evi5
K31.4	5	F	109.72 Mb	Hps4 + Q8CDD5 + Novel
132.3	5	F	122.75 Mb	Ncor2 + * + Scarb1
110.3	5	G1	138.01 Mb	Chst12 + Grifin + * + Lfng
132.8	5	G1	138.01 Mb	Chst12 + Grifin + * + Lfng
140.4	6	C1	67.95 Mb	NM_025814 + Il12rb2 + Il23r
137.2	6	C3	71.54 Mb	NM_145568 + Cd8b + Cd8a
110.4	6	D2	86.86 Mb	Tia1 + Pcbp1 + * + NM_026414 + Mad
110.2	7	A1	7.89 Mb	Slc8a2 + Dhx34 + Gpr77 + C5r1
110.4	7	A3	17.75 Mb	Nfkbib + Sirt2 + Q9D231
151.3	7	C	50.94 Mb	Novel + Klf13 + * + Trpm1
132.1	7	C	55.31 Mb	Q9CWB5 + * + Novel + Q810P9
110.4	7	F2	98.06 Mb	ADML_MOUSE + Ampd3 + Rnf141
110.2	7	F2	101.44 Mb	Spon1 + Novel + * + Copb1
151.2	7	F2	101.44 Mb	Spon1 + Novel + * + Copb1
K31.7	7	F2	101.45 Mb	Spon1 + Novel + * + Copb1
110.2	7	F4	115.86 Mb	NM_145590 + Rgs10 + Tial1
C57BLV/L3 1.1	8	E2	122.89 Mb	Tubb3 + Mela + * + Q61927 + Def8
132.1	9 random	A4	21.25 Mb	Cdkn2d + Ap1m2 + * + NM_152808
K31.5	9	E4	96.80 Mb	Ppia + Ssb4 + NM_138756 + Novel
151.2	9	F2	107.36Mb	Hemk1 + * + NM_175486 + Cacna2d2
132.3	10	A3	20.77 Mb	Novel + Ahil + Myb
K31.3	10	A3	20.89 Mb	Novel + Ahil + Myb + * + Pseudo

110.3	10	A3	20.96 Mb	Novel + Ahil + Myb + * + Pseudo
110.4	10	A3	20.96 Mb	Novel + Ahil + Myb + * + Pseudo
132.3	11	A2	11.60 Mb	NM_029171 + Zfpnl1 + Figl1 + Ddc
132.8	11	A2	11.62 Mb	NM_029171 + Zfpnl1 + Figl1 + Ddc
K31.7	11	A2	11.77 Mb	Figl1 + Ddc + Grb10
110.4	11	C	87.35 Mb	NM_172448 + Supt4h + * + Bzrap1 + Mpo
110.2	11	D	98.45 Mb	Thra + Nr1d1 + * + Casc3
110.2	11	E2	113.29 Mb	Q8C496 + Sstr2 + Cog1
151.3	11	E2	115.08 Mb	Novel + Ict1 + Atp5h
K31.5	11	E2	116.97 Mb	Pseudo + Sept9 + Pseudo
K31.4	11	E2	119.51 Mb	Nptx1 + RPOR_MOUSE + Pseudo
140.4	12	D3	80.96 Mb	Fos + Jundm2 + Batf
K31.4	13	C3	87.32 Mb	Pseudo + * + Rps23 + Apg101
132.3	14	A3	12.82 Mb	Pseudo + * + Q9D404 + Ngly1
132.8	14	B	21.81 Mb	Q8BI56 + NM_183208 + Ppif
K31.4	15	D3	62.25 Mb	Myc + * + Pvt1 + Pseudo
K31.5	15	D3	62.25 Mb	Myc + * + Pvt1 + Pseudo
132.1	15	D3	62.26 Mb	Myc + * + Pet1 + Pseudo
110.3	15	D3	62.29 Mb	Myc + * + Pet1 + Pseudo
K31.5	15	E1	75.23 Mb	Novel + * + Ly6e + Ly6i + Novel
110.2	15	E2	80.87 Mb	Novel + Cacn1i + Novel + Grap2
151.2	16	B1	16.64 Mb	Igl-5 + * + Vpreb1 + Top3b
K31.4	16	B1	18.23 Mb	Comt + Txrd2 + Gnb11
C57BLVL3 1.1	16	B5	49.71 Mb	Esrrb1 + Pseudo + * + Cd47
132.3	17	B1	28.00 Mb	Mtch1 + Fgd2 + * + Pim1
137.2	17	B1	28.00 Mb	Mtch1 + Fgd2 + * + Pim1
K31.4	17	B1	28.10 Mb	Fgd2 + Pim1 + * + Novel
C57BLVL3 1.2	17	B1	28.99 Mb	Fgd2 + Pim1 + * + Novel
108.2	17	C	43.65 Mb	Spats1 + Novel + * + Novel
110.2	17	C	45.69 Mb	NM_022015 + Ccnd3 + Pseudo
C57BLVL3 1.1	17	E1.2	63.11 Mb	Pja2 + Man2a1 + * + Q9D2E3
K24.1	18	D3	62.56 Mb	KJ85_MOUSE + * + Adrb2
K31.7	18	E2	73.16 Mb	DCC + * + O08905
K31.4	19	A	4.08 Mb	NM_026720 + Adrbk2 + Fbxl11
110.3	19	B	13.87 Mb	Novel + Tle4 + Novel + Pseudo
132.2	X	A1.1	6.20 Mb	Cacna1f + Syp + Lmo6 + Plp2
108.2	X	A4	45.09 Mb	Gpc3 + Q8C957 + * + Novel
K31.5	Y		30.55 Mb	Novel + * + NM_010245 + Novel

CHAPITRE IV

Discussion

Ce projet porte beaucoup d'informations tant au niveau des techniques employées qu'au niveau des résultats obtenus. Dans les paragraphes suivants, il sera question des problèmes et des solutions qui furent trouvées pour arriver à des résultats fiables.

Pour commencer, il a fallu travailler avec un matériel biologique abondant afin de mettre la technique des splinkerettes au point. Pour ce faire, la lignée BL/VL₃ fut utilisée. Le génome du RadLV/VL₃ n'a aucun site de restriction EcoR I (5'...G^AATTC...3'). La digestion du génome de BL/VL₃ avec l'enzyme EcoR I permet donc de déterminer le nombre d'intégrations du rétrovirus. La figure 5 représente une hybridation radioactive d'une digestion de l'ADN tumoral de la lignée cellulaire BL/VL₃ par EcoR I. L'hybridation radioactive avec une sonde moléculaire spécifique au RadLV/VL₃ permet effectivement de dénombrer les provirus. Ainsi, sachant que la lignée BL/VL₃ contient 9 intégrations rétrovirales (Rassart *et al.* 1986), il sera possible d'ajuster les paramètres des PCR des étapes qui suivent afin de retrouver toutes ces 9 intégrations lors de l'application de la technique des splinkerettes.

La figure 6 représente des résultats de PCR faites sur le clone V-12 obtenus à partir d'une intégration du RadLV/VL₃ dans la lignée BL/VL₃. Il s'agit de deux gradients de température de 10°C permettant de cibler la température d'appariement (T_m) optimale des amorces à leurs séquences complémentaires. La température optimale retenue est celle présentant le moins de bruits de fond tout en présentant des bandes claires et nombreuses. C'est pour cette raison que la température retenue est de 60.9°C même si la température à laquelle la réaction donne la plus grande quantité

d'ADN est de 63.6°C. Une PCR faite à cette dernière température présente beaucoup plus de bruits de fond que la PCR faite à 60.9°C. La première PCR et la PCR nichée présentent des bandes similaires, c'est-à-dire qu'elles sont toutes à peu près de même poids moléculaire. La différence des tailles des fragments entre la première PCR et la PCR nichée doit correspondre à environ 109 bases (différence entre les amorces dans la LTR et dans la splinkerette). Cette différence serait plus visible sur un gel d'agarose plus concentré fait avec un marqueur de poids moléculaire de 100 pb. De plus, il semble y avoir eu un problème dans le puits 2 qui présente une très forte concentration d'ADN et qui se démarque de la logique du gradient de température dans son ensemble. Il s'agit probablement d'une erreur de manipulation. Une non-spécificité de réaction est observable. Effectivement, une bande de poids moléculaire très faible est vue autant dans la première PCR que dans la PCR nichée. Il est à noter que la taille exacte du fragment à amplifier ne peut pas être déterminée étant donné que le clone V-12 n'est pas séquencé (Rassart *et al.* 1986). De plus, la position de la bande visible sur le gel ne détermine aucunement sa nature ni sa séquence.

La figure 7 démontre bien qu'il est impossible de visualiser les bandes d'ADN amplifiées lors de la première PCR peu importe la température de réaction. Il s'agit d'un gradient de température sur l'ADN de la lignée BL/VL₃. À cette étape, la concentration en MgCl₂ n'a pas encore été ajustée. La figure 8 représente un gradient de température sur une PCR nichée où la concentration de MgCl₂ n'était également pas ajustée. L'ADN utilisé ici provenait de la lignée BL/VL₃. Aucun gradient n'est observable pour la figure 7 et 8. Le seul élément marquant est une traînée d'ADN en arrière-plan qui a augmenté à la PCR nichée, comparé à la première PCR. La PCR nichée serait probablement meilleure s'il était possible de trouver une amorce nichée en U₃ de la LTR, plutôt que dans la portion U₅, comme décrit ci-dessus. La portion U₃ de la LTR est relativement unique à l'espèce virale, ce qui pourrait conférer une grande spécificité à la PCR. Cette amorce permettrait également d'obtenir des fragments d'ADN pouvant être détectés par une sonde radioactive provenant de la

région U_3 des LTR (voir ci-dessous). De plus, une PCR nichée du côté splinkerette et du côté rétroviral pourrait donner un meilleur résultat que dans le cas présent, soit une PCR nichée du côté rétroviral uniquement. Cependant, cette technique demanderait beaucoup plus de temps pour la mise au point de la réaction. Par exemple, des tests faits pour la T_m , la concentration de $MgCl_2$ et la quantité de matrice d'ADN lors de PCR nichées des deux côtés demandent beaucoup de travail.

La figure 9 permet de voir que la réaction de la PCR à la figure 7 n'est pas entièrement mise au point. Effectivement, l'observation sur gel d'agarose ne permet pas de visualiser la faible amplification des portions d'ADN flanquant les rétrovirus intégrés au génome. Une hybridation radioactive avec une sonde spécifique au produit PCR attendu permet d'amplifier le signal de ces bandes d'intérêts qui deviennent alors visibles. De plus, sachant que la lignée BL/VL₃ comporte 9 intégrations de RadLV/VL₃, il devrait être possible de dénombrer 9 bandes à la température optimale de la réaction PCR suite à l'hybridation. Il y a effectivement 9 bandes visibles au puits 9 de la figure 9, soit à une température de 69.1°C. Cette figure démontre que la technique des splinkerettes fonctionne. Les ajustements permettant de visualiser directement les bandes amplifiées sur gel d'agarose seront présentés dans les paragraphes qui suivent.

Un phénomène difficile à saisir fut que les résultats n'étaient pas reproductibles de manière stable. De petites variations étaient observables quant au rendement et à la clarté des bandes amplifiées à chaque PCR. Par exemple, une fois la T_m trouvée et la concentration en $MgCl_2$ ajustée, un nouveau gradient de T_m permettait d'obtenir une nouvelle température optimale. De plus, si un élément de réaction était mis en plus grande quantité (ADN par exemple), la non-spécificité de la réaction, soit la traînée d'ADN de fond, augmentait proportionnellement, ce qui ne permettait pas de favoriser les bandes voulues. Il en était de même pour le $MgCl_2$ et d'autres variables. La mise au point de la technique une variable à la fois fut donc

corsée. Un spectrophotomètre plus sophistiqué et plus précis pourrait faciliter de beaucoup la mise au point de la technique en ce qui concerne la quantité de matrice d'ADN à employer.

La figure 10 présente en fait un gradient de $MgCl_2$. La concentration de $MgCl_2$ optimale retenue à la figure 10 est de 3.5 mM. Une concentration de 4 mM $MgCl_2$ semble également optimale. Par contre, les non-spécificités de la réaction sont accentuées : par exemple, dans le bas des puits 6 et 7, il y a présence de plus en plus d'amplifications non spécifiques (la traînée d'ADN à l'arrière-plan augmente). Cette traînée peut rendre plus difficile la purification ainsi que le clonage des bandes. Il est intéressant de souligner que la figure 10 présente une première PCR. Comme déjà mentionné, la reproductibilité des résultats d'une manière stable fut presque impossible. Un résultat pareil sur une première PCR ne fut obtenu que quelques fois sur toute la durée de ce projet. En général, aucune bande n'était visible lors de la première PCR. Même les traînées des premières PCR variaient d'intensité. Plusieurs facteurs mentionnés au cours de ce texte pourraient expliquer ce phénomène. De plus, il est à remarquer que les bandes visibles à la figure 9 ne sont pas toutes présentes à la figure 10 malgré qu'il s'agit ici toujours de la lignée BL/VL₃.

Les figures 11 et 12 représentent respectivement un gel d'éluion migré à 40 volts toute la nuit et le résultat de l'éluion des bandes visibles. Comme mentionné, la taille des fragments ne donne aucune information sur la séquence de l'ADN de ce fragment. Il est donc impossible de déterminer où est l'intégration et se référer uniquement à la taille du fragment serait une erreur importante. Ceci implique que deux tumeurs peuvent présenter des bandes de même taille, mais qui correspondent à des intégrations rétrovirales à des endroits différents. Il peut également y avoir plusieurs intégrations virales (donc bandes) à l'intérieur d'une bande visible. Le nombre de bandes amplifiées ne fait donc que suggérer le nombre d'intégrations rétrovirales dans la tumeur. À la figure 11, c'est la bande f qui est la moins visible,

soit la bande du plus petit poids moléculaire. En général, ce sont les bandes de hauts poids moléculaires qui sont peu visibles. Ceci peut être expliqué par le manque d'efficacité de la réaction PCR à amplifier des bandes de plusieurs kpb, surtout si le cycle d'élongation lors des PCR est ajusté à 3.5 minutes, comme dans le cas présent. La Taq polymérase peut compléter 1 kb d'ADN en 1 minute environ (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada), ce qui signifie que les tailles des fragments d'ADN obtenus peuvent atteindre jusqu'à 3.5 kpb. Les facteurs pouvant avoir joué sur le nombre d'intégrations trouvées sont : 1 : la digestion par BamH I qui ne coupe pas entre toutes les intégrations rétrovirales (digestion partielle ou absence de site BamH I); 2 : la ligation de l'ADN digéré à la splinkerette implique la recombinaison de fragments d'ADN, produisant des fragments raboutés qui peuvent influencer les amplifications par PCR; 3 : les appariements des amorces à leurs sites respectifs peuvent ne pas être efficaces ni spécifiques, selon les conditions; 4 : le nombre de bandes visibles dépend de la durée du cycle d'élongation et des conditions des réactions PCR.

À la figure 13, il devrait être possible de voir des variations de 517 nucléotides entre la première PCR et la PCR nichée respective d'après les dispositions des amorces. Il est presque impossible d'observer les bandes dans les puits des premières PCR. Il est donc difficile de vérifier s'il y a réellement une différence d'environ 517 nucléotides entre les premières PCR et les PCR nichées respectives. Pour les contrôles aux puits 2, 3, une certaine amplification est observable et peut être due à la contamination ou des rétrovirus endogènes. De plus, le puits 15 devrait présenter le même patron que le puits 3, ce qui n'est pas le cas. La figure 14 confirme cependant que ces fragments ne sont pas spécifiques au RadLV/VL₃ puisque aucune bande n'est observable au puits 2 qui correspond à une première PCR faite sur C57BL/6. Les puits des PCR nichées effectuées sur la lignée BL/VL₃ (puits 5, 16 et 18) devraient également présenter le même patron (figure 13). Il est ici évident que le rendement des PCR variait beaucoup d'une fois à l'autre,

confirmant la difficulté de la mise au point des réactions présentée ci-dessus. Le puits 17 devrait présenter une bande autour de 300 bases comme le puits 21. Le puits 17 contient en fait une mauvaise sonde U_3 purifiée, probablement perdue dans les étapes de purification, mais provenant initialement de l'ADN visible au puits 21. Tout comme à la figure 13, il est impossible de différencier les bandes des premières et secondes PCR à la figure 14, où l'hybridation radioactive était faite avec une portion de U_3 dans la région de la LTR. Il est normal qu'il soit impossible d'observer les bandes des PCR nichées (amorces dans la portion U_5) à la figure 14 puisque la sonde employée provient de la portion U_3 des LTR. La PCR nichée ne contient donc aucune séquence U_3 : il faudrait comparer les fragments des PCR nichées obtenus à la figure 13 avec les hybridations des premières PCR de la figure 14 afin de voir s'il y a réellement une différence de 517 bases. Du fait même de la disposition des amorces, aucune hybridation radioactive ne devrait être visible dans les puits des PCR nichées. Cependant, ce n'est pas toujours le cas. Un exemple de ce phénomène est visible aux puits 12 et 13; le puits 12 étant la première PCR et le puits 13, la PCR nichée. À la figure 14, le puits 12 est moins hybridé que le puits 13, malgré que le puits 12 comporte une région U_3 que le puits 13 ne devrait pas comporter. Il faut également retenir que ceci pourrait être relié à la souche de souris utilisée et que les fragments rétroviraux endogènes de certaines souches, qui pourraient malencontreusement être amplifiés par PCR, hybrident plus ou moins bien avec la sonde U_3 utilisée. Cependant, aucun rétrovirus endogène ne semble avoir été amplifié puisque aucun fragment n'est observable de manière répétitive pour une souche donnée de souris. Afin de régler toutes ces ambiguïtés, il faudrait trouver une sonde radioactive spécifique à chaque PCR permettant de bien distinguer les bandes des premières PCR, des PCR nichées. La sonde employée pour ce faire fut choisie dans la portion non utilisée de la splinkerette, soit l'amorce Splink2 (oligo #591) (Figure 15).

La figure 15 sert de test dans la recherche d'une sonde radioactive (figure 16) permettant d'observer les bandes spécifiques aux intégrations de RadLV/VL₃

obtenues lors des premières PCR autant que lors des PCR nichées. L'ADN de la lignée cellulaire BL/VL₃ (puits 4 et 5) fut utilisée comme contrôle positif alors que le contrôle négatif correspond à des PCR effectuées sur l'ADN de la souche de souris C57BL/6 non infectée par le RadLV/VL₃ (puits 1 et 2). Encore une fois, il est possible de voir à la figure 15 qu'en général, aucune bande n'est visible lors de la première PCR et ce même si les conditions de la réaction furent mises au point. Ce n'est qu'à la PCR nichée qu'il est possible de différencier des bandes claires. Les témoins négatifs (puits 6 et 7) sont faits avec tous les éléments des PCR mais sans la matrice d'ADN.

C'est à la figure 16 qu'il devrait réellement être possible de vérifier si les bandes amplifiées lors de la première PCR correspondent toujours aux bandes amplifiées lors de la PCR nichée. Ceci permettrait d'éliminer tout doute concernant la spécificité d'amplification (la PCR nichée est effectuée avec l'oligo #440 (U5VL13), elle est moins spécifique que celle effectuée avec l'oligo #587 (PB/U₃) lors de la première et cela pourrait entraîner l'amplification de virus endogènes). À la figure 16, l'hybridation faite par l'oligonucléotide #591 radiomarqué (méthode de *tailing*), devrait faire ressortir tous les fragments d'ADN amplifiés avec une splinkerette, puisqu'il s'agit d'un oligonucléotide provenant de la splinkerette (Figure 4), contrairement aux oligonucléotides PB/U₃ et U₅ qui proviennent de séquences du RadLV/VL₃. Il est possible de voir que les hybridations radioactives des PCR nichées sont plus prononcées que celles des premières PCR, ce qui était attendu. De grandes traînées sont également visibles à l'arrière-plan des puits, ce qui démontre une mauvaise spécificité de la sonde. Ceci explique probablement le plus grand nombre de bandes à la figure 15 qu'à la figure 16. La figure de l'hybridation n'est également pas claire. Idéalement, il était attendu d'observer des bandes pour les puits 4 et 5, les bandes du puits 5 étant décalées de 517 pb vers le bas de la figure. Aucune bande dans les puits 2 et 3 serait également préférable, confirmant la grande spécificité de la sonde. L'absence de bandes dans les puits 6 et 7 était attendue. Le problème majeur

est que la sonde radioactive semble moins spécifique que les amorces : les bandes visibles à la figure 15 ne correspondent pas toutes aux bandes de la figure 16. Cette sonde (amorce Splink2 oligo #591) ne fut donc pas retenue.

Afin de vérifier quelle PCR a réussi à produire des fragments spécifiques aux intégrations rétrovirales en n'amplifiant pas les rétrovirus endogènes de *Mus musculus*, des oligonucléotides radiomarqués de l'amorce CAEV (oligo #627, amorce du côté de la splinkerette) ont également été synthétisés (méthode de *tailing*). Il en était de même pour l'oligonucléotide #440 (amorce du côté rétroviral). Cependant, ces oligonucléotides sont nécessairement présents sur tous les produits des PCR puisque ce sont les amorces employées lors de la PCR nichée. Ceci implique que toutes les bandes amplifiées lors des PCR, spécifiques ou non, contiennent nécessairement une ou l'autre des amorces. Il serait donc impossible de vérifier si les produits des PCR sont spécifiques aux intégrations, donc ne comportant qu'une portion rétrovirale et une partie de l'ADN génomique flanquant. Sachant que la splinkerette fut ligasée à tous les fragments d'ADN obtenus suite à la digestion par BamH I, l'oligo #627 n'est pas plus approprié pour le test de spécificité de l'hybridation radioactive, malgré que le système des splinkerettes soit conçu de manière à n'amplifier que les fragments spécifiquement amplifiés lors du premier cycle par l'amorce la plus spécifique, soit du côté rétroviral (oligo #627).

En définitive, il n'a pas été possible de vérifier si les fragments amplifiés lors de la première PCR avec l'amorce PB/U₃ (très spécifique au rétrovirus RadLV/VL₃) sont les mêmes que les fragments obtenus lors de la PCR nichée avec l'amorce #440 (moins spécifique). Effectivement, les premières PCR ne donnent pas de bandes visibles, et les hybridations radioactives ne permettent pas de tirer de conclusion claire, comme mentionné au paragraphe précédent. Une autre façon fut donc utilisée afin de vérifier si la bande amplifiée finale est une bande comportant une portion de splinkerette et une portion rétrovirale. Cependant, le résultat ne peut être vérifié qu'à

la toute fin de l'expérience, soit après le séquençage. Effectivement, les moteurs d'alignements de séquences d'ADN sur internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) permettent de vérifier si les séquences des bandes obtenues comportent les oligonucléotides voulus, soit les amorces employées lors des PCR. Le principe demeure simple. Suite au clonage dans le vecteur pDrive des produits PCR et suite au séquençage de cet ADN par des amorces situées en amont et en aval du site de clonage du vecteur, il est possible de retrouver les amorces employées lors des PCR nichées. Ces amorces sont de plus suivies de séquences connues. Du côté de l'amorce dans la portion U₅ de la LTR, une suite de 16 bases de la LTR est connue. Du côté de la splinkerette, la séquence suivant l'amorce CAEV (oligo #627) est aussi connue, soit 34 bases. Lorsque les fragments d'ADN amplifiés sont séquencés, il est possible de retrouver les amorces et la suite des bases correspondantes. Il est ainsi possible de retrouver la séquence entière de la splinkerette ainsi que la séquence de la LTR rétrovirale suivant l'oligo #440. Tous les fragments d'ADN comportant ces deux séquences sont nécessairement reliés à des intégrations rétrovirales de RadLV/VL₃. Par contre, si l'oligo #440 en U₅ est non spécifique et réussit à s'apparier à une séquence génomique quelconque qui possède la suite des bases de la LTR rétrovirale (rétrovirus endogène), et qu'un site BamH I permette à la splinkerette de se lier non loin de cette séquence, des bandes seraient visibles suite aux PCR. Cependant, ces bandes devraient être visibles dans toutes les tumeurs de la même souche de souris. De plus, tous les sites communs d'intégrations répertoriés sont criblés contre le génome du RadLV/VL₃ afin de s'assurer que le produit final de PCR n'est pas du rétrovirus. Advenant le cas que certains fragments d'ADN amplifiés par PCR aient une séquence similaire au génome rétroviral, ils correspondraient à des rétrovirus endogènes ou à des recombinaisons suivant la ligation lors de l'étape 2.5. Le rétrovirus RadLV/VL₃ entier fut également aligné contre le génome de la souris afin d'éliminer les sites potentiels de rétrovirus endogènes à la souris (Annexe M). Tenant compte de tous ces faits, si 2 tumeurs comportent une intégration rétrovirale au même endroit et que les séquences des bandes amplifiées ne sont pas identiques ou qu'elles

sont décalées une par rapport à l'autre, il est possible de dire que la séquence retrouvée correspond à la définition d'un site commun d'intégration.

Certaines bandes non présentées ne démontraient aucune présence des séquences LTR en U₅ ni de la splinkerette. Ces bandes ne furent pas retenues dans les tableaux. Les tumeurs qui présentaient seulement une des deux séquences recherchées furent également rejetées. Les séquences présentant une portion d'une ou l'autre des séquences recherchées furent gardées si elles ne contenaient pas de portions rétrovirales. Effectivement, plusieurs séquences présentaient un réarrangement d'ADN génomique de souris et d'ADN rétroviral. De plus, il arrive fréquemment qu'une ou deux bases ne soient pas identiques aux séquences des amorces. Il s'agit le plus souvent des bases à l'interface splinkerette-ADN génomique, ainsi qu'à l'interface où la LTR rétrovirale et l'ADN génomique se lient. Ceci peut s'expliquer par des mutations lors de la transformation bactérienne, des bris lors de la manipulation de l'ADN et de l'exposition aux rayons UV, des erreurs de séquençage, des mutations dues aux caractères tumoraux des cellules analysées, ainsi qu'à des erreurs lors de la polymérisation des brins d'ADN complémentaires par la Taq polymérase employée lors des PCR.

Il est très important de se souvenir que les résultats présentés au tableau I sont préliminaires. Il s'agit de plus d'un résumé de toutes les séquences obtenues. Effectivement, le nombre total de clones séquencés était plus de 107 et le nombre total de tumeurs analysées était de 23. Il ne faut donc pas poursuivre ce projet en prenant pour acquis que les résultats présentés sont suffisamment analysés. Tous les sites communs d'intégration d'intérêt répertoriés dans ce tableau devraient être vérifiés par des PCR et des Southern permettant de les confirmer par une autre méthode. Les résultats présentés ici furent obtenus suite à un travail en chaîne effectué dans le but de séquencer le maximum possible de bandes amplifiées par PCR. Qui plus est, il faudrait soumettre à nouveau toutes les séquences obtenues sur

le site internet <http://www.ensembl.org>. Effectivement, comme déjà mentionné, la séquence du génome de la souris est continuellement mise à jour et rajustée. Il faut donc s'assurer que tous les sites répertoriés se trouvent toujours aux mêmes endroits.

Tous les fragments d'ADN présentés au tableau I furent clonés, séquencés et triés en fonction de leurs positions chromosomiques. Les oncogènes répertoriés dans la base de donnée sur le site internet <http://rtcgd.ncifcrf.gov/> près des sites communs d'intégration relevés lors de ce projet sont : Notch1, Rasgrp1, Rorc, Lef1, Gfi1, Ncor2, Scarb1, Lfng, Mad, Myb, Ahi1, Supt4h, Bzap1, Sept9, Fos, Jundm2, Myc, Pim1, Ccnd3, Bcl2l1, Gpc3 (indiqués en rouge). Les tumeurs C57BLVL3 1.1, C57BLVL3 1.2, 108.2, 137.2 proviennent de la souche de souris C57BL/6, les tumeurs K24.1, K31.3, K31.4, K31.5, K31.7, 110.2, 110.3, 110.4, 132.1, 132.2, 132.3, 132.8, 140.4, 151.2, 151.3 proviennent de souris SIM.R.

De toutes les tumeurs analysées, plusieurs sites communs ont déjà été répertoriés (Annexes I et J). Cependant, au tableau I, seulement les sites communs sur les chromosomes 7 et 11 furent retenus comme étant encore non associés à des intégrations rétrovirales. Après plusieurs analyses des séquences, il s'est avéré que certaines séquences étaient pareilles (Annexe N). Effectivement, plusieurs clones d'une même tumeur mais de différentes bandes éluées présentent des séquences identiques ou des portions de séquences identiques. Ceci s'explique surtout par le fait que lors de l'éluion des bandes, il y a parfois contamination d'une bande par une autre. Donc, lorsqu'une bande est clonée, il se peut que ce soit la contamination qui est clonée. Cette contamination d'une bande par l'autre ne paraît pas toujours sur les gels de vérification des bandes clonées et c'est pourquoi il est avantageux de séquencer la majorité des bandes qui proviennent de clones positifs.

4.1 Sites d'intégration sur le chromosome 7, position F2

À la lumière de ce qui précède, deux sites communs d'intégration rétrovirale furent identifiés loin de tout oncogène répertorié sur le site internet <http://rtcgd.ncifcrf.gov/>. Il s'agit de sites identifiés à plusieurs reprises sur le chromosome 7 à la position F2 (Spon1, un nouveau gène, Copb1) et sur le chromosome 11 à la position A2 (Zfpn1a1, Fign11, Ddc, Grb10) (Tableau I). Cependant, suite à des analyses plus poussées, il s'est avéré que les séquences retrouvées sont déjà répertoriées sur le site internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Effectivement, Hansen *et al.* 2000 ont associé la séquence retrouvée lors de ce travail au site commun d'intégration Lvis2.

Dans le cas des intégrations au niveau du chromosome 7, des travaux sur des souris AKXD ont permis de répertorier plusieurs sites communs d'intégration dont Lvis2 (Hansen *et al.* 2000). Les souris AKXD sont des souris consanguines qui développent spontanément une panoplie de cancers hématopoïétiques. Ces cancers sont causés par des intégrations rétrovirales somatiques qui changent l'expression de proto-oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs (Gilbert *et al.* 1993; Mucenski *et al.* 1986, 1987). La souche AKXD dérive du croisement des souches AKR/J et DBA/2J. Les souris AKR/J présentent une fréquence élevée de développement de lymphomes spontanés, surtout des lymphomes de cellules T à l'âge de 7 ou 9 mois (Gilbert *et al.* 1993). Ces lymphomes sont associés à l'expression de deux loci du provirus MuLV endogène écotrope, soit le Emv-11 et le Emv14. Emv-13 est un autre locus de rétrovirus endogène mais celui-ci semble être défectif (Copeland *et al.* 1984). Les plus hauts taux de tumorigenèse spontanée sont de 67% (42 de 63 souris) de la souche AKXD-18 à l'âge de 18 mois (Hansen *et al.* 2000).

Lorsque Hansen *et al.* (2000) ont identifié Lvis2, ils précisent que sa séquence se retrouvait au site du marqueur *D7Mit237* dans le *Mouse Genome Database* de 1999. Ils indiquent que trois gènes sont reliés à ce marqueur. Il s'agit du gène *Stim1* (*Stromal Interaction Molecule 1*), *Ptpn5* (*Protein Tyrosine Phosphatase, Nonreceptor type 5*) et le *Sox6* (*SRY-box containing gene 6*) (Hansen *et al.* 2000). *Sox6* et *Ptpn5* ont des fonctions d'oncogènes. *Stim1* semble être impliqué dans la promotion de la survie des cellules pré-B en culture (Oritani & Kincade 1996). Même si peu d'information est disponible sur la fonction du gène *Stim1*, il semble être un candidat intéressant comme gène impliqué dans la maladie (Hansen *et al.* 2000). De plus, l'homologue humain de *Stim1*, soit *STIM1* (*Stromal Interaction Molecule 1*) est une phosphoprotéine transmembranaire de la surface cellulaire identifiée comme étant un suppresseur de croissance tumorale (Manji *et al.* 2000; Parker *et al.* 1996; Sabbioni *et al.* 1997; Williams *et al.* 2002).

En ce qui concerne le gène *Sox6* et le site *Lvis2*, ils furent situés au même endroit (Hansen *et al.* 2000). Cependant, en 2005, le séquençage complet du génome de la souris permet de voir que le gène *Sox6* est repositionné plus en aval sur le chromosome 7, soit à environ 102.76 Mb, à la position F3 (<http://www.ensembl.org>). Par contre, aujourd'hui, la séquence exacte de positionnement de *Lvis2* est située sur le chromosome 7 à la position F2 et à 101.44 Mb (<http://www.ensembl.org>). Une distance de 1.32 Mb sépare donc l'ancien positionnement du nouveau, ce qui est trop grand pour être défini comme le même site d'intégration. Plusieurs auteurs mentionnent cependant que les intégrations rétrovirales peuvent se faire à de grandes distances (Bartholomew *et al.* 1991; Denicourt *et al.* 2003; Hansen & Justice 1999; Lammie *et al.* 1992; Landais *et al.* 2005 (en soumission); Sola *et al.* 1988; Tschlis *et al.* 1989, 1990; Varmus 1982) et ce jusqu'à 300 kpb (Lazo *et al.* 1990). De plus, le marqueur *D7Mit237*, étant également associé à *Lvis2* par Hansen *et al.* (2000), se trouve présentement au niveau de F3 à la position 103.12 Mb du chromosome 7. *Sox6* englobe la séquence de *D7Mit237*. Deux autres gènes, soit *Stim1* et *Ptpn5* on

aussi été identifiés à proximité de Lvis2 par Hansen *et al.* (2000). Il fut vérifié que le gène Stim1 est situé au niveau de F1 à la position 89.93 Mb sur le chromosome 7, tandis que le gène Ptpn5 est aujourd'hui au niveau de B2 à la position 34.48 Mb sur le chromosome 7. À la lumière de ces résultats, il est possible de conclure que les positions des gènes furent réajustées depuis le travail de Hansen *et al.* (2000). Toutes ces ambiguïtés permettent de dire que les gènes et oncogènes potentiels activés par l'intégration au site Lvis2 n'ont pas été réellement identifiés. Il serait ainsi possible de vérifier quels gènes sont réellement affectés par des intégrations rétrovirales à sa proximité. Ces gènes pourraient être de nouveaux oncogènes.

Il semble donc que le site d'intégration Lvis2 soit repositionné sur le chromosome 7 à la position F2 au niveau de Spon1, un nouveau gène, ainsi que Copb1. Spon1 (*Spondin-1*), code une protéine *f-spondin* de la matrice extracellulaire. En 2001, Terai *et al.* mentionnent que la *f-spondin* peut inhiber l'angiogénèse. De plus, Spon1 semble impliqué dans les liaisons aux protéines, l'adhésion cellulaire et le développement (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=233744). Copb1 (*Coatmer Protein Complex, Subunit Beta 1*) semble être une protéine impliquée dans le transport cellulaire (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=70349).

4.2 Sites d'intégrations sur le chromosome 11, position A2

Lors de recherches plus poussées dans Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>) sur les intégrations près des gènes sur le chromosome 11 à la position A2 (Zfpn1a1, Figl1, Ddc, Grb10) (Tableau I), il s'est avéré que le gène Zfpn1a1 (*Zinc Finger Protein, Subfamily 1A, 1*) (aussi nommé Ikaros) fut déjà associé au développement de leucémies de type T par intégrations

rétrovirales chez la souche de souris N^{ic} ayant le gène Notch actif constitutivement (Beverly & Capobianco 2003). En fait, le locus Ikaros est réarrangé dans 40% des tumeurs engendrées par le MoMuLV (Beverly & Capobianco 2003). Ikaros est un régulateur transcriptionnel critique dans le développement de toutes les cellules lymphoïdes (Beverly & Capobianco 2003; Georgopoulos *et al.* 1994; Wang *et al.* 1996). Ikaros est exprimé sous diverses isoformes qui relèvent d'épissages alternatifs (Beverly & Capobianco 2003). Toutes les isoformes contiennent 2 doigts de zinc liant les protéines, mais un nombre variable de doigts de zinc liant l'ADN (Hahm *et al.* 1994; Molnar & Georgopoulos 1994). Les souris hétérozygotes pour une certaine isoforme d'Ikaros développent des leucémies de type T agressives (Winandy *et al.* 1995). Ceci semble démontrer qu'une inhibition du fonctionnement normal d'Ikaros peut être en relation avec la progression de la leucémie et des lymphomes humains (Beverly & Georgopoulos 1994).

En ce qui a trait au gène Ddc (*Dopa Decarboxylase*), aucune information pertinente ne fut trouvée en rapport avec ce projet. La *Dopa Decarboxylase* est une enzyme nécessaire à la synthèse de neurotransmetteurs monoaminergiques tels la dopamine, noradrénaline, adrénaline et sérotonine (Børglum *et al.* 2003; Christenson *et al.* 1972). Ce gène a été associé à des cancers humains. Effectivement, ce gène sert de marqueur dans la détection de neuroblastomes (Bozzi *et al.* 2004) et de micro métastases de cancers gastriques dans le péritoine (Sakakura *et al.* 2004). Le gène *Figln1 (Fidgetin-Like 1)* n'a jusqu'ici pas été associé au développement tumoral. Il s'agit d'un gène codant une protéine membre de la famille de protéines AAA (Yang *et al.* 2005). Cette famille de protéines correspond à un grand groupe d'ATPases similaires aux chaperonnes qui facilitent l'assemblage et le désassemblage de complexes de macro protéines. Les protéines AAA ont plusieurs fonctions cellulaires dont la fusion des membranes et le transport vésiculaire menant à la biogenèse de péroxisomes et à la protéolyse (Lupas & Martin 2002).

Grb10 (*Growth Factor Receptor Bound Protein 10*) présente plusieurs caractéristiques d'oncogène. Premièrement, il s'agit d'un récepteur de facteur de croissance souvent associé à la classe II des oncogènes. Le Grb10 est impliqué dans le syndrome Russell-Silver (MIM 180860). Il s'agit d'une maladie génétique rare entraînant un retard de croissance prénatal, d'une croissance exagérée d'une moitié du corps (hémihypertrophie) et de traits inhabituels du visage (Blagitko *et al.* 2000; Børglum *et al.* 2003; Yoshihashi *et al.* 2000). Dans une expérience sur des cellules transformées par l'adénovirus 12 tumorigène (*Adenovirus 12 transformed cells*), Guan *et al.* (2003) ont découvert que Grb10 était surexprimé, comparé à Grb10 dans des cellules transformées par l'adénovirus 5 non tumorigène. Leur expérience consistait en l'analyse de 242 gènes par la technique des microarrays (Guan *et al.* 2003). En 2003 toujours, Casas *et al.* ont découvert que les gènes GRB10 et JUN sont sous exprimés chez des patients ayant la forme aiguë de la leucémie myéloïde tandis que ces mêmes patients ont les gènes TP53 et CDKN2A surexprimés. En 2005, Pantoja *et al.* ont découvert que Grb10, ainsi que d'autres gènes tels *Cdkn1c*, *Igf2*, *H19*, *Ndn1*, et *Meg3*, sont inactivés lors d'une induction de stress cellulaire et de tumorigenèse. Suivant tous ces résultats variables, il serait intéressant d'observer l'effet d'une intégration de RadLV/VL₃ dans le chromosome 11, au niveau A2 aux alentours de 11.82 Mb en faisant des tests sur l'expression des gènes.

4.3 Oncogènes connus relevés

Plusieurs gènes connus pour être impliqués dans la formation de cancers furent également identifiés lors de ce projet. Les gènes mentionnés ici sont ceux répertoriés sur le site internet <http://rtcgd.ncicrf.gov/>. Il est possible de remarquer les gènes suivants : Notch1, Rasgrp1, Rorc, Lef1, Gfi1, Ncor2, Scarb1, Lfng, Mad, Myb, Ahi1, Supt4h, Bzrap1, Sept9, Fos, Jundm2, Myc, Pim1, Ccnd3, Bcl2l1, Gpc3. Tous

les gènes non décrits dans l'introduction seront très brièvement décrits dans les paragraphes qui suivent.

4.3.1 Rasgrp1

Chez la souris, *Rasgrp1* (*RAS Guanyl Releasing Protein 1*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=19419) se trouve à la position E5 du chromosome 2 entre 117.02 Mb et 117.13 Mb environ (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?seq_region_right=118176758&click_right=895&click_left=110&seq_region_strand=1&seq_region_name=2&seq_region_left=117176759&highlight=BLAST_NEW%3ABLA_bGHR11A10%21%2120040902&seq_region_width=2385&click.x=206&click.y=20). Chez l'humain, ce gène se trouve à la position 15q15 sur le chromosome 15 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Le nom du site commun d'intégration qui est associé à cet oncogène est Evi18 (<http://rtcgd.ncifcrf.gov/>; Mikkers *et al.* 2002). Dans leur étude, Kim *et al.* (2003) ont déterminé que *Rasgrp1* était un des deux gènes les plus affectés dans les tumeurs analysées. Le second gène était *Rras2/TC21*. Ensemble, ils comptaient pour 30% des sites d'intégrations répertoriés (Kim *et al.* 2003). La technique employée par cette équipe afin d'identifier cet oncogène fut celle des IPCR (Li *et al.* 1999) et le matériel de travail était des lymphomes de cellules T induits par le rétrovirus murin SL3-3 (SL3) après 2 à 4 mois post-inoculation (Hays & Bristol 1992; Kim *et al.* 2003; Nieves *et al.* 1997). Cependant, Kim *et al.* (2003) mentionnent que ce gène n'est pas reconnu comme étant impliqué dans la tumorigenèse chez l'homme.

4.3.2 Rorc

Chez la souris, *Rorc* (*RAR-Related Orphan Receptor Gamma*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Gra>

phics&list_uids=19885) se trouve sur le chromosome 3 à la position F2 entre 94.36 Mb et 94.38 Mb environ (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=3&vc_start=94360954&vc_end=94363381&highlight=BLAST_NEW:BLA_eBPdBc1Tr!!20041112). Chez l'humain, RORC est situé sur le chromosome 1 à la position 1q21. Le nom du site commun d'intégration qui est associé à cet oncogène est Rorc. Une équipe a identifié ce gène comme impliqué dans les lymphomes de cellules T causé par le TBLV (*Type B Leukemogenic Virus*) qui ressemble à 98% au MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*). La seule différence entre ces deux virus réside en une délétion de 440 pb dans la portion U₃ du LTR du MMTV (Broussard *et al.* 2004). Le locus Rorc code pour deux isoformes d'une protéine, soit Rory et l'isoforme spécifique au thymus, Roryt. Ces deux isoformes sont membres de la superfamille du récepteur hormonal nucléaire, qui inclut les facteurs de transcription régulés par des ligands et des récepteurs sans ligands spécifiques associés (Broussard *et al.* 2004; Stehlin-Gaon *et al.* 2003). Rory est également connu sous le nom de RORC, RZR, le récepteur orphelin du thymus et le récepteur nucléaire 1F3 (Medvedev *et al.* 1996, 1997; Ortiz *et al.* 1995). Rory et Roryt sont des protéines reliées utilisant des promoteurs distincts et se distinguant uniquement par leur extrémité amino terminale (He *et al.* 1998; Jetten *et al.* 2001; Villey *et al.* 1999). Les souris knockout de Rory n'expriment plus aucune isoforme de Rorc et n'ont pas de plaques de Peyers ni de nodules lymphatiques, ce qui démontre un rôle de Rory/yt dans la formation du système lymphatique (He *et al.* 2000; Kurebayashi *et al.* 2000; Sun *et al.* 2000). Ces souris ont également une baisse de 75% du taux normal des cellules T et une baisse importante de l'expression du gène antiapoptotique Bcl-XL (Kurebayashi *et al.* 2000; Sun *et al.* 2000).

4.3.3 Lef1

Lef1 (*Lymphoid Enhancer Binding Factor 1*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=16842)

se trouve sur le chromosome 3 chez la souris, à la position H1 entre 131.69 Mb et 131.81 Mb environ (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=3&vc_start=131530201&vc_end=131532366&highlight=BLAST_NEW:BLA_DnkKMZKo0!!20050301). Chez l'humain, LEF1 est situé sur le chromosome 4 à la position 4q23-q25. Le nom du site commun d'intégration qui est associé à cet oncogène est Lef1. Dans une étude, 2 intégrations rétrovirales du rétrovirus murin SL3-3 (SL-3) furent identifiées à l'intérieur de la portion codante de ce gène (Kim *et al.* 2003). Lef1 est associé avec la voie de signalisation Wnt (Zorn *et al.* 1999), déjà identifiée comme étant impliquée dans le développement de lymphocytes (Li *et al.* 2002; Okamura *et al.* 1998). Il se peut donc que la voie de signalisation Wnt, par l'intermédiaire de Lef1, soit impliquée dans les lymphomes, même chez l'humain (Kim *et al.* 2003). Lef1 est membre de la famille des facteurs de cellules T (TCF : *T-Cell Factor*) des protéines HMG (*High-Mobility Group*) qui interagissent avec la β -caténine (Kim *et al.* 2003). Sox3 et Sox4 furent également identifiés comme oncogènes et les protéines qu'ils codent sont aussi membres de la famille des HMG (Suzuki *et al.* 2002; Xia *et al.* 2000; Zorn *et al.* 1999), ce qui porte à croire que les protéines HMG sont impliquées dans le développement des tumeurs hématopoïétiques (Kim *et al.* 2003).

4.3.4 Gfi1

Gfi1 (*Growth Factor Independent 1*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=14581), chez la souris, est situé sur le chromosome 5 à la position E5 entre 105.15 Mb et 105.16 Mb environ (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=5&vc_start=105140991&vc_end=105143316&highlight=BLAST_NEW:BLA_7HiISNo5e!!20050209). Chez l'humain, GFI1 est situé sur le chromosome 1 à la position 1p22. Le nom du site commun d'intégration qui est associé à cet oncogène est Gfi1. Ce facteur de transcription fut identifié précédemment comme étant un gène cible fréquent dans la

formation de lymphomes de cellules T par MoMuLV (Kim *et al.* 2003; Selten *et al.* 1984; Van Lohuizen *et al.* 1991). En comparant la fréquence de réarrangement de Myc et de Gfi1, il a été vérifié que Myc est réarrangé dans 4 tumeurs, contre une où Gfi1 est réarrangé. Il peut s'avérer qu'une intégration de MuLV dans ces loci produit des lymphomes de manières très différentes (Kim *et al.* 2003). Gfi1 fut déjà identifié par la technique des splinkerettes comme étant impliqué dans la leucémie chez des souris transgéniques E μ Myc ne présentant pas l'expression de Pim1 ni de Pim2 (Mikkers *et al.* 2002). Lors de travaux sur les souris AKXD, Gfi1 fut également répertorié comme site commun d'intégration (Hansen *et al.* 2000; Suzuki *et al.* 2002). Hwang *et al.* (2002) ont trouvé que les intégrations dans Gfi1 et Pim1 se font à la même fréquence chez les souris p27^{-/-} et p27^{+/+} lors d'expériences menées sur le virus MoMuLV. Ils mentionnent cependant que la perte de p27 n'augmente pas la fréquence de formation de lymphomes (Hwang *et al.* 2002).

4.3.5 Ncor2

Ncor2 (*Nuclear Receptor Co-Repressor 2*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=20602) se trouve à la position F entre 122.55 Mb et 122.72 Mb sur le chromosome 5 chez *Mus musculus* http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=5&vc_start=122749321&vc_end=122752250&highlight=BLAST_NEW:BLA_TVVT432dE!!20040928). Chez l'humain, ce gène est situé sur le chromosome 12 à la position 12q24. Le site d'intégration qui lui est associé est Btl40 (<http://rtcgd.ncifcrf.gov/>). Ncor2 fut associé à la formation de tumeurs chez des souris AKXD et le site d'intégration qui lui fut associé dans ce cas est Evi69 (Suzuki *et al.* 2002). Le rétrovirus recombinant MoMuLV/PDGFB (*Moloney Murine Leukemia Virus* codant le *Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) B-Chain*) (Uhrbom *et al.* 1998) fut associé au gène Ncor2 lors d'une étude portant sur des tumeurs du cerveau chez la souris (Johansson *et al.* 2004).

4.3.6 Scarb1

Scarb1 (*Scavenger Receptor Class B, Member 1*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=20778) se trouve sur le chromosome 5 à la position F entre 122.81 Mb et 122.88 Mb chez la souris (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=5&vc_start=122749321&vc_end=122752250&highlight=BLAST_NEW:BLA_TVVT432dE!!20040928). Chez l'humain, ce gène est situé à la position 12q24.31 sur le chromosome 12. Le site d'intégration qui lui est associé est Btl40, comme pour Ncor2.

4.3.7 Lfng

Lfng (*Lunatic Fringe Gene Homolog*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=16848), chez la souris, est situé sur le chromosome 5 à la position G1 entre 138.02 Mb et 138.03 Mb environ (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=5&vc_start=138009110&vc_end=138011601&highlight=BLAST_NEW:BLA_VW5o4OaSm!!20050212). Chez l'humain, ce gène se trouve à la position 7p22 sur le chromosome 7. Le site commun d'intégration qui lui est associé est Evi72. Il fait partie de la famille des protéines de signalisation cellulaire du type Notch et fut identifié chez des souris AKXD (Suzuki *et al.* 2002). Il s'avère effectivement qu'une partie du promoteur du Lfng entraîne une expression périodique du PSM (*Presomitic Mesoderm*). Le PSM est une zone terminale de croissance à partir de laquelle les cellules bourgeonnent pour former les somites, soit des structures métamériques d'embryons vertébrés. De plus, il fut démontré que la famille Notch joue un rôle important dans la somitogenèse (Morales *et al.* 2002). L'équipe de Morales *et al.* (2002) démontrent une relation entre la perte de l'expression du PSM et l'absence totale de signalisation de Notch. Ils ont démontré que l'expression cyclique de Lfng du PSM de souris et du poulet est contrôlée au niveau de l'initiation transcriptionnelle indiquant l'implication cyclique

du promoteur de *Lfng* dans le développement embryonnaire. Ils ont de plus identifié une région de 2.3 kb du locus *Lfng* qui contrôle la transcription cyclique dans le PSM tout en contrôlant simultanément l'ARNm de *Lfng*. Cette région de 2.3 kb est fortement conservée chez l'humain et la souris, et elle comporte des séquences qui contrôlent l'activation et la répression de l'expression de *Lfng* tout en ayant des rôles différents dans diverses régions du PSM. Ils concluent de leurs résultats que Notch agit directement et indirectement sur l'expression cyclique de *Lfng* (Morales *et al.* 2002).

4.3.8 Mad

Ce gène est situé sur le chromosome 6 à la position D2 entre 86.99 Mb et 87.01 Mb chez la souris (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=6&vc_start=86860845&vc_end=86863011&highlight=BLAST_NEW:BLA_QS9IjpBJV!!20050209). La séquence de Mad murin à 85.5% d'homologie avec la séquence d'*Homo Sapiens* (Västrik *et al.* 1995). La famille Mad comporte les protéines Mad1, Mx11, Mad3, Mad4 et Mnt/Rox (Grinberg *et al.* 2004). Mad peut avoir des effets de régulation négative de l'expression de Myc suite à la formation d'hétérodimères avec la protéine Max durant la différenciation des monocytes (Wolff 1997). Comme le mentionne Västrik *et al.* (1995), Mad est une protéine simple zipper-leucine de forme hélice-boucle-hélice. Il s'agit d'un facteur de transcription. Alors que l'expression de Myc est essentielle pour la multiplication cellulaire, l'expression de Mad est induite lors de la différenciation de quelques lignées cellulaires leucémiques. Lors de l'organogenèse des embryons de souris, Mad est exprimé à plusieurs endroits différents dans le temps (Västrik *et al.* 1995). Il a été démontré également que Mad inhibe la transcription de promoteurs contenant la séquence CACGTG (Ayer *et al.* 1993). Des chercheurs ont montré que lors de l'induction de la différenciation de monocytes/macrophages chez des cellules leucémiques U937, l'expression de l'ARNm de Mad fut augmentée en même temps qu'une baisse de l'expression de

l'ARNm de c-Myc fut notée (Ayer & Eisenman 1993; Larsson *et al.* 1994; Zervos *et al.* 1993). Grinberg *et al.* (2004) mentionnent qu'avec la participation de Myc, Mad joue un rôle important dans le contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire. Mad et Mx11 semblent impliquées dans le développement puisqu'elles contrebalancent les effets positifs du gène Myc sur la croissance et promeuvent l'arrêt de la multiplication cellulaire suite à la différenciation cellulaire (Västrik *et al.* 1995).

4.3.9 Myb

Chez la souris, Myb (*Myeloblastosis Oncogene*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=17863), est situé sur le chromosome 10 à la position A3 entre 20.82 Mb et 20.87 Mb environ (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=10&vc_start=20959910&vc_end=20962109&highlight=BLAST_NEW:BLA_SV1IcC2I!!20040928). Chez l'humain, ce gène est situé à la position 6q22-23 sur le chromosome 6. Le site commun d'intégration qui lui est associé est Myb. Le gène Myb code pour un facteur de transcription (Kim *et al.* 2003). Il s'agit d'un gène fortement impliqué dans l'oncogenèse des cellules T (Badiani *et al.* 1996). Mikkers *et al.* (2002) ont identifié ce gène par la technique des splinkerettes dans des tumeurs induites par le MoMuLV. Ils ont également associé cet oncogène au gène Hbs11 suite à l'identification du site d'intégration Dkmi19 (Mikkers *et al.* 2002). Wolff (1997) mentionne que le gène v-Myb chez le virus aviaire ALV (*Avian Leukosis Virus*) proviendrait du même gène endogène au poulet. Le gène c-Myb fut identifié chez des souris BXH-2 leucémiques (Wolff 1997). Lors de leucémies de type MML (*MuLV-Induced Myeloid Leukemia*), le proto-oncogène c-Myb est le gène le plus ciblé par les virus (Mukhopadhyaya & Wolff 1992; Nazarov & Wolff 1995; Shen-Ong & Wolff 1987; Wolff *et al.* 1991). Il a également été démontré que ce gène est victime d'une intégration rétrovirale très tôt dans les étapes pré-leucémiques (Nason-Burchenal & Wolff 1993) et qu'une inflammation chronique est nécessaire à la progression

néoplasique des cellules ayant le gène c-Myb activé (Nason-Burchenal & Wolff 1992, 1993). Dans les leucémies murines promonocytiques, les intégrations les plus fréquentes ont lieu dans les introns 2 ou 3 et dans les transcrits d'ARN, qui commencent dans le LTR et s'étendent jusqu'à c-Myb. À cet endroit, ils subissent un épissage au niveau de *gag* et le site suivant disponible dans Myb (début de l'exon 2 ou 4). Ceci correspond à une insertion de promoteur où non seulement le promoteur de transcription/amplification de c-Myb est ignoré, mais l'arrêt de transcription au niveau de l'intron 1 est également évité (Bender *et al.* 1987; Reddy & Reddy 1989; Shen-Ong & Wolff 1987; Watson 1988; Wolff *et al.* 1991). Le rôle de l'oncogène c-Myb dans les maladies myéloïdes demeure le plus étudié (Introna *et al.* 1994; Luscher & Eisenman 1990).

4.3.10 Ahi1

Ahi1 (*Abelson Helper Integration Site*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=52906), est situé sur le chromosome 10 chez la souris, à la position A3 entre 20.65 Mb et 20.78 Mb environ (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=10&vc_start=20959910&vc_end=20962109&highlight=BLAST_NEW:BLA_SV11IcC2!!!20040928). Chez l'humain, ce gène est situé à la position 6q23.3 sur le chromosome 6. Le site commun d'intégration qui lui est associé est Myb. Lors de travaux sur le rétrovirus murin SL3-3, Ahi1/Epi1 (site commun d'intégration nommé Si23) fut identifié à environ 30 kb à 40 kb en direction 3' de Myb (Blaydes *et al.* 2001; Jiang *et al.* 1994), grâce à la technique des IPCR (Kim *et al.* 2003). Blaydes *et al.* (2001) et Jiang *et al.* (1994) précisent cependant que Myb n'est pas affecté par une intégration rétrovirale au niveau de Ahi1.

4.3.11 Supt4h

Supt4h (*Suppressor of Ty 4 Homolog 1*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=20922), est situé sur le chromosome 11 à la position C entre 87.33 Mb et 87.34 Mb environ chez *Mus musculus*. (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=11&vc_start=87310966&vc_end=87313798&highlight=BLAST_NEW:BLA_4pD9Y6cig!!20040907). Ce gène est retrouvé sur le chromosome 17 à la position 17q21-q23 chez l'humain. Le site d'intégration associé à ce gène fut nommé Evi159. Il fut déjà identifié par la technique des splinkerettes (Mikkers *et al.* 2002). Le gène SUPT4H humain code pour une protéine de 117 acides aminés identique à Supt4h. Normalement, Supt4h vient d'un épissage de 5 exons situés sur le chromosome 11. Cependant, il existe une séquence similaire au gène Supt4h sur le chromosome 10 codant pour un gène sans introns nommé Supt4h2, possédant une région contrôle en 5' différente (Chiang *et al.* 1998). L'équipe de Chiang *et al.* (1998) a testé 4 tissus (embryon de souris de 17 jours; cerveau, cœur et foie de souris adulte) qui expriment les deux gènes. Supt4h2 code pour une protéine de 117 acides aminés et ne diffère de Supt4h que par un acide aminé : ceci porte à croire que ces séquences sont un exemple de convergence de gènes. Par contre, il n'y a aucune homologie entre le promoteur de Supt4h et Supt4h2, d'où ces deux gènes peuvent présenter 2 profils différents d'expression. Les gènes Supt4h et Supt4h2 sont très similaires autant dans leurs portions codantes que non codantes. L'intérêt de la ressemblance entre Supt4h et Supt4h2 est qu'ils sont similaires dans leurs portions non traduites, ce qui n'est pas observable dans le cas des histones par exemple, qui elles aussi ont des caractéristiques de convergence de gènes. Ces caractéristiques semblent souligner l'importance des régions non traduites dans la fonction du gène Supt4h (Chiang *et al.* 1998).

4.3.12 Bzrap1

Bzrap1 (*Benzodiazapine Receptor Associated Protein 1*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=207777) est situé sur le chromosome 11 à la position C chez la souris, entre 87.36 Mb et 87.39 Mb environ (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=11&vc_start=87310966&vc_end=87313798&highlight=BLAST_NEW:BLA_4pD9Y6cig!20040907). Chez l'*Homo Sapiens* BZRAP1 est situé sur le chromosome 17 à la position 17q22-q23. Le site commun d'intégration qui lui est associé est Evi159 (<http://rtcgd.ncifcrf.gov/>). Ce site d'intégration est associé à Supt4h2.

4.3.13 Sept9

Chez la souris, Sept9 (*Septin 9*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=53860), est situé sur le chromosome 11 à la position E2 entre 116.96 Mb à 117.03 Mb environ (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=11&vc_start=116967648&vc_end=116970164&highlight=BLAST_NEW:BLA_hpNKJAVcR!!20050131). Le site commun d'intégration qui lui est associé est Sint1. Chez l'humain, SEPT9 est localisé sur le chromosome 17 à la position 17q25. En 2000, Sørensen *et al.* ont identifié Sint1 dans 2 tumeurs sur 20 comme site d'intégration du MuLV SL3-3, causant des lymphomes de cellules T (Sørensen *et al.* 1996). Ce gène fut ciblé par une intégration rétrovirale chez la souche de souris AKXD. Sept9 est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, soit au moment de la division cellulaire (Sørensen *et al.* 2002; Suzuki *et al.* 2002). Sørensen *et al.* (2002) et Suzuki *et al.* (2002) mentionnent que Sint1 est l'homologue murin de MSF (*MLL Septin-Like Fusion*) identifié comme un gène de fusion partenaire de MLL avec t(11;17)(q23;q25) (Osaka *et al.* 1999; Taki *et al.* 1999) dans la maladie AML (*Acute Myeloid Leukemia*) qui s'associe avec la région commune 17q25 perdue dans les cancers du sein et des

ovaires (Kalikin *et al.* 2000). Sept9 est un gène murin de la famille des septines qui fut isolé comme proto-oncogène impliqué dans la lymphomagenèse des cellules T (Sørensen *et al.* 2002). Ce site d'intégration est associé à Bzap1 (<http://rtcgd.ncifcrf.gov/>).

4.3.14 Fos

Fos (*FBJ Osteosarcoma Oncogene*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=14281) est situé sur le chromosome 12 à la position D3 entre 80.79 Mb et 80.80 Mb chez *Mus musculus* (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=12&vc_start=80963459&vc_end=80965543&highlight=BLAST_NEW:BLA_hLSVGYXd8!!20050301). Chez l'humain, ce gène est situé sur le chromosome 14 à la position 14q24.3 (Lund *et al.* 2002). Le site commun d'intégration qui lui est associé est Si4. Johansson *et al.* (2004) l'ont associé à Btl-59 (*Btl : Brain Tumor Locus*). Fos fut initialement identifié comme étant un gène cible des virus FBJ (*Finkel-Biskis-Jinkins virus*) et FBR (*Finkel-Biskis-Reilly virus*) (Miller *et al.* 1984). Il a un rôle important dans la lymphomagenèse. Fos fut également étudié comme étant un composant du facteur de transcription AP-1 (*Activating Protein-1*) (Hoffman *et al.* 2002; Kim *et al.* 2003), qui joue un rôle majeur dans le développement, la prolifération et l'apoptose (Heinrich *et al.* 2004). Hoffman *et al.* (2002) mentionnent que Fos/Jun sont reconnues pour être des activateurs de l'apoptose et de la différenciation dans l'hématopoïèse des lignées myéloïdes (Liebermann *et al.* 1998; Lord *et al.* 1993). Lors d'une étude sur MoMuLV, Hwang *et al.* (2002) remarquent qu'il n'y a pas de surexpression du gène Fos dans les tumeurs où il y a surexpression du gène *Jundp2* (gène relié à Fos). Il a également été remarqué que si le domaine PEST est enlevé, il y a activation du potentiel oncogène de c-Fos (Tsurumi *et al.* 1995). Hoffmann *et al.* (2002) concluent qu'une perte de régulation de c-Fos par des modifications du génome entraîne un dérèglement de l'expression de c-Myc lors de la leucémogenèse. En plus d'être

impliqué dans la leucémie, il a été découvert que le rétrovirus FBR-MuSV (*Finkel-Biskis-Reilly Murine Sarcoma Virus*) induisant des tumeurs des os, contient les 4 exons de c-Fos mais sans les 24 premiers et les 98 derniers acides aminés de son produit (Merregaert *et al.* 1986).

4.3.15 Jundm2

Jundm2 (*Jun Dimerization Protein 2*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=81703) est situé sur le chromosome 12 à la position D3 entre 80.91 Mb et 80.96 Mb chez *Mus musculus*. Chez l'être humain, ce gène est situé sur le chromosome 14 à la position 14q24.3 et est nommé JDP2 (*Jun Dimerization Protein 2*). Le site commun d'intégration qui lui est associé est Jundm2. c-Jun est une protéine de dimérisation (JDP2) membre de la famille des AP-1, facteurs de transcription de type zipper-leucine. Le mécanisme de l'action anti-tumorale de JDP2 peut être en partie expliqué par la formation de complexe AP-1 inhibiteurs suite à une augmentation de l'expression de JunB, JunD et Fra2 et une baisse d'expression de c-Jun (Heinrich *et al.* 2004). Jun peut se lier à l'ADN sous forme d'homo et d'hétérodimère (Aronheim *et al.* 1997; Jin *et al.* 2001). Suite à la dimérisation avec des membres de la famille Jun, il y a perte de transcription des gènes dépendants de AP-1. JDP2 joue donc plusieurs rôles dans l'inhibition de la transcription par des mécanismes de compétition pour la liaison à l'ADN, la formation de complexes AP-1 inactifs et en recrutant directement l'histone déacétylase 3 (Heinrich *et al.* 2004; Jin *et al.* 2002). Heinrich *et al.* (2004) mentionnent que des études doivent encore être faites afin de voir si JDP2 régule les promoteurs de JunB et JunD directement, ou si la surexpression de ces 2 protéines est reliée à des effets indirects de la part de JDP2.

4.3.16 Ccnd3

Ccnd3 (*Cyclin D3*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=12445) de *Mus musculus* se trouve sur le chromosome 17 à la position C entre 45.67 Mb et 45.76 Mb environ (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=17&vc_start=45694132&vc_end=45696290&highlight=BLAST_NEW:BLA_rc3GOBoGa!!20040920). Chez l'être humain CCND3 est situé sur le chromosome 6 à la position 6p21 (Lund *et al.* 2002). Le nom du site commun d'intégration qui lui est relié est Evi14 (<http://rtcgd.ncifcrf.gov/>). Ccnd3 est victime de réarrangements chromosomiques lors de cancers chez l'humain (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>; Kim *et al.* 2003). Il fut déjà identifié par la technique des splinkerettes (Mikkers *et al.* 2002), ainsi que dans une étude sur les souris AKXD (Li *et al.* 1999). Il a été vérifié que dans certains cas, deux oncogènes peuvent être modifiés dans une même tumeur (Bear *et al.* 1989; Nakamura *et al.* 1996; Van Lohuizen *et al.* 1991). Ccnd3, Myc, ainsi que Pim1 semblent en faire partie (Kim *et al.* 2003). Ce gène est important dans la tumorigenèse chez l'homme puisqu'il est réarrangé et sa protéine se voit surexprimée dans le cas de plusieurs tumeurs lymphoïdes. Les cyclines de type D sont primordiales dans les signaux oncogéniques. Elles ont des effets stimulateurs de la croissance. La cycline D3 est la cible ultime de la voie pre-TCR→p56. Il pourrait s'avérer que des molécules ciblant la cycline D3 pourraient favoriser la lutte contre certains cancers (Sicinska *et al.* 2003).

4.3.17 Bcl2l1

Chez la souris, le gène Bcl2l1 (*Bcl2-Like 1*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=12048) se trouve à la position H1 sur le chromosome 2 entre 152.83 Mb et 152.89 Mb environ. (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=2&vc_start=15286

4806&vc_end=152866951&highlight=BLAST_NEW:BLA_JDcfIVhXX!!2004102
 5). Chez l'être humain, BCL2L1 est situé sur le chromosome 20 à la position 20q11.21 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene>). Le nom du site commun associé à ce gène est Bcl2l1 (<http://rtcgd.ncifcrf.gov/>). Casas *et al.* (2003) mentionnent que Bcl2l1 génère des signaux antiapoptotiques puissant inhibant Bax et activant le cytochrome C. Le gène Bcl2 est un gène qui a des fonctions antiapoptotiques qui sont distinctes mais complémentaires aux fonctions de Notch1 (Aster & Pear 2001; Chang *et al.* 2000). Des gènes de la famille Bcl2, tels BAG-1, NIP3 et BCL2A1, ont un rôle anti-apoptotique dans la AML (Aster & Pear 2001).

4.3.18 Gpc3

Chez la souris, Gpc3 (*Glypican 3*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=14734) se trouve sur le chromosome X à la position A4 entre 44.61 Mb et 44.96 Mb environ (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?chr=X&vc_start=45094241&vc_end=45096443&highlight=BLAST_NEW:BLA_HO085PYK1!!20050301). Le nom du site d'intégration associé à ce gène est Gpc3. Le gène Q8C957 se trouve à l'intérieur de Gpc3, soit entre 44.92 Mb et 44.97 Mb. Chez l'humain, GPC3 se trouve à la position Xq26.1 sur le chromosome X. Gpc3 fut associé au syndrome de Simpson-Golabi-Behmel (syndrome de croissance incontrôlée), maladie reliée au chromosome X (Cano-Gauci *et al.* 1999; Pellegrini *et al.* 1998; Pilia *et al.* 1996) chez l'humain. Des symptômes de ce syndrome peuvent également être retrouvés chez les souris lorsque Gpc3 est manquant (Cano-Gauci *et al.* 1999). Gpc3 est membre de la famille des GRIPS (*Glypican-Related Integral Membrane Heparan Sulfate Proteoglycans*) (Pellegrini *et al.* 1998). Ce type de protéine se lie à la surface cellulaire par une ancre glycosyl-phosphatidylnositol (Cano-Gauci *et al.* 1999). GPC3 semble donc être impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire et dans

l'apoptose pendant le développement de l'organisme (Hughes-Benzie *et al.* 1996). GPC3 a des effets inhibiteurs sur IGF-II (*Insulin-Like Growth Factor II*), impliqué dans le syndrome de croissance incontrôlée de Beckwith-Wiedemann (BWS : *Beckwith-Wiedemann Syndrome*). Gpc3 est également un élément influençant la viabilité de l'organisme (Cano-Gauci *et al.* 1999).

Conclusion

Depuis bien longtemps déjà, il fut déterminé que les rétrovirus peuvent engendrer des tumeurs. Pour ce faire, les rétrovirus non défectifs doivent activer ou inactiver certains gènes spécifiques, soit les proto-oncogènes, en s'intégrant à leur proximité. Dans le cas de ce projet de maîtrise, la leucémie murine fut analysée suite à des infections par le rétrovirus RadLV/VL₃ clone V-13. Ce virus possède un pouvoir leucémogène très fort. Le but fut d'identifier des sites communs d'intégrations rétrovirales afin d'en identifier de nouveaux, menant du fait même à l'association de nouveau proto-oncogène au développement tumoral.

La technique utilisée fut celle des splinkerettes. La splinkerette est une molécule d'ADN qui permet de cibler les intégrations rétrovirales d'une façon plus efficace que les techniques employées jusqu'à présent. Cette technique nécessite l'utilisation de plusieurs protocoles de biologie moléculaire dont la PCR et le séquençage. Sa caractéristique principale est une boucle en épingle à cheveux qui empêche les amplifications aléatoires. Il n'a cependant pas été possible d'exploiter la technique au maximum, à savoir passer directement des PCR au séquençage, en évitant les étapes de clonage. La technique fut mise au point suite à l'utilisation de séquences du rétrovirus CAEV pour l'élaboration de la splinkerette, augmentant ainsi sa spécificité.

La technique des splinkerettes s'avère très efficace dans la recherche de sites d'intégration des rétrovirus. Plusieurs sites déjà connus pour être ciblés par des intégrations rétrovirales furent retrouvés dans le cadre de ce projet. Par contre, concernant les intégrations spécifiques de RadLV/VL₃, plusieurs de ces sites sont nouveaux. RadLV/VL₃ ne fut associé dans le passé qu'à quelques sites communs d'intégration tels Vin1, Kis1, Notch1, Pim1 et c-Myc. Par exemple, le site Rorc ne fut

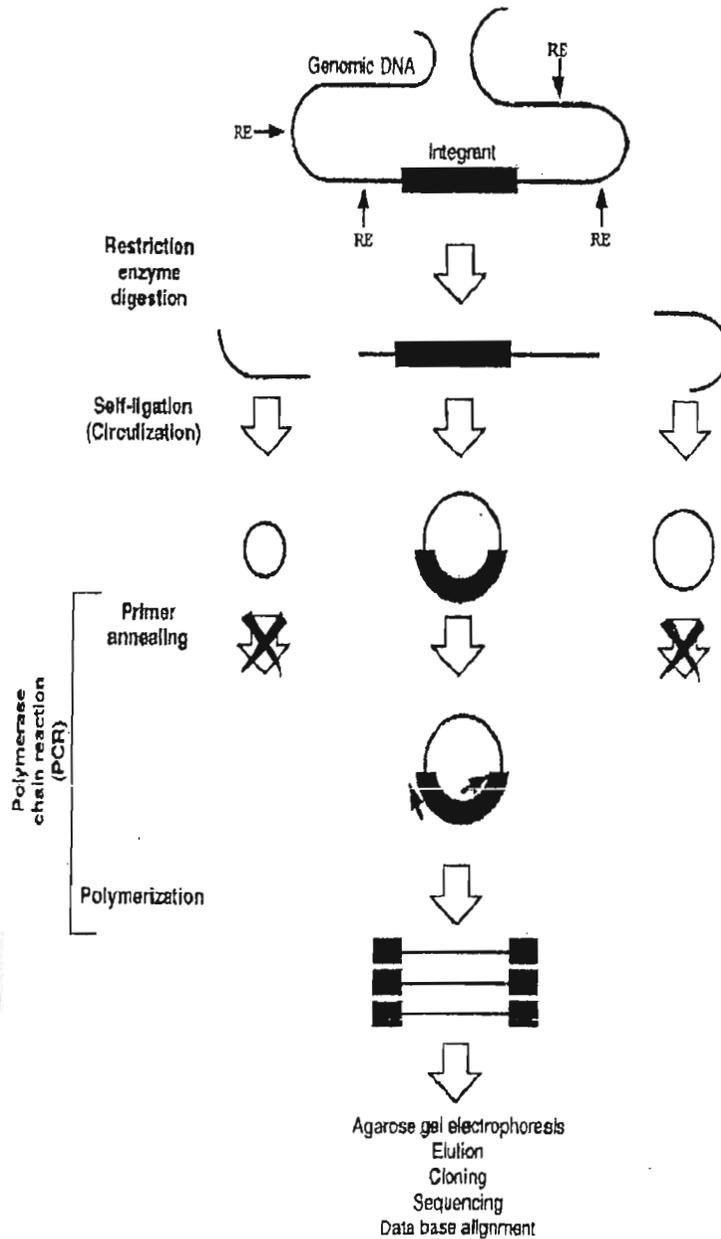
jamais associé directement aux intégrations du rétrovirus RadLV/VL₃. Il n'en demeure pas moins que le locus Rorc a déjà été répertorié comme cible des rétrovirus. Cependant, il fut également possible d'identifier 2 sites intéressants contenant une intégration rétrovirale. Un de ces sites est nommé Lvis2. Il est situé sur le chromosome 7. Le second se trouve sur le chromosome 11, mais il n'est pas défini. L'oncogène Grb10 semble cependant y être associé.

Certains réarrangements semblent avoir lieu lors des manipulations de l'ADN tumoral au cours de cette démarche expérimentale. Il semble que des ligations contaminantes plus ou moins fréquentes ont lieu lors de la digestion de l'ADN génomique tumoral et de sa ligation aux splinkerettes. Ceci pourrait porter à croire que les fragments clonés ne correspondent qu'à des fragments d'ADN génomique agencés de manière aléatoire qui, lorsque criblés contre le génome entier de *Mus musculus*, s'y appariaient au hasard. Par contre, les sites internet de criblages donnent des statistiques concernant l'appariement des séquences. Selon ces statistiques, il est possible de s'assurer de l'exactitude de l'appariement. Une compréhension plus complète du système statistique des sites internet de criblage permettrait également d'améliorer le rendement de la technique. Un exemple intéressant de cette situation serait les fragments d'ADN qui sont semblables au génome de RadLV/VL₃. Quelquefois, les fragments clonés s'appariaient au génome de RadLV/VL₃. Cependant, le génome de RadLV/VL₃ s'apparie lui aussi à plusieurs endroits dans le génome de la souris (Annexe M). Il faudrait donc vérifier si la séquence retrouvée est d'origine virale ou animale. C'est le cas de la tumeur 110.3 et de l'oncogène Zfp42 (Annexe N). Toutes les bandes séquencées et d'intérêt sont présentées à l'annexe N.

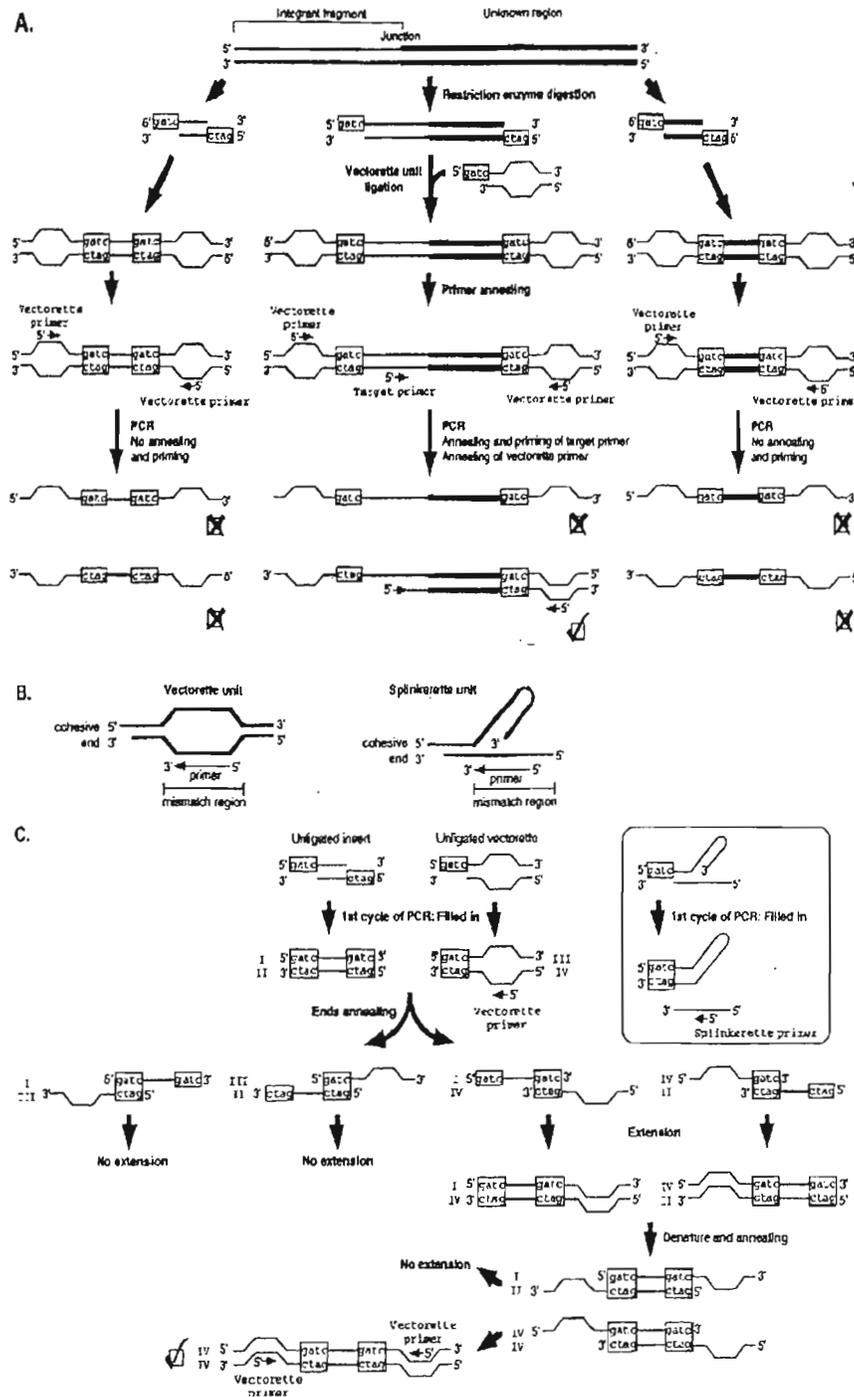
Malgré tout, il est clairement possible de trouver des nouveaux sites d'intégration de RadLV/VL₃. Par contre, il faudrait perfectionner la technique des splinkerettes. Effectivement, la mise au point de PCR nichées des deux côtés augmenterait certainement la spécificité de la réaction permettant d'éviter les étapes

de clonages et passer au séquençage direct des produits des PCR. Il serait également nécessaire de vérifier à nouveau les séquences ambiguës en testant à nouveau les tumeurs ciblées. De plus, quelques sites d'intégrations répertoriés lors de ce projet ne sont associés à aucun oncogène connu. Premièrement, il faut s'assurer que les intégrations répertoriées relèvent de tumeurs clonales. Des digestions du génome de ces tumeurs devront être faites par plusieurs enzymes et suite à des transferts Southern, il sera possible de voir si les allèles sont visiblement réarrangés. Des sondes uniques devront donc être créées. De plus, des PCR faits directement sur de l'ADN tumoral avec des amorces appropriées devraient permettre de vérifier dans combien de tumeurs il y a une intégration au site analysé. Des tests sur l'ARNm des tumeurs concernées permettraient peut-être d'identifier de nouveaux oncogènes ciblés par RadLV/VL₃ clone V-13. Plusieurs des sites trouvés ne furent pas associés à RadLV/VL₃ clone V-13 impliquant du même fait que des gènes différents pourraient être ciblés par les LTR de RadLV/VL₃ clone V-13. Cependant, il semble que la meilleure façon de poursuivre ce projet est de continuer à analyser les tumeurs engendrées par RadLV/VL₃ afin d'identifier de nouveaux oncogènes. Par contre, la rapidité avec laquelle le génome est analysé diminue grandement les chances d'en identifier de nouveaux par les techniques mentionnées dans ce travail. De plus, les laboratoires qui réussissent à identifier de nouveaux oncogènes testent des centaines de séquences. Au cours de ce projet, un peu plus de 100 séquences ont pu être analysées.

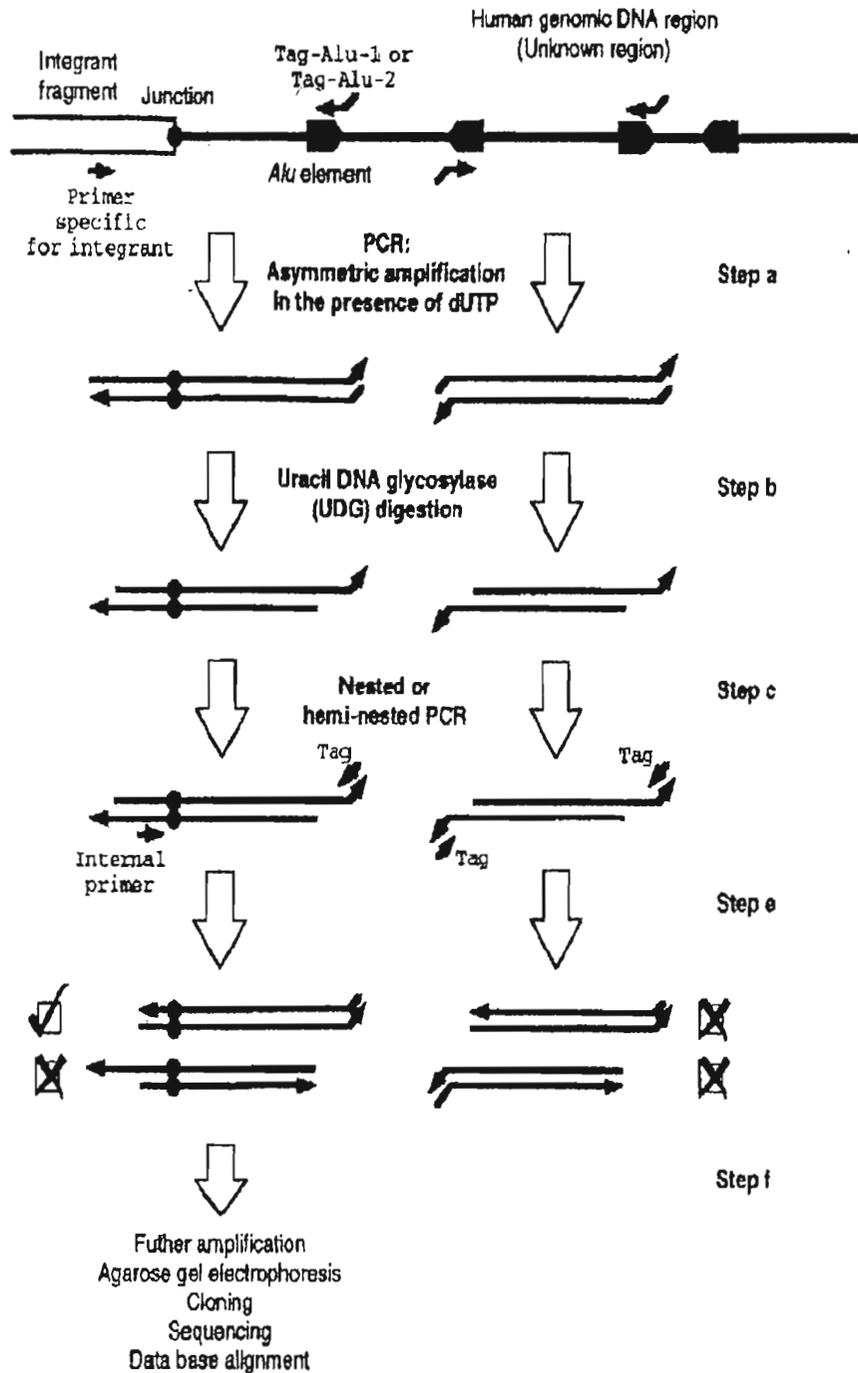
Annexes



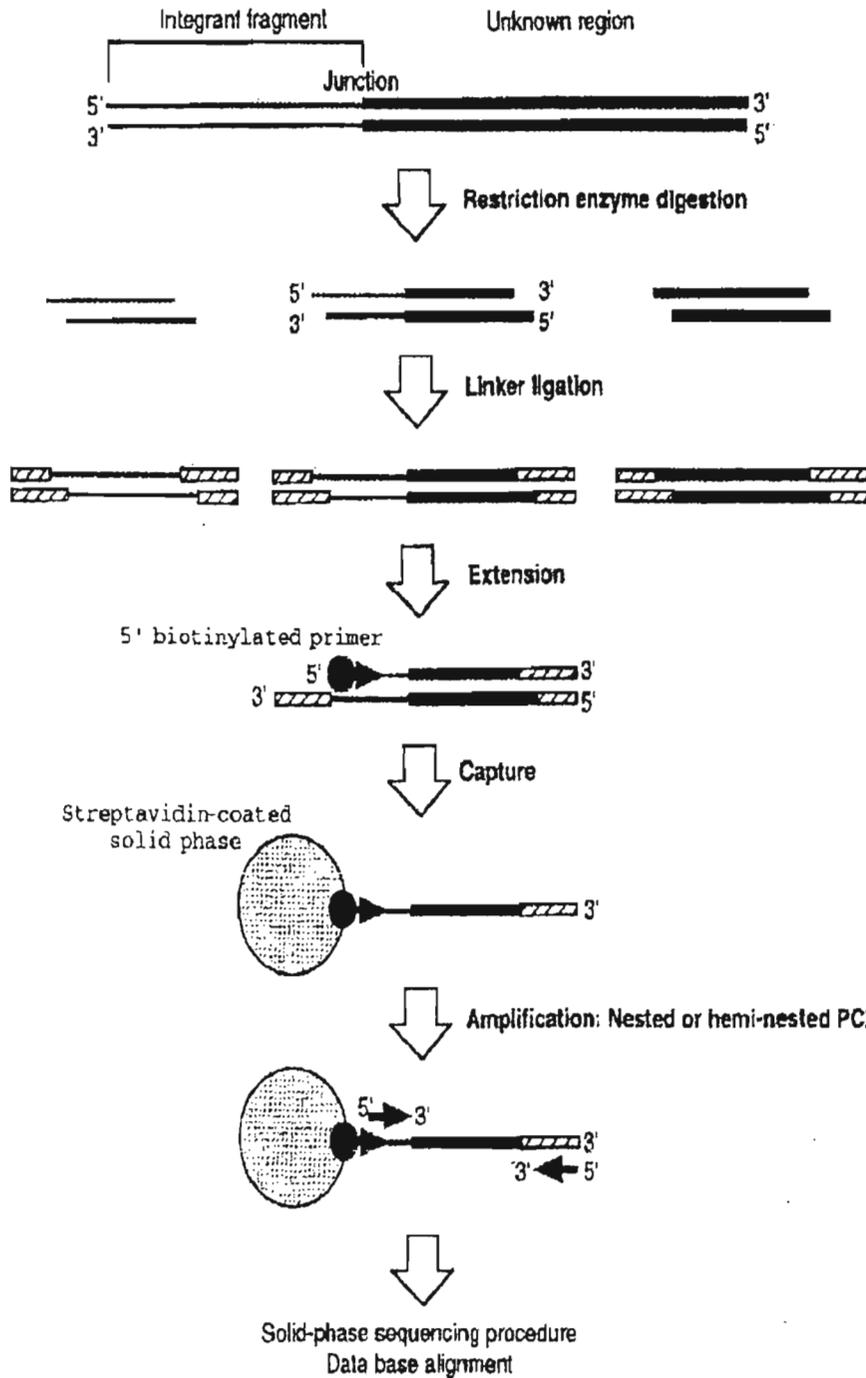
Annexe A : Principe de la *IP-PCR*. La ligne grasse et la ligne mince représentent respectivement le fragment intégré et la séquence génomique. Dans cet exemple, les sites de restriction ne sont pas présents dans le fragment intégré. Les croix sur les flèches indiquent qu'aucun appariement d'amorce n'aura lieu dans l'ADN circularisé sans intégration rétrovirale. Les flèches correspondent aux amorces. (Tiré de Hui *et al.* 1998).



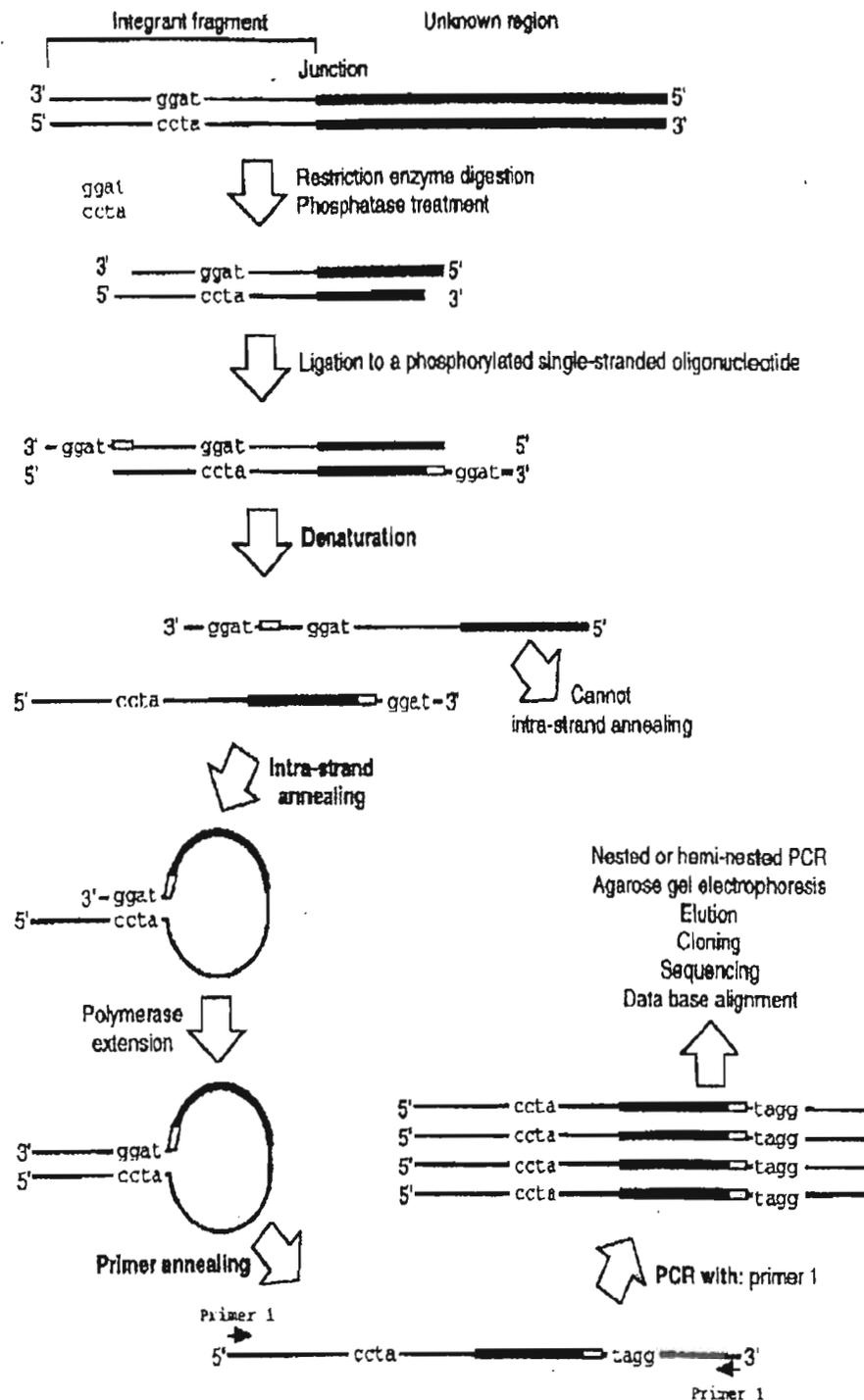
Annexe B : Principe de la PCR par vectorette et splinkerette. (A) Deux brins complémentaires d'ADN sont représentés par des lignes noires et grises. Les lignes épaisses et minces représentent les séquences génomiques inconnues et du fragment intégré, respectivement. Une vectorette est montrée dans la figure. Les amorces sont représentées par des flèches. (B) Un diagramme schématisant comparant une vectorette à une splinkerette. (C) Un diagramme représentant le « end-repair priming ». (Tiré de Hui *et al.* 1998).



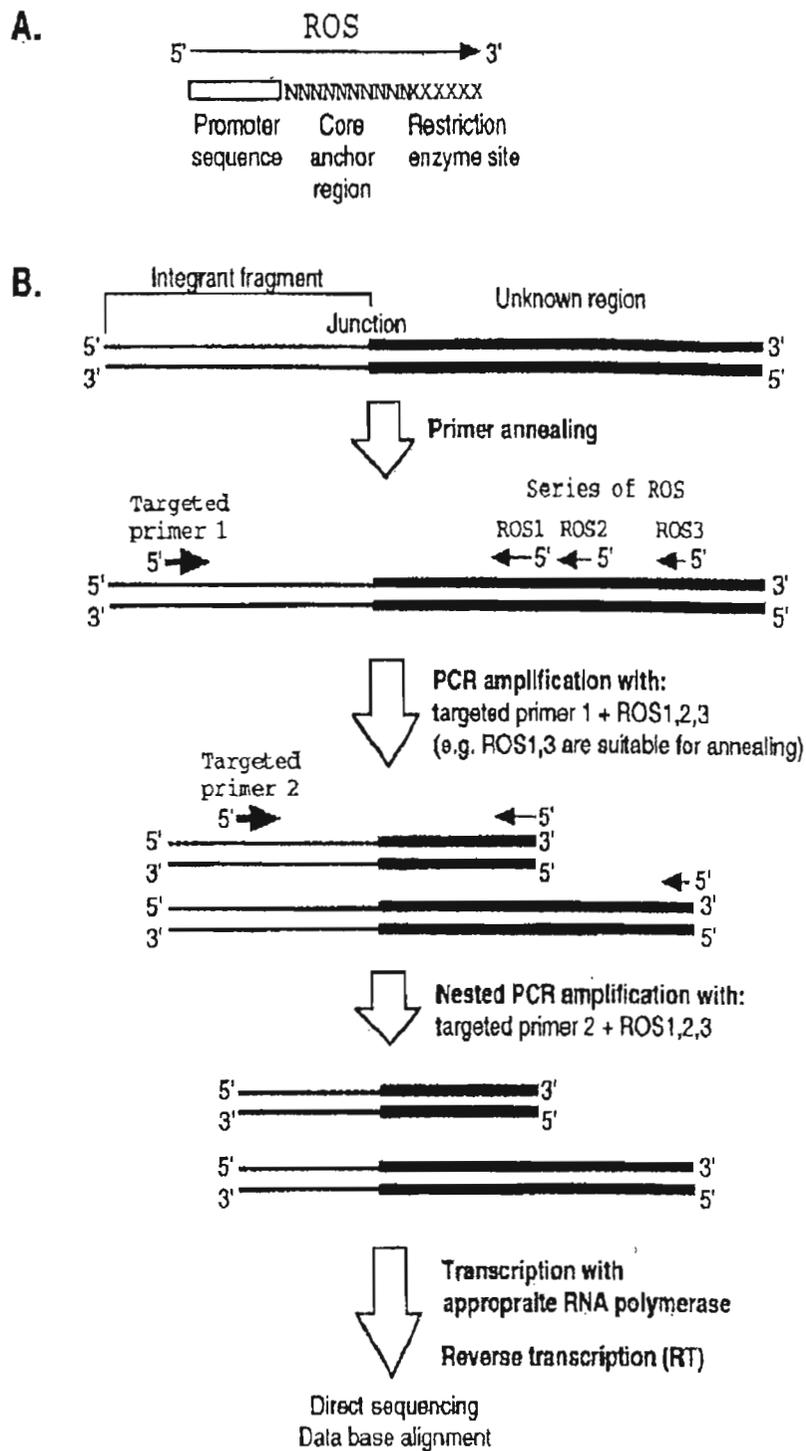
Annexe C : Principe de la *Alu*-PCR. La boîte et la ligne grasse indiquent respectivement le fragment intégré et la séquence génomique humaine inconnue. Les points noirs représentent les sites de jonctions. Les boîtes pleines en forme de flèches représentent les portions *Alu* du génome humain dans leurs orientations variées. Les flèches avec une partie courbée représentent les amorces contenant du dUTP s'appariant aux séquences *Alu*. Les amorces pour les PCR sont indiquées par de petites flèches. Les croix et les marques grasses représentent les amplifications. Seules les marques grasses indiquent les élongations de la réaction PCR. (Tiré de Hui *et al.* 1998).



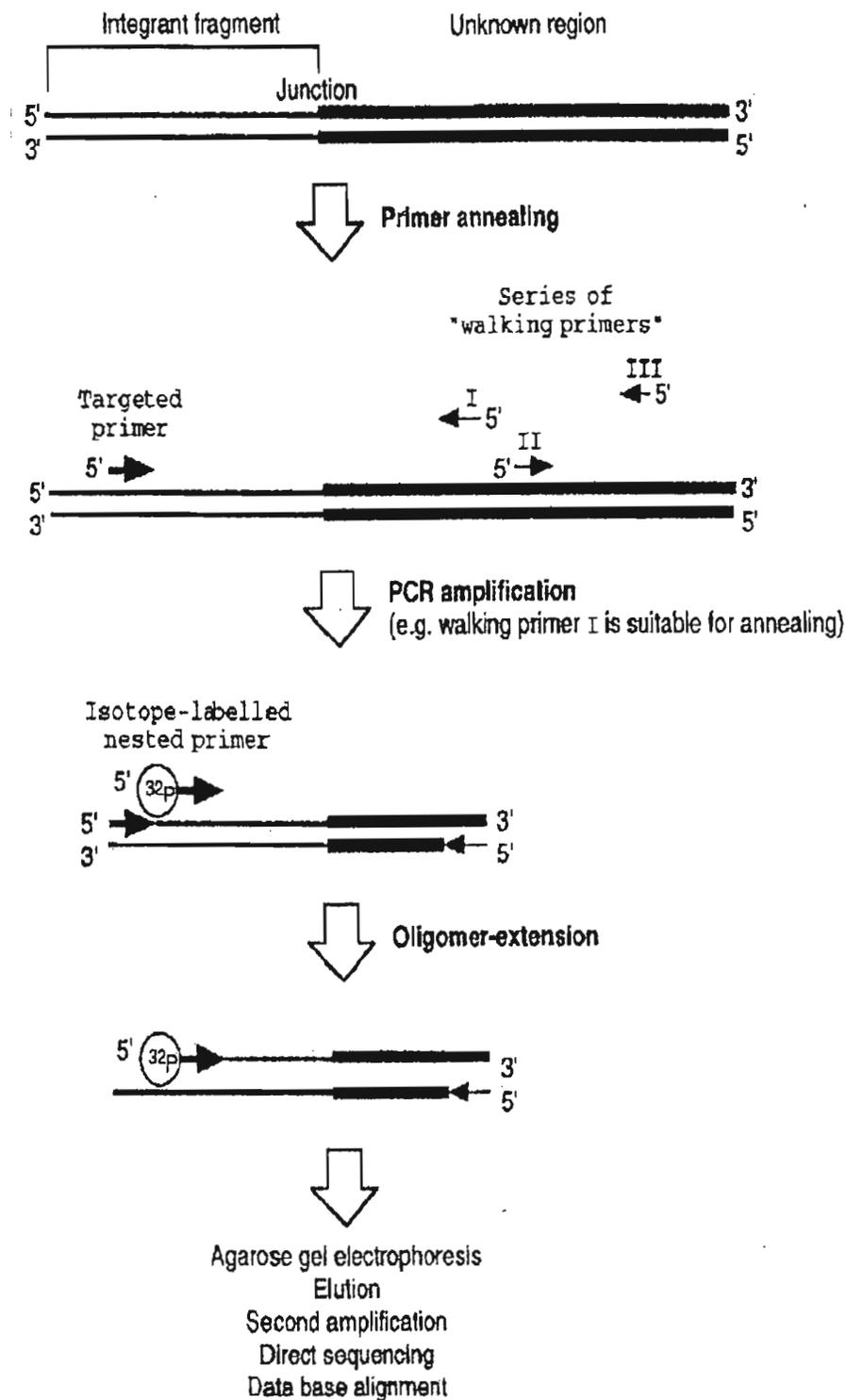
Annexe D : Principe de la *Capture PCR*. Les 2 brins d'ADN complémentaire sont indiqués par des lignes noires. Les portions grasses représentent l'ADN génomique inconnu et les portions minces représentent l'intégration de séquence connue. La molécule liée lors de la ligation est représentée par des carrés rayés. Les amorces biotinylées pour l'élongation sont représentées par des flèches contenant un cercle fermé. Les amorces pour les PCR nichées sont représentées par des flèches. Les amorces de la PCR sont indiquées par des flèches. (Tiré de Hui *et al.* 1998).



Annexe E : Principe de la *panhandle PCR*. Les 2 brins d'ADN complémentaires sont indiqués par des lignes noires. Les portions grasses représentent l'ADN génomique inconnu et les portions minces représentent l'intégration de séquence connue. Les lettres sur les lignes minces représentent les régions spécifiques d'appariement pour les portions internes du fragment intégré et des oligonucléotides ligasés. Les amorces de la PCR sont indiquées par des flèches. (Tiré de Hui *et al.* 1998).



Annexe F : Principe de la *Restriction-Site PCR*. (A) Structure d'un RSO (*Restriction Site Oligonucleotide*). (B) Représentation schématique de la stratégie par *RS-PCR*. Les 2 brins d'ADN complémentaire sont indiqués par des lignes noires. Les portions grasses représentent l'ADN génomique inconnu et les portions minces représentent l'intégration de séquence connue. Les amorces de la PCR sont indiquées par des flèches. (Tiré de Hui *et al.* 1998).



Annexe G : Principe de la *targeted gene-walking PCR*. Les 2 brins d'ADN complémentaires sont représentés par les lignes noires. Les portions grasses représentent l'ADN génomique inconnu et les portions minces représentent l'intégration de séquence connue. Les amorces de la PCR sont indiquées par des flèches. (Tiré de Hui *et al.* 1998).

Method	DNA digestion	Ligation	Amount of DNA used	Steps to optimize	Nonspecific products (false positive)	Sensitivity
Inverse PCR (IPCR) (fig. 1)	yes	self-ligation (intramolecular circularization)	D: 2–5 µg L: 0.25–5 ng µl	1. requires large amount of DNA sample 2. DNA concentration of self-ligation	from free non-integrated DNA and nonligated DNA	low
Novel <i>Alu</i> -PCR (fig. 2)	no	no	P: 20–106 ng	1. <i>Alu</i> orientation consideration 2. species-specific repetitive sequence	from <i>Alu</i> - <i>Alu</i> amplification	high
Vectorette- or splinkerette-PCR (fig. 3A)	yes	vectorette unit ligation	D: 1–2 µg L: 1–2 µg	1. ligation condition 2. laborious and time-consuming	from 'end-repair priming' (fig. 3C).	medium
Targeted gene-walking PCR (fig. 4)	no	no	P: 50 pg–15 ng	primer set design	from single walking primer amplification	high
Restriction-site PCR (RS-PCR) (fig. 5B)	no	no	P: 200 ng	RSO set design	from single RSO primer amplification	high
Capture PCR (CPCR) (fig. 6)	yes	linker ligation	L: 100 ng	ligation efficiency	from single biotinylated primer	medium
Panhandle PCR (fig. 7)	yes	single-stranded oligonucleotide ligation	D: 1.2–5 µg L: 0.5–2.5 µg	1. ligation efficiency 2. intrastrand looping condition	from single target primer	medium

D, DNA digestion reaction; L, ligation reaction; P, PCR reaction.

Annexe H : Tableau résumant les techniques employées pour retrouver des intégrations rétrovirale dans des séquences d'ADN inconnues. (Tiré de Hui *et al.* 1998).

CIS name	CIS gene	Protein family	Mouse chr.	Human chr.	No. hits	Accession number
		Transcription factors				
Evi3	<i>Bco21376</i>	zinc finger, Kruppel type	18	ND	5	AAH21376.1
Evi6	<i>Hoxa9</i>	homeobox	6	7p15-p14	4	NP_034586.1
Evi7	<i>Hoxa7</i>	homeobox	6	7p15-p14	8	NP_034585.1
Evi8	<i>Meis1</i>	homeobox	11	2p14-p13	15	NP_034919.1
Evi9	<i>Bcl11a</i>	zinc finger, Kruppel type	11	2p24.3-p24	2	NP_057916.1
Evi13	<i>Runx1</i>	Runt related	16	21q22.3	1	NP_033951.1
Evi16	<i>Sox4</i>	HMG-box related	13	6p22.3	55	NP_033264.1
Evi22	<i>Rarg</i>	nuclear hormone receptor	15	12q13	4	NP_035374.1
Evi23	<i>Bhlhb3</i>	basic helix-loop-helix	6	12p11.23-p12.1	2	HP_077789.1
Evi24	<i>Zfp36</i>	zinc finger	7	19q13.1	6	NP_035886.1
Evi25	<i>KIAA1076</i>	Enhancer-of-zeste related	5	12	3	BAA83028.1
Evi31	<i>C6orf23h</i>	ETO related	8	16q24	6	NP_033954.1
Evi33	<i>Sirs10</i>	differentiation specific	1	2	2	XP_049068.1
Evi34	<i>Npas2</i>	basic helix-loop-helix	1	2p11.2-q13	2	NP_032745.1
Evi46	<i>1810007D21Rik</i>	zinc finger	2	20pter-q11.23	2	NP_081200.1
Evi49	<i>Zfp217</i>	zinc finger, Kruppel type	2	20q13.2	2	NP_006517.1
Evi53	<i>Mer2d</i>	myocyte specific	3	1q12-q23	3	AAB29973.1
Evi59	<i>Bacn2</i>	unspecified	4	6q15	6	NP_031547.1
Evi60	<i>Pax5</i>	paired box	4	9p13	2	NP_032808.1
Evi62	<i>Ikb3, E2F2</i>	basic helix-loop-helix, E2f family transcription factor	4	1p36.13-p36.12	2	NP_032347.1, NP_004082.1
Evi64	<i>Klf3</i>	zinc finger	5	4p16.1-p15.2	2	NP_032479.1
Evi71	<i>Cutl1</i>	homeobox	5	7q22	2	NP_034116.1
Evi82	<i>Zfp296</i>	zinc finger, Kruppel type	7	19	3	NP_071854.1
Evi93	<i>Junb</i>	Jun related	8	19p13.2	3	NP_032442.1
Evi94	<i>Hfat5</i>	Hfat related, T cell	8	16q22.1	2	NP_061293.1
Evi96	<i>Foxc2</i>	Forkhead	8	16q22-16q24	2	NP_038547.1
Evi101	<i>Ptdm1</i>	zinc finger, Kruppel type	10	6q21-q22.1	3	NP_031574.1
Evi104	<i>Tcrie2a</i>	basic helix-loop-helix	10	19p13.3	5	AAK18618.1
Evi112	<i>Znf1a3</i>	zinc finger	11	17q11.2	2	AAB58795.1
Evi121	<i>Mer2c</i>	myocyte specific	13	5q14	6	NP_079558.1
Evi128	<i>Hes1</i>	Hairy related	16	3q28-q29	3	NP_032261.1
Evi133	<i>Tcreb</i>	microphthalmia related	17	6p21	2	NP_035679.1
Evi134	<i>Btf2</i>	putative nuclear	17	2p22.3-p21	2	NP_031591.1
Evi138	<i>Hfatc1</i>	Hfat related, T cell	18	18q23	2	NP_058071.1
Evi140	<i>Htkb2</i>	Rel/Dorsal related	19	10q24	2	NP_062281.1
Evi157	<i>Nrkbl</i>	Rel/Dorsal related	3	4q24	2	NP_032715.1
Evi158	<i>Hfic</i>	CCAAT-box binding	10	19p13.3	2	NP_032714.1
Evi162	<i>Klf4</i>	zinc finger	4	9q31	2	AAK04892.1
Bmi1	<i>Bmi1</i>	polycomb group	2	10p13	3	NP_031578.1
Flt1	<i>Flt1</i>	ETS related	9	11q24.1-q24.3	1	NP_032052.1
Gfi1	<i>Gfi1</i>	zinc finger, Kruppel type	5	1p22	7	NP_034408.1
Lvis1	<i>Hnex</i>	homeobox	19	10q24.1	23	NP_032271.1
Myb	<i>Myb</i>	Myb related	10	6q22-q23	9	TVNSMAY
Myc	<i>Myc</i>	Myc related	15	8q24.12-q24.13	4	NP_034979.1

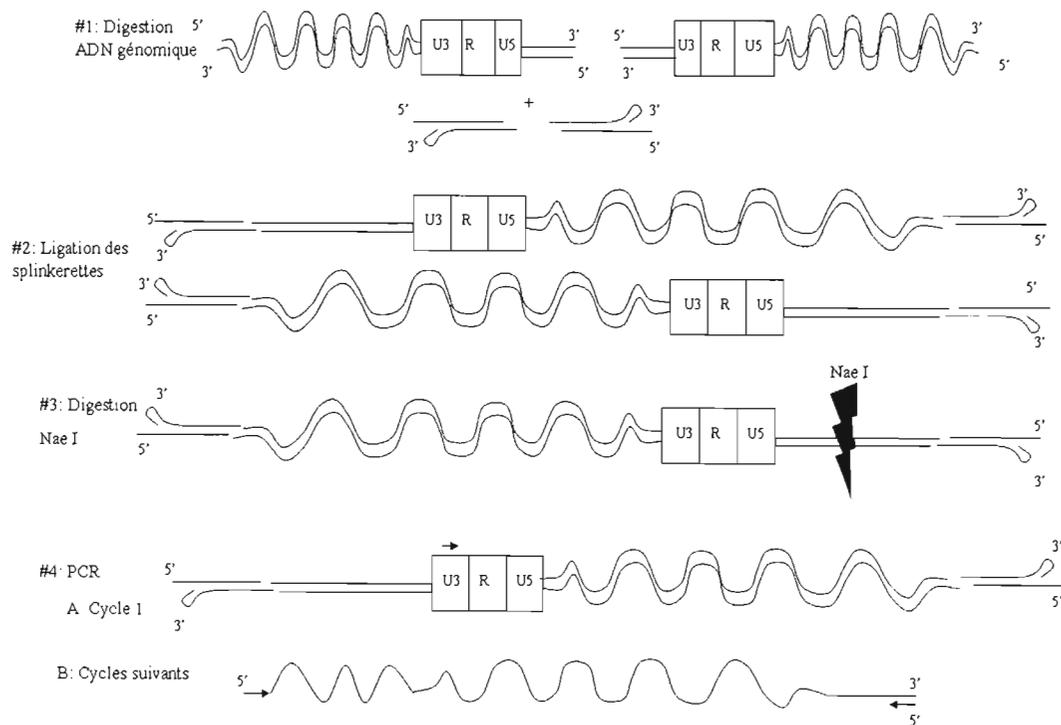
CIS name	CIS gene	Protein family	Mouse chr.	Human chr.	No. hits	Accession number
<i>Evi18</i>	<i>Rasgrp1</i>	Ras GAP	2	15q15	7	NP_035376.1
<i>Evi80</i>	<i>Kras2</i>	Ras related	6	12p12.1	3	NP_113703.1
<i>Evi84</i>	<i>Ras2</i>	Ras related	7	11pter-p15	4	NP_080122.1
<i>Evi105</i>	<i>Rap1b</i>	Ras related	10	ND	2	AAK14823.1
<i>Hras1</i>	<i>Hras1</i>	Ras related	7	11p15.5	3	NP_032310.1
<i>Hras</i>	<i>Hras</i>	Ras related	3	1p13.2	1	NP_035067.1
		Signaling				
<i>Evi43</i>	<i>Form2l</i>	formin binding	2	9q34	2	AA052479.1
<i>Evi44</i>	<i>Form2e</i>	formin binding	2	13	2	NP_061298.1
<i>Evi66</i>	<i>Fmn</i>	LIM domain	5	12q24	2	BA018997.1
<i>Evi70</i>	<i>Dtx2</i>	Notch	5	7	3	NP_076231.1
<i>Evi72</i>	<i>Lfng</i>	Notch	5	7p22	2	NP_032520.1
<i>Evi73</i>	<i>Gna12</i>	G protein	5	7p22-p21	2	NP_034432.1
<i>Evi78</i>	<i>Calm2</i>	calcium binding	6	2p21	5	NP_031615.1
<i>Evi86</i>	<i>Iris2</i>	GRB2 interacting	8	13q34	3	P81122
<i>Evi88</i>	<i>Plxkna2</i>	PH domain	8	ND	2	NP_112547.1
<i>Evi90</i>	<i>Eps15-rs</i>	EGF receptor substrate	8	19p13.1	4	NP_031970.1
<i>Evi92</i>	<i>Gab1</i>	IGRB2 interacting	8	4	2	NP_067331.1
<i>Evi115</i>	<i>Gga2</i>	signal transducing adapter	11	17q25	2	NP_054720.1
<i>Evi129</i>	<i>Isgb5</i>	integrin	16	3p14.3-p14.1	2	NP_034710.1
<i>Evi135</i>	<i>Mapre2</i>	APC-binding-protein related	18	18q12	2	NP_055083.1
<i>Evi149</i>	<i>Lasp1</i>	LIM and SH3 domains	11	17q11-q21.3	2	NP_034818.1
		Apoptosis				
<i>Evi57</i>	<i>Bcl10</i>	B-cell leukemia lymphoma	3	1p22	3	NP_033870.1
<i>Evi68</i>	<i>Rnf34</i>	apoptosis-inhibitor related	5	12	2	NP_085041.1
<i>Evi123</i>	<i>11038602Rik</i>	apoptosis-inhibitor related	14	14q22.1	2	NP_066559.1
<i>Evi145</i>	<i>Caro4</i>	apoptosis inducer	6	7p15-p14	2	NP_066083.1
		Actin binding				
<i>Evi20</i>	<i>Ccoo1a</i>	coonin related, actin binding	16		2	NP_034028.1
<i>Evi65</i>	<i>Ccoo1c</i>	coonin related, actin binding	5	12q24.1	2	NP_035909.1
<i>Evi74</i>	<i>Fxn1</i>	actin bundling	5	7p22	4	NP_032010.1
<i>Evi127</i>	<i>Parva</i>	actin binding	15	22q13.2-q13.33	2	AA027172.1
		Splicing				
<i>Evi103</i>	<i>Ptbp1</i>	polypyrimidine-tract binding	10	19p13.3	4	NP_032982.1
<i>Evi109</i>	<i>Sfp1p8l</i>	pre-mRNA splicing	11	17p13.3	2	BA032671.1
		Cell cycle				
<i>Evi5</i>	<i>Eck5</i>	cell cycle checkpoint control	5	1p22	3	NP_031990.1
<i>Evi91</i>	<i>Mcm25</i>	DNA replication licensing factor	8	22q13.1	2	NP_032592.1
<i>Ccmd1</i>	<i>Ccmd1</i>	G1/S-specific cyclin	7	11q13	2	NP_031657.1
<i>Ccmd2</i>	<i>Ccmd2</i>	G1/S-specific cyclin	6	12p13	3	NP_033959.1
<i>Sirt1</i>	<i>Sept9</i>	cell division control	11	17q25	2	NP_059076.1
		Unknown				
<i>Evi12</i>	<i>Tn31</i>	tumor rejection antigen	10	12q24.2-q24.3	4	NP_035761.1
<i>Evi19</i>	<i>Hmgcr</i>	HMG-CoA reductase	13	5q13.3-q14	2	NP_032266.1
<i>Evi26</i>	<i>Ra117</i>	ND	14	10	2	BA086538.1
<i>Evi29</i>	<i>1700028P05Rik</i>	ND	5	ND	4	BA024605.1
<i>Evi38</i>	<i>Stg2</i>	B-cell translocation gene	1	1q32	3	NP_031596.1
<i>Evi39</i>	<i>Tnr</i>	fibrin-associated collagens	1	1q24	2	NP_031177.1
<i>Evi50</i>	<i>23100X1G06Rik</i>	ND	2	ND	2	NP_079807.1
<i>Evi61</i>	<i>Smarc11</i>	SWI/SNF related	4	ND	2	NP_291044.1
<i>Evi79</i>	<i>Lrmp</i>	lymphoid-restricted protein	6	12p12	2	NP_032537.1
<i>Evi83</i>	<i>Svap70</i>	chromosome segregation	7	11p15	2	NP_033328.1
<i>Evi89</i>	<i>Pga</i>	6-phosphogluconolactonase related	8	19p13.2	2	NP_079672.1
<i>Evi95</i>	<i>Ori2c</i>	ND	8	16	2	XP_015780.1
<i>Evi97</i>	<i>Ori29</i>	ND	8	14q24.3	2	BF787074
<i>Evi98</i>	<i>Usp2</i>	ubiquitin hydrolase	9	15q22.3	2	NP_006528.1
<i>Evi99</i>	<i>Stag1</i>	stromal-antigen related	9	3q24	2	NP_033308.1
<i>Evi100</i>	<i>2700018N07Rik</i>	ND	9	ND	2	BA028125.1
<i>Evi102</i>	<i>Notch3-rs</i>	EGF-like domain containing	10	ND	2	ND
<i>Evi107</i>	<i>Ifi47</i>	interferon- γ inducible	11	ND	2	NP_032356.1
<i>Evi108</i>	<i>Ori22</i>	ND	11	17p13.3	3	BA034452.2
<i>Evi117</i>	<i>0610010123Rik</i>	ND	12	ND	2	NP_077185.1
<i>Evi118</i>	<i>SC003495</i>	immunoglobulin-heavy-chain related	12	ND	2	BC003495
<i>Evi120</i>	<i>Cplx2</i>	complexin	13	5q35	2	NP_034076.1
<i>Evi122</i>	<i>4U020082</i>	DNAJ related	14	ND	2	CA007197.1
<i>Evi126</i>	<i>3110002K08Rik</i>	suppression of tumorigenicity	15	22q13.2	2	AA03843.1
<i>Evi131</i>	<i>Klhl3</i>	Kelch related	17	5q31	3	NP_059111.1
<i>Evi136</i>	<i>Hspa9a</i>	heat shock	18	5q31.1	2	NP_034611.1
<i>Evi137</i>	<i>C17orf34</i>	ND	18	ND	2	BA086595.1
<i>Evi143</i>	<i>Ak4</i>	adenylate kinase	4	9p24-p13	2	NP_033777.1
<i>Evi150</i>	<i>Ori30</i>	ND	11	ND	2	ND
<i>Evi151</i>	<i>2900070E19Rik</i>	glutaredoxin related	12	ND	2	BA028985.1
<i>Evi152</i>	<i>18100X1M12Rik</i>	unknown	18	ND	2	AA018220
<i>Evi154</i>	<i>ND</i>	ND	2	ND	2	ND
<i>Evi155</i>	<i>Kuab1b</i>	type II integral membrane	6	ND	2	CA066111.1
<i>Evi156</i>	<i>ND</i>	ND	7	ND	2	ND
<i>Evi161</i>	<i>ND</i>	ND	10	ND	2	ND
<i>Evi163</i>	<i>Slc38a1</i>	amino-acid transporter	15	12	2	AF184240
<i>Hist1</i>	<i>Hist1</i>	ND	2	2q14-q21	1	U10269
<i>Hist1l1</i>	<i>Hist1l1</i>	membrane, low1 related	7	11p15	3	NP_034956.1

Annexe I : Tableau des sites communs d'intégration, gène affecté, famille de la protéine affectée, chromosome de souris et chromosomes humains correspondants de 149 intégrations retrouvées chez des souris BXH2 et AKXD ayant des leucémies myéloïdes des lymphomes de cellules B et T respectivement. (Tiré de Suzuki *et al.* 2002).

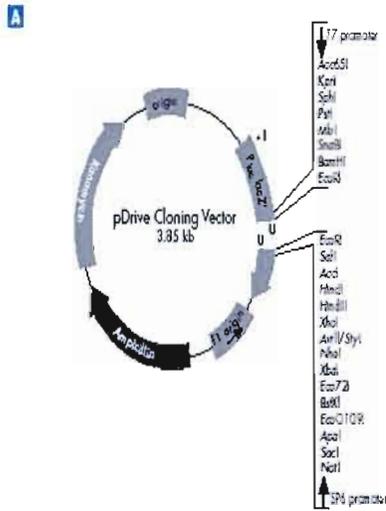
CIS name	Candidate gene	Accession ID	Candidate protein family	Mouse chr.	Human chr.	No. Isolated tags	No. Insertions
<i>Dkmi1</i>	<i>Dst</i>	ENSMUSG00000026131	actin cross-linking protein	1	6p11-p12	2	2
<i>Dkmi2</i>	<i>Ly108</i>	ENSMUSG00000015314	carcinoembryonic antigen	1	1	2	1
<i>Cis1</i>	<i>Ptma</i>	ENSMUSG00000026238	nuclear protein	1	2q35-q34	1	ND
<i>Nki3^a</i>	<i>Zfhx1b</i>	ENSMUSG00000026872	zinc-finger homeobox protein	2	2q22	1	ND
<i>Dkmi3</i>	<i>Ptpn1</i>	ENSMUSG00000027540/	TYR phosphatase	2	20q13.1-13.2	5	ND
<i>Dkmi4</i>	<i>Selt/ND/</i> 1190004A01Rik	NM 023871 ENSMUSG00000026785 ENSMUSG00000015335	nucleosome assembly protein/ protein kinase/ ND	2	9q34	3	ND
<i>Gfi1b</i>	<i>Gfi1b</i>	ENSMUSG00000026815	transcription factor	2	9q34.13	2	2
<i>Notch1</i>	<i>Notch1</i>	ENSMUSG00000026923	receptor	2	9q34.3	2	ND
<i>Bmi1</i>	<i>Bmi1</i>	ENSMUSG00000026739	polycomb protein	2	10p13	17	17
<i>Evi18</i>	<i>RasGrp1</i>	ENSMUSG00000027347	RAS exchange factor	2	15q15	8	3
<i>Dkmi5</i>	ND	ND	ND	2	20	2	1
<i>Dkmi6</i>	<i>Pki_g</i>	ENSMUSG00000035268	protein kinase inhibitor	2	20q12-q13.1	2	ND
<i>Dxmi7</i>	<i>Mcl1</i>	ENSMUSG00000038612	BCL-2-related	3	1q21	3	1
<i>Dkmi8</i>	<i>Cla3</i>	ENSMUSG00000015749	ND	3	1q21.1	2	ND
<i>Left1</i>	<i>Left1</i>	ENSMUSG00000027985	transcription factor	3	4q23-q25	3	2 ^c
<i>Evi55^a</i>	<i>Camk2d</i>	ENSMUSG00000027970	SER/THR kinase	3	4	2 ^b	ND
<i>Cis2</i>	ND	ND	ND	4	9	1	ND
<i>Nki11^a</i>	<i>Runx3</i>	ENSMUSG00000028814	transcription factor	4	1p36	2 ^b	ND
<i>Evi62^a</i>	<i>E2f2/Idb3</i>	ENSMUSG0000007872/ ENSMUSG00000018983	HLH factor/ transcription factor	4	1p36	2 ^b	ND
<i>Evi143^a</i>	<i>Lk/L/Lepr</i>	NM 009647/ ENSMUSG00000028529	adenylate kinase/ leptin receptor	4	9p24-p13	1	ND
<i>Evi58^a</i>	5830400A04Rik	ENSMUSG00000029204	RAS-related	5	4p13	1	ND
<i>Gfi1/Evi5</i>	<i>Gfi1/Evi5</i>	ENSMUSG00000029275/ ENSMUSG00000011831	transcription repressor/ cell-cycle protein	5	1p22	15	15
<i>Dkmi9</i>	<i>Kdr</i>	ENSMUSG00000029232	TYR kinase receptor	5	4q12	3	3
<i>Kit</i>	<i>Kit</i>	ENSMUSG0000005672	TYR kinase receptor	5	4q12	1	3
<i>Dkmi10</i>	ND	ENSMUSG00000035273	heparanase	5	4q21.3	3	2 ^c
<i>Nki16</i>	ND	ENSMUSG00000029471	SER/THR kinase	5	12q24.31	1	ND
<i>Evi65^a</i>	<i>Coro1c/Selp1</i>	ENSMUSG00000004530/ NM 009151	actin binding protein/ selectin	5	12q24.1	1	ND
<i>Evi78^a</i>	<i>Calm2/ND</i>	NM 007589/ ENSMUSG00000030349	calcium binding protein/ ribosomal protein	6	2p21	1	ND
<i>Ccnd2</i>	<i>Ccnd2</i>	ENSMUSG0000000184	cell-cycle regulator	6	12p13	3	5
<i>Cis3</i>	<i>ND/Wnt5b</i>	mCG19753/ ENSMUSG00000030170	F-box protein/ growth factor	6	12p13.3	1	ND
<i>Evi167^a</i>	<i>Sema4b</i>	ENSMUSG00000030539	receptor	7	15q26.1	2	ND
<i>Cis4</i>	PD	LOC243990	ND	7	ND	1	ND
<i>Dkmi11</i>	PD	mCG60113	ND	7	10q25	2	2
<i>Dxmi12</i>	<i>Rras2/Copb1</i>	ENSMUSG00000038142/ ENSMUSG00000030754	RAS-related/ beta coat protein	7	11pter-p15	3	3
<i>Evi83^a</i>	<i>Swap70</i>	ENSMUSG00000031015	coiled-coil BCR binding protein	7	11p15	1	ND
<i>Dkmi13</i>	<i>Ntpp1</i>	ENSMUSG00000037887	TYR/THR phosphatase	7	11p15.5	3	ND
<i>Dkmi14</i>	PD	mCG57816	<i>Drosophila</i> protein CG5765	8	13q34	2	2
<i>Evi86^a</i>	<i>Irs2</i>	ENSMUSG00000038894	docking protein	8	13q34	1	ND
<i>Evi97^a</i>	ORF23 like/ ND	mCG10088/mCG57228	KIAA1865/ ND	8	14q24.3	1	ND
<i>Dkmi15</i>	ND	ND	ND	8	16p12	3	4
<i>Evi92^a</i>	<i>Gab1/Apm1</i>	ENSMUSG0000003033/ ENSMUSG00000031714	clathrin coat protein/ growth factor receptor associated	8	4	1	ND
<i>Cis5</i>	110000113Rik/ <i>Mshra</i>	ENSMUSG00000001472/ ENSMUSG00000001188	ND/ receptor	8	16q24.3	1	ND
<i>Cis6</i>	<i>Lyl1</i>	NM008535	transcription factor	8/10	19p13.2/ 10q22	1	ND

<i>Fli1</i>	<i>Fli1</i>	ENSMUSG00000016087	transcription factor	9	11q24.1-24.3	1	ND
<i>Ets1</i>	<i>Ets1</i>	ENSMUSG00000032035	transcription factor	9	11q23.3	2	ND
<i>Dkmi16</i>	<i>Madh3</i>	ENSMUSG00000032402	transcription factor	9	15q14-q15	4	ND
<i>Dkmi17</i>	<i>Tcf12</i>	ENSMUSG00000032228	transcription factor	9	15q21	2	2
<i>Cis7</i>	<i>Kif9l</i> / PD	ENSMUSG00000032489/ ENSMUSG00000032483	kinesin-related/ KELCH-like	9	3p21	1	ND
<i>Evi100^A</i>	2700018N07	ENSMUSG00000041012	ND	9	ND	1	ND
<i>Cis8</i>	<i>Mknk2</i>	ENSMUSG00000020190	MAPK interacting protein	10	19p13.3	1	ND
<i>Dkmi18^d</i>	PD	ENSMUSG00000020258	ND	9/11	3p21/5q33.1	7	ND
<i>Myb</i>	<i>Myb</i>	ENSMUSG00000019982	transcription factor	10	6q23.3-q24	7	ND
<i>Dkmi19</i>	<i>Hbs1l/Myb</i>	NM019702/ ENSMUSG00000019982	elongation factor/ transcription factor	10	6q23-q24	5	10
<i>Nki28^A</i>	PD/ <i>Galgt1</i>	ENSMUSG00000040462/ ENSMUSG00000006731	ND/transferase	10	12q13	1	ND
<i>Tcf2a</i>	<i>Tcf2a</i>	ENSMUSG00000020167	transcription factor	10	19p13.3	2	2
<i>Evi158^A</i>	<i>Nfic</i>	ENSMUSG00000020237	transcription factor	10	19p13.3	1	ND
<i>Evi106^B</i>	2810013G11Rik	ENSMUSG00000020280	ND	11	2p16	1	ND
<i>Evi19</i>	<i>Bcl11a</i>	ENSMUSG00000000861	transcription factor	11	2	4	ND
<i>Il9r</i>	<i>Il9r</i>	ENSMUSG00000020279	interleukin receptor	11	5q35	1 ^b	ND
<i>Evi159^A</i>	<i>Sup4h</i>	ENSMUSG00000020485	transcription suppressor	11	17q21-q23	1	ND
<i>Cis9</i>	<i>Grb7l/Znf1a</i>	ENSMUSG00000019312/ ENSMUSG00000018168	cloning protein/ transcription factor	11	17q21.2	1	ND
<i>Cis10</i>	ND/ <i>Cdc6</i>	ENSMUSG000000038013/ ENSMUSG00000017499	WASP interacting/ cell-cycle regulator	11	17q21.3	2	ND
<i>Cis11</i>	<i>Stat5a/Stat5b/Stat3</i>	ENSMUSG00000040433/ ENSMUSG00000020919/ ENSMUSG00000004040	transcription factors	11	17q11.2	1	ND
<i>Cis12</i>	PD	ENSMUSG00000034168	transcription factor	12	14q24.3	1	ND
<i>Cis13</i>	<i>Itf4</i>	ENSMUSG00000021356	transcription factor	13	6p25-p23	1	ND
<i>Evi112^A</i>	<i>Tin25/Txnrd1</i>	AL022677/ ENSMUSG00000020250	transcription factor/ thioredoxin reductase	11/10	17q11.2/12q23.3	1	ND
<i>Dkmi20</i>	<i>Cryabp1</i>	ENSMUSG00000021366	transcription factor	13	6p24-p22.3	2	3
<i>Nki33</i>	PD	ENSMUSG00000021755	ND	13	5p13.2	1	ND
<i>Dkmi21</i>	<i>Ptp4a</i>	ENSMUSG00000022606	TYR phosphatase	15	8q24	2	ND
<i>Pim3</i>	<i>Pim3</i>	AF086624	SER/THR kinase	15	22q13.3	5	9
<i>Evi163^A</i>	PD	ENSMUSG00000022462	amino acid transporter	15	12q13.11	1	ND
<i>Dkmi22</i>	<i>Kcnh3</i> / PD	ENSMUSG00000037579/ ENSMUSG00000037570	potassium channel/ transcription factor	15	12q13.12	2	ND
<i>Cis14</i>	PD	LOC239926	ND	15	ND	1	ND
<i>Dkmi23</i>	PD/ <i>Runx1</i>	mCG00009/ ENSMUSG00000022952	ND/transcription factor	16	21q22	3	4
<i>Evi13</i>	<i>Runx1</i>	ENSMUSG00000022952	transcription factor	16	21q22.12	4	3 ^c
<i>Cis15</i>	1810041B05Rik	ENSMUSG00000023883	transcription factor	17	6q27	1	ND
<i>Pim1^e</i>	<i>Pim1</i>	ENSMUSG00000024014	SER/THR kinase	17	6p21	9	-
<i>Evi14</i>	<i>Cnd3l</i> / <i>Tbn</i> pending	ENSMUSG00000034165/ ENSMUSG00000023980	cell-cycle regulator/ chromatin associated protein	17	6p21	6	ND
<i>Dkmi24</i>	PD/ PD	mCG55784/ENSMUSG00000041683	ND	17	6p21	2	1
<i>Dkmi25</i>	<i>TsgA2</i>	ENSMUSG00000024034	phosphatidylinositol kinase	17	21q22.3	2	ND
<i>Dkmi26</i>	<i>Fsrg1</i>	ENSMUSG00000024335	bromodomain containing protein	17	4p16.3	2	ND
<i>Tp12</i>	<i>Tp12</i>	ENSMUSG00000024235	SER/THR kinase	18	10p11	7	7
<i>Evi136^B</i>	<i>Egr1</i>	ENSMUSG00000038418	transcription factor	18	5q31.1	1	ND
<i>Evi153^A</i>	<i>Hmg1l</i>	m.C.69361/ ENSMUSG00000035765	HMG box protein/ ND	18	13q12	1	ND
<i>Dkmi27</i>	<i>Fbxw4</i>	ENSMUSG00000040913	F-box/WD40-repeat	19	10q24-q25	4	1
<i>Evi17^A</i>	<i>Rasgrp2</i>	ENSMUSG00000032946	RAS exchange factor	19	11q13	1	ND
<i>Dkmi28</i>	<i>Vegib</i>	ENSMUSG00000024962	growth factor	19	11q13	2	4
<i>Dkmi29^B</i>	<i>Cd6</i>	ENSMUSG00000024670	scavenger receptor	19	11q13	2	1
<i>Pim2^e</i>	<i>Pim2</i>	ENSMUSG00000031155	SER/THR kinase	X	Xp11.23	2	-
<i>Nki37^A</i>	<i>Elf4</i>	ENSMUSG00000031103	transcription factor	X	Xq26	1	ND
<i>Dkmi30</i>	1200013B08Rik	ENSMUSG00000031101	TYR kinase	X	Xq25-26.3	2	-1

Annexe J : Tableau présentant 52 sites communs d'intégration chez des souris transgéniques *EμMyc* qui ne présentent pas d'expression de *Pim1* ni de *Pim2*. (Tiré de Mikkers *et al.* 2002).



Annexe K : Représentation schématisée des étapes de digestion, de ligation et d'appariement des amorces lors des PCR sur le matériel biologique utilisé au cours de la démarche expérimentale des splinkerettes adaptées à RadLV/VL₃.



Element	Position (bp)
Multiple cloning site	266-393
lacZ α -peptide	216-593
T7 RNA polymerase promoter	239-258
T7 transcription start	256
SP6 RNA polymerase promoter	398-417
SP6 transcription start	400
Ampicillin resistance gene	1175-2032
Kanamycin resistance gene	2181-2993
pUC origin	3668
Phage f1 origin	588-1043
Primer binding sites:	
M13 forward (-20)	431-447
M13 forward (-40)	451-467
M13 reverse	209-224
T7 promoter primer	239-258
SP6 promoter primer	400-418

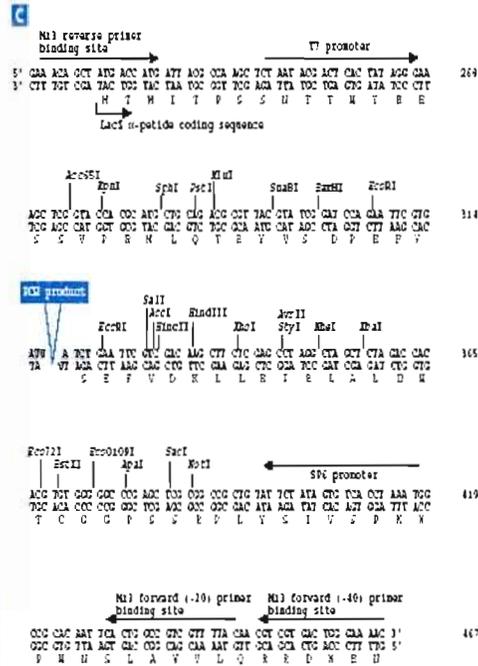
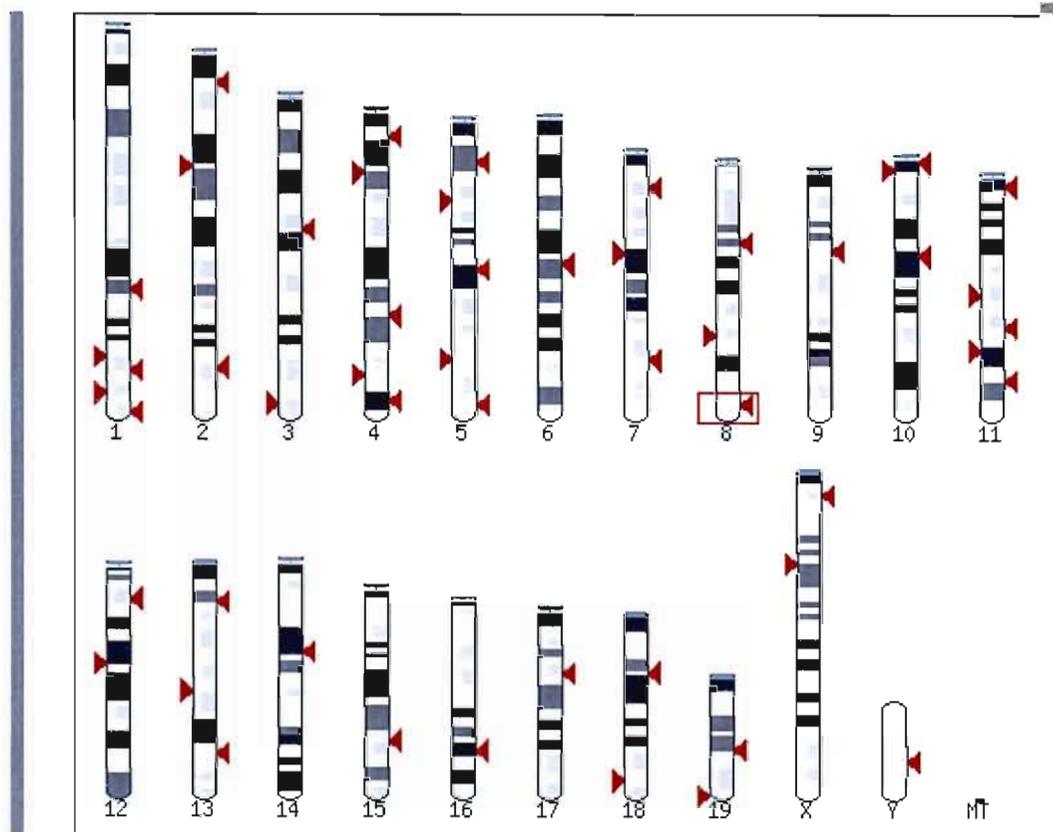


Figure 1. pDrive Cloning Vector Map. **A** Representative of the linearized pDrive Cloning Vector with U overhangs. The unique restriction and endonuclease recognition sites on either side of the cloning site are listed. **B** Positions of various elements in the pDrive Cloning Vector. **C** DNA sequence of the region surrounding the cloning site. The amino acid sequence of the lacZ α -peptide is also given. The positions of the T7 and SP6 promoter sites and the M13 forward and reverse sequencing primer binding sites are provided, as are the cutting patterns of the unique restriction endonucleases.

Annexe L : Caractéristiques du vecteur pDrive : représentation schématique et séquence d'intérêt. (Tiré de *Qiagen PCR Cloning Kit*, Qiagen, Mississauga, Canada).



Annexe M : Résultats de l'alignement des 8934 bases du génome du rétrovirus RadLV/VL₃ entier (Janowski *et al.* 1985) contre le génome de *Mus musculus* (<http://www.ensembl.org>); 408 sites furent identifiés. L'appariement le plus significatif statistiquement est indiqué par un carré rouge sur le chromosome 8.

Tumeur	Bande clonée	Longueur séquencée	Longueur criblée	Chromosome	Position	Site exact	Gènes les plus proches
BL/VL3							
108.2	Bande 2 clone 29	578	389	17	C	43.65 Mb	CdC51 + NM_177065 + Spats1 + Novel + * + Novel + Tctel
	Bande 3	271	203	X	A4	44.045 Mb	Gpc3 + Q8C957 + * + Novel + Pseudo (KIS2)
110.4	Bande 3 - 16	803	320	3	F2	93.1 Mb	Q9D1P8 + NM_028628 + * + Pseudo + Sprtl
	Bande 1	165	166	3	H1	131.53 Mb	RL34_MOUSE + Pseudo + Pseudo + * + Pseudo + Lef1
	Bande 1	165	166	3	H1	131.53 Mb	RL34_MOUSE + Pseudo + Pseudo + Pseudo + Lef1
	Bande 4 clone 15	684	258	4	D1	121.605 Mb	Ppie + Hpcal4 + Novel + Hey1 + Pseudo + Pabpc4
	Bande 4 - 15	684	258	4	D1	121.6 Mb	Novel + Hey1 + Pabpc4
	Bande 3 - 17	263	260	4	D1	122.19 Mb	NM_183163 + Q7TQ04 + Pseudo + Mycbp
	Bande 6 clone 20	415	271	6	D2	86.86 Mb	Tial + Pcbpl + * + NM_026414 + Mad
	Bande 2 clone 9	595	167	6	D2	86.86 Mb	Tial + Pcbpl + * + NM_026414 + Mad
	Bande 2 clone 9	595	167	6	D2	86.86 Mb	Tial + Pcbpl + * + NM_026414 + Mad
	Bande 6 clone 20	416	271	6	D2	87.94 Mb	Arhgap25 + Gpr73 + ^ + NM_024251 + NM_177057 + Novel + Novel
	Bande 3 clone 16	314	95	7	A3	17.75 Mb	Nfkbib + Sirt2 + Q9D231 + NM_177158 + Hnrp1 + Ech1
	Bande 3 clone 16	734	320	7	A3	17.75 Mb	Nfkbib + Sirt2 + Q9D231 + NM_177158 + Hnrp1 + Ech1
	Bande 4 clone 13	619	619	7	F2	98.06 Mb	Novel + ADML_MOUSE + Ampd3 + Rnf141 + Xikd1
	Bande 4 - 13	620	620	7	F3	102.79 Mb Vrai: 98.06Mb	Ampd3 + Rnf141 *** Nouveau: Sox6 Vrai nouveau: Novel + ADML_Mouse + Ampd3 + Rnf141
	Bande 5 clone 17	475	200	10	A3	20.96 Mb	Ahil + Myb + * + Pseudo + Hbs11
	Bande 5 clone 17	478	201	10	A3	20.96 Mb	M16449 + Pseudo + Hbs11 *** Myb + * + Pseudo + Hbs11
Bande 2 clone 8	932	935	11	C	87.35 Mb	Tex14 + Novel + Sept4 + Mtmr4 + Novel + NM_172448 + Supt4h + * + Bzrap1 + Mpo	
Bande 2	937	835	11	C	87.35 Mb	Supt4h + * + Bzrap1 + Mpo	
132.2	Bande 1	225	226	X	A1.1	6.20 Mb	Cacna1f + Syp + Lmo6 + Plp2 + Pdzx
132.8	Bande 3	115	115	5	G1	138.01 Mb	Chst12 + Griffin + * + Lfng
	Bande 5 clone 36	242	139	11	A2	11.62 Mb	NM_029171 + Zfpn1a1 + Fignl1
	Bande 3 clone 16	307	170	14	B	21.81 Mb	Novel + Q8BI56 + NM_183208 + Ppif
137.2	clone 2 = B5	300		2	A3	26.76 Mb	Notch1 --- + Lcn4 + Pseudo + * + Abo

	clone 10 = B4	500	392	2	E5	117.675 Mb	Rasgrp1 + Thbs1 + * + Fsip1
	Bande 4	389	386	2	E5	117.675 Mb	Rasgrp1 + Thbs1 + * + Fsip1
	Bande 5 clone 14	266	266	2	A3	26.76 Mb	Notch1 --- + Lcn4 + Pseudo + * + Abo
	Bande 3	718	290	6	C3	71.54 Mb	NM_145568 + Cd8b + Cd8a
	Bande 2 clone 8	1821	700	17	B1	28 Mb	Mtch1 + Fgd2 + * + Pim1 + Novel
140.4	Bande 2	627	428	3	F2	94.36 Mb	NM_025416 + Rorc + Novel + NM_177250 + Tdrkh
	Bande 4	371	309	6	C1	67.45 Mb	NM_025814 + Il12rb2 + Il23r + Novel
	Bande 4	312	311	6	C1	67.95 Mb	NM_025814 + Il12rb2 + Il23r + Novel
	Bande 4	319	85	12	D3	80.96 Mb	Fos + Jundm2 + Batf + FVR2_MOUSE
K24.1	Bande 3 clone 18	669	180	18	D3	62.56 Mb	KJ85_MOUSE + * + Adrb2 + Q8C9F4
110.3	950 clone 13	728	374	1	H2	171.02 Mb	Dusp12 + Dusp12 + Novel + NM_145141 + * + Fcgr2b
	300 clone 14	264	261	2	A3	26.46 Mb	Novel + Notch-1 + Egf17
	cn clone 15	263	255	4	D1	121.605 Mb	Ppie + Hpca14 + Novel + Hey1 + Pseudo + Pabpc4
	1.6 clone 7	205	167	5	A3	22.09 Mb	M115 + Novel + Srpk2 + * + NM_178403 + NM_177323
	800 clone 12	639	350	5	A3	22.095 Mb	M115 + Novel + Srpk2 + * + NM_178403 + NM_177323
	800 clone 12	639	350	5	A3	22.09 Mb	M115 + Novel + Srpk2 + * + NM_178403 + NM_177323
	Bande 6 clone 18	654	326	5	E5	105.14 Mb	NM_144911 + Novel + * + Gfi1 + Novel + Evi5
	Bande 7 clone 21	656	326	5	E5	105.14 Mb	NM_144911 + Novel + * + Gfi1 + Novel + Evi5
	Bande 5 clone 20	654	326	5	E5	105.14 Mb	NM_144911 + Novel + * + Gfi1 + Novel + Evi5
	Bande 5 clone 20	655	326	5	E5	105.14 Mb	NM_144911 + Novel + * + Gfi1 + Novel + Evi5
	Bande 7 clone 21	656	326	5	E5	105.14 Mb	NM_144911 + Novel + * + Gfi1 + Novel + Evi5
	750 clone 2	656	326	5	E5	105.14 Mb	NM_144911 + Novel + * + Gfi1 + Novel + Evi5
	Bande 6 clone 18	654	326	5	E5	106.81 Mb	V2r16 + Novel + Novel + Novel + Pseudo + Novel
	Bande 7 clone 21	657	326	5	F		V2r16 + Novel + Novel + Novel + Pseudo + Novel
	900 clone 4	713	492	5	G1	138.01 Mb	Kif19a + Chst12 + Grifin + * + Lfng
	Bande 6 clone 19	712	492	5	G1	138.01 Mb	Kif19a + Chst12 + Grifin + * + Lfng
	Bande 6 clone 19	712	492	5	G2	139.3 Mb	Novel + Sdk1 + Foxk1
	Bande 7	416	271	6	D2	86.86 Mb	Kifc1 + Novel + Pcyox1 + NM_146170 + Tia1 + Pcbp1 + NM_026414 + Mad
	Bande 6 clone 11	424	139	6	C3	71.54 Mb	Fabp1 + Smyd1 + NM_145568 + Cd8b + * + Cd8a
	Bande 7	416	271	6	D2	86.86 Mb	Tia1 + Pcbp1 + * + NM_026414 + Mad
Bande 3 clone 7	205	167	8	B1.3	42.44 Mb	Novel + Pseudo + Zfp42 + NM_010245 + * + Novel	

	Bande 4 clone 17	475	200	10	A3	22.09 20.96 Mb	M16449 + Pseudo + Hbs11 *** Myb + * + Pseudo + Hbs11
	600 clone 14	475	200	10	A3	20.96 Mb	Ahi1 + Myb + * + Pseudo + Hbs11
	Bande 4 clone 17	475	200	10	A3	20.96 Mb	Ahi1 + Myb + * + Pseudo + Hbs11
	Bande 4 clone 22	784	580	15	D3	62.29 Mb	Myc + * + Pet1 + Pseudo
	Bande 5 clone 21	783	580	15	D3	62.29 Mb	Myc + * + Pet1 + Pseudo
	1.6 clone 1	790	579	15	D3	62.29 Mb	Myc + * + Pet1 + Pseudo
	Bande 3 clone 22	783	575	15	D3	62.29 Mb	Myc + * + Pet1 + Pseudo
	Bande 5 clone 21	782	575	15	D3	62.29 Mb	Myc + * + Pet1 + Pseudo
	Bande 3	2611	919	19	B	13.87 Mb	Novel + Tle4 + Novel + Pseudo + O08905
Contrôle négatif splinkerette fragmentée	782	255					
110.2	Bande 5 clone 19	729	492	1	H2	171.02 Mb	Novel + NM_145141 + * + Fcgr2b
	Bande 2 clone A sans suite U5	1005	529	7	F2	101.44 Mb	Spon1 + Novel + * + Copb1
	Bande 3 clone 12	1365	527	7	F2	101.44 Mb	Spon1 + Novel + * + Copb1
	Bande 9 clone 23	74	74	11	E2	113.29 Mb	Q8C496 + Sstr2 + Cog1
	Bande 3 clone D	965	742	15	E2	80.87 Mb	Cacn1i + Novel + Grap2
	Bande 4 clone 16	1212	751	15	E2	80.87 Mb	Cacn1i + Novel + Grap2
	Bande 4 clone 13	549	159	17	C	45.69 Mb	NM_022015 + Cend3 + Pseudo + Bys1
	Bande 4 clone 14	549	159	17	C	45.69 Mb	NM_022015 + Cend3 + Pseudo + Bys1
Bande 4 clone 15	522	369	9 random	A4	21.25 Mb	Cdkn2d + Ap1m2 + * + NM_152808	
132.1	Bande 4 clone 10	848	831	3	F3	94.37 Mb	NM_025416 + Rorc + Novel + Tdrkh
	Bande 2 clone 1	455	461	7	C	55.31 Mb	Q9CWB5 + * + Novel + Q810P9
	Bande 2 clone 3	731	731	15	D3	62.26 Mb	Myc + * + Pet1 + Pseudo
	Bande 3 clone 8	730	727	15	D3	62.26 Mb	Myc + * + Pet1 + Pseudo
	Bande 5 clone 11	731	727	15	D3	62.27 Mb	Myc + * + Pet1 + Pseudo
	Bande 6 clone 15	522	369	9 random	A4	21.25 Mb	Cdkn2d + Ap1m2 + * + NM_152808
132.3	Bande 5 clone 13	727	493	1	H2	171.02 Mb	Novel + NM_145141 + * + Fcgr2b
	Bande 4 clone 12	1100	934	5	F	122.75 Mb	Ncor2 + * + Scarb1
	Bande 3 clone 8	779	560	10	A3	20.77 Mb	Novel + Ahi1 + Myb
	Bande 2 clone 4	744	344	11	A2	11.60 Mb	NM_029171 + Zfp111 + Fign1
	Bande 6 clone 18	210	210	14	A3	12.82 Mb	O08505 + Pseudo + * + Q9D404 + Ngly1
	Bande 7 clone 21	129	127	17	B1	28.00 Mb	Fgd2 + * + Pim1 + Novel

	Bande 2 clone 2	680	no hits				chr5:22,093,186-22,093,858
	Bande 2 clone 2	679	no hits				chr5:22,093,186-22,093,858
	Bande 2 clone 2 NCBI	739	no hits				
151.2	Bande 1 clone 8	1019	758	4	A2	11.67 Mb	Novel + Pseudo + Gem + * + Cdh17 + Novel
	Bande 3 clone 3	539	528	7	F2	101.44Mb	Spon1 + Novel + * + Copb1
	Bande 3 clone 20 nouveau	540	540	7	F2	101.44Mb	Spon1 + Novel + * + Copb1
	Bande 2 clone 24	780	157	9	F2	107.36Mb	Cish + Hemk1 + * + NM_175486 + Cacna2d2
	Bande 6 clone 24	144	144	16	B1	16.64 Mb	Igl-5 + * + Vpreb1 + Top3b
	Bande 5 clone 11	242	146	2 random	H1	152.86 Mb	Cox4i2 + Bcl2l1 + Tpx2
151.3	Bande 2 clone 3	1255	1025	7	C	50.94 Mb	novel + k1f13 + * + Trpm1
	Bande 1 clone 19	1363	663	11	E2	115.08 Mb	Novel + Ict1 + Atp5h
C57BLV/L3 1.1	Bande 8 clone 14	239	228	8	E2	122.89 Mb	Tubb3 + Mela + * + Q61927 + Def8
	Bande 3	1269	296	16	B5	49.71 Mb	Esrbl1 + Pseudo + * + Cd47
	Bande 3 clone 4	342	20	17	E1.2	63.11 Mb	Pja2 + Man2a1 + * + Q9D2E3
C57BLV/L3 1.2	Bande 7 clone 17	483	257	17	B1	28.99 Mb	Fgd2 + Pim1 + * + Novel
K31.7	Bande 5 clone 23 U5X2	829	401	5	A3	22.09 Mb	M115 + Novel + Srpk2 + * + NM_178403
	Bande 5 23 U5X1	282	282	7	F2	101.45 Mb	Spon1 + Novel + * + Copb1
	Bande 6 clone 24	282	282	7	F2	101.45 Mb	Spon1 + Novel + * + Copb1
	Bande 7 clone 1	282	282	7	F2	101.45 Mb	Spon1 + Novel + * + Copb1
	Bande 6 clone 17	238	238	11	A2	11.77 Mb	Figl1 + Ddc + Grb10
	Bande 9 clone 6	238	238	11	A2	11.77 Mb	Figl1 + Ddc + Grb10
	Bande 3 Clone 8	226	20	18	E2	73.16 Mb	DCC + * + O08905
K31.3	Bande 2 clone 10	597	333	10	A3	20.89 Mb	Ahi1 + Myb + * + Pseudo + Hbs11
K31.4	Bande 4 clone 5	566	337	2	A2	17.46 Mb	O08905 + Neb1 + Q8BWC6
	Bande 2 clone 12	1288	987	5	F	109.72 Mb	Hps4 + Q8CDD5 + Novel + Q80Vp9
	Bande 1 clone 11	1352	1040	11	E2	119.51 Mb	Nptx1 + RPOR_MOUSE + Pseudo + Novel + Baiap2 + Aatk + Azi1
	Bande 3 clone 17	243	33	13	C3	87.32 Mb	Pseudo + * + Rps23 + Apg101
	Bande 6 clone 14 sans retro	1134	603	15	D3	62.25 Mb	Myc + * + Pvt1 + Pseudo
	Bande 7 clone 20	300	301	15	D3	62.25 Mb	Myc + * + Pvt1 + Pseudo
	Bande 5 clone 12	1122	409	16	B1	18.23 Mb	Comt + Txnrd2 + Gnb11

	Bande 8 clone 22	485	179	17	B1	28.10 Mb	Fgd2 + Pim1 + * + Novel ou chromo 6 Lep + Rbm28 + Novel + NM_023516 + * + NM_207258 + Calu
	Bande 9 clone 3	482	480	19	A	4.08 Mb	Ssh3 + NM_026720 + Adrbk2 + Fbx111
110.2 A	Bande 1 clone 7	1330	1035	5	F	109.72 Mb	Hps4 + Q8CDD5 + Novel + Q80Vp9
	Bande 5 clone 18	350	182	7	F4	115.86 Mb	Slc5a2 + NM_145590 + Rgs10 + Tial1 + Bag3
	Bande 7 clone 13	862	214	7	A1	7.89 Mb	Novel + Napa + NM_133727 + Slc8a2 + Dhx34 + Gpr77 + C5r1 + Ccde9
	Bande 2 clone 3	172	66	11	E2	113.29 Mb	Slc39a11 + Q8C496 + Sstr2 + Cog1
	Bande 4 clone 10	73	74	11	E2	113.29 Mb	Slc39a11 + Q8C496 + Sstr2 + Cog1
	Bande 8 clone 22	74	74	11	E2	113.29 Mb	Slc39a11 + Q8C496 + Sstr2 + Cog1
	Bande 9 clone 4	78	75	11	E2	113.29 Mb	Slc39a11 + Q8C496 + Sstr2 + Cog1
	Bande 3 clone 10	821	644	15	E2	80.87 Mb	Novel + Cacna1i + Novel + Grap2
	Bande 6 clone 21	797	734	15	E2	80.87 Mb	Novel + Cacna1i + Novel + Grap2
	K31.5	Bande 5 clone 18	498	498	9	E4	96.80 Mb
Bande 4 clone 13		1353	525	11	E2	116.97 Mb	Sec1411 + Pseudo + Sept9 + Pseudo
Bande 1 clone 4		1386	469	15	D3	62.25 Mb	Myc + * + Pvt1 + Pseudo
Bande 6 clone 23		123	102	15	E1	75.23 Mb	Pseudo + Hemt1 + Novel + Cyp11b2 + NM_025929 + Novel + * + Ly6e + Ly6i + Novel
Bande 2 clone 5		342	65	Y		30.55 Mb	Novel + Novel + * + NM_010245 + Novel OU Chromo 8 E2 122.90 Mb Mela + Q61927 + * + Def8

Annexe N : Tableau de tous les résultats bruts de positionnement des bandes séquencées au cours de ce projet. **Caractères verts** : indiquent le site d'intégration. **Caractères rouges** : indiquent les oncogènes connus. **Caractères mauves** : indiquent le site d'intégration dans un oncogène connu.

Références

AJCHENBAUM, F., ANDO, K., DECAPRIO, J.A. et GRIFFIN, J.D. 1993. Independent Regulation of Human D-type Cyclin Gene Expression during G1 Phase in Primary Human T Lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, vol.: 268 (6), p. 4113-4119.

AKAGI, K., SUZUKI, T., STEPHENS, R.M., JENKINS, N.A. et COPELAND, N.G. 2004. RTCGD: Retroviral Tagged Cancer Gene Database. *Nucleic Acids Research*, vol.: 32, p. D523-D527.

ARNOLD, C. et HODGSON, I.J. 1991. Vectorette PCR: a Novel Approach to Genomic Walking. *PCR Methods Appl.*, vol.: 1 (1), p. 39-42.

ARONHEIM, A., ZANDI, E., HENNEMANN, H., ELLEDGE, S. et KARIN, M. 1997. Isolation of an AP-1 Repressor by a Novel Method for Detecting Protein-Protein Interactions. *Mol. Cell. Biol.*, vol.: 17, p. 3094-3102.

ARTAVANIS-TSAKONAS, S., MATSUNO, K. et FORTINI, M.E. 1995. Notch Signaling. *Science*, vol.: 268, p. 225-232.

ASTER, J.C. et PEAR, W.S. 2001. Notch Signaling in Leukemia. *Current Opinion in Hematology*, vol.: 8, p. 237-244.

AYER, D.E. et EISENMAN, R.N. 1993. A Switch from Myc:Max to Mad:Max Heterocomplexes Accompanies Monocyte/Macrophage Differentiation. *Genes Dev.*, vol.: 7, p. 2110-2119.

AYER, D.E., KRETZNER, L. et EISENMAN, R.N. 1993. Mad: a Heterodimeric Partner for Max that Antagonizes Myc Transcriptional Activity. *Cell*, vol.: 72, p. 1-20.

BADIANI, P.A., KIOUSSIS, D., SWIRSKY, D.M., LAMPERT, I.A. et WESTON, K. 1996. T-Cell Lymphomas in V-Myb Transgenic Mice. *Oncogene*, vol.: 13, p. 2205-2212.

BARTHOLOMEW, C. et IHLE, J. 1991. Retroviral Insertions 90 Kilobases Proximal to the Evi-1 Myeloid Transforming Gene Activate Transcription from the Normal Promoter. *Mol. Cell. Biol.*, vol.: 11 (4), p. 1820-1828.

BAUMANN, R., ASKOVIC, S. et BENG TEN, E. 2001. *Viruses and Cancer*. University of Mississippi, Medical Center, Department of Microbiology. <http://iain.umsmed.edu/~micro/oncs.html>

- BEAR, S.E., BELLACOSA, A., LAZO, P.A., JENKINS, N.A., COPELAND, N.G., HANSON, C., LEVAN, G. et TSICHLIS, P.N. 1989. Provirus Insertion in Tpl-1, an Ets-1-Related Oncogene, is Associated with tumor Progression in Moloney Murine Leukemia Virus-Induced Rat Thymic Lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol.: 86, p. 7495-7499.
- BELLO-FERNANDEZ, C., PACKHAM, G. et CLEVELAND, J.L. 1993. Ornithine Decarboxylase is a Transcriptional Target of c-Myc. *Proc. Natl., Acad. Sci.*, vol.: 90, p. 7804-7808.
- BEN-DAVID, Y., YEFENOF, E. et KOTLER, M. 1987. Clonal Analysis of Radiation Leukemia Virus-Induced Leukemic and Preleukemic Murine Cell. *Cancer Res.*, vol.: 47, p. 6590-6594.
- BENDER, T.P., THOMPSON, C.B. et KUEHL, W.M. 1987. Differential Expression of c-Myb mRNA in Murine B Lymphomas by a Block to Transcription Elongation. *Science* vol.: 237 (4821), p. 1473-1476.
- BEVERLY, L.J. et CAPOBIANCO, A.J. 2003. Perturbation of Ikaros Isoform Selection by MLV Integration is a Cooperative Event in Notch^{1C}-Induced T Cell Leukemogenesis. *Cancer Cell*, vol.: 3, p. 551-564.
- BIRD, A.P. 1986. CpG-Rich Islands and the Function of DNA Methylation. *Nature*, vol.: 321, p.209-213.
- BLAGITKO, N., MERGENTHALER, S., SCHULZ, U., WOLLMANN, H.A., CRAIGEN, W., EGGERMANN, T., ROPERS, H.H. et KALSCHUEUR, V.M. 2000. Human GRB10 is Imprinted and Expressed from the Paternal and Maternal Allele in a Highly Tissue- and Isoform-Specific Fashion. *Hum. Mol. Genet.*, vol.: 9, p. 1587-4595.
- BLAUMUELLER, C.M. et ARTAVANIS-TSAKONAS, S. 1997. Comparative Aspects of Notch Signaling in Lower and Higher Eukaryotes. *Perspect. Dev. Neurobiol.*, vol.: 4, p. 325-343.
- BLAYDES, S.M., KOGAN, S.C., TRUONG, B.-T., GILBERT, D.J., JENKINS, N.A., COPELAND, N.G., LARGAESPADA, D.A. et BRANNAN, C.I. 2001. Retroviral Integration at the Epi1 Locus Cooperates with Nf1 Gene Loss in the Progression to Acute Myeloid Leukemia, *J. Virol.*, vol.: 75, p. 9427-9434.
- BOUILLE, P., SUBRA, F., GOULAOUIC, H., CARTEAU, S. et AUCLAIR, C. 1995. Impairment of Moloney Murine Leukemia Virus Integration in a Cell Line Underexpressing DNA Topoisomerase II. *Cancer Res.*, vol.: 55, p. 3211-3217.

- BOZZI, F., LUKSCH, R., COLLINI, P., GAMBIRASIO, F., BARZANO, E., POLASTRI, D., PODDA, M., BRANDO, B. et FOSSATI-BELLANI, F. 2004. Molecular Detection of Dopamine Decarboxylase Expression by Means of Reverse Transcriptase and Polymerase Chain Reaction in Bone Marrow and Peripheral Blood: Utility as a Tumor Marker for Neuroblastoma. *Diagn. Mol. Pathol.*, vol.: 13 (3), p. 135-143.
- BØRGLUM, A.D., KIROV, G., CRADDOCK, N., MORS, O., MUIR, W., MURRAY, V., MCKEE, I., COLLIER, D.A., EWALD, H., OWEN, M.J., BLACKWOOD, D. et KRUSE, T.A. 2003. Possible Parent-of-Origin Effect of Dopa Decarboxylase in Susceptibility to Bipolar Affective Disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*, vol.: 117B, p. 18-22.
- BUCHHAGEN, D.L., PEDERSEN, F.S., CROWTHER, R.L. et HASELTINE, W.A. 1980. Most Sequence Differences Between the Genomes of the AKV Virus and a Leukemogenic Gross A Virus Passaged *in vitro* are Located Near the 3' Terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.: 77 (7), p. 4359-4363.
- BROUSSARD, D.R., LOZANO, M.M. et DUDLEY, J.P. 2004. Rory (Rorc) Is a Common Integration Site in Type B Leukemogenic Virus-Induced T-Cell Lymphomas. *Journal of Virology*, vol.: 78 (9), p. 4943-4946.
- BROWN, P.O., COFFIN, J.M., HUGHES, H.E. et VARMUS, P.P. 1997. *Integration, Retroviruses*. Cold Spring Harbor Lab, Press.
- CAMPOS-ORTEGA, J.A. 1996. Numb Diverts Notch Pathway Off the Tramtrack. *Neuron*, vol.: 17, p. 1-4.
- CANO-GAUCI, D.F., SONG, H.H., YANG, H., MCKERLIE, C., CHOO, B., SHI, W., PULLANO, R., PISCIONE, T.D., GRISARU, S., SOON, S., SEDLACKOVA, L., TANSWELL, A.K., MAK, T.W., YEGER, H., LOCKWOOD, G.A., ROSENBLUM, N.D. et FILMUS, J. 1999. Glypican-3-Deficient Mice Exhibit Developmental Overgrowth and some of the Abnormalities Typical of Simpson-golabi-Behmel Syndrome. *The Journal of Cell Biology*, vol.: 146 (1), p. 255-264.
- CASAS, S., OLLILA, J., AVENTÍN, A., VIHINEN, M., SIERRA, J. et KNUUTILA, S. 2003. Changes in Apoptosis-Related Pathways in Acute Myelocytic Leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, vol.: 146, p. 89-101.
- CHANG, D., VALDEZ, P., HO, T. et ROBEY, E. 2000. MHC Recognition in Thymic Development: Distinct, Parallel Pathways for Survival and Lineage Commitment. *J. Immunol.*, vol.: 165, p. 6710-6715.

CHATTOPADHYAY, S.K., CLOYD, M.W., LINEMEYER, D.L., LANDER, M.R., RANDS, E. et LOWY, D.R. 1982. Cellular Origin and Role of Mink Cell Focus-Forming Viruses in Murine Thymic Lymphomas. *Nature*, vol.: 295 (5844), p. 25-31.

CHATTOPADHYAY, S.K., LANDER, M.R., GUPTA, S., RANDS, E. et LOWY, D.R. 1981. Origin of Mink Cytopathic Focus-Forming (MCF) Viruses: Comparison with Ecotropic and Xenotropic Murine Leukemia Virus Genomes. *Virology*, vol.: 113, p.465-483.

CHATTOPADHYAY, S.K., LOWY, D.R., TEICH, N.M., LEVINE, A.S. et ROWE, W.P. 1974. Evidence that the AKR Murine-Leukemia-Virus Genome is Complete in DNA of the High-Virus AKR Mouse and Incomplete in the DNA of the "Virus-Negative" NIH Mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.: 71 (1), p. 167-171.

CHIANG, P.-W., ZHANG, R., STUBBS, L., ZHANG, L., ZHU, L. et KURNIT, D.M. 1998. Comparison of Murine Supt4h and a Nearly Identical Expressed, Processed Gene: Evidence of Sequence Conservation Through Gene Conversion Extending Into the Untranslated Regions. *Nucleic Acids Research*, vol.: 26 (21), p. 4960-4964.

CHRISTENSON, J.G., DAIRMAN, W. et UDENFRIEND, S. 1972. On the Identity of DOPA Decarboxylase and 5-Hydroxytryptophan Decarboxylase (Immunological Titration-Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase-Serotonin-Dopaminenorepinephrine). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol.: 69, p. 343-347.

COFFIN, J. M., HUGHES, S. H., VARMUS, H. E. 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, États-Unis, 842 pages.

COOPER, G.M. 1999. *La cellule: une approche moléculaire*. DeBoeck Université, Bruxelles, 674 p.

COPELAND, N.G., BEDIGIAN, H.G., THOMAS, C.Y. et JENKINS, N.A. 1984. DNAs of Two Molecularly Cloned Endogenous Ecotropic Proviruses are Poorly Infectious in DNA Transfection Assays. *J. Virol.*, vol.: 49, p. 437-444.

CORCORAN, L.M., ADAMS, J.M., DUNN, A.R. et CORY, S. 1984. Murine T Lymphomas in which the Cellular *myc* Oncogene has been Activated by Retroviral Insertion. *Cell*, vol.: 37 (1), p. 113-122.

CUYPERS, H.T., SELTEN, G., QUINT, W., ZIJILSTRA, M. MAANDAG, E.R., BOELEN, W., VAN WEZENBEEK, P., MELIEF, C. et BERNIS, A. 1984. Murine Leukemia Virus-Induced T-Cell Lymphomagenesis: Integration of Proviruses in a Distinct Chromosomal Region. *Cell*, vol.: 37, p. 141-150.

DANIEL, R., KATZ, R.A. et SKALKKA, A.M. 1999. A Role for DNA-PK in Retroviral DNA Integration. *Science*, vol.: 284, p. 644-647.

DATTA, S.K., THOMAS, C.Y., NICKLAS, J.A. et COFFIN, J.M. 1983. Thymic Epithelial Genotype Influences the Production of Recombinant Leukemogenic Retroviruses in Mice. *J. Virol.*, vol.: 47, p. 33-45.

DAVIS, A.C., WIMS, M., SPOTTS, G.D., HANN, S.R. et BRADLEY, A. 1993. A Null c-Myc Mutation Causes Lethality Before 10.5 Days of Gestation in Homozygote Embryos and Reduced Fertility in Heterozygous Female Mice. *Genes and Development*, vol.: 7, p. 671-682.

DECLÈVE, A., LIEBERMAN, M., IHLE, J.N., ROSENTHAL, P.N., LUNG, M.L. et KAPLAN, H.S. 1978. Physicochemical, Biological and Serological Properties of a Leukemogenic Virus Isolated from Cultured RadLV-Induced lymphomas of C57BL/Ka Mice. *Virology*, vol.: 90, p. 23-35.

DECLÈVE, A., SATO, C., LIEBERMAN, M. et KAPLAN, H.S. 1974. Selective Thymic Localization of Murine Leukemia Virus-Related Antigens in C57BL/Ka Mice After Inoculation with Radiation Leukemia Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.: 71, p. 3124-3128.

DENHARDT, D.T. 1966. A Membrane-Filter Technique for the Detection of Complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol.: 23, p. 641-646.

DENICOURT, C., EDOUARD, E. et RASSART, E. 1999. Oncogene Activation in Myeloid Leukemias by Graffi Murine Leukemia Virus Proviral Integration. *Journal of Virology*, vol.: 73 (5), p. 4439-4441.

DENICOURT, C., KOZAK, C.A. et RASSART, E. 2003. *Gris1*, a New Common Integration Site in Graffi Murine Leukemia Virus-Induced Leukemias: Overexpression of a Truncated Cyclin D2 due to Alternative Splicing. *Journal of Virology*, vol.: 77 (1), p. 37-44.

DESGROSEILLERS, L. et JOLICOEUR, P. 1984. The Tandem Direct Repeats within the Long Terminal Repeat of Murine Leukemia Viruses are the Primary Determinant of their Leukemogenic Potential. *Journal of Virology*, vol.: 52 (3), p. 945-952.

DEVON, S.R., PORTEOUS, D.J. et BROOKES, A.J. 1995. Splinkerettes-Improved Vectors for Greater Efficiency in PCR Walking. *Nucleic Acids Research*, vol.: 23 (9), p. 1644-1645.

ELLERMAN, V. et BANG, O. 1908. *Experimentelle Leukämie bei Huhnern*. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig., vol.: 46, p. 595-609.

FEHON, R.G., KOOH, P.J., REBAY, T., REGAN, C.L., XU, T., MUSKAVITCH, M.A.T. et ARTAVANIS-TSAKONAS, S. 1990. Molecular Interactions Between the Protein Products of the Neurogenic Loci Notch and Delta, Two EGF-Homologous Genes in *Drosophila*. *Cell*, vol.: 61 (3), p. 523-534.

FORTINI, M.E. et ARTAVANIS-TSAKONAS, S. 1994. The Suppressor of Hairless Protein Participates in Notch Receptor Signaling. *Cell*, vol.: 79, p. 273-282.

GARDINER-GARDEN, M. et FROMMER, M. 1987. CpG Islands in Vertebrate Genomes. *J. Mol. Biol.*, vol.: 196, p. 216-282.

GELB, L.D., MILSTIEN, J.B., MARTIN, M.A. et AARONSON, S.A. 1973. Characterization of Murine Leukemia Virus-Specific DNA Present in Normal Mouse Cells. *Nature New Biol.*, vol.: 244, p. 76-79.

GEORGOPOULOS, K., BIGBY, M., WANG, J.H., MOLNAR, A., WU, P., WINANDY, S. et SHARPE, A. 1994. The *Ik* Gene is Required for the Development of All Lymphoid Lineages. *Cell*, vol.: 79, p. 143-156.

GILBERT, D., NEUMANN, P., TAYLOR, B., JENKINS, N. et COPELAND, N. 1993. Susceptibility of AKXD Recombinant Inbred Mouse Strains to Lymphomas. *J. Virol.*, vol.: 67, p. 2083-2090.

GIRARD, L., HANNA, Z., BEAULIEU, N., HOEMANN, C.D., SIMARD, C., KOZAK, C.A. et JOLICOEUR, P. 1996. Frequent Provirus Insertional Mutagenesis of Notch1 in Thymomas of MMTVD/myc Transgenic Mice Suggests a Collaboration of *c-myc* and Notch1 for Oncogenesis. *Genes Dev.*, vol.: 10 (15), p. 1930-1944.

GIRARD, L. et JOLICOEUR, P. 1998. A Full-Length Notch1 Allele is Dispensable for Transformation Associated with a Provirally Activated Truncated Notch1 Allele in Moloney MuLV-Infected MMTV^D/myc Transgenic Mice. *Oncogene*, vol.: 16, p. 517-522.

GREENWALD, I. 1994. Structure/Function Studies of Lin-12/Notch Proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol.: 4, p. 556-562.

GRIDLEY, T. 1996. Human Genetics. Notch, Stroke and Dementia. *Nature*, vol.: 383, p. 673.

- GRINBERG, A.V., HU, C.-D. et KERPPOLA, T.K. 2004. Visualization of Myc/Max/Mad Family Dimers and the Competition for Dimerization in Living Cells. *Molecular and Cellular Biology*, vol.: 24 (10), p. 4294-4308.
- GROSS, L. 1970. *Oncogenic Viruses*. Pergamon Press, Inc., Elmsford, New York.
- GUAN, H., SMIRNOV, D.A. et RICCIARDI, R.P. 2003. Identification of Genes Associated with Adenovirus 12 Tumorigenesis by Microarray. *Virology*, vol.: 309, p. 114-124.
- HAHM, K., ERNST, P., LO, K., KIM, G.S., TURCK, C. et SMALE, S.T. 1994. The Lymphoid Transcription Factor LyF-1 is Encoded by Specific, Alternatively Spliced mRNAs Derived From the Ik Gene. *Mol. Cell. Biol.*, vol.: 14, p. 7111-7123.
- HANNA, Z., JANKOWSKI, M., TREMBLAY, P., JIANG, X., MILATOVICH, A., FRANCKE, U. et JOLICOEUR, P. The Vin-1 Gene, Identified by Provirus Insertional Mutagenesis, is the Cyclin D2. 1993. *Oncogene*, vol.: 8 (6), p. 1661-1666.
- HANSEN, G.M. et JUSTICE, M.J. 1999. Activation of Hex and mEG5 by Retroviral Insertion may Contribute to Mouse B-Cell Leukemia. *Oncogene*, vol.: 18, p. 6531-6539.
- HANSEN, G.M., SKAPURA, D. et JUSTICE, M.J. 2000. Genetic Profile of Insertion Mutations in Mouse Leukemias and Lymphomas. *Genome Research*, vol.: 10, p. 237-243.
- HARAN-GHERA, N. et PELED, A. 1979. Induction of Leukemia in Mice by Irradiation and Radiation Leukemia Virus Variants. *Adv. Cancer Res.*, vol.: 30, p. 45-87.
- HAREN, L., TON-HOANG, B. et CHANDLER, M. 1999. Integrating DNA: Transposases and Retroviral Integrases. *Annu. Rev. Microbiol.*, vol.: 53, p. 245-281.
- HAYS, E.F. et BRISTOL, G. 1992. Observations on Lymphomagenesis and Lymphoma in AKR Mice. A Description of Preliminary changes in the Thymus and Phenotypic Diversity of Lymphomas Induced by SL3-3 Virus. *Thymus*, vol.: 19, p. 219-234.
- HE, Y.W., BEERS, C., DEFTOS, M.L., OJALA, E.W., FORBUSH, K.A. et BEVAN, M.J. 2000. Down-Regulation of the Orphan Nuclear Receptor ROR γ t is Essential for T Lymphocyte Maturation. *J. Immunol.*, vol.: 164, p. 5668-5674.

- HE, Y.W., DEFTOS, M.L., OJALA, E.W. et BEVAN, M.J. 1998. ROR γ t, a Novel Isoform of an Orphan Receptor, Negatively Regulates Fas Ligand Expression and IL-2 Production in T Cells. *Immunity*, vol.: 9, p. 797-806.
- HEINRICH, R., LIVNES, E., BEN-IZHAK, O. et ARONHEIM, A. 2004. The c-Jun Dimerization Protein 2 Inhibits Cell Transformation and Acts as a Tumor Suppressor Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.: 279 (7), p. 5708-5716.
- HIATT, H.H., WATSON, J.D., WINSTEIN, J.A. eds. 1977. *Origins of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Conf. New York. Cell Proliferation.
<http://iain.umsmmed.edu/~micro/oncs.html>
- HOEMANN, C.D., BEAULIEU, N., GIRARD, L., REBAI, N. et JOLICOEUR, P. 2000. Two Distinct Notch1 Mutant Alleles Are Involved in the Induction of T-Cell Leukemia in c-Myc Transgenic Mice. *Molecular and Cellular Biology*, vol.: 20 (11), p. 3831-3842.
- HOFFMAN, B., AMANULLAH, A., SHAFARENKO, M. et LIEBERMANN, D.A. 2002. The Proto-Oncogene c-Myc in Hematopoietic Development and Leukemogenesis. *Oncogene*, vol.: 21, p. 3414-3421.
- HSIEH, J.J., HENKEL, T., SALMON, P., ROBEY, E., PETERSON, M.G. et HAYWARD, S.D. 1996. Truncated Mammalian Notch1 Activates CBF1/RBPJk-Repressed Genes by a Mechanism Resembling that of Epstein-Barr Virus EBNA2. *Molecular and Cellular Biology*, vol.: 16, p. 952-959.
- HU, W.-Y., BUSHMAN, F.D. et SIVA, A.C. 2004. RNA Interference Against Retroviruses. *Virus Research*, vol.: 102, p. 59-64.
- HUGHES, S.E., SHANK, P.R., SPECTOR, D.H., KUNG, H.-J., BISHOP, J.M., VARMUS, H.E., VOGT, P.K. et BREITMAN, M.L. 1978. Provirus of Avian Sarcoma Virus are Terminally Redundant, Coextensive with Unintegrated Linear DNA and Integrated at many Sites. *Cell*, vol.: 15, p. 1397-1410.
- HUGHES-BENZIE, R.M., PILIA, G., XUAN, J.Y., HUNTER, A.G.W., CHEN, E., GOLABI, M., HURST, J.A., KOBORI, J., MARYMEE, K., PAGON, R.A., PUNNETT, H.H., SCHELLEY, S., TOLMIE, J.L., WOHLFERD, M.M., GROSSMAN, T., SCHLESSINGER, D. et MACKENZIE, A.E. 1996. Simpson-Golabi-Behmel Syndrome: Genotype/Phenotype Analysis of 18 Affected Males from 7 Unrelated Families. *Am. J. Med. Genet.*, vol.: 66, p. 227-234.

HUI, E. K.-W., WANG, P.-C. et LO, S.J. 1998. Mini-Review: Strategies for Cloning Unknown Cellular Flanking DNA Sequences from Foreign Integrants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol.: 54, p. 1403-1411.

HWANG, H.C., MARTINS, C.P., BRONKHORST, Y., RANDEL, E., BERNS, A., FERRO, M. et CLURMAN, B.E. 2002. Identification of Oncogenes Collaborating with p27^{Kip1} Loss by Insertional Mutagenesis and High-Throughput Insertion Site Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol.: 99 (17), p. 11 293-11 298.
<http://www.pnas.org/cgi/content/full/99/17/11293>

INTRONA, M., LUCHETTI, M., CASTELLANO, M., ARSURA, M. et GOLAY, J. 1994. The Myb Oncogene Family of Transcription Factors: Potent Regulators of Hematopoietic Cell Proliferation and Differentiation. *Semin. Cancer Biol.*, vol.: 5 (2), p. 113-124.

INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES. 2003. Invitrogen Catalogue 2003. Ontario, Burlington. <http://www.invitrogen.com>

JANOWSKI, M., MERREGAERT, J., BONIVER, J. et MAISIN, J.R. 1985. Proviral Genome of Radiation Leukemia Virus Molecular Cloning of Biologically Active Proviral DNA and Nucleotide Sequence of its Long Terminal Repeat. *Journal of Virology*, vol.: 55 (1), p. 251-255.

JANOWSKI, M., MERREGAERT, J. et REDDY, P. 1986. Retroviruses in Radiation-Induced Lymphomas. *Leuk. Res.*, vol.: 10, p. 833-842.

JANSEN-DURR, P., MEICHLE, A., STEINER, P., PAGANO, M., FINKE, K., BOTZ, J., WESSBECHER, J., DRAETTA, G. et EILERS, M. 1993. Differential Modulation of Cyclin Gene Expression by MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol.: 90 (8), p. 3685-3689.

JARRIAULT, S. BROU, C., LOGEAT, F., SCHROETER, E.H., KOPAN, R. et ISRAEL, A. 1995. Signalling Downstream of Activated Mammalian Notch. *Nature*, vol.: 377, p. 355-358.

JETTEN, A.M., KUREBAYASHI, S. et UEDA, E. 2001. The ROR Nuclear Orphan Receptor Subfamily: Critical Regulators of Multiple Biological Processes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, vol.: 69, p. 205-247.

JIANG, X., VILLENEUVE, L., TURMEL, C., KOZAK, C.A. et JOLICOEUR, P. 1994. The Myb and Ahi-1 Genes are Physically very closely Linked on Mouse Chromosome 10. *Mamm. Genome*, vol.: 5, p. 142-148.

JIN, C., LI, H., MURATA, T., SUN, K., HORIKOSHI, M., CHIU, R. et YOKOYAMA, K.K. 2002. JDP2, a Repressor of AP-1, Recruits a Histone Deacetylase 3 Complex to Inhibit the Retinoic Acid-Induced Differentiation of F9 Cells. *Mol. Cell. Biol.*, vol.: 22, p. 4815-4826.

JIN, C., UGAI, H., SONG, J., MURATA, T., NILI, F., SUN, K., HORIKOSHI, M. et YOKOYAMA, K.K. 2001. Identification of Mouse Jun Dimerization Protein 2 as a Novel Repressor of ATF-2. *FEBS Lett.*, vol.: 489 (1), p. 34-41.

JOHANSSON, F.K., BRODD, J., EKLÖF, C., FERLETTA, M., HESSELAGER, G., TIGER, C.-F., UHRBOM, L. et WESTERMARK, B. 2004. Identification of Candidate Cancer-Causing Genes in Mouse Brain Tumors by Retroviral Tagging. *Cell Biology, PNAS*, vol.: 101 (31), p. 11 334-11 337.

JONKERS, J. et BERNIS, A. 1995. Retroviral Insertional Mutagenesis as a Strategy to Identify Cancer Genes. *Biochemica et Biophysica Acta*, p. 29-57.

JOOSTEN, M., VANKAN-BERKHOUDT, Y., TAS, M., LUNGI, M., JENNISKENS, Y., PARGANAS, E., VALK, P.J., LÖWENBERG, B., VAN DEN AKKER, E. et DELWEL, R. 2002. Large-Scale Identification of Novel Potential Disease Loci in Mouse Leukemia applying an Improved Strategy for Cloning Common Virus Integration Sites. *Oncogene*, vol.: 21, p. 7247-7255.

KALIKIN, L.M., SIMS, H.L. et PETTY, E.M. 2000. Genomic and Expression Analyses of Alternatively Spliced Transcripts of the MLL Septin-Like Fusion Gene (MSF) that Map to a 17q25 Region of Loss in Breast and Ovarian Tumors. *Genomics*, vol.: 63, 165-172.

KAPLAN, H.S. 1964. The Role of Radiation in Experimental Leukemogenesis. *Proc. Natl.*, vol.: 14, p. 207-220.

KAPLAN, H.S. 1967. On the Natural History of the Murine Leukemias: Presidential Address. *Cancer Res.*, vol.: 27, p. 1325-1340.

KATO, G.J., BARRET, J., VILLA-GARCIA, M. et DANG, C.V. 1990. An Amino-Terminal c-Myc Domain Required for Neoplastic Transformation Activates Transcription. *Mol. Cell. Biol.*, vol.: 10, p. 5914-5920.

KIM, R., TRUBETSKOY, A., SUZUKI, T., JENKINS, N.A., COPELAND, N.G. et LENZ, J. 2003. Genome-Based Identification of Cancer Genes by Proviral Tagging in Mouse Retrovirus-Induced T-Cell Lymphomas. *Journal of Virology*, vol.: 77 (3), p. 2056-2062.

- KOPAN, R., SCHROETER, E.H., WEINTRAUB, H. et NYC, J.S. 1996. Signal Transduction by Activated mNotch: Importance of Proteolytic Processing and its Regulation by the Extracellular Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.: 93 (4), p. 1683-1688.
- KRETZNER, L., BLACKWOOD, E.M. et EISENMAN, R.N. 1992. Myc and Max Proteins Possess Distinct Transcriptional Activities. *Nature*, vol.: 359 (6394), p. 426-429.
- KUNG, H.J., BOERKOEL, C. et CARTER, T.H. 1991. Retroviral Mutagenesis of Cellular Oncogenes: a Review with Insights Into the Mechanisms of Insertional Activation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol.: 171, p. 1-25.
- KUPIEC, J.J. et SONIGO, P. 2001. Ni Dieu ni gène : pour une autre théorie de l'hérédité. Éditions du Seuil, Paris, France.
- KUREBAYASHI, S., UEDA, E., SAKANE, M., PATEL, D.D., MEDVEDEV, A., ZHANG, F. et JETTEN, A.M. 2000. Retinoid-Related Orphan Receptor Gamma (ROR γ) is Essential for Lymphoid Organogenesis and Controls Apoptosis during Thymopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol.: 97, p. 10 132-10 137.
- LAMBERT, J., BERGERON, D., KOZAK, C.A. et RASSART, E. 1999. Identification of a Common Site of Provirus Integration in Radiation Leukemia Virus-Induced T-Cell Lymphomas in Mice. *Virology*, vol.: 264, p. 181-186.
- LAMMIE, G.A., SMITH, R., SILVER, J., BROOKES, S, DICKSON, C. et PETERS, G. 1992. Proviral Insertions Near Cyclin D1 in Mouse Lymphomas: a Parallel for BCL1 Translocations in human B-Cell Neoplasms. *Oncogene*, vol. 7, p. 2381-2387.
- LANDAIS, S., QUANTIN, R. et RASSART, E. 2005. RadLV Common Integration at the Kis2 Locus : Simultaneous Overexpression of a Novel Non-Coding RNA and of the Proximal Phf6 Gene. En soumission au Journal of Virology.
- LARSSON, L.-G., PETTERSON, M., ÖBERG, F., NILSSON, K. et LÜSCHER, B. 1994. Expression of Mad, Mx1, Max, and c-Myc During Induced Differentiation of Hematopoietic Cells : Opposite Regulation of Mad and c-Myc. *Oncogene*, vol.: 9, p. 1247-1252.
- LATARJET, R. et DUPLAN, J.F. 1962. Experiment and Discussion on Leukemogenesis by Cell-Free Extracts of Radiation-Induced Leukemia in Mice. *Int. J. Radiat. Biol.*, vol.: 5, p. 339-344.

LAZO, P.A., LEE, J.S. et TSICHLIS, P.N. 1990. Long-Distance Activation of the Myc Protooncogene by Provirus Insertion in Mlvi-1 or Mlvi-4 in rat T-Cell Lymphomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol.: 87 (1), p. 170-173.

LENVIK, T., LUND, C.T. et VERFAILLIE, C.M. 2002. Blockerette-Ligated Capture T7-Amplified RT-PCR, a New Method for Determining Flanking Sequences. Molecular Therapy, vol.: 6 (1), p. 113-118.

LEWIN, B. 1997. Genes VI. Oxford University Press, Oxford, 1260 p.

LI, Y., HOLLAND, C.A., HARTLEY J.W. et HOPKINS, N. 1984. Viral Integration Near c-Myc in 10-20% of MCF 247-Induced AKR Lymphomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.: 81, p. 6808-6811.

LI, Q.L., ITO, K., SAKAKURA, C., FUKAMACHI, H., INOUE, K., CHI, X.Z., LEE, K.Y., NOMURA, S., LEE, C.W., HAN, S.B., KIM, H.M., KIM, W.J., YAMAMOTO, H., YAMASHITA, N., YANO, T., IKEDA, T., ITOHARA, S., INAZAWA, J., ABE, T., HAGIWARA, A., YAMAGISHI, H., OOE, A., KANEDA, A., SUGIMURA, T., USHIJIMA, T., BAE, S.C. et ITO, Y. 2002. Causal Relationship Between the Loss of RUNX3 Expression and Gastric Cancer. Cell, vol.: 109, p. 113-124.

LI, J., SHEN, H., HIMMEL, K.L., DUPUY, A.J., LARGAESPADA, D.A., NAKAMURA, T., SHAUGHNESSY, J.D. Jr., JENKINS, N.A. et COPELAND, N.G. 1999. Leukemia Disease Genes: Large-Scale Cloning and Pathway Predictions. Nature Genetics, vol.: 23, p. 348-353.

LIEBERMAN, M., DECLÈVE, A. et KAPLAN, H.S. 1978. Rapid in vitro Assay For Thymotropic, Leukemogenic Murine C-Type RNA Viruses. Virology, vol.: 90, p. 274-278.

LIEBERMAN, M., DEVLÈVE, A., GELLMANN, E.P. et KAPLAN, H.S. 1977. Biological and Serological Characterization of the C-type RNA Viruses Isolated from C57BL/Ka Strain of Mice. II. Induction and Propagation of the Isolates in Radiation-Induced Leukemogenesis and Related Viruses. Dans TMINSERM Symposium No. 4° (J.F. Duplan, Ed.), p. 231-246. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris.

LIEBERMAN, M., DECLÈVE, A., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., BONIVER, J., FINN, O.J. et KAPLAN, H.S. 1979. Establishment, Characterization and Virus Expression of Cell Lines Derived from Radiation and Virus-Induced Lymphomas of C57BL/Ka Mice. Int. J. Cancer, vol.: 24, p. 168-177.

LIEBERMAN, M. et KAPLAN, H.S. 1959. Leukemogenic Activity of Filtrates from Radiation-Induced Lymphoid Tumors of Mice. *Science*, vol.: 130, p. 387-388.

LIEBERMANN, D.A., GREGORY, B. et HOFFMAN, B. 1998. AP-1 (Fos/Jun) Transcription Factors in Hematopoietic Differentiation and Apoptosis. *Int. J. Onc.*, vol.: 12 (3), 685-700.

LINDSAY, W.A. et BIRD, A.P. 1987. Use of Restriction Enzymes to Detect Potential Gene Sequences in Mammalian DNA. *Nature*, vol.: 327, p. 336-338.

LINDSELL, C.E., SHAWBER, C.J., BOULTER, J. et WEINMASTER, G. 1995. Jagged: A Mammalian Ligand that Activates Notch1. *Cell*, vol.: 80, p. 909-917.

LODISH, H.F. et DARNELL, J.E. 1997. *Biologie moléculaire de la cellule*. 3^e édition, De Boeck-Wesmael, Bruxelles, 1344 p.

LORD, KA., ABDOLLAHI, A., HOFFMAN-LIEBERMANN, B. et LIEBERMANN, D.A. 1993. Proto-Oncogenes of the Fos/Jun Family of Transcription Factors are Positive Regulators of Myeloid Differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, vol.: 13 (2), p. 841-851.

LOWER, K.M., TURNER, G., KERR, B.A., MATHEWS, K.D., SHAW, M.A., GEDEON, A.K., SCHELLEY, S., HOYME, H.E., WHITE, S.M., DELATYCKI, M.B., LAMPE, A.K., CLAYTON-SMITH, J., STEWART, H., VAN RAVENSWAAY, C.M., DE VRIES, B.B., COX, B., GROMPE, M., ROSS, S., THOMAS, P., MULLEY, J.C. et GECZ, J. 2002. Mutations in PHF6 are associated with Börjeson-Forssman-Lehmannsyndrome. *Nat. Genet.*, vol.: 32, p. 661-665.

LU, F.M. et LUX, S.E. 1996. Constitutively Active Human Notch 1 Binds to the Transcription Factor CBF1 and Stimulates Transcription Through a Promoter Containing a CBF1-Responsive Element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.: 93, p. 5663-5667.

LUND, H.A., TURNER, G., TRUBETSKOY, A., VERHOEVEN, E., WIENTJENS, E., HULSMAN, D., RUSSEL, R., DEPINHO, R.A., LENZ, J. et VAN LOHUIZEN, M. 2002. Genome-Wide Retroviral Insertional Tagging of Genes Involved in Cancer in Cdkn2a-Deficient Mice. *Nature Genetics*, vol.: 32 (1), p. 160-165.
<http://www.nature.com/naturegenetics>

LUNG, M.L., HARTLEY, J.W., ROWE, W.P. et HOPKINS, N.H. 1983. Large Rnase T₁-Resistant Oligonucleotides encoding p15E and the U3 Region of the Long Terminal Repeat Distinguish Two Biological Classes of Mink Cell Focus-Forming Type C Viruses of Inbred Mice. *J. Virol.*, vol.: 45, p. 275-290.

LUPAS, A.N. et MARTIN, J. 2002. AAA Proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol.: 6, p. 746-753.

LUSCHER, B. et EISENMAN, R.N. 1990. New Light on Myc and Myb. Part II. *Myb. Genes Dev.*, vol.: 4, p. 2235-2241.

MANJI, S.S., PARKER, N.J., WILLIAMS, R.T., VAN STEKELENBURG, L., PEARSON, R.B., DZIADEK, M. et SMITH, P.J. 2000. STIM1: a Novel Phosphoprotein Located at the Cell Surface. *Biochim. Biophys. Acta*, vol.: 1481 (1) p. 147-155.

MARCU, K.B., BOSSONE, S.A. et PATEL, A.J. 1992. Myc Function and Regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, vol.: 61, p. 809-860.

MCNABB, D. 2001. MBIO4753: General Virology RNA viruses with DNA intermediate: *Retroviridae*. University of Arkansas.
<http://biology.uark.edu/dmcnabb/mbio4753/class32to34.pdf>

MEDVEDEV, A., CHISTOKHINA, A., HIROSE, T. et JETTEN, A.M. 1997. Genomic Structure and Chromosomal Mapping of the Nuclear Orphan Receptor ROR γ (RORC) Gene. *Genomics*, vol.: 46, p. 93-102.

MEDVEDEV, A., YAN, Z.H., HIROSE, T., GIGUERE, V. et JETTEN, A.M. 1996. Cloning of a cDNA Encoding the Murine Orphan Receptor RZR/ROR γ and Characterization of its Response Element. *Gene*, vol.: 181, p. 199-206.

MERREGAERT, J., JANOWSKI, M. et REDDY, E.P. 1987. Nucleotide Sequence of a Radiation Leukemia Virus Genome. *Virology*, vol.: 158 (1), p. 88-102.

MERREGAERT, J., MICHIELS, L., VAN DER RAUWELART, E., LOMMEL, M., GOL-WINKLER, R. et JANOWSKI, M. 1986. Oncogene Involvement in Radiation- and Virus-Induced Mouse Osteosarcomas. *Leuk. Res.*, vol.: 10 (7), p. 912-921.

MIKKERS, H., ALLEN, J., KNIPSCHER, P., ROMEYN, L., HART, A., VINK, E. et BERNS, A. 2002. High-Throughput Retroviral Tagging to Identify Components of Specific Signaling Pathways in Cancer. *Nature Genetics*, vol.: 32 (1), p. 153-159. Advance online publication. <http://www.nature.com/naturegenetics>

MILLER, A.D., CURRAN, T. et VERMA, I.M. 1984. C-Fos Protein Can Induce Cellular Transformation : a Novel Mechanism of Activation of a Cellular Oncogene. *Cell*, vol.: 36, p. 51-60.

MOLNAR, A. et GEORGOPOULOS, K. 1994. The Ik Gene Encodes a Family of Functionally Diverse Zinc Finger DNA-Binding Proteins. *Mol. Cell. Biol.*, vol.: 14, p. 8292-8303.

MORALES, A.V., YASUDA, Y. et ISH-HOROWICZ, D. 2002. Periodic Lunatic Fringe Expression is Controlled during Segmentation by a Cyclic Transcriptional Enhancer Responsive to Notch Signaling. *Developmental Cell*, vol.: 3, p. 63-74.

MÖRÖY, T., VERBEEK, S., MA, A., ACHACOSO, P., BERNS, A. et ALT, F. 1991. E μ N- and E μ L-Myc Cooperate with E μ Pim-1 to Generate Lymphoid Tumors at High Frequency in Double Transgenic Mice. *Oncogene*, vol.: 6, p. 1941-1948.

MUCENSKI, M.B., GILBERT, D., TAYLOR, B., JENKINS, N. et COPELAND, N. 1987. Common Sites of Viral Integration in Lymphomas Arising in AKXD recombinant Inbred Mouse Strains. *Oncogene Res.*, vol.: 2, p. 33-48.

MUCENSKI, M.B., JENKINS, N.J. et COPELAND, N. 1986. AKXD Recombinant Inbred Strains: Models for Studying the Molecular Genetic Basis of Murine Lymphomas. *Mol. Cell. Biol.*, vol.: 6, p. 4236-4243.

MUKHOPADHYAYA, R. et WOLFF, L. 1992. New Sites of Proviral Integration Associated with Murine Promonocytic Leukemias and Evidence for Alternate Modes of c-Myb Activation. *J. Virol.*, vol.: 66, p. 6035-6044.

National Library of Medicine, National Institutes of Health. 2004. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NAKAMURA, T., LARGAESPADA, D.A., SHAUGHNESSY, J.D.Jr., JENKINS, N.A. et COPELAND, N.G. 1996. Cooperative Activation of Hoxa and Pbx1-Related Genes in Murine Myeloid Leukaemias. *Nat. Genet.*, vol.: 12, p. 149-153.

NASON-BURCHENAL, K. et WOLFF, L. 1992. Involvement of the Spleen in Preleukemic Development of a Murine Retrovirus-Induced Promonocytic Leukemia. *Cancer Res.*, vol.: 52, p. 5317-5322.

NASON-BURCHENAL, K. et WOLFF, L. 1993. Activation of c-Myb is an Early Bone-Marrow Event in a Murine Model for Acute Promonocytic Leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol.: 90, 1619-1623.

NAZAROV, V. et WOLFF, L. 1995. Novel Integration Sites at the Distal 3' End of the c-Myb Locus in Retrovirus-Induced Promonocytic Leukemias. *J. Virol.*, vol.: 69, p. 3885-3888.

NEEL, B.G., HAYWARD, W.S., ROBINSON, H.L. FANG, J. et ASTRIN, S.M. 1981. Avian Leukosis Virus-Induced Tumors Have Common Proviral Integration sites and Synthesize Discrete New RNAs : Oncogenesis by Promoter Insertion. *Cell*, vol.: 23, p. 323-334.

NEW ENGLAND BIOLABS INC. 2002. New England Biolabs Inc. 2002-03 Catalog & Technical Reference. Ontario, Mississauga. <http://www.neb.com>

NIEVES, A., LEVY, L.S. et LENZ, J. 1997. Importance of a c-Myb Binding Site for Lymphomagenesis by the Retrovirus SL3-3. *J. Virol.*, vol.: 71, p. 1213-1219.

NUSSE, R. et VARMUS, H.E. 1982. Many Tumors Induced by the Mouse Mammary Tumor Virus contain a Provirus Integrated in the Same Region of the Host Genome. *Cell*, vol.: 31, p. 99-109.

O'DONNELL, P.V., FLEISSNER, E., LONIAL, H., KOEHNE, C.F. et REICIN, A. 1985. Early Clonality and High-Frequency Proviral Integration Into the c-Myc Locus in AKR Leukemia. *J. Virol.*, vol.: 55, p. 500-503.

ODAWARA, T., OSHIMA, M., DOI, K., IWAMOTO, A. et YOSHIKURA, H. 1998. Threshold Number of Provirus Copies Required per Cell for Efficient Virus Production and Interference in Moloney Murine Leukemia Virus-Infected NIH 3t3 Cells. *J. Virol.*, vol.: 72, p. 5414-5424.

OKAMURA, R.M., SIGVARDSSON, M., GALCERAN, J., VERBEEK, S., CLEVERS, H. et GROSSCHEDL, R. 1998. Redundant Regulation of T Cell Differentiation and TCR α Gene Expression by the Transcription Factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity*, vol.: 8, p. 11-20.

ORITANI, K. et KINCADE, P.W. 1996. Identification of Stromal Cell Products that Interact with Pre-B Cells. *J. Cell. Biol.*, vol.: 134, p. 771-782.

ORTIZ, M.A., PIEDRAFITA, F.J., PFAHL, M. et MAKI, R. 1995. TOR: a New Orphan Receptor Expressed in the Thymus that can Modulate Retinoid and Thyroid Hormone Signals. *Mol. Endocrinol.*, vol.: 9, p. 1679-1691.

OSAKA, M., ROWLEY, J.D. et ZELEZNIK-LE, N.J. 1999. MSF (MLL Septin-Like Fusion), a Fusion Partner Gene of MLL, in a Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia with a t(11;17)(q23;q25). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol.: 96, p. 6428-6433.

PANTOJA, C., DE LOS RÍOS, L., MATHEU, A., ANTEQUERA, F. et SERRANO, M. 2005. Inactivation of Imprinted Genes Induced by Cellular Stress and Tumorigenesis. *Cancer Res.*, vol.: 65 (1), p. 26-33.

PARKER, N.J., BEGLEY, C.G., SMITH, P.J. et FOX, R.M. 1996. Molecular Cloning of a Novel Human Gene (D11S4896E) at Chromosomal Region 11p15.5. *Genomics*, vol.: 37 (2), p. 253-256.

PEDERSEN, F.S., CROWTHER, R.L., TENNEY, D.Y., REIMOLD, A.M. et HASELTINE, W.A. 1981. Novel Leukaemogenic Retroviruses Isolated from Cell Line Derived from Spontaneous AKR Tumor. *Nature*, vol.: 292, p. 167-170.

PELLEGRINI, M., PILIA, G., PANTANO, S., LUCCHINI, F., UDA, M., FUMI, M., CAO, A., SCHLESSINGER, D. et FORABOSCO, A. 1998. *Gpc3* Expression Correlates with the Phenotype of the Simpson-Golabi-Behmel Syndrome. Wiley-Liss, Inc. *Developmental Dynamics*, vol.: 213, p. 431-439.

PETERS, G. 1990. Oncogenes at Viral Integration Sites. *Cell Growth Differ.*, vol.: 1, p. 503-510.

PILIA, G., HUGHES-BENZIE, R.M., MACKENZIE, A., BAYBAYAN, P., CHEN, E.Y., HUBER, R., NERI, G., CAO, A., FORABOSCO, A., SCHLESSINGER, D. 1996. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel Overgrowth Syndrome. *Nat. Genet.* Vol.: 12, p. 241-247.

PUI, J.C., ALLMAN D., XU, L., DEROCOCCO, S., KARNELL, F.G., BAKKOUR, S., LEE, J.Y., KADESCH, T., HARDY, RR., ASTER, J.C. et PEARS, W.S. 1999. Notch1 expression in Early Lymphopoiesis Influences B versus T Lineage Determination. *Immunity*, vol.: 11, p. 299-208.

QUANTIN, R. 2002. Recherche de sites communs d'intégration dans les leucémies induites par le rétrovirus murin RadLV/VL₃. Mémoire, 102 p.

RAPPOLD, G.A., STUBBS, L., LABEITS, S., CRKVENJAKOV, R.B. et LEHRAH, H. 1987. Identification of a Testis-Specific Gene From the Mouse 1-Complexe Next to a GpC-Rich Island. *EMBO J.*, vol.: 6, p. 1975-1980.

RASSART, E., HOUDE, J., DENICOURT, C., RU, M., BARAT, C., EDOUARD, E., POLIQUIN, L. et BERGERON, D. 1996. Molecular Analysis and Characterization of Two Myeloid Leukemia Inducing Murine Retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol.: 211, p. 201-210.

RASSART, E. et JOLICOEUR, P. 1982. Restriction Analysis and Molecular Cloning of Endogenous Murine Leukemia Virus-Specific DNA Sequences of the Mouse Genome. *Virology*, vol.: 123, p. 175-186.

RASSART, E., SANKAR-MISTRY, P., LEMAY, G., DESGROSEILLERS, L. et JOLICOEUR, P. 1983. New Class of Leukemogenic Ecotropic Recombinant Murine Leukemia Virus Isolated from Radiation-Induced Thymomas of C57BL/6 Mice. *J. Virol.* vol.: 45, p. 565-575.

RASSART, E., SHANG, M., BOIE, Y. et JOLICOEUR, P. 1986. Studies on Emerging Radiation Leukemia Virus Variants in C57BL/Ka Mice. *Journal of Virology*, vol.: 58 (1), p. 96-106.

REDDY, C.D. et REDDY, E.P. 1989. Differential Binding of Nuclear Factors to the Intron 1 Sequences Containing the Transcriptional Pause Site Correlates with c-Myb Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol.: 86, 7326-7330.

RÉVILLARD, J.-P. 1994. *Immunologie*. DeBoeck Université, Bruxelles, 367 pages.

ROSENBERG, N. et JOLICOEUR, P. 1997. Retroviral Pathogenesis, p. 475-586. *Dans* J.M. Coffin, S.H. Hughes et H.E. Varmus (ed.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

ROUS, P. 1911. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J. Exp. Med.*, vol.: 13, p. 397-411.

SABBIONI, S., BARBANTI-BRODANO, G., CROCE, C.M. et NEGRINI, M. 1997. GOK: a Gene at 11p15 Involved in Rhabdomyosarcoma and Rhabdoid Tumor Development. *Cancer Res.*, vol.: 57 (20), p. 4493-4497.

SAKAKURA, C., TAKEMURA, M., MIYAGAWA, K., FUKUDA, K., SHIMOMURA, K., KIN, S., NAKASE, Y., KURIU, Y., NAKASHIMA, S., YOSHIKAWA, T., UEDA, Y., FUJIYAMA, J., SONOYAMA, T., OKAZAKI, Y., HAYASHIZAKI, Y., HAGIWARA, A. et YAMAGISHI, H. 2004. Utility of Dopa Decarboxylase as a Novel Marker for the Detection of Peritoneal Micro-Metastases of Gastric Cancer with Realtime RT-PCR. *Gan To Kagaku Ryoho*, vol.: 31 (11), p. 1906-1908.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. et MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning : a Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SAMBROOK, J. et RUSSELL, D.W. 2001. *Molecular Cloning : a Laboratory Manual*. 3^e édition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SELTEN, G., CUYPERS, H.T., BOELEN, W., ROBANUS-MAANDAG, E., VERBECK, J., DOMEN, J., VAN BEVEREN, C. et BERNIS, A. 1986. The Primary Structure of the Putative Oncogene Pim-1 Shows Extensive Homology with Protein Kinases. *Cell*, vol.: 46, p. 603-611.

SELTEN, G., CUYPERS, H.T., ZIJLSTRA, M., MELIEF, C. et BERNIS, A. 1984. Involvement of c-myc in MuLV-Induced T Cell Lymphomas in Mice: Frequency and Mechanisms of Activation. *EMBO J.*, vol.: 3, p. 3215-3222.

SHANK, P.R., HUGHES, S.E., KUNG, H.-J., MAJORS, J.E., QUINTRELL, N., GUNTAKA, R.V., BISHOP, J.M. et VARMUS, H.E. 1978. Mapping Unintegrated Avian Sarcoma Virus DNA: Termini of Linear DNA bear 300 Nucleotides Present Once or Twice in Two Species of Circular DNA. *Cell*, vol.: 15, p. 1383-1395.

SHEELER, P. et BIANCHI, D.E. 1987. *Cell and Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Troisième Édition, New York, 704 pages.

SHEN-ONG, G.L. et WOLFF, L. 1987. Moloney Murine Leukemia Virus-Induced Myeloid Tumors in Adult BALB/C Mice: Requirement of c-Myb Activation but Lack of v-Abl Involvement. *J. Virol.*, vol.: 61, p. 3721-3725.

SICINSKA, E., ALFANTIS, I., LE CAM, L., SWAT, W., BOROWSKI, C., YU, Q., FERRANDO, A.A., LEVIN, S., GENG, Y., VON BOEHMER, H. et SICINSKI, P. 2003. Requirement for Cyclin D3 in Lymphocyte Development and T Cell Leukemias. *Cancer Cell.*, vol.: 4, p. 451-461.

SILVER, J. et KOZAK, C. 1986. Common Proviral Integration Region on Mouse Chromosome 7 in Lymphomas and Myelogenous Leukemias Induced by Friend Murine Leukemia Virus. *J. Virol.*, vol.: 57, p. 526-533.

SITBON, M., DENESVRE, C., DARDALHON, V., BATTINI, J.-L. et MOUGEL, M. 2001. Les rétrovirus leucémogènes murins: pathogènes, gènes et outils génétiques. *Virologie*, vol.: 5, p. 265-293.

SOLA, B., SIMON, D., MATTEI, M.G., FICHELSON, S., BORDEREAUX, D., TAMBOURIN, P.E., GUENET, J.L. et GISSELBRECHT, S. 1988. Fim-1, Fim-2/c-Fms, and Fim-3, Three Common Integration Sites of Friend Murine Leukemia Virus in Myeloblastic Leukemias, Map to Mouse Chromosomes 13, 18, and 3, respectively. *J. Virol.*, vol.: 62, p. 3973-3978.

SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, vol.: 98, p. 503-517.

SØRENSEN, A.B., DUCH, M., AMTOFT, H.W., JØRGENSEN, P. et PEDERSEN, F.S. 1996. Sequence Tags of Provirus Integration Sites in DNAs of Tumors Induced by the Murine Retrovirus SL3-3. *Journal of Virology*, vol.: 70, p. 4063-4070.

SØRENSEN, A.B., DUCH, M., JØRGENSEN, P. et PEDERSEN, F.S. 1993. Amplification and Sequence Analysis of DNA Flanking Integrated Proviruses by a Simple Two-step Polymerase Chain Reaction Method. *Journal of Virology*, vol.: 67 (12), p. 7118-7124.

SØRENSEN, A.B., LUND, A.H., ETHELBERG, S., COPELAND, N.G., JENKINS, N.A. et PEDERSEN, F.S. 2000. Sint1, a Common Integration Site in SL3-3 Induced T-Cell Lymphomas, Harbors a Putative Proto-Oncogene with Homology to the Septin Gene Family. *J. Virol.*, vol.: 74, p. 2161-2168.

SØRENSEN, A.B., WARMING, S., FÜCHTBAUER, E.-M. et PEDERSEN, F.S. 2002. Alternative Splicing, Expression, and Gene Structure of the Septin-Like Putative Proto-Oncogene Sint1. *Gene*, 285, vol.: 285, p. 79-89.

STEHLIN-GAON, C., WILLMANN, D., ZEYER, D., SANGLIER, S., VAN DORSSELAER, A., RENAUD, J.P., MORAS, D. et SCHULE, R. 2003. All-Trans Retinoic Acid is a Ligand for the Orphan Nuclear Receptor ROR β . *Nat. Struct. Biol.*, vol.: 10, p. 820-825.

SUN, Z., UNUTMAZ, D., ZOU, Y.R., SUNSHINE, M.J., PIERANI, A., BRENNER-MORTON, S., MEBIUS, R.E. et LITTMAN, D.R. 2000. Requirement for ROR γ in Thymocyte Survival and Lymphoid Organ Development. *Science*, vol.: 288, p. 2369-2373.

SUZUKI, T., SHEN, H., AKAGI, K., MORSE III, H.C., MALLEY, J.D., NAIMAN, D.Q., JENKINS, N.A. et COPELAND, N.G. 2002. New Genes Involved in Cancer Identified by Retroviral Tagging. *Nature Genetics*, vol.: 32 (1) p: 166-174.

TAKI, T., OHNISHI, H., SHINOHARA, K., SAKO, M., BESSHO, F., YANAGISAWA, M. et HAYASHI, Y. 1999. AF17q25, a Putative Septine Family Gene, Fuses the MLL Gene in Acute Myeloid Leukemia with t(11;17)(q23;q25). *Cancer Res.*, vol.: 59, p. 4261-4265.

TERAI, Y., ABE, M., MIYAMOTO, K., KOIKE, M., YAMASAKI, M., UEDA, M., UEKI, M. et SATO, Y. 2001. Vascular Smooth Muscle Cell Growth-Promoting Factor/F-Spondin Inhibits Angiogenesis via the Blockade of Integrin $\alpha\beta$ 3 on Vascular Endothelial Cells. *Journal of Cellular Physiology*, vol.: 188, p. 394-402.

The Cancer Genome Anatomy Project. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

The Leukemia and Lymphoma Society. 2004. Leukemia Facts & Statistics, Leukemia, Lymphoma, Myeloma, Facts 2004, In Press. http://www.leukemia-lymphoma.org/hm_lls

The Wellcome Trust Sanger Institute, The European Bioinformatics Institute (EBI). 2004. Project Ensembl. <http://www.ensembl.org>

THOMAS, C.Y. et COFFIN, J.M. 1982. Genetic Alterations of RNA Leukemia Viruses Associated with the Development of Spontaneous Thymic Leukemia in AKR/J Mice. *J. Virol.*, vol.: 43, p. 416-426.

TODARO, G.J. et HUEBER, R.J. 1972. The Viral Oncogene Hypothesis: New Evidence. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, vol.: 69, p. 1009-1015.

TREMBLAY, P., KOZAK, C.A. et JOLICOEUR, P. 1992. Identification of a Novel Gene, Vin-1, in Murine Leukemia Virus-Induced T Cell Leukemias by Proviral Insertional Mutagenesis. *Journal of Virology*, vol.: 66, p. 1344-1353.

TSICHLIS, P.N., LEE, J.S., BEAR, S.E., LAZO, P.A., PATRIOTIS, C., GUSTAFSON, E., SHINTON, S., JENKINS, N.A., COPELAND, N.G., HUEBNER, K. CROCE, C., LEVAN G. et HANSON, C. 1990. Activation of Multiple Genes by Provirus Integration in the Mlvi-4 Locus in T-Cell Lymphomas Induced by Moloney Murine Leukemia Virus. *J. Virol.*, vol.: 64 (5), p. 2236-2244.

TSICHLIS, P.N., SHEPHERD B.M. et BEAR, S.E. 1989. Activation of the Mlvi-1/Mis1/Pvt-1 Locus in Moloney Murine Leukemia Virus-Induced T-cell Lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol.: 86 (14), p. 5487-5491.

TSURUMI, C., ISHIDA, N., TAMURA, T., KAKIZUKA, A., NISHIDA, E., OKUMURA, E., KISHIMOTO, T., INAGAKI, M., OKAZAKI, K., SAGATA, N., ICHIHARA, A. et TANAKA, K. 1995. Degradation of c-Fos by the 26S Proteasome is Accelerated by c-Jun and Multiple Protein Kinases. *Mol. Cell. Biol.*, vol.: 15 (10); p. 5682-5687.

VAN LOHUIZEN, M. et BERNS, A. 1990. Tumorigenesis by Slow-Transforming Retroviruses-an Update. *Biochim. Biophys. Acta*, vol.: 1032, p. 213-235.

VAN LOHUIZEN, M., VERBEEK, S., KRIMPENFORT, P., DOMEN, J., KRAAL, G. et BERNS, A. 1989. Predisposition to Lymphomagenesis in Pim-1 Transgenic Mice Cooperation with c-Myc and N-Myc in Murine Leukemia Virus-Induced Tumors. *Cell*, vol.: 56, p. 673-682.

VAN LOHUIZEN, M., VERBEEK, S., SCHEIJEN, B., WIENTJENS, E., VAN DER GULDEN, H. et BERNS, A. 1991. Identification of Cooperating Oncogenes in E μ -Myc Transgenic Mice by Provirus Tagging. *Cell*, vol.: 65, p. 737-752.

VARMUS, H.E. 1982. Form and Function of Retroviral Proviruses. *Science*, vol.: 216 (4548), p. 812-820.

VÄSTRIK, I., KAIPAINEN, A., PENTTILÄ, T.-L., LYMBOUSSAKIS, A., ALITALO, R., PARVINEN, M. et ALITALO, K. 1995. Expression of the Mad Gene During Cell Differentiation *In Vivo* and its Inhibition of Cell Growth *In Vitro*. *The Journal of Cell Biology*, vol.: 128 (6), p. 1197-1208.

VERBEEK, S.M., VAN LOHUIZEN, M., VAN DEL VALK, M., DOMEN, J., KRAAL, G. et BERNS, A. 1991. Mice Bearing the E μ -Myc and E μ -Pim-1 Transgenes Develop Pre-B-Cell Leukemia Prenatally. *Mol. Cell. Biol.*, vol.: 11, p. 1176-1179.

VILLEMUR, R., MONCZAK, Y., RASSART, E., KOZAK, C. et JOLICOEUR, P. 1987. Identification of a New Common Provirus Integration Site in Gross Passage A Murine Leukemia Virus-Induced Mouse Thymoma DNA. *Mol. Cell. Biol.*, vol.: 7 p. 512-522.

VILLEMUR, R., RASSART, E., DESGROSEILLERS, L. et JOLICOEUR, P. 1983. Molecular Cloning of Viral DNA from Leukemogenic Gross Passage A Murine Leukemia Virus and Nucleotide Sequence of its Long Terminal Repeat. *J. Virol.*, vol.: 45, p. 539-546.

VILLEY, I., DE CHAVESSAL, R. et DE VILLARTAY, J.P. 1999. ROR γ t, a Thymus-Specific Isoform of the Orphan Nuclear Receptor ROR γ /TOR, is Up-Regulated by Signaling Through the Pre-T Cell Receptor and Binds to the TEA Promoter. *Eur. J. Immunol.*, vol. 29, p. 4072-4080.

WANG, J.H., NICHOGIANNPOULOU, A., WU, L., SUN, L., SHARPE, A.H., BIGBY, M. et GEORGOPOULOS, K. 1996. Selective Defects in the Development of the Fetal and Adult Lymphoid System in Mice with an Ik Null Mutation. *Immunity*, vol.: 5, p. 537-549.

WATSON, R.J. 1988. Expression of the c-Myb and c-Myc Genes is Regulated Independently in Differentiating Mouse Erythroleukemia Cells by Common Processes of Premature Transcription Arrest and Increased mRNA Turnover. *Mol. Cell. Biol.*, vol.: 8 (9), p. 3938-3942.

WILLIAMS, R.T., SENIOR, P.V., VAN STEKELENBURG, L., LAYTON, J.E., SMITH, P.J. et DZIADEK, M.A. 2002. Stromal interaction molecule 1 (STIM1), a Transmembrane Protein with Growth Suppressor Activity, Contains an Extracellular SAM Domain Modified by N-Linked Glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol.: 1596, p. 131-137.

WINANDY, S., WU, P. et GEORGOPOULOS, K. 1995. A Dominant Mutation in The Ik Gene Leads to Rapid Development of Leukemia and Lymphoma. *Cell*, vol.: 83, p. 289-299.

WOLFF, L. 1997. Contribution of Oncogenes and Tumor Suppressor Genes to Myeloid Leukemia. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol.: 1332, p. F67-F104.

WOLFF, L., KOLLER, R. et DAVIDSON, W. 1991. Acute Myeloid Leukemia Induction by Amphotropic Murine Retrovirus (4070A): Clonal Integrations Involve c-Myb in Some but not all Leukemias. *J. Virol.*, vol.: 65, p. 3607-3616.

XIA, Y., PAPALOPULU, N., VOGT, P.K. et LI, J. 2000. The Oncogenic Potential of the High Mobility Group Box Protein Sox3. *Cancer Res.*, vol.: 60, p. 6303-6306.

YANAGAWA, S.-I., LEE, J.-S., KAKIMI, K., MATSUDA, Y., HONJO, T. et ISHIMOTO, A. 2000. Identification of *Notch1* as a Frequent Target for Provirus Insertional Mutagenesis in T-Cell Lymphomas Induced by Leukemogenic Mutants of Mouse Mammary Tumor Virus. *Journal of Virology*, vol.: 74 (20), p. 9786-9791.

YANG, Y., MAHAFFEY, C.L., BÉRUBÉ, N., NYSTUEN, A. et FRANKEL, W.N. 2005. Functional Characterization of Fidgetin, an AAA-Family Protein Mutated in Fidget Mice. *Experimental Cell Research*, vol.: 304, p. 50-58.

YOSHIHASHI, H., MAEYAMA, K., KOSAKI, R., OGATA, T., TSUKAHARA, M., GOTO, Y., HATA, J., MATSUO, N., SMITH, R.J. et KOSAKI, K. 2000. Imprinting of Human GRB10 and its Mutations in Two Patients with Russell-Silver Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, vol.: 67, p. 476-482.

ZERVOS, A., GYURIS, J. et BRENT, R. 1993. Mxi1, a Protein that Specifically Interacts with Max to Bind Myc-Max Recognition Sites. *Cell*, vol.: 72, p. 223-232.

ZORN, S.M., BARISH, G.D., WILLIAMS, B.O., LAVENDER, P., KLYMKOWSKY, M.W. et VARMUS, H.E. 1999. Regulation of Wnt Signaling by Sox Proteins: XSox17 α/β and XSox3 physically Interact with β -Catenin. Mol. Cell, vol.: 4, p. 487-498.