

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL (UQÀM)

RECHERCHE DE SITES COMMUNS D'INTÉGRATION DANS DIFFÉRENTES  
TUMEURS INDUITES PAR LE RÉTROVIRUS GRAFFI 1.4 CHEZ LA SOURIS

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

DIANA PAULINA SALAZAR OSPINA

NOVEMBRE 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

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de maîtrise Dr. Éric Rassart pour m'avoir donné l'opportunité de faire ma maîtrise dans son laboratoire. Son encadrement et conseils pertinents m'ont beaucoup aidé tout au long de mon projet. De plus, son intérêt et passion pour la science ont été d'une grande inspiration pour moi.

Je tient aussi à remercier Véronique Voisin, pour son temps, sa patience, ses conseils et sa confiance dans le projet et en moi. Son optimisme et persévérance m'ont aidée à poursuivre mon projet et à surmonter les moments difficiles durant ce travail.

J'adresse un remerciement à Séverine Landais, elle était toujours prête à m'aider. Son dévouement envers la science, a été un exemple pour moi.

Je remercie aussi Fée-Ann McNabb pour son amitié inconditionnelle, à ses côtés, les journées au laboratoire ont été très agréables.

Je n'oublie pas de remercier Elsy Édouard, Philippe Legault et Sonia Do Carmo, pour leur aide et soutien.

Un remerciement général au reste de l'équipe du laboratoire du Dr. Éric Rassart, pour avoir fait de mon séjour à l'UQÀM, une expérience inoubliable.

Gracias papitos por haberme inculcado el amor por el estudio, gracias porque sin su ayuda, no hubiera tenido la oportunidad de llegar hasta acá. Este logro se los dedico a ustedes a mis hermanos y a Dios. Los quiero mucho!

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>xi</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>xiv</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I. ÉTAT DES CONNAISSANCES.....</b>	<b>3</b>
1.1. Le Cancer.....	3
1.2. La Leucémie.....	4
1.2.1. Différents Types de Leucémie chez l'humain.....	5
1.2.2. Différents types de leucémie chez la souris.....	7
1.3. Les Rétrovirus.....	8
1.3.1. Classification des Rétrovirus.....	8
1.3.2. Structure du Génome Rétroviral.....	10
1.4. Cycle de Réplication Rétrovirale.....	12
1.5. Rétrovirus Oncogéniques.....	15
1.5.1. Les Rétrovirus Leucémogènes Murins (MuLVs).....	15
1.5.2. Les Rétrovirus Edogènes (ERVs).....	16
1.5.3. Le Rétrovirus Graffi.....	17
1.6. Mutagenèse Insertionnelle.....	18
1.6.1. Sites Préférentiels d'Insertion Rétroviral.....	18
1.7. Sites Communs d'Intégration Rétrovirale.....	20

1.8. Techniques Utilisées pour la Détection des Intégrations Rétrovirales.....	21
1.9. Classification des Oncogènes.....	22
1.10.Oncogènes cellulaires activés par mutagenèse insertionnelle.....	24
1.10.1.c-myc et N- myc.....	25
1.10.2.Notch-1.....	25
1.10.3.Evi-1.....	26
1.10.4.Pim-1.....	26
1.10.5.Fli-1.....	27
1.10.6.Spi-1/PU.1.....	27
1.10.7.Yin-Yang 1 (YY1).....	28
1.10.8.Gris1.....	28
1.10.9.P-53.....	29
1.10.10.HoxA9.....	29
1.10. Hypothèse.....	30
<b>CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>31</b>
2.1. La splinkerette.....	31
2.1.1.Amorces de la splinkerette.....	31
2.2. Souris et virus.....	33
2.3. Extraction de l'ADN génomique.....	33
2.4. Digestion de l'ADN génomique.....	34
2.5. Ligation de la splinkerette à l'ADN génomique.....	34
2.6. Précipitation de l'ADN.....	35
2.7. Deuxième Digestion de l'ADN Génomique.....	35
2.8. Réaction en Chaîne de la Polymérase (PCR).....	36
2.8.1.Amorces de la Réaction de PCR.....	36
2.8.2.1ère PCR.....	37
2.8.3.PCR nichée.....	38
2.9. Analyse par Southern Blot des Sites d'Insertion Rétroviraux.....	38
2.9.1.Transfert de l'ADN sur une Membrane de Nylon.....	38

2.9.2.Sonde Radioactive.....	38
2.9.3.Hybridation de la Sonde.....	39
2.10. Isolement des Sites d'Intégration Proviraux.....	39
2.10.1.Élution des Fragments Amplifiés par PCR.....	39
2.10.2.Clonage des fragments amplifiés dans le vecteur pDrive.....	40
2.10.3.Transformation bactérienne des amplicons.....	40
2.10.4.Mini-Extraction des Fragments Clonés dans pDrive (Minipreps).....	41
2.10.5.Séquençage des Clones Positifs.....	41
2.10.6.Alignement des Séquences.....	41
2.11. Vérification des possibles sites communs d'intégration.....	42
<b>CHAPITRE III. RÉSULTATS.....</b>	<b>43</b>
3.1. Choix d'Amorces.....	43
3.2. Mise au Point de la Technique.....	44
3.2.1.Comparaison du Patron des Fragments Amplifiés par PCR avec l'Amorce 666 pour l'ADN Tumoral vs non Tumoral Provenant des Souches de Souris FVB/n, NFS, et Balb/c.....	44
3.2.2.Détermination de la température optimale d'appariement (Gradients de température).....	46
3.2.2.1.Première PCR.....	46
3.2.2.2.PCR nichée.....	47
3.2.3.Hybridation des fragments amplifiés par la méthode de PCR-splinkerette.....	48
3.2.3.1.Hybridation Southern première PCR.....	48
3.2.3.2.Hybridation Southern PCR nichée.....	49
3.2.4.Ajustement de la Concentration de MgCl <sub>2</sub> .....	50
3.3. Isolement des sites d'intégration rétroviraux.....	51
3.3.1.PCRs nichées de plusieurs tumeurs.....	52
3.3.2.Élution des fragments amplifiés par PCR-splinkerette.....	53
3.4. Criblage des séquences obtenues.....	54
3.5. Sites d'intégration répertoriés grâce à la technique de PCR-splinkerette.....	55

3.6. Vérification des sites communs d'intégration potentiels.....	58
3.6.1. Vérification par PCR des sites communs d'intégration potentiels.....	60
3.7. Vérification par hybridation Southern du site d'intégration potentiel trouvé sur le chromosome 10 B5.2.....	64
<b>CHAPITRE IV. DISCUSSION.....</b>	<b>65</b>
4.1. ONCOGÈNES IMPORTANTS.....	76
4.1.1. Gse1 (Genetic suppressor element 1).....	77
4.1.2. Ras Grp 1 (RAS guanyl releasing protein 1).....	77
4.1.3. Ptpn6 (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type).....	78
4.1.4. Prdm16 (transcription factor MEL1).....	78
4.1.5. Lmo2 (LIM domain only 2).....	79
<b>CHAPITRE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES .....</b>	<b>80</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>83</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>90</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1. Particule Rétrovirale et Structure du Génome.....	11
2. Cycle de Réplication d'un Virus Simple.....	14
3. Représentation des Mécanismes d'Intégration Rétrovirale.....	20
4. Représentation de la splinkerette utilisée avec ses amorces respectives .....	32
5. Représentation des régions à l'intérieur de la portion U3 de Graffi 1.4, où ont été placées les amorces utilisées pour amplifier les intégrations rétrovirales.....	43
6. Gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium illustrant les résultats du test de spécificité de l'amorce 666 pour les fragments exogènes.....	44
7. Hybridation Southern du gel de la figure 6. ....	45
8. Gradient de température optimale d'appariement fait sur une première PCR.....	46
9. Gradient de température optimale d'appariement fait sur une PCR nichée .....	47
10. Hybridation Southern du gradient de température d'appariement présenté à la figure 8.....	48
11. Hybridation Southern du gradient de température d'appariement présenté à la figure 9.....	49
12. Résultats du gradient de $MgCl_2$ pour une deuxième PCR faite suite au protocole de la PCR-splinkerette.....	50
13. Electrophorèse sur gel d'agarose 1%, comparant une première (A) et une deuxième PCR (B), faites sur l'ADN des tumeurs 36.2, 36.3 et 1.3, après avoir employé la méthode de PCR splinkerette. ....	51
14. Gel d'agarose 1% rassemblant plusieurs PCR nichées des différentes tumeurs, après avoir employé le procédé des splinkerettes.....	52
15. Éluion des fragments amplifiés par PCR. ....	53
16. Exemple de localisation exacte de la séquence d'intégration Graffi 1.4 sur le chromosome de la souris et détermination des gènes qui sont à proximité.....	54

17.	Représentation des orientations possibles du rétrovirus par rapport à la séquence d'ADN cellulaire..	59
18.	Résultats de la vérification par PCR du site commun d'intégration potentiel du rétrovirus Graffi dans la région génomique 10B5.2 69.69M.....	60
19.	Résultats de la vérification par PCR du site commun d'intégration potentiel du rétrovirus Graffi dans la région génomique 14B 19.65Mb. ....	61
20.	Résultats de la vérification par PCR du site commun d'intégration potentiel du rétrovirus Graffi dans la région génomique 17D 55.27Mb .....	62
21.	Figure 21. Résultats de la vérification par PCR du site commun d'intégration potentiel du rétrovirus Graffi dans la région génomique 4E1 14.61Mb.....	63
22.	Hybridation Southern de la PCR présentée à la figure 18.....	64

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
I. Résumé des différents désordres hématopoïétiques présents chez la souris.....	7
II. Tableau représentant les différents tumeurs, positions chromosomiques et gènes retrouvés lors de la recherche de sites communs d'intégration du rétrovirus Graffi 1.4 répertoriés par la méthode de splinkerettes.....	55
III. Tableau réunissant les sites communs d'intégration trouvés dans le cadre de ce projet. ....	58

## LISTE DES ANNEXES

Annexe	Page
A. Voies parallèles de la tumorigénèse .....	83
B. Vectorette vs splinkerette PCR. ....	84
C. Résumé des principales techniques utilisées pour amplifier l'ADN inconnu flanquant une intégration rétrovirale.....	85
D. Principe de la technique de PCR splinkerette .....	86
E. Cartographie du vecteur pDrive .....	87
F. Résultats du criblage de la séquence de la région U3 de Graffi 1.4 contre le génome de <i>Mus musculus</i> . ....	88
G. Résultats du criblage de la séquence du rétrovirus Graffi 1.4 entier contre le génome de <i>Mus musculus</i> .....	89

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

A.A	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
$\alpha$	Alpha
ALV	Avian Leukemia Virus
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BDA	Boomerang DNA amplification
BLV	Virus de la leucémie bovine
°C	Degré Celsius
C	Packaging signal
CA	Capside
CAEV	Caprine Arthritis-Encephalitis Virus
CDKs	Cyclines dépendantes des kinases
CIS	Sites communs d'intégration
CFV	<i>Chimpanzee foamy virus</i>
CFV/Hu	Souche humaine <i>Chimpanzee foamy virus</i>
C-Myc	Oncogène Myc cellulaire
CPCR	Capture PCR
CPS	Coups par seconde
DH5 $\alpha$	DH5 alpha
DLS	Dimer-linkage structure
D.O.	Densité optique
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
dUTP	Deoxyuridine triphosphate
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EPP	Domaine Endonuclease/Exonuclease/Phosphate
env	Gène de l'enveloppe
$\epsilon$	Épsilon
ERVs	Endogenous retroviruses
Evi-1	Ecotropic viral integration site 1
Fli-1	Friend leukemia integration 1
FLV	Feline Leukemia Virus
Gag	Gène de la capsid
Gtf2f1	General transcription factor IIF
Gse1	Genetic suppressor element 1
GTP	Guanosine triphosphate
HCl	Chlorure d'hydrogène
HFV	Human foamy virus
HMG	High-mobility group
HoxA9	Protéine homéodomaine HOX9
HTLV	Human T-cell Leukemia Virus
IAPs	Intracisternal type-A particles

IN	Intégrase
IPCR	Inverse or inverted PCR
Khsrp	KH type splicing regulatory protein
Kpb	Kilopaire de bases
KDa	Kilodalton
LAL	Leucémie aiguë lymphoblastique
LB	Luria broth
LLC	Leucémie lymphocytaire chronique
LMA	Leucémie myéloblastique aiguë
LMC	Leucémie myéloïde chronique
Lmo2	Lim domain only 2
LTR	Long terminal repeats
M	Molaire
MA	Matrice
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
Mb	Mégabase
MCF-virus	Mink-cell focus-forming virus.
MDS	Myelodysplasie
MDS/AML	Myelodysplastic syndrome/ acute myelogenous leukemia
Mégac	Mégacaryocytaire
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
mg	Milligramme
mL	Millilitre
Mm	Millimolaire
µg	Micro gramme
µl	Microlitres
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
Mo-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus.
MORF	Monocytic leukemia zinc finger protein-related factor
MPMV	Virus de Mason-Pfizer
MuLV	Murine leukemia virus
Myst4	Histone acetyltransferase monocytic leukemia 4
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NaOAc	Acétate de sodium
NC	Nucléocapside
NEB	New England Biolabs Inc.
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
Notch-1	Notch Gene Homolog 1
Oligo	Oligonucléotide
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
o/n	Overnight
pb	Paire de bases
PBS	Primer binding site
PCR	Polymerase chain reaction

PFU	Plaque forming units
Pim-1	Proviral Integration Site 1
Pol	Gène de la transcriptase inverse et de l'intégrase
PPT	Polypurine tract
PR	Positive regulatory domain
PR	Protease viral
Ptpn6	Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 6
Ψ	Psi
R	Séquence répétée dans le long terminal repeat
RAS	Oncogène ras
Ras Grp 1	RAS guanyl releasing protein 1
Rb	Protéine du rétinoblastome
Rex2	RNA exonuclease 2
RIS	Sites d'intégration rétroviral
RSO	Restriction site oligonucléotide
RS-PCR	Restriction-site PCR
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Transcriptase inverse
SA	Splice acceptor site
SD	Splice donor site
Sn RNA	Small nuclear ribonucleic acid.
Spi-1/PU.1	SFFV proviral integration-1
SSV	Simian Sarcoma Virus
SU	Glycoprotéine de la surface de l'enveloppe virale
SV40	Simian vacuolating virus 40
TAN1	Translocation-associated Notch homolog
TGF β	Tumor Growth Factor β
Tm	Melting point temperature
TM	Protéine transmembranaire de l'enveloppe virale
Tnfsf9	Tumor necrosis factor superfamily number 9
Tris	1,3-Propanediol, 2-amino-2-(hydroxymethyl)
U3	Séquence unique dans le LTR du génome viral
U5	Séquence unique dans le LTR du génome viral
UV	Ultra-violet
VIH-1	Virus de l'immunodeficiency humaine 1
VIH-2	Virus de l'immunodeficiency humaine 2
VIS	Viral integration sites
V	Volt
Vdac2	Voltage dependent anion channel 2
VSR	Virus du Sarcome de Rous
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
YY1	Yin-Yang
Zfp503	Zinc finger protein 503

## RÉSUMÉ

Les rétrovirus murins peuvent causer une grande incidence de leucémies par le processus de mutagenèse insertionnelle. L'intégration d'un rétrovirus au niveau du même locus dans plus d'une tumeur définit un site commun d'intégration (CIS). L'identification des nouveaux sites communs d'intégration rétrovirale s'avère un outil important pour identifier de nouveaux gènes pouvant être impliqués dans l'apparition primaire du cancer chez l'être humain. Nous avons adapté une nouvelle technique pour isoler rapidement des sites d'intégration rétrovirale. Cette technique, appelée PCR-splinkerette, permet de mettre en évidence un grand nombre de ces sites et de trouver des nouveaux gènes impliqués dans les leucémies murines causées par le rétrovirus Graffi 1.4. En utilisant cette méthode, il nous a été possible de situer plusieurs intégrations du rétrovirus dans le génome de la souris et de repérer les gènes à proximité de l'intégration, à l'aide de banques de données (ENSEMBL). Nous avons cloné et analysé les séquences de 63 sites d'intégration rétrovirale (RISs) à partir de 12 tumeurs composées par des lymphomes de cellules T, B, myéloïdes, érythrocytaires et mégacaryocytaires, induits par Graffi 1.4. Les gènes *Notch1*, *Ras*, *Grp1*, *Myc*, *Ptpn6*, *Gsel*, *Lmo2* et *Evi1* et *Prdm16* dont le rôle est déjà connu dans le cancer, ont été trouvés à proximité de ces sites. Trois régions susceptibles de posséder plus d'une intégration dans le même locus, ont été identifiées sur les chromosomes 17D, 14B, 4E1. Plusieurs gènes trouvés autour de ces régions n'ont pas été rapportés comme étant des oncogènes connus. Une analyse plus profonde de ces sites et des gènes dont l'expression est modifiée dans ces tumeurs permettrait de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement du cancer.

**Mots-clés :** Rétrovirus, rétrovirus Graffi 1.4, leucémie, mutagenèse insertionnelle, réaction en chaîne de la polymérase, splinkerette, oncogènes, gènes suppresseurs de tumeurs.

## INTRODUCTION

La complexité des organismes multicellulaires nécessite un grand niveau de coordination entre les différents types de cellules spécialisés. Le maintien de cette organisation exige un système constant et dynamique de communication intercellulaire. Cet échange organisé d'information est essentiel pour garder l'état différencié des cellules, et la rupture des principales voies de signalisation intercellulaires peut prédisposer à la malignité (Derek *et al.*, 2004). La leucémie est un excellent exemple de ceci.

Les leucémies sont des cancers issus des cellules du système hématopoïétique qui sont produites dans la moelle osseuse durant l'hématopoïèse. Chez l'humain, les leucémies sont souvent le résultat d'un réarrangement chromosomique. Les modèles de leucémie chez la souris sont la conséquence de l'activation de proto-oncogènes par des rétrovirus (MuLV: murine leukemia virus) (Kung *et al.*, 1991).

Les rétrovirus murins ont été largement utilisés pour comprendre les mécanismes par lesquels ils perturbent le cours normal de l'hématopoïèse et pour identifier les gènes impliqués dans le processus leucémogénique. La mutagenèse insertionnelle est le mécanisme par lequel ces virus induisent la transformation cellulaire. Lors de l'intégration rétrovirale, les cellules hôtes peuvent être transformées par l'activation de proto-oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ce qui pourrait perturber le processus d'hématopoïèse normal et causer le cancer (Askew *et al.*, 1993, Jonker *et al.*, 1996, Wolff *et al.*, 1997).

Un aspect très important et utile du processus de mutagenèse insertionnelle réside dans la capacité du virus de non seulement altérer le gène cellulaire pendant l'intégration pour le rendre transformant, mais aussi de fournir un marqueur qui peut être utilisé dans l'identification et le clonage du site d'intégration (Van Lohuizen et Berns, 1990).

Lorsque le rétrovirus s'intègre au niveau du même locus plusieurs fois dans différentes tumeurs, on considère que cette région de l'ADN est un site commun

d'intégration (Ihle *et al.*, 1990). Puisque les rétrovirus murins s'intègrent au hasard dans le génome de la cellule hôte, retrouver une intégration rétrovirale au même locus dans plusieurs tumeurs différentes suggère fortement que les gènes qui se trouvent autour de l'intégration jouent un rôle important dans la transformation cellulaire.

Dans cette étude, le rétrovirus murin Graffi 1.4 a été utilisé comme modèle pour étudier les mécanismes de l'induction et de la progression de la leucémie et l'identification de nouveaux proto-oncogènes. Le but du projet a été de trouver de nouveaux sites communs d'intégrations dans l'ADN génomique de tumeurs induites par Graffi. Afin d'étudier la contribution du rétrovirus Graffi 1.4 dans le processus de la leucémie, nous avons examiné l'ADN de douze tumeurs d'origine T, B, mégacaryocytaire et myéloïde en utilisant la technique de PCR-splinkerette. Pour ce faire, un oligonucléotide de séquence connue, nommé splinkerette, a été utilisé. L'ADN provenant d'une tumeur est coupé puis une splinkerette y est ligasée. Ceci permet d'amplifier, par des réactions de PCR, les régions flanquant l'intégration rétrovirale. Une fois clonés, les produits des PCR sont séquencés, permettant de situer l'intégration 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.

En utilisant cette technique nous avons déterminé la position chromosomique de 60 sites d'insertion rétroviral (RIS, «Retroviral Integration Sites») en utilisant la banque de données Ensembl. Ces résultats montrent clairement que la technique de PCR-splinkerette est très efficace pour repérer des sites d'intégration rétrovirale qui sont susceptibles de contenir des gènes qui contribuent au développement de la tumeur.

## CHAPITRE I. ÉTAT DES CONNAISSANCES

### 1.1. Le Cancer

Les cellules des organismes vivants, qu'ils soient de type eucaryote ou procaryote, ont la capacité de percevoir et de répondre aux mécanismes de signalisation cellulaire. Ces mécanismes détectent et intègrent les signaux chimiques et physiques de l'environnement puis les transmettent à des molécules effectrices qui déclenchent une réponse homéostatique appropriée à l'intérieur de la cellule. L'incapacité des cellules eucaryotes animales à percevoir et à intégrer adéquatement les signaux auxquels elles sont exposées est associée à l'apparition de différents désordres physiopathologiques, comme le cancer.

Le cancer est le résultat d'une combinaison entre, d'une part, l'activation de voies favorisant la prolifération cellulaire et, d'autre part, l'inhibition de signaux restreignant le potentiel prolifératif des cellules. (Hanahan *et al.*, 2000). Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une autosuffisance en signaux de croissance, une résistance à l'apoptose, une insensibilité aux signaux d'inhibition de croissance, un potentiel répliatif infini ("immortalisation"), un potentiel de néovascularisation ("angiogenèse") et une capacité d'invasion tissulaire et métastase (Annexe A)

L'indépendance en signaux de croissance, acquise par les cellules cancéreuses, peut provenir d'altérations moléculaires se situant à différents niveaux dans la cellule :

1. Au niveau **des facteurs de croissance extracellulaires**. Selon un mécanisme de stimulation autocrine, les cellules cancéreuses synthétisent les facteurs auxquels elles sont sensibles. Cette "boucle" de rétroaction positive est retrouvée entre autres dans les sarcomes et les carcinomes qui produisent du TGF $\beta$  (Kohler *et al.*, 1992).
2. Au niveau **des récepteurs membranaires** qui ont une activité tyrosine kinase. Les récepteurs membranaires ainsi dérégulés envoient, aux cellules et de façon constitutive, des messages de survie et de prolifération (Hanahan *et al.*, 2000).

3. Au niveau **des molécules effectrices** activées par les récepteurs membranaires. La dérégulation se situe en aval de l'activation du récepteur, au niveau des voies de transduction. La voie RAS/MAP est fréquemment touchée. 25% des tumeurs humaines présentent des protéines RAS ayant une structure altérée (Shannon 1995).
4. Au niveau des voies induisant **l'apoptose** ainsi que les protéines impliquées dans la survie cellulaire.

## 1.2. La Leucémie

La leucémie est le terme utilisé pour désigner un groupe de cancers affectant le sang. Dans cette maladie, les globules blancs se multiplient de façon anormale dans la moelle osseuse et perturbent la production de globules rouges, de globules blancs normaux et de plaquettes sanguines. La maladie surgit lorsqu'il y a un envahissement du sang par des globules blancs anormaux. Les cellules leucémiques peuvent également envahir d'autres organes comme les ganglions lymphatiques, la rate, le foie, les testicules ou le système nerveux central (<http://www.fr.wikipedia.org>)

La leucémie peut prendre l'une des deux formes suivantes :

- **La leucémie aiguë qui progresse rapidement** : L'espérance de vie, sans traitement, est faible (de quelques semaines à quelques mois). La leucémie aiguë est la forme la plus souvent constatée chez les enfants, bien qu'on puisse en souffrir à tout âge. Elle représente à peu près la moitié des cas de leucémie.
- **La leucémie chronique qui progresse lentement** : Avec le traitement approprié, la progression de la maladie peut être arrêtée. Les malades peuvent vivre de longues périodes de bien-être et d'activité normale. La leucémie chronique est constatée le plus souvent chez les adultes, mais on peut en souffrir à tout âge. Elle représente à peu près la moitié des cas de leucémie (The Leukemia and Lymphoma Society 2004).

### 1.2.1. Différents Types de Leucémie chez l'Humain

Il existe deux formes principales de leucémie : la leucémie lymphoïde et la leucémie myéloïde. Il existe également plusieurs variétés de chaque forme.

- *Leucémie aiguë lymphoblastique* (LAL), qui est la forme la plus courante chez les enfants. Elle entraîne une multiplication et une accumulation non contrôlées de lymphocytes immatures. Leur grand nombre dérègle également la production des globules rouges.
- *Leucémie lymphocytaire chronique* (LLC), qui apparaît presque toujours chez des personnes de plus de 50 ans. C'est la forme de leucémie la plus courante dans l'ensemble, qui est environ deux fois plus fréquente chez les hommes que chez les femmes. Elle se développe plus lentement que la LAL et ne modifie pas la production des globules rouges.
- *Leucémie myéloblastique aiguë* (LMA), qui entraîne une croissance et une accumulation anarchique des cellules appelées myéloblastes. Ce trouble réduit la fonction des globules rouges, des plaquettes et des globules blancs normaux
- *Leucémie myéloïde chronique* (LMC), qui survient plus lentement que la LMA et risque moins d'entraver la production des autres types cellulaires. Les risques d'être atteint de la LMC varient de un sur un million chez les enfants de moins de 10 ans à un sur 10.000 pour les personnes de plus de 80 ans (American cancer society. (<http://www.cancer.org>))

La leucémie aiguë affecte :

- **Les globules rouges** : le nombre de globules rouges diminue, à mesure que les cellules qui fabriquent les globules rouges dans la moelle osseuse sont remplacées par des cellules leucémiques.
- **Les plaquettes** : la fabrication de plaquettes diminue, parce que les cellules qui fabriquent les plaquettes dans la moelle sont remplacées par des cellules leucémiques.
- **Les globules blancs** : les globules blancs sont remplacés par des cellules anormales.

- **La moelle** : les globules blancs anormaux envahissent la moelle et dérèglent la fabrication normale des globules sanguins

Dans le cas de la leucémie chronique, les effets sont moins néfastes.

**Leucémie lymphoïde** : Le principal effet est une augmentation du nombre des lymphocytes qui circulent dans le sang et dans la moelle. Les ganglions lymphatiques et la rate peuvent grossir.

**Leucémie myéloïde** : L'anémie est courante, mais les globules blancs et plaquettes fonctionnant normalement peuvent prévenir les infections et les saignements anormaux (The Leukemia and Lymphoma Society 2004).

Généralement, la leucémie chronique peut être contrôlée pendant plusieurs années, mais la plupart des cas finissent par évoluer vers des phases semblables à la leucémie aiguë. L'OMS résume la classification des différents types de désordres hématopoïétiques chez l'humain de la façon suivante :

- Néoplasmes des cellules B;
- Néoplasmes des cellules T;
- Lymphome de Hodgkin;
- Immunodéficience liée au désordre lymphoprolifératif;
- Néoplasme histiocytique et des cellules dendritiques et autres désordres associés;
- Leucémies aiguës;
- Syndrome myélodysplastique;
- Désordres myéloprolifératifs chroniques

(World Health Organisation Classification of Tumors, International Agency for Research on Cancer, Lyon 2001)

### 1.2.2. Différents Types de Leucémie chez la Souris

La plupart des leucémies qui se développent chez la souris apparaissent après inoculation avec un rétrovirus. La plus récente classification des néoplasmes chez la souris est celle donnée par Bethesda en 2002 (Scott *et al.*, 2002). Elle compare les désordres hématologiques chez l'humain avec ceux de la souris. Ceci permet de mieux adapter la classification donnée par l'Organisation Mondiale de la Santé chez l'humain, aux désordres hématopoïétiques chez la souris.

On peut constater deux grands types de désordres hématopoïétiques : des désordres de type lymphoïde et non lymphoïde qui sont eux même divisés en catégories.

DÉSORDRES HÉMATOPOIÉTIQUES NON LYMPHOIDES	DÉSORDRES HÉMATOPOIÉTIQUES LYMPHOIDES
Leucémie non lymphoïde	<b>NÉOPLASMES DES CELLULES B</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Néoplasme des précurseurs des cellules B</li> </ul>
Sarcome hématopoïétique non lymphoïde	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Néoplasme des cellules B matures</li> </ul>
Dysplasie myéloïde	<b>NÉOPLASME DES CELLULES T</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Néoplasme des précurseurs des cellules T</li> <li>• Néoplasme des cellules T matures</li> <li>• Néoplasme des cellules T à caractère indéterminé</li> </ul>
Prolifération myéloïde (non réactive)	

**Tableau I.** Résumé des différents désordres hématopoïétiques présents chez la souris, selon la classification de Bethesda en 2002.

### 1.3. Les Rétrovirus

Les rétrovirus sont des virus à ARN simple brin de polarité positive (le génome d'ARN simple brin représente le brin codant qui correspond à l'ARN messager), qui sont entourés d'une enveloppe sur laquelle on retrouve les glycoprotéines virales. Ces virus possèdent une enzyme, la transcriptase inverse, capable de retrotranscrire l'ARN viral en ADN.

Le rétrovirus forment un groupe de virus très répandus dans la nature. On les retrouve chez les reptiles, les oiseaux et les mammifères et parmi ceux-ci chez la souris (MuLV: Murine Leukemia Virus), le chat (FLV: Feline Leukemia Virus), le singe (SSV: Simian Sarcoma Virus) et l'homme (HTLV: Human T-cell Leukemia Virus) (Butera, 2001).

Les rétrovirus demeurent un outil inestimable pour étudier la cellule et comprendre les mécanismes moléculaires de la transformation maligne car ils possèdent la capacité de s'intégrer dans l'ADN de la cellule hôte, de la transformer en mutant l'ADN pendant le processus, pour finalement induire une maladie néoplasique (Jolicoeur *et al.*, 1988).

#### 1.3.1. Classification des Rétrovirus

La famille des Retroviridae est divisée en trois sous-familles basées sur les propriétés biologiques et pathogéniques :

- *Lentiviridae* (lentus, lent) : Virus cytopathologiques non transformants avec une période de latence très longue, auxquels appartiennent certains virus prototypes connus depuis de nombreuses années et qui affectent diverses espèces animales, comme le virus de l'arthrite-encéphalite caprine (CAEV : Caprine Arthritis-Encephalitis Virus) et chez l'humain le virus de l'immunodéficience humaine 1 et 2 (Human immunodeficiency virus 1 [HIV-1] et 2 [HIV-2])
- *Spumaviridae* (spuma, mousse) : Virus qui causent une dégénérescence des cellules infectées en donnant comme résultat un aspect écumeux au cytoplasme. Ces virus ne

sont pas connus comme pathogéniques et sont capables d'infecter des cellules au repos. Parmi eux, on retrouve le *Chimpanzee foamy virus* [CFV], souche humaine [CFV/Hu] (anciennement dénommée Human foamy virus, HFV) qui sont associés à des désordres inflammatoires et dégénératifs progressifs.

- *Oncoviridae* (onkos, tumeur) : Virus qui sont associés à des tumeurs malignes et parmi eux on retrouve :
  - Les Rétrovirus de type A aussi connus comme "particules intracisternales" (IAPs). Il s'agit de particules immatures sans enveloppe, strictement intracellulaires, lesquelles sont le résultat des éléments génétiques similaires aux rétrovirus endogènes. Exemple : le virus du sarcome de Rous (RSV: Rous Sarcoma Virus).
  - Les Rétrovirus de type B sont des particules extracellulaires enveloppées avec un noyau excentrique sphérique condensé et ayant des épines proéminentes. Le virus de la tumeur mammaire chez la souris (MMTV: Mouse Mammary Tumor Virus) est un rétrovirus de type B.
  - Les Rétrovirus de type C sont des particules exclusivement extracellulaires, avec un noyau central sphérique. Ces virus s'assemblent dans la membrane et possèdent des épines peu visibles. La majorité des rétrovirus mammifères et aviaires font partie de ce groupe-ci. Exemples : le virus de la leucémie murine (MLV: Murine Leukemia Virus), le virus de la leucémie aviaire (ALV: Avian Leukemia Virus), le virus de la leucémie des cellules T chez l'humain (HTLV I et II: Human T cell Leukemia Virus).
  - Les Rétrovirus de type D sont des virus généralement un peu plus gros (jusqu'à 120nm) et qui possèdent des épines moins proéminentes et un noyau cylindrique. Ils peuvent être intracellulaires ou extracellulaires. Exemple : le virus de Mason-Pfizer (MPMV) (Weiss *et al.*, 1985).

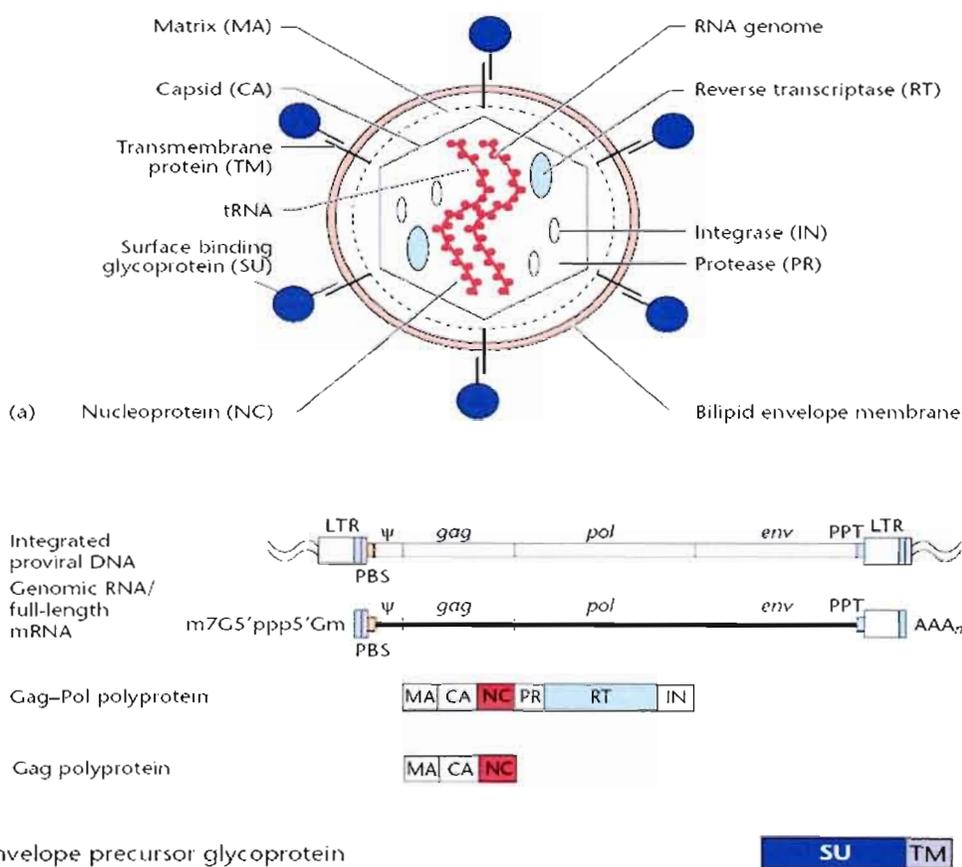
### 1.3.2. Structure du Génome Rétroviral

Le génome des rétrovirus peut être considéré sous deux formes : ARN génomique ou sous la forme d'ADN intégré (provirus) (Figure 1) (Sitbon *et al.*, 2001). Le génome rétroviral est le dimère d'un ARN simple brin de polarité positive long d'environ 8300 nucléotides. La formation du dimère est possible par un appariement local de type Watson-Crick entre les deux brins d'ARN sur une séquence hautement structurée dénommée DLS («dimer-linkage structure») (Sitbon *et al.*, 2001).

Chaque brin de l'ARN génomique contient le groupe m<sup>7</sup>G5'ppp5'Gm dans son extrémité terminale 5' et une queue poly-A dans son extrémité 3'. Le génome rétroviral est organisé avec trois régions codantes gag-pol-env, encadrées par les LTR (long terminal repeats (U3-R-U5)) non codantes. L'ADN proviral intégré est plus long que le génome à ARN dû aux LTR 5' et 3' longues d'environ 600 nucléotides situées de part et d'autre du provirus (Pedersen et Duch, 2001). Les LTR abritent des séquences de contrôle de la transcription virale : ils possèdent le promoteur et les séquences «enhancer» du génome viral (Jolicœur *et al.*, 1988). Le PBS (primer binding site) situé immédiatement en aval de la LTR 5' du génome et le PPT (polypurine tract) situé en amont de la LTR 3', jouent des rôles essentiels dans la transcription inverse du rétrovirus. La région Ψ (psi), qui englobe la DLS contient des signaux importants pour la dimérisation et l'incorporation sélective de l'ARN viral dans les

Le gène "gag" du virus, code pour les protéines internes de la particule virale comme la protéine de la matrice du rétrovirus (MA), la protéine de la capsid (CA) et la nucléocapsid (NC). Le gène "pol" code pour les enzymes IN et RT nécessaires pour la répllication et finalement le gène "env" code pour les protéines de l'enveloppe virale telles que la glycoprotéine de surface (SU) et la glycoprotéine transmembranaire (TM), toutes deux dérivées à partir d'un précurseur glycoprotéique. Le gène pro code pour la protéase virale (PR) qui agit dans le processus d'assemblage de la particule virale. Ce gène se trouve entre les gènes gag et pol (Coffin *et al.*, 1997).

Les rétrovirus qui comportent uniquement les protéines codées par les gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env*, sont appelés simples. Cependant, il existe d'autres rétrovirus (*spumavirus* et *lentivirus*) appelés complexes, qui contiennent des gènes accessoires. Ces gènes régulent et coordonnent l'expression des gènes viraux et certains ont également d'autres rôles auxiliaires. Ils sont localisés entre *pol* et *env* et aussi en aval de *env* incluant la région U3 du LTR (Cullen, 1992)



**Figure 1. Particule Rétrovirale et Structure du Génome.** (a) Particule rétrovirale montrant l'emplacement des principales protéines et structures virales. (b) Organisation du génome rétroviral illustrant la structure d'un provirus intégré à proximité de l'ADN cellulaire de l'hôte. Il est possible d'observer les séquences LTR (U3-R-U5) et l'ARN de longue taille qui sert comme ARN génomique ainsi que comme ARN messager pour la traduction des cadres

de lecture ouverts (ORFs) des gènes gag et pol en polyprotéines. L'ARN messager de env est généré par épissage et code pour la glycoprotéine précurseur Env.

LTR, Long Terminal Repeat, PBS, Primer Binding Site;  $\Psi$ , packaging signal; PPT, PolyPurine Tract. (Tiré de Pedersen et Duch, 2001).

#### 1.4. Cycle de Réplication Rétrovirale

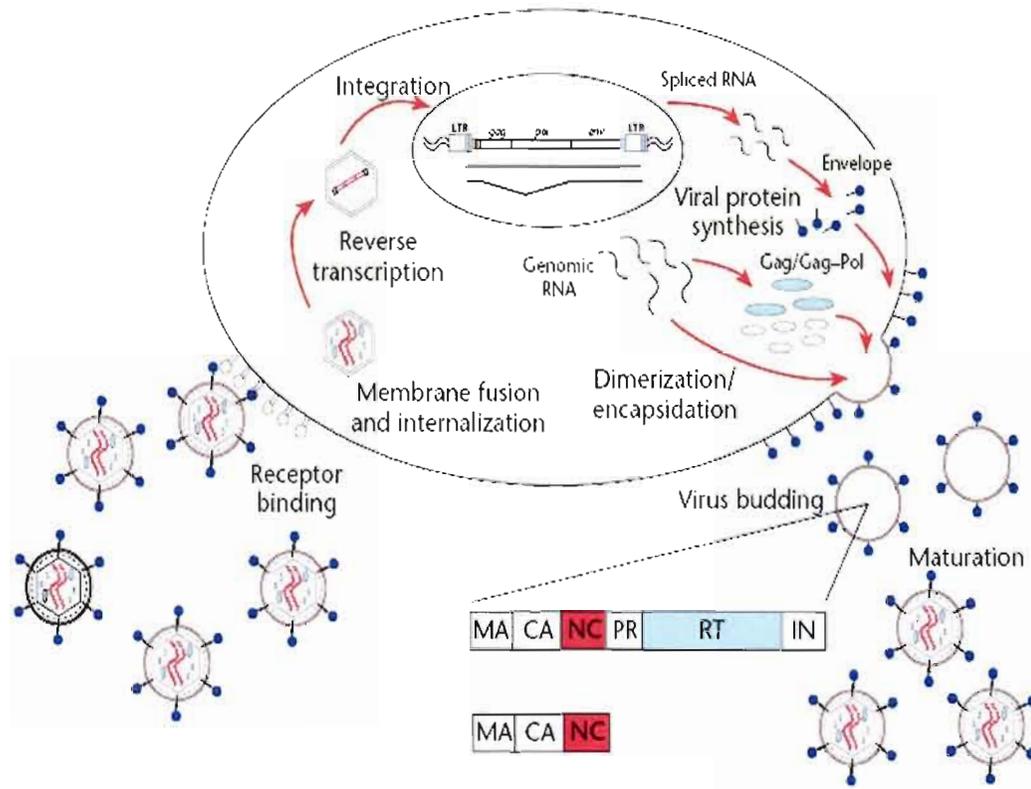
Les aspects du cycle viral des rétrovirus qui leur permettent d'interagir avec des gènes cellulaires pour produire une expression génique aberrante et la formation de tumeurs sont bien connus et ont été largement étudiés (Coffin *et al.*, 1997) (figure 2). Les séquences génomiques, y compris celles avec potentiel oncogénique, peuvent être capturées par le rétrovirus durant l'intégration virale adjacente et dans la même orientation transcriptionnelle que le gène avec potentiel oncogénique (proto-oncogène) (Blair et Athanasiou, 2000). L'ADN qui s'intègre dans la cellule hôte peut rester et être hérité aux générations cellulaires ultérieures. (Perry, 2001).

La première étape dans le cycle de réplication rétrovirale est l'interaction spécifique de la glycoprotéine de l'enveloppe du virion (env) avec les récepteurs de la surface cellulaire. Ces récepteurs se retrouvent seulement sur les cellules d'une espèce ou d'un tissu déterminé. La population de cellules cibles ou le tropisme cellulaire d'un rétrovirus particulier est défini par conséquent par la prévalence de ce récepteur (Navarro, 2001).

Après l'entrée du rétrovirus dans la cellule hôte, l'ARN viral est copié en une molécule d'ADN linéaire double brin. Ce processus est catalysé par l'enzyme virale transcriptase inverse. Étant donné la présence de deux ARN génomiques dans le virion, une recombinaison entre ces deux molécules pendant le processus de transcription inverse peut avoir lieu (Jonkers et Berns, 1996). L'étape suivante dans le processus d'infection implique l'entrée de l'ADN viral dans le noyau et son insertion dans le génome de l'hôte. Ce processus est médié par l'intégrase virale et l'ADN viral intégré prend alors le nom de provirus. C'est dans cette étape qu'on peut avoir des variations dans la régulation des gènes, ce qui peut causer la transformation cellulaire et ainsi le cancer. Une fois intégré dans le génome

cellulaire, le provirus se comporte comme un gène ou une unité transcriptionnelle. Celle-ci est transcrite par l'ARN polymérase II cellulaire en un seul transcrit primaire à partir du premier nucléotide de R dans le LTR. La transcription dépend des éléments de contrôle contenus dans la région LTR 5' du provirus. Il est important de remarquer que la région LTR 3' peut aussi être un promoteur transcriptionnel et activer les gènes cellulaires en aval. Des séquences promotrices, ainsi que des séquences activatrices (enhancers) de la transcription sont situés dans la région U3 (Sitbon *et al.*, 2001).

Une fois l'ADN proviral transcrit, l'ARN entier peut subir le processus d'épissage, être transporté dans le cytoplasme et y être directement traduit ou être dimérisé dans des nouvelles particules en formation. Le rétrovirus une fois assemblé est excrété par bourgeonnement de la membrane pour infecter d'autres cellules et de cette façon recommencer le cycle.



**Figure 2. Cycle de Réplication d'un Virus Simple.** Le cycle de réplication commence par l'attachement du virus au récepteur et l'internalisation de ce dernier, continuant par la transcription reverse et l'intégration de l'ADN proviral. Les étapes tardives du cycle comportent la transcription et traduction de l'ARN viral pour l'assemblage et bourgeonnement des particules virales. La maturation des particules libérées implique la coupure des polyprotéines virales par la PR (protéase). (Tiré de Pedersen et Duch, 2001).

## 1.5. Rétrovirus Oncogéniques

De façon générale, les rétrovirus peuvent être sub-divisés en deux groupes, dépendamment de leur patron de pathogénicité. Les rétrovirus défectifs induisent une multitude de néoplasies (carcinomes, lymphomes, érythroleucémies, sarcomes, etc.) entre 2 à 3 semaines après l'infection. Ils sont capables de transformer des cellules en culture car leur génome a subi non seulement une délétion de certaines de leurs séquences, mais aussi une substitution importante acquérant ainsi un nouveau gène d'origine cellulaire responsable de la transformation maligne ou de la cancérisation. Le deuxième groupe est formé par les rétrovirus non défectifs qui causent des tumeurs mono ou oligoclonales après une période de latence de plusieurs mois et qui sont incapables de transformer des cellules *in vitro*. Ces virus ne possèdent pas d'oncogènes viraux et induisent des néoplasmes seulement lors de l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte en mutant et activant des séquences cellulaires flanquantes (Jonkers et Berns, 1996, Van Louhizen et Berns, 1990, Jolicoeur *et al.*, 1988).

### 1.5.1. Les Rétrovirus leucémogènes Murins (MuLVs)

Les MuLVs induisent une grande variété de tumeurs hématopoïétiques (érythroleucémie, lymphome à cellules T ou B, leucémie myéloïde), à travers de mécanismes complexes, qui impliquent l'activation des proto-oncogènes cellulaires dans les cellules de la tumeur dû à l'insertion de l'ADN proviral. (Van Louhizen et Berns, 1990).

Il a été démontré que le potentiel leucémogène de certains des MuLVs leur est conféré par le LTR (DesGroseillers et Jolicoeur, 1984). Le type de tumeur induite dépend généralement des séquences localisées dans la région promotrice virale, mais aussi d'autres régions du génome viral (Rassart *et al.*, 1996).

Le tropisme cellulaire des MuLVs dépend d'une action complémentaire entre le LTR et le gène de l'enveloppe du virus. Ils peuvent être divisés en quatre catégories selon leur type de tropisme : **xénotropique**, le virus ne peut infecter que des cellules non-murines;

**écotropique**, le virus peut infecter des cellules murines mais pas des cellules d'une autre espèce; **amphotropique**, le virus peut infecter des cellules murines, humaines et autres; et finalement **dual tropique**, le virus peut infecter des cellules de vison et de cellules murines (Jonkers et Berns, 1996).

Les MuLVs peuvent être présents sous la forme de virus endogènes intégrés dans le génome de la souris, transmis verticalement dans la lignée germinale, et sous forme exogène infectieuse transmise horizontalement (Sitbon *et al.*, 2001).

### 1.5.2. Les Rétrovirus Endogènes (ERVs)

Si un rétrovirus s'insère dans l'ADN de la lignée germinale, il sera copié et hérité en même temps que le reste du génome de l'hôte comme un rétrovirus endogène (ERV) (Bromham, 2002).

Il a été détecté dans le génome de plusieurs espèces d'animaux, des séquences liées aux rétrovirus. Le génome de la souris contient plusieurs copies de séquences de MuLVs, lesquelles ont été mises en évidence par hybridation moléculaire. Chez certaines souches pures de souris, quelques unes de ces séquences codent pour des rétrovirus biologiquement actifs qui s'expriment de façon spontanée ou après plusieurs traitements d'induction (Rassart et Jolicoeur, 1982)

Les séquences rétrovirales endogènes sont constituées, pour la plupart d'entre elles, soit de fragments de génomes rétroviraux, soit de génomes entiers qui sont défectifs dans l'expression de gènes essentiels pour la réplication virale, soit, plus rarement, des rétrovirus entiers compétents pour la réplication (Sitbon *et al.*, 2001)

Les ERVs font partie du patrimoine génétique de l'espèce et sont présents sur un ou plusieurs chromosomes. Les virus endogènes sont peu infectieux et rarement pathogènes. Par contre, ils sont très abondants sur les chromosomes de certaines espèces et forment un

réservoir pour se recombinaison avec des virus exogènes, générant ainsi une variété de nouveaux rétrovirus (Jolicœur *et al.*, 1988)

Des analyses récentes basées sur le séquençage du génome humain suggèrent que au moins 8% du génome est dérivé des rétroéléments avec peut-être autant que la moitié d'un billion de copies (Bromham, 2002).

Les ERVs influencent la fonction du génome et peuvent contribuer à la transformation maligne des cellules porteuses, par une multitude de moyens comme : la disruption de la fonction d'un gène de l'hôte par l'insertion à l'intérieur de celui-ci, positionnement des promoteurs viraux près des gènes de l'hôte (en causant la dérégulation de leur expression), et déplacement de l'ADN de l'hôte autour du génome comme un dérivé de la transposition (Bromham, 2002).

### 1.5.3. Le Rétrovirus Graffi

Le virus murin Graffi est un rétrovirus non déficient qui induit des leucémies lymphoïdes de type T, B, des leucémies myéloïdes ainsi que des leucémies de type érythrocytaire et mégacaryocytaire chez plusieurs souches de souris (Voisin *et al.*, 2006). Le rétrovirus Graffi a été isolé à partir d'un filtrat cellulaire du sarcome de Elrich (Graffi, 1957). Deux clones moléculaires infectieux, GV1.2 et GV1.4, ont été isolés et caractérisés (Ru *et al.*, 1993). Ces deux clones moléculaires sont très similaires en structure, excepté que le virus issu du clone GV1.2 induit la maladie avec une période de latence plus courte et porte une duplication de 60 pb dans la région activatrice U3 dans le LTR (Ru *et al.*, 1993). Des souris nouvelles nées BALB/c et NFS inoculées avec un des deux clones ou avec le mélange parental développent à différents degrés une hépatosplénomégalie, un agrandissement du thymus, une lymphoadénopathie généralisée et des nodules lymphatiques mésentériques, et en plus de l'anémie dans un stage leucémique. Pour ces raisons, le rétrovirus murin Graffi peut être considéré comme un excellent modèle pour étudier les mécanismes de l'induction et de la progression de la leucémie et l'identification de nouveaux proto-oncogènes (Denicourt *et al.*, 2003).

## 1.6. Mutagenèse Insertionnelle

Les insertions rétrovirales dans le génome peuvent transformer les cellules de l'hôte par l'activation de proto-oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. (Jonkers et Berns, 1996). Ce mécanisme permet aux rétrovirus murins de type non déficient de perturber le processus normal d'hématopoïèse et causer la leucémie (Denicourt *et al.*, 2003).

Les cellules qui acquièrent un avantage de croissance dû à ces intégrations seront enrichies dans la population de la tumeur et le clonage de ces provirus et de l'ADN cellulaire adjacent à l'intégration peut être utilisé pour identifier les gènes qui contribuent au phénotype malin (Dudley, 2003). De cette façon, la capacité du virus d'altérer le gène cellulaire suite à l'intégration pour le rendre transformant peut fournir un marqueur qui peut être utilisé dans l'identification et le clonage du site d'intégration (Wolff, 1997)

### 1.6.1. Sites Préférentiels d'Insertion Rétrovirale

Les rétrovirus s'intègrent au hasard dans tous les types cellulaires infectés, hématopoïétiques ou non (Sitbon *et al.*, 2001). Cependant, certains sites d'intégration sont effectivement retrouvés plus fréquemment dans les différentes tumeurs à cause de l'avantage sélectif, notamment de la capacité de prolifération qu'ils confèrent à des types cellulaires particuliers (Fan, 1997). Parmi ces sites, on retrouve ceux où il y a eu des changements dans la structure locale de l'ADN, comme lors d'une méthylation ou lorsque des régions génomiques sont enrichies avec le dinucléotide CpG, appelées îlots CpG (Weidhaas *et al.*, 2000).

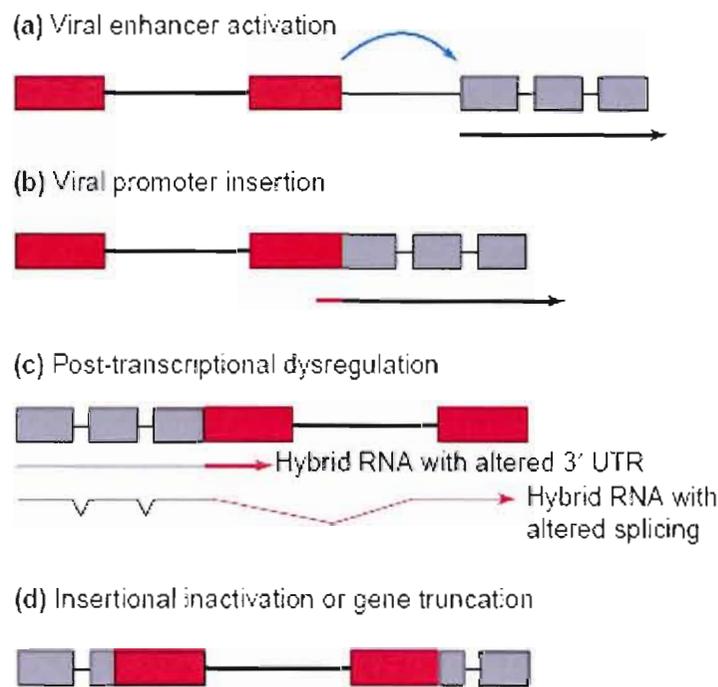
Les gènes cellulaires qui subissent plus directement les effets de la mutagenèse par insertion et qui participent au processus leucémogène, sont ceux codant pour des facteurs de transcription, des cytokines ou récepteurs de cytokines et des suppresseurs de tumeurs (Van Lohuizen, Berns, 1990).

Les rétrovirus agissent au niveau moléculaire pour altérer la structure et l'expression des proto-oncogènes grâce à différents mécanismes (figure 3). L'interaction entre les provirus

et les gènes est déterminée par les propriétés uniques des longues séquences répétées (LTR) présentes aux deux extrémités du provirus. Ces séquences contiennent des éléments promoteurs et des séquences activatrices ainsi que des signaux de polyadénylation capables d'influencer la transcription cellulaire (Van Lohuizen et Berns, 1990). Un premier mécanisme implique l'activation des promoteurs de protooncogènes par les portions promotrices des LTR. L'intégration a lieu dans la même orientation transcriptionnelle du gène cible et la transcription commence depuis le promoteur viral dans le LTR 5' ou 3'. L'activation par insertion de promoteur est associée fréquemment avec des délétions virales dans les cas où le promoteur du LTR 3' est utilisé (Cullen *et al.*, 1984), tandis que dans les cas où le promoteur du LTR 5', est utilisé la transcription résulte dans la formation de transcrits hybrides qui contiennent des séquences virales et cellulaires (Coffin et Moore, 1990). L'expression augmentée des gènes peut être obtenue par un autre mécanisme connu comme l'insertion au niveau de la séquence activatrice «enhancer». Dans cette stratégie d'activation, le virus s'intègre dans la région 5' du gène, dans la direction transcriptionnellement opposée ou dans la région 3' du gène en suivant la même orientation transcriptionnelle (Wolff, 1997), ce qui engendre une augmentation dans l'expression des gènes cibles.

Le troisième mécanisme, appelé mécanisme de terminaison, est associé à l'intégration du virus dans un exon du proto-oncogène ou dans l'extrémité 3' du gène réarrangé. Dans ce cas, le signal de polyadénylation de la région R du LTR 5' du provirus conduit à la terminaison de la transcription et entraîne la délétion du proto-oncogène dans l'extrémité 3' ou la substitution des séquences 3' non traduites du proto-oncogène.(Sitbon *et al.*, 2001). Finalement, l'intégration d'un virus dans l'unité transcriptionnelle peut avoir des effets sur la protéine résultante. Si une insertion virale affecte les domaines codants, la séquence de la protéine peut être complètement inactivée ou mutée d'une manière à ce qu'un gène aberrant avec une activité biologique anormale soit produit. Ceci peut se produire en même temps que l'activation au niveau du promoteur ou de la séquence activatrice, en créant de cette manière des niveaux élevés de la protéine mutante. Bien que l'activation en cis des gènes hôtes paraît être un mécanisme prédominant avec lequel les rétrovirus transformants lents exercent leur potentiel de transformation, certains rétrovirus de ce type, comme le virus de la leucémie bovine (BLV) et de la leucémie des cellules T humaines (HTLV), sont capables de

transactiver des gènes viraux ainsi que différents gènes hôtes par l'intermédiaire de la protéine transactivatrice *tax* codée viralement (Sodroski *et al.*,1985).



**Figure 3. Représentation des Mécanismes d'Intégration Rétrovirale.** Les explications se trouvent dans le texte ci-dessous (Tiré de Dudley, 2003)

### 1.7. Sites Communs d'Intégration Rétrovirale

Comment il a été décrit précédemment, l'intégration des rétrovirus se fait de manière aléatoire dans le génome. Ceci signifie que la probabilité de retrouver un rétrovirus intégré au même site plusieurs fois est très rare. Si dans une région de l'ADN, on trouve un virus intégré au niveau du même locus plusieurs fois dans différentes tumeurs, on peut définir cette région comme un «site commun d'intégration» (Ihle *et al.*, 1990) 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).

La recherche des sites communs d'intégration rétrovirale s'avère comme un outil important pour identifier des sites d'intégration préférentiels de certaines tumeurs et dans l'identification des nouveaux gènes qui pourraient être importants dans l'apparition primaire du cancer chez l'être humain.

### 1.8. Techniques Utilisées pour la Détection des Intégrations Rétrovirales

Pendant les 10 dernières années, plusieurs stratégies ont été développées pour amplifier l'ADN cellulaire inconnu flanquant le provirus dans le génome. (Hui *et al.*, 1998). Les techniques qui seront décrites ici donnent des bonnes approches :

- **IPCR (Inverse or inverted PCR)** : Cette approche est une modification de la technique de PCR (polymerase chain reaction), qui se sert de la circularisation intramoléculaire de la séquence intégrée dans le génome pour amplifier l'ADN cellulaire adjacent l'intégration (Hui *et al.*, 1998).
- **Alu PCR** : Dans cette méthode, il est possible d'identifier la séquence de jonction entre l'intégrant et l'ADN cellulaire en utilisant la séquence insérée qui est connue et les séquences humaines consensus Alu (Hui *et al.*, 1998).
- **Vectorette-PCR (Arnold & Hodgson 1991) et splinkerette-PCR (modification de la PCR-vectorette) (Devon *et al.*, 1995)**: La ligation à l'ADN de ces unités permet l'amplification par PCR des séquences qui se trouvent entre le site d'intégration et une amorce connue, sans besoin de circularisation de l'ADN (Annexe B et D) (Hui *et al.*, 1998).

Les techniques suivantes peuvent aussi offrir des stratégies alternatives pour cloner les séquences flanquantes :

- **Targeted gene-walking PCR et RS-PCR (restriction-site PCR)**: Ces techniques de PCR utilisent la combinaison d'une amorce spécifique avec des amorces non-spécifiques appelées «walking primers» pour amplifier les séquences d'ADN flanquantes inconnues (Hui *et al.*, 1998).

- **CPCR (capture PCR) :** Technique basée sur l'enrichissement des séquences d'intérêt avec un support revêtu de streptavidin pour la réaction de PCR (Hui *et al.*, 1998).
- **Panhandle PCR:** Cette procédure doit son nom au fait que, pendant l'étape de extension de la réaction de PCR, une matrice d'ADN en forme de casserole avec une poignée est formée, et contient une répétition inversée du fragment intégré (Hui *et al.*, 1998).
- **Boomerang DNA amplification (BDA) :** Cette méthode est semblable à celui des vectorettes et du Panhandle PCR (Hui *et al.*, 1998).

Pour un résumé de ces techniques se référer à l'annexe C.

### 1.9. Classification des Oncogènes

Les oncogènes ont été classiquement définis comme des gènes, à caractère dominant, qui, lorsqu'ils sont exprimés de façon dérégulée ou lorsque leur structure est altérée, contribuent au phénotype transformé d'une cellule. Actuellement, plus de 100 oncogènes ont été décrits dans les hémopathies malignes humaines. Ces gènes codent pour des protéines de fonctions très diverses (Gisselbrecht, 2003). Les oncogènes peuvent être divisés en différents groupes selon leur fonction dans la cellule :

#### ➤ Facteurs de Croissance

Les facteurs de croissance sont des polypeptides qui fonctionnent comme des signaux extracellulaires pour stimuler la prolifération de cellules ciblées, la différenciation cellulaire et l'inhibition de l'apoptose. Ces polypeptides doivent avoir un récepteur spécifique qui répond à un type déterminé de facteur de croissance (Cross et Dexter, 1991).

#### ➤ Récepteurs de Facteurs de Croissance

Un grand nombre d'oncogènes codent pour des formes mutantes de récepteurs de facteurs de croissance, lesquels possèdent une activité protéine tyrosine kinase intrinsèque.

Ces onco-protéines provoquent une transformation maligne en maintenant un signal mitogénique indépendant de son interaction avec le ligand. Le récepteur envoie alors de façon constante des signaux mitogéniques qui peuvent aboutir à la transformation cellulaire (Bishop, 1991, Pimentel, 1985).

#### ➤ **Transducteurs Intracellulaires**

Cette troisième classe d'oncogènes, code pour des protéines cytoplasmiques mutantes. Ces onco-protéines ont deux fonctions fondamentales, l'activité protéine kinase et GTPase. Comme dans le groupe des récepteurs, les proto-oncogènes de cette catégorie possèdent avec une activité kinase, peuvent être transformés en oncogènes grâce à des changements structurels qui augmentent leur activité kinase. Dans le cas des proto-oncogènes avec une activité GTPase, la transformation oncogénique est due à une mutation de la protéine G, plus spécifiquement de sa sous-unité  $\alpha$ . Cette mutation élimine l'activité GTPase, ce qui altère la cascade induite par la croissance. Les membres de la famille des onco-protéines avec activité kinase et GTPase peuvent être associés à la membrane ou libres dans le cytoplasme. (Kung, 1991).

#### ➤ **Facteurs de Transcription**

L'activation anormale de certains facteurs de transcription peut entraîner la transformation cellulaire. Le mécanisme d'action de ces facteurs implique leur interaction avec d'autres protéines et d'autres facteurs de transcription pour former des complexes hétérodymériques qui permettent la transcription de gènes importants lorsque plusieurs signaux de croissance sont présents (Perry, 2001). En parallèle avec les voies mitogéniques, on a aussi les voies qui amènent à la mort cellulaire, lesquelles doivent être inhibées afin que la prolifération maligne puisse procéder selon un mode exponentiel.

### ➤ Inhibiteurs de l'Apoptose

La dernière classe d'oncogènes est constituée par les inhibiteurs de l'apoptose, lesquels peuvent fonctionner comme des oncogènes. Le seul protooncogène reporté jusqu'à présent comme régulateur de la mort cellulaire programmée est bcl-2. Il a été démontré que ce dernier était surexprimé dans plusieurs lymphomes (Perry, 2001).

#### 1.10. Oncogènes Cellulaires Activés par Mutagenèse Insertionnelle

Les avancées récentes dans les méthodes d'amplification des séquences génomiques environnant les sites d'intégration virale (VIS), leur séquençage ainsi que la facilité d'accès aux banques de données du génome ont donné comme résultat une très vaste liste de gènes impliqués dans le cancer. Une telle liste en relation avec les cancers murins est disponible sur le site <http://rtcgd.ncifcrf.gov/> (Akagi *et al.*, 2003).

Des chercheurs comme Suzuki *et al.*, (2003) ont trouvé 152 sites communs d'intégration sur un total de 1336 insertions provirales dans 194 lymphomes primaires de cellules B analysés. D'autres, comme Mikkers *et al.*, (2002) et Lund *et al.*, (2002) ont réussi à identifier 52 CIS's sur 477 RIS's et 54 CIS's sur 747 RIS's respectivement.

Dans le cas du rétrovirus Graffi 1.4, il y a plusieurs sites communs d'intégration qui ont été mis en évidence en utilisant la technique de IPCR. Denicourt *et al.*, (2003), ont rapporté le site commun d'intégration *Gris1* dans 13 % des tumeurs testées. Selon les résultats obtenus par Erkland *et al.*, (2003,2004), concernant le rétrovirus Graffi 1.4, sur 94 sites d'intégration trouvés, 14 ont été rapportés comme sites communs d'intégration dans les 69 tumeurs analysées. Parmi ces sites se trouvent les gènes *YY1*, *p53*, *Notch-1*, *Evi-1*, *NFI* (*Evi-2*), *Lck-1*, *Pim-1*, *HoxA9* (*Evi-6*), *Fli-1* et *N-myc*. Denicourt *et al.*, (1999) ont mis en évidence l'activation des proto-oncogènes *c-myc*, *fli-1*, *Pim-1*, *Spi1/PU.1* suite à l'intégration du virus Graffi dans 20, 10, 3.3 et 3.3% des tumeurs testées respectivement.

### 1.10.1. c-myc et N-myc

La famille myc (Myelocytomatosis Oncogene) d'oncogènes cellulaires est composée de *c-myc*, *N-myc*, *R-myc* et *L-myc*, trois gènes liés qui participent dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Le Gouy *et al.*, 1987). Une expression ectopique de *c-myc* empêche l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux signaux inhibiteurs de croissance et aux stimuli de différenciation. D'ailleurs, une activation de *c-myc* chez les cellules quiescentes est suffisante pour induire l'entrée au cycle cellulaire en absence de facteurs de croissance. Cependant, myc peut aussi induire l'apoptose en absence de facteurs de survivance pour la cellule (Amati *et al.*, 1998). La présence de *c-myc* est essentielle à la progression de la phase G1 du cycle cellulaire à cause de son action de régulation positive sur les CDK et en particulier sur les complexes cycline E/CDK2 (Crews *et al.*, 1982).

Ce gène qui se trouve sur le chromosome 8 chez l'humain et 15 chez la souris code pour une protéine qui contient un domaine «E box myc site», ainsi qu'un domaine hélice-boucle hélice suivi d'un leucine «zipper» capable de former des homo et hétérodimères (Wolff, 1997). L'expression augmentée de ce facteur de transcription est un événement commun durant l'induction de leucémies et lymphomes chez plusieurs espèces, incluant l'humain. Dans la plupart des cas, ces malignités sont causées par des translocations chromosomiques qui dérégulent l'expression de cet oncogène (Dudley, 2002).

### 1.10.2. Notch-1

Les protéines codées par l'oncogène Notch (*Notch Gene Homolog 1*) appartiennent à une famille de récepteurs transmembranaires très conservés qui régulent le destin des cellules durant le développement de plusieurs types cellulaires tant chez les vertébrés que chez les invertébrés (Artavanis *et al.*, 1999). Ce gène, a été identifié aussi comme étant impliqué dans la maintenance de cellules souches, la différenciation et prolifération cellulaire et l'apoptose (Radtke et Raj, 2003).

Le premier homologue chez l'humain du gène Notch a été identifié chez des personnes atteintes de leucémie aiguë lymphoblastique des cellules T. Chez ces patients, la translocation chromosomique t (7;9) (q34;q34.3) entraîne l'expression aberrante d'une protéine tronquée de Notch-1 appelée TAN1 (Translocation-Associated Notch homolog) laquelle, lorsque exprimée dans les cellules progéniteurs hématopoïétiques, cause la leucémie (Radtke *et al.*, 2004)

### 1.10.3. Evi-1

Le gène Evi-1 (Ecotropic viral integration site 1) est un membre de la grande famille de protéines à doigts de zinc. La protéine codée par ce gène possède deux domaines à doigt de zinc et un domaine acide à son extrémité c-terminale (Xi *et al.*, 1997). Bien que la fonction de cette protéine ne soit pas encore très connue, sa localisation cellulaire et sa structure suggèrent qu'elle peut être un régulateur transcriptionnel (Tsichlis et Lazo, 1991).

Evi-1 s'exprime normalement dans les reins et les oocytes en développement, mais il ne s'exprime pas dans les cellules myéloïdes normales. Par conséquent, son potentiel oncogénique dans les cellules myéloïdes peut être dû à une expression aberrante de celui-ci (Morishita *et al.*, 1988). Chez les patients atteints de leucémie myéloblastique aiguë et myélodysplasie (MDS), l'expression de Evi-1 est associée avec des translocations impliquant le chromosome 3q26, le site du gène Evi-1 (Russell *et al.*, 1993).

### 1.10.4. Pim-1

Le gène Pim-1 (Proviral Integration Site 1) code pour une protéine serine/thréonine kinase de 313 a.a. laquelle est normalement exprimée dans le foie fœtal humain entre les jours 16 et 19 de gestation ainsi que dans la vessie et le thymus fœtal et adultes (Tsichlis et Lazo, 1991). Originellement identifié dans des lymphomes malins, Pim-1 est induit par des cytokines dans des lymphocytes où son expression élevée est associée à la prolifération cellulaire et à la suppression de l'apoptose (Borg KE. *et al.*, 1999). Le gène Pim-1 a été reconnu initialement comme un site commun d'intégration, présent dans 50% des lymphomes

de cellules T induits par le virus Mo-MuLV ou MCF. Des insertions virales à proximité de ce gène avaient comme conséquence une surexpression de l'ARN messager et de la protéine sauvage (Jonkers et Berns, 1996).

#### 1.10.5. Fli-1

Le gène Fli-1 (Friend leukemia integration 1) est un membre de la famille des facteurs de transcription ETS, lequel s'avère un régulateur important pendant la différenciation mégacaryocytaire (Eisbacher *et al.*, 2003). Ce gène est ciblé par les rétrovirus CasBrE (Barbeau *et al.*, 1996), Graffi (Denicourt *et al.*, 1999), 10A1 (Ott et Rein, 1994), et Friend (Ben-David *et al.* 1990), (Lee *et al.*, 2003). Fli-1 est normalement exprimé à un niveau élevé chez les cellules et tissus hématopoïétiques, particulièrement le thymus et la vessie où il joue un rôle important (Klemsz *et al.*, 1993). L'induction de la surexpression de Fli-1 dans des cellules hématopoïétiques pluripotentes induit un phénotype mégacaryocytaire et augmente le niveau d'expression des marqueurs mégacaryocytaires (Athanasίου *et al.*, 2000). Les rôles de Fli-1 dans le développement normal des mégacaryocytes ont été supportés par des études portant sur des délétions dans le gène. Les souris possédant la délétion meurent à un stade précoce de l'embryogenèse, exhibent des défauts au niveau de l'hématopoïèse (différenciation anormale des érythrocytes et mégacaryocytes) et ont une tendance à développer des hémorragies (Blair et Athanasίου, 2000).

#### 1.10.6. Spi-1/PU.1

Tout comme Fli-1, Spi-1/PU.1 (SFFV proviral integration-1) appartient aussi à la famille des facteurs de transcription Ets dont l'expression est dérégulée par l'insertion virale des virus SFFV (spleen focus-forming virus) et F-MuLV (Friend murine leukemia virus) dans la plupart des lignées cellulaires érythroleucémiques (Starck *et al.*, 1999).

La surexpression dans les cellules proérythroblastiques d'une forme normale de la protéine codée par Spi-1/PU.1 empêche leur différenciation terminale. Dans le processus de hématopoïèse, Spi-1/PU.1 est un facteur de transcription qui joue un rôle clé dans la

différenciation normale des cellules myéloïdes et des lymphocytes B. D'ailleurs, Spi-1/PU.1 s'attache à l'ARN et interfère avec le processus d'épissage *in vitro* (Hallier *et al.*, 1998).

#### 1.10.7. Yin-Yang 1 (YY1)

Ce gène est un facteur de transcription de la famille des protéines à doigt de zinc GLI-Krüppel, qui contrôle plusieurs processus cellulaires. Une perturbation dans le gène YY1 amène à la létalité embryonnaire à cause des défauts sévères induits dans le développement des tissus embryonnaires et extra-embryonnaires (Austen *et al.*, 1997). Le gène YY1 de 23 kpb comprend 5 exons et code pour une protéine de 44 KDa. Le gène est situé sur le chromosome humain 14q32 et sur le chromosome 12 chez la souris et est très conservé entre ces espèces (95% d'homologie au niveau de l'ARN messager) (Yao *et al.*, 1998). YY1 a été rapporté comme étant un activateur ou un répresseur de la transcription d'une grande variété de gènes viraux et cellulaires. En plus, YY1 régule l'expression des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire en utilisant un mécanisme de contrôle impliquant la protéine du rétinoblastome (Rb) qui libère YY1 dans la phase S du cycle cellulaire (Erkeland *et al.*, 2003).

#### 1.10.8. Gris1

Le site commun d'intégration Gris1 (Graffi integration site 1) a été identifié dans des tumeurs induites par le rétrovirus Graffi 1.4 (Denicourt *et al.*, 2002). Dans cette étude, les intégrations dans Gris1 ont été détectées dans 13% des tumeurs analysées (30 tumeurs au total). Le locus du gène Gris1 se trouve sur le chromosome 6 et est situé à 85 kpb en amont du gène de la cycline D2. L'intégration virale dans le locus Gris1 augmente l'expression du transcrite majeur de 6.5 kb du gène de la cycline D2 et induit l'apparition d'un nouveau transcrite de 1.1 Kb, produit d'un épissage alternatif du même gène, appelé cycline D2 tronquée (Denicourt *et al.*, 2002). Il est connu que la cycline D2 agit comme un proto-oncogène très puissant car elle peut transformer des fibroblastes primaires d'embryon de rat, lorsqu'elle est surexprimée avec un oncogène Ras (Kerkhoff et Ziff, 1995). Aussi, une surexpression de la cycline D2 est souvent observée dans certaines malignités humaines,

comme les lymphomes de cellules-T, les carcinomes testiculaires et les tumeurs ovariennes. Les cyclines D forment des complexes avec les cyclines dépendantes des kinases (Cdk). Ce complexe est important pour la transition du cycle cellulaire de la phase G0 à G1, ainsi que dans la régulation de la croissance cellulaire (Denicourt *et al.*, 2002).

#### **1.10.9. P-53**

Le gène P-53 code pour un suppresseur des tumeurs impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, réparation de l'ADN et mort cellulaire programmée (Schuler 2000). Étant donné que ce gène est engagé dans de nombreux processus cellulaires, il joue un rôle essentiel dans le développement du cancer. On retrouve une haute fréquence de mutations du gène P53 dans divers cancers humains, ce qui démontre que la perte de fonction du P53 est un événement important dans l'apparition des tumeurs (Wallace-Brodeur 1999). Ce gène code pour une phosphoprotéine nucléaire de 375 a.a qui a été détectée initialement dans des cellules transformées par SV40 (Simian vacuolating virus 40) dû à son association stricte avec l'antigène grand T de SV40 ((Tschlis et Lazo, 1991).

#### **1.10.10.HoxA9**

Les protéines homéodomaine HOX exercent des effets importants durant l'embryogenèse et le développement des cellules sanguines. En faisant partie de cette large famille, HoxA9 s'exprime dans des cellules du sang CD34+ et est régulé à la baisse pendant la différenciation (Dorsam *et al.*, 2004). Des études précédentes ont montré que la surexpression de différents gènes Hox chez des cellules normales de la moelle osseuse donne comme résultat la perturbation des patrons de différenciation des cellules souches. La perte de fonction du gène HoxA9 affecte le processus normal d'hématopoïèse (Lawrence *et al.*, 1997). Les souris déficientes pour HoxA9 démontrent une variété de défauts lymphoïdes et myéloïdes (Sauvageau *et al.*, 1994).

### 1.11. Hypothèse

L'intégration de l'ADN proviral se fait au hasard dans le génome de la cellule hôte. Lorsqu'un rétrovirus s'intègre au niveau du même locus dans deux tumeurs indépendantes (CIS), on peut supposer que les gènes qui entourent l'intégration sont impliqués d'une façon quelconque dans le développement de la tumeur. Repérer ces sites en utilisant des techniques comme la PCR-splinkerette pourrait permettre de trouver des nouveaux sites communs d'intégration dans l'ADN des tumeurs de souris infectées par Graffi, pour à long terme mieux comprendre le processus de cancérisation. En fait, la technique de PCR-splinkerette s'est révélée efficace pour au moins deux autres rétrovirus (Virus Murin du Sarcome de Moloney et rétrovirus RadLV/VL3). Donc, nous pensons qu'il serait possible de l'adapter au rétrovirus Graffi. La vaste gamme de leucémies induites par ce virus pourrait permettre d'identifier des gènes impliqués dans tous les types de leucémies, qui seraient dérégulés en lien avec le processus de mutagenèse insertionnelle.

La méthode des splinkerettes permet de travailler plus rapidement et d'analyser un plus grand nombre de sites d'intégration et aussi d'augmenter les chances d'identifier un site commun d'intégration en comparaison avec les autres méthodes employées précédemment. (Mikkers *et al.* 2002).

## CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 La splinkerette

C'est un oligonucléotide double brin de séquence connu lequel, quand ligasé à une séquence d'ADN inconnue, permet son amplification par PCR, sans besoin de circularisation de l'ADN (Hui *et al.*, 1998) (Devon *et al.* 1995). (Figure 4). Elle est formée d'une portion droite qui contient une extrémité 3'cohésive et une portion avec une structure en forme d'épingle à cheveux qui empêche les amplifications non spécifiques qui pourraient se faire pendant la réaction de PCR. La splinkerette fourni aussi une amorce ayant la même séquence que son fragment linéaire, qui servira à amplifier la séquence d'intérêt lors de la PCR.

#### 2.1.1 Amorces de la splinkerette

La séquence des amorces utilisées pour former la splinkerette sont : pour la «splinkerette droite»: 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), d'une longueur de 61 bases et pour la «Splinkerette Hair Pin» la séquence suivante : 5'-GAT CCC ACT AGT GTC GAC ACC AGT CTC TAA TTT TTT TTT TCA AAA AAA-3' d'une longueur de 48 bases (Splinkerette Hair Pin; oligo #589) (BioCorps, Montréal, Canada). Le choix de l'extrémité cohésive en 3' de la splinkerette a été faite en fonction du l'enzyme de restriction utilisée pour faire la digestion initiale de l'ADN génomique. Ainsi, cette extrémité est complémentaire au séquence de restriction de l'enzyme BamH1, étant, le seul endroit de reconnaissance de cet enzyme dans la splinkerette. La portion droite de la splinkerette est dérivée d'une portion du virus d'arthrite et d'encéphalite de chèvre (*Caprine Arthritis-Encephalitis Virus* : CAEV). Ceci a permis de concevoir une splinkerette avec une séquence très spécifique, laquelle partage peu d'homologie avec le génome de *Mus musculus*. Cette portion comporte deux séquences qui peuvent être utilisées comme amorces pendant la réaction de PCR, soit, la séquence 5'- CAT GGG CTA AAG AGG ACT AAT AAC AAG-3', d'une longueur de 28 bases (Amorce CAEV; oligo #627) pour la première PCR et la séquence 5'- GTG GCT GAA TGA GAC TGG TGT CGA C -3', d'une longueur de 25 bases,

(Amorce Splink2; oligo #591), utilisée pour la PCR nichée. Pour associer toutes les parties qui comportent la splinkerette, 150 pmoles du fragment «splinkerette droite» et du fragment «splinkerette hair pin» ont été prises et mises dans un volume total de 100 µl complétées avec de l'eau ultrapure et du tampon M (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Dithiothréitol, 500 mM NaCl) (General Electric Healthcare, Baie d'Urfée, Canada), à une concentration finale de 0.5X. Pour appairer les deux brins des splinkerettes, l'appareil à PCR de la compagnie Eppendorf a été utilisé (Eppendorf Mastercycler Gradient, Eppendorf, Westbury, USA). Le programme a consisté en une première étape de chauffage de 3 minutes à 95°C, suivie par une diminution de température de 1°C à toutes les 15 secondes jusqu'à 22°C (température pièce) (Mikkers *et al.*, 2002). Le stock de splinkerette peut être conservé à -20°C.

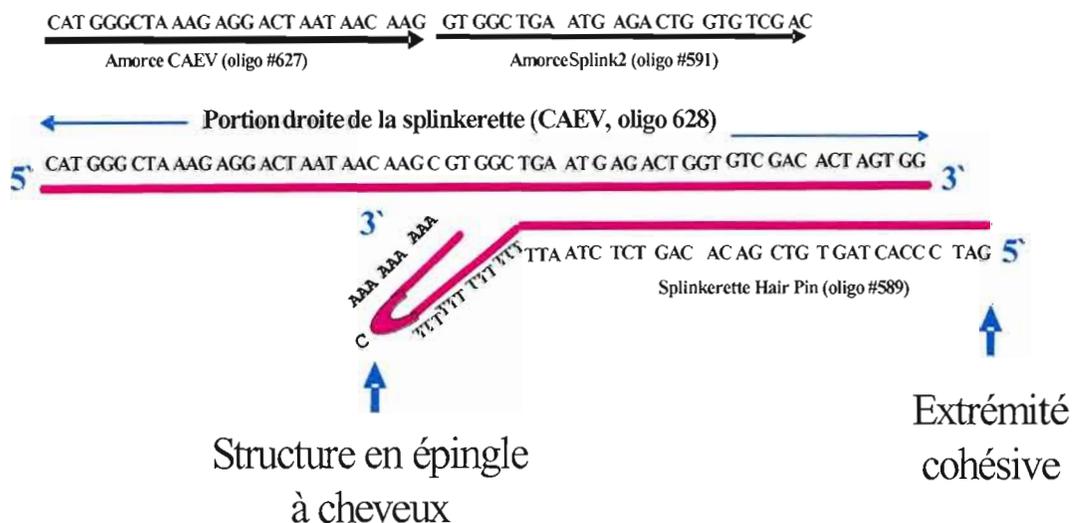


Figure 4. Représentation de la splinkerette utilisée avec ses amorces respectives (Mikkers *et al.*, 2002).

## 2.2 Souris et virus

Des souris nouveaux nées (<24 heures d'âge) BALB/c, NFS et FVB/N ont été chroniquement infectées par injection intra- péritonéale avec 0.1 ml d'une culture du rétrovirus Graffi 1.4 à un titre supérieur à 1.10<sup>6</sup> PFU. Après avoir développé la leucémie, les souris ont été sacrifiées et ensuite les organes hématopoïétiques, comme la rate, le thymus, les ganglions et aussi les cellules de la moelle osseuse et du sang ont été récupérés pour des analyses moléculaires.

## 2.3 Extraction de l'ADN génomique

L'ADN des organes cancéreux fut extrait. L'ADN des souris saines a aussi été extrait. Les cellules ont été homogénéisées dans une solution tampon (10 mM Tris-acetate pH 8.0, 500 mM NaCl et 10mM EDTA). Par la suite, celles-ci ont été lysées avec du SDS 0.5% p/v et traitées avec 100ug de pronase/ml (Boehringer Ingelheim Corp., Ridgefield, USA) et incubées pendant 12 à 16 heures à 37°C. Les protéines présentes dans les cellules lysées ont ensuite été éliminées en faisant deux extractions avec du phénol (Anachemia Science, Lachine, Canada), suivies de deux extractions au chloroforme (Anachemia Science, Lachine, Canada) contenant 4 % v/v d'alcool isoamylique (Anachemia Science, Lachine, Canada). L'ADN a été précipité et récupéré en ajoutant deux volumes d'éthanol (Anachemia Science, Lachine, Canada). Par la suite, l'ADN a été resuspendu dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 8.5 dans un volume de 1 à 4 mL (Sambrook *et al.* 1989)

L'évaluation de la quantité et de la qualité de l'ADN récupéré a été faite à l'aide d'un spectrophotomètre à 260 nm. Le ratio densité optique à 260 nm/densité optique à 280nm a permis de vérifier la pureté de l'ADN. Un ratio supérieur à 1.7 correspond de façon générale à une préparation de bonne qualité d'ADN libre de protéines (Sambrook *et al.*, 1989).

## 2.4 Digestion de l'ADN génomique

L'ADN génomique est digéré une première fois avec l'enzyme BamHI. Cette enzyme crée des extrémités cohésives qui sont complémentaires au bout 3' de la portion droite de la splinkerette. Le site de restriction de BamH I est 5'-G<sup>1</sup>GATCC-3'; (New England Biolabs Inc., Pickering, Canada). Elle produit en moyenne des fragments de 4000 paires bases dans l'ADN génomique de *Mus musculus*. Cet enzyme n'est pas sensible à la méthylation de l'ADN (New England Biolabs Inc.) et pourtant coupe souvent dans l'ADN de la souris ce qui permet d'obtenir des fragments facilement amplifiables par PCR. Dans l'ADN du rétrovirus Graffi 1.4, BamHI coupe cinq fois aux positions 16, 1203, 1789,3067 et 3373pb et ne coupe pas dans le LTR du rétrovirus ce qui est important parce qu'on se sert d'une amorce située dans celui-ci (région U3 du LTR) pour amplifier la séquence d'intérêt. Dix microgrammes d'ADN des tumeurs ont été digérés avec l'enzyme BamHI (New England Biolabs Inc., Pickering, Canada). Dans le cas de l'ADN génomique, 5 unités de cette enzyme par microgramme d'ADN ont été utilisées. La digestion a été faite en utilisant le tampon NEBuffer BamH I à une concentration finale de 1X (10 mM Tris- HCl; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM dithiothréitol; pH 7.9), durant toute la nuit à une température de 37°C. Afin de regarder si la digestion a été complète, une électrophorèse sur gel d'agarose 1% a été faite. Ensuite, l'inactivation de l'enzyme se fait en passant l'échantillon par des colonnes de purification de PCR (*PCR Purification Kit*, Qiagen, Mississauga, Canada) selon le protocole fourni par la compagnie.

## 2.5 Ligation de la splinkerette à l'ADN génomique

Suite à la digestion de l'ADN, la splinkerette a été ligasée. Le bout 5' cohésif de la splinkerette est comme mentionné ci-dessus, complémentaire aux fragments cohésifs créés par la digestion avec Bam HI et donc elle va se ligaser à ces fragments. Les fragments d'intérêt seront ceux qui portent l'ADN génomique à proximité de l'ADN du provirus avec la splinkerette ligasée aux deux bouts.

Afin de ligaser la splinkerette aux fragments d'ADN digérés par Bam HI, 10 moles de splinkerette pour 1 mole d'ADN (Mikkers *et al.*, 2002) ont été utilisées. La formule suivante a été utilisée pour calculer ceci : (in vitro life technologies)

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

Le milieu qui a été utilisé pour faire la ligation contenait de l'ATP à une concentration finale de 2 mM, 10 unités de T4 ligase (New England Biolabs Inc, Pickering, Canada) pour 1 µg d'ADN et du tampon de ligation de bouts cohésifs (50 mM Tris-HCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP; 10 mM dithiothréitol; 25 µg/mL BSA; pH 7.5) à une concentration finale de 1X, le tout a été fait dans le plus petit volume possible. La réaction de ligation a duré 16 heures (o/n) à 16°C (Mikkers *et al.*, 2002). L'arrêt de la réaction a été fait à 65°C pendant 10 minutes (New England Biolabs Inc.).

## 2.6 Précipitation de l'ADN

Une précipitation de l'ADN à l'éthanol a été faite, ce qui a permis d'éliminer les sels. 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M (0.3 M NaOAc final) a été ajouté à l'échantillon ainsi que deux volumes d'éthanol 100% froid (-20°C). Le tout a été mis à -80°C pendant 15 à 20 minutes et centrifugé à 15 000 rpm pendant 15 minutes. Le culot a été précipité dans 200µl d'éthanol 70% et centrifugé 5 minutes à 15 000 rpm. Le culot a été séché à température et a été resuspendu dans 40µl du tampon TE PH 8.0, pour être utilisé dans la réaction de PCR.

## 2.7 Deuxième Digestion de l'ADN Génomique

Pour éviter l'amplification des fragments internes du provirus pendant la réaction de PCR, une deuxième digestion de l'ADN des tumeurs a été faite (New England Biolabs Inc., Pickering, Canada). L'enzyme ClaI fut choisi pour couper entre la splinkerette ligasée dans le rétrovirus à la position 3373 et le LTR en 3'. Cet enzyme a un seul site de coupure à la position 4815pb dans l'ADN du Graffi 1.4 (National Center for Biotechnology Information).

Sa séquence de reconnaissance est AT/CGAT. ClaI possède des caractéristiques importantes; elle ne coupe pas souvent dans l'ADN de la souris car on risque de digérer l'ADN recherché, de même elle ne coupe pas dans les LTR car l'amorce qu'on utilise pour faire la réaction de PCR se trouve dans celui-ci (région U<sub>3</sub> du LTR) et finalement elle ne coupe pas dans la séquence de la splinkerette qui va nous permettre d'amplifier les fragments adjacents à l'intégration rétrovirale. La réaction de ligation a été faite dans un volume final de 50µl, en utilisant le tampon M (Amersham Biosciences, 2002) et 5 unités d'enzyme pour digérer 2µg d'ADN ligasé aux splinkerettes (Mikkers *et al.*, 2002). La réaction a été faite pendant 2 heures à 30°C et arrêtée à 60°C pendant 15 minutes. (Amersham Biosciences, 2002)

## 2.8 Réaction en Chaîne de la Polymérase (PCR)

### 2.8.1 Amorces de la Réaction de PCR

La PCR est effectuée en utilisant l'amorce fourni par la splinkerette, soit l'amorce CAEV (oligo #627) et une des amorces suivantes situées dans la région U<sub>3</sub> du LTR de Graffi 1.4 : oligo #667 (5'-TAG TTC AAA TGA GGC GCA AGG TCG- 3'), oligo #666 (5'-GGT CTC TTG AAA CTG CTG AGG G- 3'), oligo #665 (5'-AGA TAT CCT GTT TGG CCC AAC TGC- 3'), oligo #664 (5'-GAC CTT GAT CTG AAC TTC CCT ATT C- 3'), amorce PU33 (5'-GTT TTT CTG CTC TGA CCT TGA TCT GAA CTT C-3' oligo #663), oligo#198 (5'-CTG CTC ACC ACA GAT ATC CTG TTT GG-3'), amorce L1 (5'-TGC AAG ATG GCG TTA CTG TAG CTAG-3').

Étant donné la similitude de la portion U<sub>3</sub> de Graffi 1.4 avec les séquences endogènes présentes dans le génome, la séquence de chacune de ces amorces a été méticuleusement choisie pour cibler de façon plus spécifique les intégrations exogènes du rétrovirus Graffi 1.4. En comparant les régions U<sub>3</sub> de Graffi 1.4 avec celles de plusieurs séquences endogènes connues provenant des souches NFS, Balb/c et *Mus musculus*, il a été possible de concevoir des amorces spécifiques situées dans les régions d'homologie réduite entre ces séquences.

### 2.8.2 1ère PCR

La réaction de PCR a été faite dans un volume final de 50  $\mu$ l en utilisant le kit de PCR (Taq PCR Core Kit, Qiagen, Mississauga, Canada). Pour l'amplification de 150 ng d'ADN des tumeurs, 2.5 Unités de Taq polymérase sont utilisées par réaction, ainsi que 200  $\mu$ M de dNTP, 10 pmoles de chaque amorce, et du tampon de PCR à une concentration finale de 1X. Finalement une concentration de 4 mM de  $MgCl_2$  est nécessaire.

Les cycles de PCR comprennent :

- 94°C pendant 1 minute.
- 68°C pendant 30 secondes.  
(Fait 2 fois)
- 94°C pendant 15 secondes.
- T°C selon l'amorce utilisée, pendant 30 secondes.
- 72°C pendant 3.5 minutes.  
(Fait 27 fois)
- 94°C pendant 15 secondes.
- T°C selon l'amorce utilisée, pendant 30 secondes.
- 72°C pendant 3,5 minutes.
- 72°C pendant 5 minutes.

Ensuite, cinq microlitres des produits de PCR ont été pris avec 2  $\mu$ l de bleu de chargement (1X final) et 5  $\mu$ l d'eau pour être mis sur un gel 1-1.5% d'agarose avec du tampon TAE 1X. Le standard de poids moléculaire utilisé a été l'ADN du phage Lambda ( $\lambda$ ) digéré par l'enzyme de restriction Hind III (250  $\mu$ g/  $\mu$ l). 500 ng de ce standard ont été utilisés avec 2  $\mu$ l de bleu de chargement et 8  $\mu$ l d'eau pour avoir un volume final de 12  $\mu$ l. Le gel a été soumis à une tension de 100 Volts pendant 40 minutes, coloré au bromure d'éthidium 1X pendant 30 minutes et exposé aux UV pour situer les bandes d'intérêt (Sharp *et al.*, 1973). Finalement, le produit de PCR a été purifié en le passant par des colonnes de purification de

PCR (PCR purification kit, Qiagen, Mississauga, Canada), en suivant le protocole fourni par la compagnie.

### **2.8.3 PCR nichée**

Pour amplifier d'une façon plus spécifique les fragments d'intérêt, une deuxième PCR ou PCR nichée a été faite. Cette PCR a été accomplie en prélevant 2µl du produit de la première PCR. Les étapes du cycle d'amplification de la première PCR ont été conservées pour celle-ci aussi. Les amorces utilisées furent: l'amorce de la splinkerette (CAEV oligo #627), et une des amorces situées dans la région U3 de Graffi choisie selon l'amorce utilisée pour la première PCR, mais toujours en aval de celle-ci. Suite à la PCR nichée, les produits sont vérifiés sur un gel d'agarose 1% pour leur élution postérieure. Un résumé des principales étapes de la méthode de PCR-splinkerette est montré dans l'annexe J.

## **2.9 Analyse par Southern Blot des Sites d'Insertion Rétroviraux**

### **2.9.1 Transfert de l'ADN sur une Membrane de Nylon**

Le protocole utilisé est celui du transfert d'ADN cloné dans une solution de NaOH 0.4 M. Deux feuilles de papier Whatman ont été placées dans un bac de NaOH 0.4 M. Le gel a été déposé par-dessus les deux feuilles et une membrane de nylon (Fisher Scientific Co.) a été mise sur le gel. Trois feuilles de papier Whatman ont été déposées sur la membrane et le montage a été recouvert de tampon de transfert et laissé toute la nuit. La membrane a été séchée et est exposée aux UV pendant 3 minutes afin d'y fixer l'ADN (Sambrook et Russell, 2001).

### **2.9.2 Sonde Radioactive**

La sonde utilisée pour l'hybridation est dérivée de la portion U3 du LTR rétroviral du Graffi 1.2. Deux microlitres (20 ng) de la sonde U3 ont été pris et dénaturés à 100°C pendant 5 minutes. Par la suite, 30 µl d'un pool d'oligonucléotides (tampon de polymérisation : 0.25

mM dCTP, dGTP et dTTP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 20 mM Tris-HCl pH 7.5 et 350 µg/ml d'oligohexamères) (Pharmacia, Canada), 20µCi (2µl) de phosphore radiomarqué (α-32 d-ATP) (Amersham, Canada) et une unité du fragment Klenow de l'ADN polymérase I (Pharmacia, Canada) ont été ajoutés à l'ADN dénaturé. L'ADN a été précipité après une incubation de 15 minutes à 37°C à l'aide de 1µg/ml d'ARN<sub>i</sub>, 300 mM d'acétate de sodium et deux volumes d'éthanol 100% froid (-20°C). Le mélange a été mis sur la glace sèche pendant 15 minutes et centrifugé à 13.000 r.p.m. pendant 15 minutes. Le culot a été resuspendu dans 100µl d'eau.

### 2.9.3 Hybridation de la Sonde

La composition du tampon d'hybridation utilisé pour l'ADN cloné est 5X SSC, 0.5%SDS, 5X Denhardt's (Denhardt, 1996), 100µl/ml d'ADN de sperme de saumon. La membrane a été incubée dans le tampon pendant une heure à 65°C. Ensuite le tampon a été remplacé par du tampon frais auquel la sonde a été ajoutée. L'hybridation avec la sonde a été faite toute la nuit (O/N) à 65°C. Le lendemain, le lavage de la sonde est nécessaire pour éliminer l'excès de sonde non spécifique. Un premier lavage avec une solution 2X SSC a été fait pendant 15 minutes à 42°C. Si ce n'est pas suffisant pour diminuer le compte radioactif en dessous de 200 coups par seconde (cps), un dernier lavage de 15 minutes à 1 heure est fait dans une solution de 0.1X SSC- 0.1X SDS à 65°C. L'exposition de la membrane a été fait à l'aide d'un écran à PhosphorImager (Kodak) entre 20 minutes et toute la nuit selon le compte de radioactivité. La radioactivité a été éliminée de la membrane en submergeant celle-ci dans une solution bouillante de 0.1% SDS (Sambrook *et al.*, 1989.).

## 2.10 Isolement des Sites d'Intégration Proviraux

### 2.10.1 Éluion des Fragments Amplifiés par PCR

Après avoir vérifié les produits de la deuxième PCR, plusieurs tubes (5 à 10) sont refaits, pour augmenter la concentration de l'ADN pour son clonage. Ces tubes ont été mis ensemble et ont été migrés sur un gel de 1.5% d'agarose, toute la nuit à 40 volts. Le gel est

coloré au bromure d'éthidium pendant 30 minutes et ensuite décoloré pendant 10 minutes suivi d'une exposition aux rayons UV. Un marqueur fait à partir de l'ADN du phage  $\lambda$  (Lambda) digéré par HindIII ainsi qu'un de 100 pb (General Electric Healthcare, Baie d'Urfée, Canada) (1  $\mu$ g de chaque environ), sont mis également sur le gel. Les fragments d'ADN ont été élués du gel en faisant beaucoup d'attention de ne pas contaminer les bandes entre elles. L'éluion de l'ADN a été fait à l'aide d'un kit d'éluion (Qiaex II Gel Extraction Kit, Qiagen, Mississauga, Canada). Les bandes qui ont été éluées sont soumises à une électrophorèse sur un gel 1.5% d'agarose pour déterminer leur concentration et vérifier leur correct poids moléculaire, en les comparant avec le marqueur (250ng, 500 ng et 750 ng) du phage  $\lambda$  (Lambda) digéré par HindIII.

### **2.10.2 Clonage des fragments amplifiés dans le vecteur pDrive**

Une fois que la concentration et la taille des fragments ont été déterminées, ceux-ci sont tous clonés dans le vecteur pDrive (Annexe M) en suivant le protocole fourni par la compagnie (Qiagen PCR Cloning Kit, Qiagen, Mississauga, Canada). La ligation se fait à 16°C pendant 16 heures.

### **2.10.3 Transformation bactérienne des amplicons**

Les fragments ligés dans le vecteur pDrive (Annexe K) ont été transformés dans des bactéries compétentes DH5 $\alpha$  comme suit : les bactéries compétentes DH5 $\alpha$  ont été décongelées graduellement en les laissant 15 minutes sur glace, ensuite, 100  $\mu$ L de bactéries compétentes sont ajoutés au mélange précédant de ligation. Le tout est mis à 30 secondes à 42°C ou 5 minutes à 37°C (choc thermique) et postérieurement remis sur la glace pendant 5 minutes. Par la suite, 400  $\mu$ L de L-Broth ont été ajoutés et le milieu de réaction a été mis en croissance pendant 30 minutes à 37°C. Différentes dilutions de ces bactéries ont été étalées sur pétris contenant du X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside; Roche, Laval, Canada) à 40  $\mu$ g/mL final et de l'ampicilline à une concentration finale de 100  $\mu$ g/mL (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada), pour ensuite être incubés pendant 16 heures à 37°C.

#### 2.10.4 Mini-Extraction des Fragments Clonés dans pDrive (Minipreps)

Des colonies blanches (positives) et deux colonies bleues (négatives) ont été mises en culture avec 2ml du milieu LB+ ampicilline (100 µg/mL) toute la nuit à 37°C. Ensuite, une extraction de l'ADN plasmidique a été faite en suivant les indications données par le protocole fourni par la compagnie (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Mississauga, Canada). Pour vérifier la présence des inserts, les échantillons ont été digérés avec l'enzyme EcoRI (New England Biolabs Inc., Pickering, Canada) pendant 1 heure à 37°C. Le mélange de réaction contenait, 1µL des minipreps, le tampon EcoR I (NEBuffer EcoR I : 100 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.025% Triton) à une concentration finale de 1X et 2 unités/µg de l'enzyme EcoRI, le tout dans un volume total de 30 µL. Ce mélange a été migré sur un gel d'agarose 1% et la bonne taille des inserts a été déterminée à l'aide des marqueurs de poids moléculaire de 100 et 1000pb.

#### 2.10.5 Séquençage des Clones Positifs

Les clones qui contiennent les fragments d'intérêt sont ultérieurement envoyés au séquençage (Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill, Montréal). Le séquençage des fragments a été fait en utilisant les amorces Sp6 et T7, propres du vecteur pDrive.

#### 2.10.6 Alignement des Séquences

Après avoir obtenu la séquence des clones positifs, les bouts appartenant au vecteur, splinkerette et portion U3 du rétrovirus Graffi 1.4 ont été enlevés de celle-ci. Le fragment d'ADN restant a été criblé contre la banque de données du génome de *Mus musculus*, Ensembl (<http://www.ensembl.org>). On peut considérer qu'on a trouvé un nouveau site commun d'intégration si l'on amplifie la même séquence d'ADN génomique au moins deux fois dans des tumeurs d'origine différente et que cette séquence n'est pas répertoriée comme étant un site commun d'intégration déjà connu dans la banque de données *Retroviral Tagged Cancer Gene Database*. (Akagi *et al.* 2004). (<http://www.rtcgd.ncifcrf.gov>)

### **2.11 Vérification des Possibles Sites Communs d'Intégration**

Pour vérifier si le rétrovirus Graffi 1.4 s'est intégré à proximité de l'ADN cellulaire des tumeurs impliquées dans le CIS, une PCR en utilisant une amorce spécifique à l'ADN cellulaire des tumeurs et une amorce dans la région U3 de Graffi a été effectuée. Cette PCR permet de vérifier l'existence d'un possible nouveau site commun d'intégration du rétrovirus Graffi dans les tumeurs testées.

## CHAPITRE III. RÉSULTATS

Les résultats qui seront montrés ensuite résument les étapes les plus importantes qui ont été réalisées afin de bien cibler les sites d'intégration rétrovirale du rétrovirus Graffi 1.4 chez les souches de souris NFS, FVB/n et Balb/c.

### 3.1 Choix d'Amorces

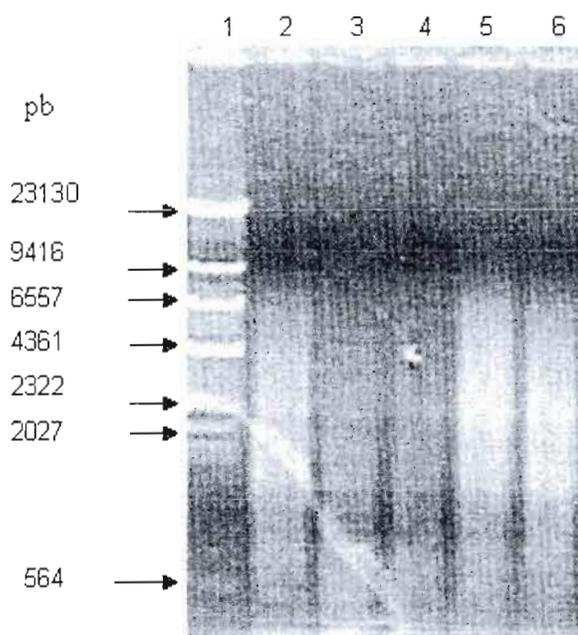
```
1  aatgaaagac cccaccataa ggcttagcaa gctagctaca gtaacgccat cttgcaagrc
61  ctggaaaaat acaggactga gaatagggaa gttcagatca aggtcaagc agaaaaaac
121 cteragttgg gcaaaaacag abalcttgg tgagcagttt cgggacccgg ccggggggca
181 agaacagatg gtccccagat atggpctaac cctcagcagt ttaagagac cealcagatg
241 tttccaggtt gccccaaaga cctgaaacga ccttgogoct ctttgaact aaccaatcag
301 ccgcttctc gcttctgttc gogogcttct gctccccgag ctctataaaa gaggcccaag
361 aacccttact cggcgcgcca gtctccgat agactgtgtc gccccgggtac cgttctacta
421 taaagcctct tgctgtttgc atccgaatcg tggctcagct ggtccttgag agggctctct
481 cagattgatt gactgcccac ctgggggtc ttcatt
```

**Figure 5. Représentation des régions à l'intérieur de la portion U3 de Graffi 1.4, où ont été placées les amorces utilisées pour amplifier les intégrations rétrovirales.** Surlignée en bleu : emplacement de l'oligo 664, surlignée en rouge : emplacement des oligos 663, 665 et 198, surlignée en mauve : emplacement de l'oligo 666, surlignée en vert: emplacement de l'oligo 667. Caractères en noir : portion U3 du LTR de Graffi 1.4, Caractères en bleu : portion R du LTR de Graffi 1.4, Caractères en jaune : portion U5 du LTR de Graffi 1.4.

La figure 5 représente le LTR du rétrovirus Graffi 1.4. Nous avons surligné les différentes régions utilisées comme amorces pour amplifier les sites communs d'intégration selon la technique de PCR-splinkerette. Ces dernières sont situées dans la portion U3 du LTR de Graffi 1.4. Ces régions ont été choisies après plusieurs analyses d'alignements de séquences entre la portion U3 de Graffi 1.4 et différentes séquences de rétrovirus endogènes des souches NFS, Balb/c et *Mus musculus* pour minimiser les réactions non spécifiques.

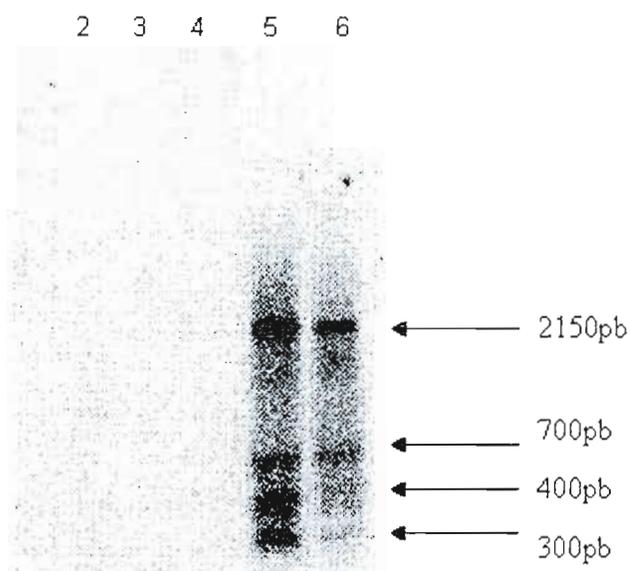
### 3.2 Mise au Point de la Technique

#### 3.2.1 Comparaison du Patron des Fragments Amplifiés par PCR avec l'Amorce 666, pour l'ADN Tumoral vs non Tumoral Provenant des Souches de Souris FVB/n, NFS, et Balb/c.



**Figure 6. Gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium illustrant les résultats du test de spécificité de l'amorce 666 pour les fragments exogènes.** Différents tests ont été réalisés en comparant le patron d'amplification de l'amorce 666 sur l'ADN tumoral (tumeur 30.8 provenant de la souche FVB/n) et non tumoral provenant des souches de souris FVB/N, NFS et Balb/c. Puits 1 :  $\lambda$ /Hind III, puits 2 : ADN provenant de la souche FVB/n, puit 3 : ADN provenant de la souche NFS, puit 4 : ADN provenant de la souche Balb/c, puit 5 et 6 : première PCR ( $T= 59$  et  $56.2^{\circ}\text{C}$ , respectivement) faite sur l'ADN de la tumeur 30.8. La réaction de PCR à été réalisée en utilisant les amorces, 666 (portion U3 du Graffi 1.4) et 627 (fournie par la splinkerette).

La figure 6 illustre les fragments amplifiés par la méthode de PCR-splinkerette pour la tumeur 30.8 et permet de les comparer avec ceux présents chez les souches FVB/n, NFS et Balb/c, utilisées dans ce projet. Il n'est pas possible d'observer des bandes claires durant cette première PCR : seules des traînées qui varient d'intensité indiquent que l'amorce 666 s'apparie de façon plus spécifique à l'ADN provenant de la souche FVB/n que à celui provenant des souches NFS et Balb/c. Cette amorce, amplifie aussi l'ADN de la tumeur 30.8. Cette expérience a été faite aussi pour les amorces : L1, 667, 198, 663, 664, 665 (résultats non montrés).



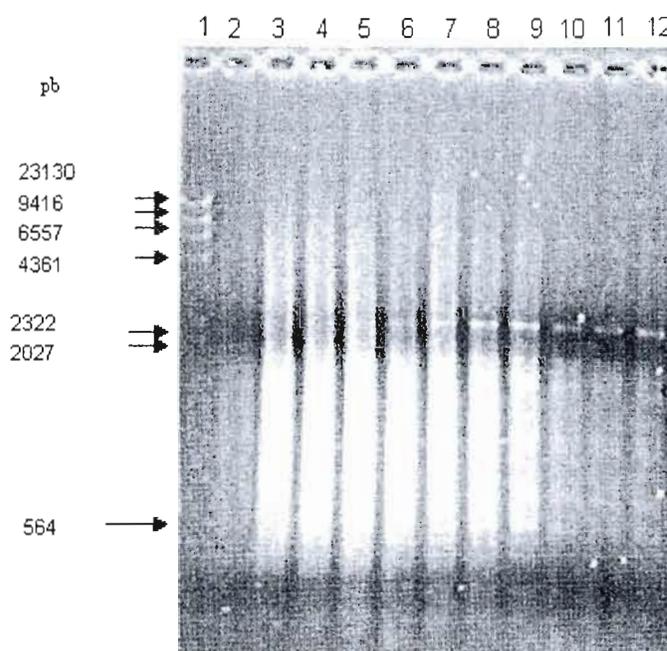
**Figure 7. Hybridation Southern du gel de la figure 6.** L'hybridation de type Southern a été faite à l'aide d'une sonde dérivée de la portion U3 de Graffi 1.4. Puit 2 : ADN provenant de la souche FVB/n, puit 3 : ADN provenant de la souche NFS, puit 4 : ADN provenant de la souche Balb/c, puit 5 et 6 : première PCR (T= 59 et 56.2°C, respectivement) faite sur l'ADN de la tumeur 30.8.

La figure 7 permet d'observer que l'amorce 666 cible de façon spécifique les intégrations exogènes du rétrovirus Graffi 1.4 et non les fragments endogènes déjà présents dans l'ADN non tumoral des souches FVB/N, NFS et Balb/c utilisées dans ce projet. Les

traînés amplifiées durant la première PCR pour les souches FVB/N, NFS et Balb/c, n'ont donné aucun résultat lorsqu'ils ont été hybridés avec une sonde spécifique à la région U3 du rétrovirus. Cette expérience a été réalisée aussi pour les amorces : L1, 667, 198, 663, 664, 665 (résultats non montrés).

### 3.2.2 Détermination de la température optimale d'appariement (Gradients de température)

#### 3.2.2.1 Première PCR

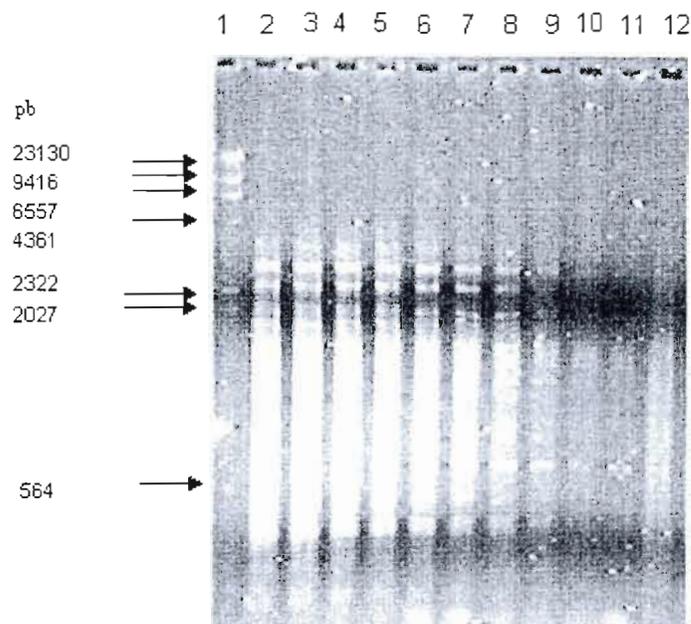


**Figure 8. Gradient de température optimale d'appariement fait sur une première PCR.**

Gel d'agarose 1%, coloré au bromure d'éthidium présentant un gradient de température d'appariement réalisé sur une première PCR, en utilisant l'ADN de la tumeur 30.8 provenant de la souche FVB/n, après avoir appliqué la méthode des splinkerettes. La première PCR a été effectuée en utilisant l'amorce #664 (dans la portion U3) ainsi que la #627 (fourni par la splinkerette). Le gradient sur cette PCR est de 8°C autour d'une température de 57.3°C (donnée par BioCorps, Montréal, Canada). Les amorces utilisées pour cette expérience ont été

la #667 (dans la portion U3) et #627 (fourni par la splinkerette). Puits 1 :  $\lambda$ Hind III, puits 2 :49.4°C, puits 3 :49.9°C, puits 4 :51.1°C, puits 5 :52.8°C, puits 6 :54.7°C, puits 7 :56.9°C, puits 8 :59.0°C, puits 9 :61.1°C, puits10 :63.0°C, puits 11 :64.5°C, puits 12 : 65.5°C.

### 3.2.2.2 PCR nichée



**Figure 9. Gradient de température optimale d'appariement fait sur une PCR nichée.** Gel d'agarose 1.5%, coloré au bromure d'éthidium présentant un gradient de température d'appariement réalisé sur une PCR nichée, en utilisant l'ADN de la tumeur 30.8 provenant de la souche FVB/n, après avoir appliqué la méthode des splinkerettes. Le gradient est de 5°C autour de 56.6°C (donnée par BioCorps, Montréal, Canada). Les amorces utilisées pour cette PCR ont été la #666 (dans la portion U3) et #627 (fourni par la splinkerette). Puits 1 :  $\lambda$ Hind III, puits 2 :51.7°C, puits 3 :52.0°C, puits 4 :52.8°C, puits 5 :53.8°C, puits 6 :55.0°C, puits 7 :56.3°C, puits 8 :57.7°C, puits 9 :59.0°C, puits10 :60.2°C, puits 11 :61.2°C, puits 12 : 61.8°C

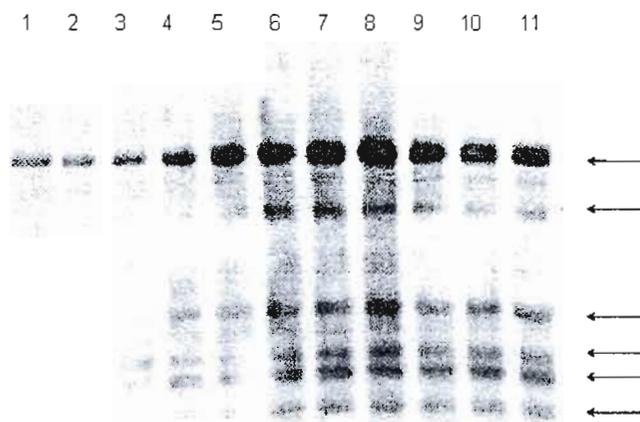
Les figures 8 et 9 montrent les résultats des gradients de température d'appariement faits (sur une première PCR et PCR nichée), en utilisant la tumeur 30.8, après avoir effectué la technique des splinkerettes. La température la plus basse est à gauche. Elle monte

progressivement de gauche à droite pour être la plus élevée à l'extrême droite. Selon ces résultats, la meilleure température d'appariement pour l'oligo 667 (portion U3 du Graffi 1.4) et l'oligo 627 (fourni par la splinkerette) utilisées pour la première PCR se trouve entre 63 et 65.5°C. Une grande traînée est observée pour les puits 2-8, ce qui empêche une visualisation claire des bandes. Celle-ci diminue par la suite permettant de mieux repérer les fragments. Pour le puits 1, la réaction de PCR n'a pas bien marché.

En ce qui concerne la PCR nichée, la meilleure température d'appariement pour l'amorce 666 (portion U3 du Graffi 1.4) et l'amorce 627 (fourni par la splinkerette) se trouve à 56.3°C. La qualité de l'amplification de cette PCR diminue à partir de cette température pour être pratiquement nulle vers la température de 61.8°C. Ces manipulations ont été accomplies aussi pour les amorces L1, 198, 663, 664, 665 (résultats non montrés).

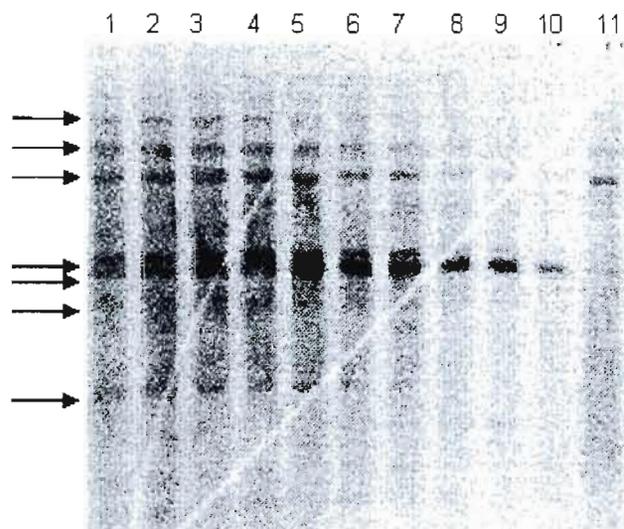
### 3.2.3 Hybridation des fragments amplifiés par la méthode de PCR-splinkerette

#### 3.2.3.1 Hybridation Southern première PCR



**Figure 10. Hybridation Southern du gradient de température d'appariement présenté à la figure 8.** Cette hybridation a été faite à l'aide d'une sonde dérivée de la portion U3 de Graffi 1.4. Puits 1 :49.4°C, puits 2 :49.9°C, puits 3 :51.1°C, puits 4 :52.8°C, puits 5 :54.7°C, puits 6 :56.9°C, puits 7 :59.0°C, puits 8 : 61.1°C, puits 9: 63.0°C, puits10 :64.5°C, puits 11 :65.5°C.

### 3.2.3.2 Hybridation Southern PCR nichée

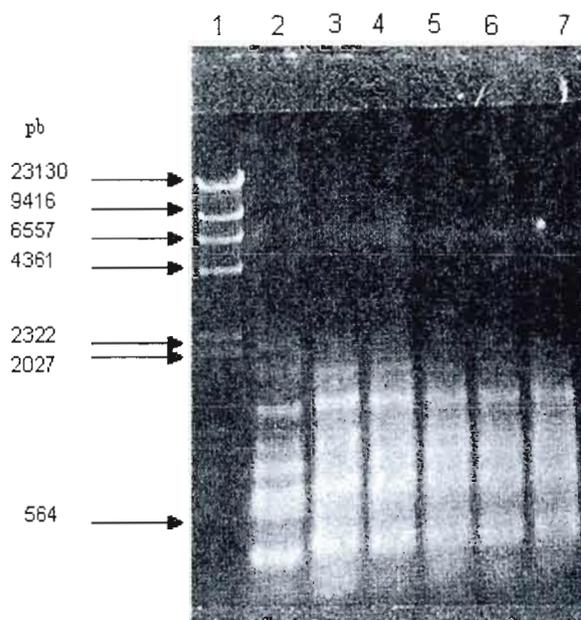


**Figure 11. Hybridation Southern du gradient de température d'appariement présenté à la figure 9.** Cette hybridation a été faite à l'aide d'une sonde dérivée de la portion U3 de Graffi 1.4. Puits 1 :51.7°C, puits 2 :52.0°C, puits 3 :52.8°C, puits 4 :53.8°C, puits 5 :55.0°C, puits 6 :56.3°C, puits 7 :57.7°C, puits 8 :59.0°C, puits 9 :60.2°C, puits 10 :61.2°C, puits 11 : 61.8°C

Les figures 10 et 11 permettent d'observer l'hybridation Southern des fragments d'ADN cellulaire de la tumeur 30.8 qui flanquent l'intégration du rétrovirus Graffi 1.4. Cette hybridation permet de bien percevoir les bandes les plus spécifiques, amplifiées durant la première PCR et confirme les résultats obtenus pour la température d'appariement.

Les fragments amplifiés pendant la première PCR sont difficilement visualisés jusqu'à une température de 54.7°C, mais apparaissent nettement en utilisant de températures qui varient entre 63 et 65.5°C. Dans le cas de la deuxième PCR, les fragments sont clairement repérés entre 56.3 et 59°C.

### 3.2.4 Ajustement de la Concentration de $MgCl_2$



**Figure 12. Résultats du gradient de  $MgCl_2$  pour une deuxième PCR faite suite au protocole de la PCR-splinkerette.** Il s'agit de l'ADN de la tumeur 40X, provenant de la souche de souris NFS. Puits 1 :  $\lambda$ /Hind III, puits 2 : 2.0 mM  $MgCl_2$ , puits 3 : 2.5 mM  $MgCl_2$ , puits 4 : 3.0 mM  $MgCl_2$ , puits 5 : 3.5 mM  $MgCl_2$ , puits 6 : 4.0 mM  $MgCl_2$ , puits 7 : 4.5 mM  $MgCl_2$ .

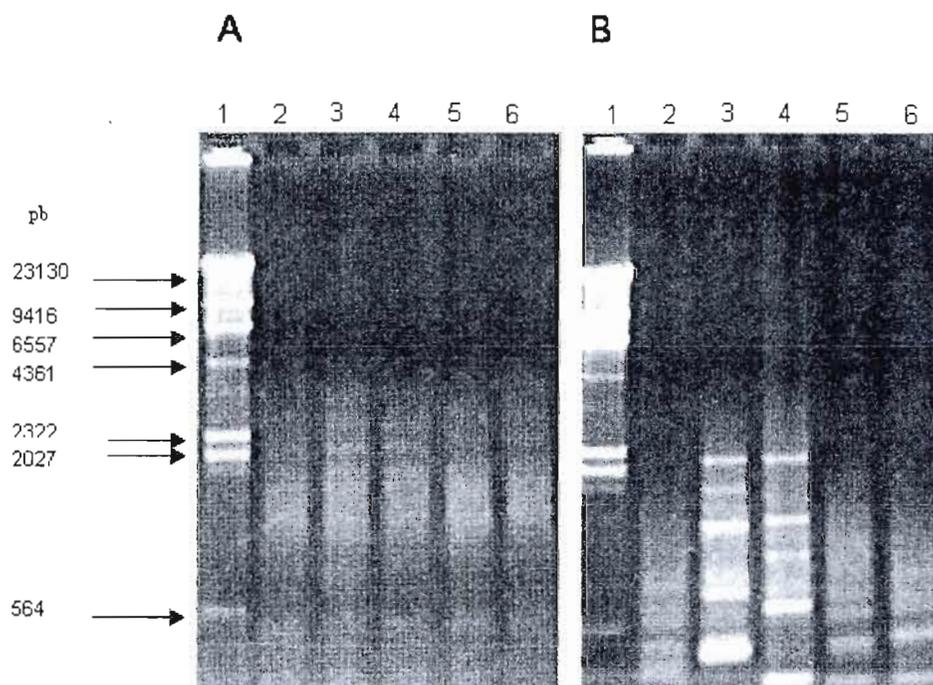
La quantité de  $MgCl_2$  optimale pour la réaction de PCR a été aussi un facteur à mettre au point car il est démontré qu'une concentration incorrecte de magnésium peut réduire ou empêcher complètement l'amplification du produit de PCR. Des gradients de  $MgCl_2$  ont été faits pour augmenter le rendement de la réaction de PCR.

La figure 12, montre l'effet de la concentration de  $MgCl_2$  sur l'efficacité de la PCR. Le but de cette expérience a été de choisir une concentration optimale de  $MgCl_2$  pour réduire le bruit de fond des fragments amplifiés par PCR et de cette façon arriver à mieux cloner les

fragments par la suite. Il est possible de constater que la meilleure efficacité se trouve à une concentration de 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>.

### 3.3 Isolement des sites d'intégration rétroviraux

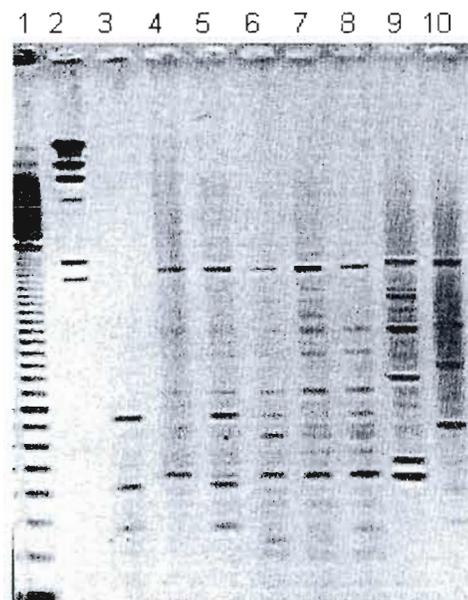
Après avoir mis au point tout les variables mentionné ci-dessous, il a été possible d'obtenir des PCR qui exhibent d'une manière claire toutes les sites d'intégration du rétrovirus Graffi 1.4 chez les différentes souches de souris.



**Figure 13.** Electrophorèse sur gel d'agarose 1%, comparant une première (A) et une deuxième PCR (B), faites sur l'ADN des tumeurs 36.2, 36.3 et 1.3, après avoir employé la méthode de PCR splinkerette. La première PCR a été effectuée avec les amorces #666 (dans la portion U3) et #627 (fourni par la splinkerette) et la deuxième PCR avec les amorces #664 (dans la portion U3) et #627. Les ADN génomiques contrôles provenant des souches Balb/c et NFS ont été migrés avec les ADN tumoraux dérivant des mêmes souches, pour comparer le patron d'amplification et de migration des fragments amplifiés par cette

méthode. Puits 1 :  $\lambda$ Hind III, puits 2 : ADN contrôle Balb/c, puits 3 : ADN de la tumeur 36.2, puits 4 : ADN de la tumeur 36.3, puits 5 : ADN contrôle NFS, puits 6 : ADN de la tumeur 1.3.

### 3.3.1 PCR nichées de plusieurs tumeurs



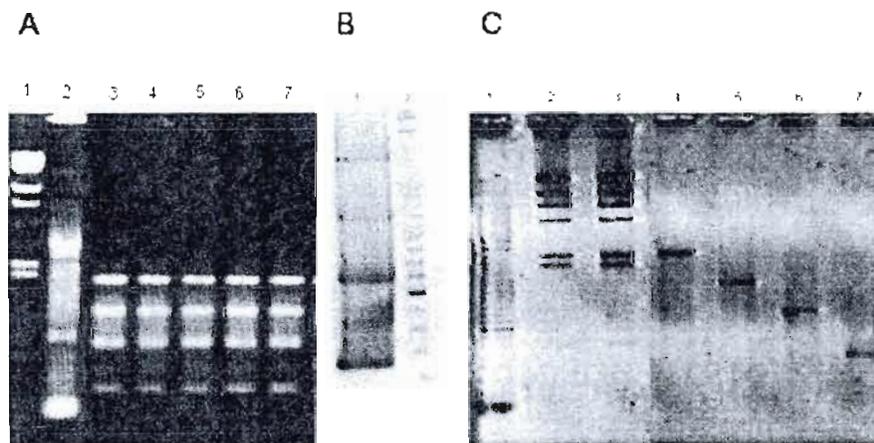
**Figure 14.** Gel d'agarose 1% assemblant plusieurs PCR nichées des différentes tumeurs, après avoir employé le procédé des splinkerettes. La première PCR a été effectuée avec les amorces #666 (dans la portion U3) et #627 (fourni par la splinkerette) et la deuxième PCR avec les amorces #L1 (dans la portion U3) et #627. Puits 1 : marqueur de poids moléculaire de 100pb, puits 2 :  $\lambda$ Hind III, puits 3 : ADN de la tumeur 30.9, puits 4 : ADN de la tumeur 61.3, puits 5 : ADN de la tumeur 39.3, puits 6 : ADN de la tumeur 58.8, puits 7 : ADN de la tumeur 61.5, puit 8 : ADN de la tumeur 67.2, puits 9 : ADN de la tumeur 36.2, puits 10 : ADN de la tumeur 36.3.

Les figures 13 et 14, exhibent les différences de rendement existantes entre les premières et deuxièmes PCR, après avoir amélioré toutes les conditions pouvant influencer

l'efficacité de la PCR. Des bandes bien définies sont aperçues en faisant une PCR nichée sur les produits de la première PCR (figure 13 à droite et figure 14), tout en comparant le patron de migration des ADN tumorales avec celui des ADN contrôles (sans tumeur) des différentes souches. Des résultats réunissant plusieurs PCR nichées des différentes tumeurs sont présentés à la figure 14.

### 3.3.2 Éluion des fragments amplifiés par PCR-splinkerette

La qualité des fragments amplifiés, suite à l'utilisation de la technique des splinkerettes, permet de les éluer, pour leur séquençage ultérieur. La figure 15 illustre toutes les intégrations rétrovirales de la tumeur 61.3, qui ont été éluées. Quatre sur cinq bandes observées en faisant une PCR nichée de la tumeur ont été éluées avec succès. Leur poids moléculaire exact ainsi que leur concentration a été déterminée pour leur clonage.

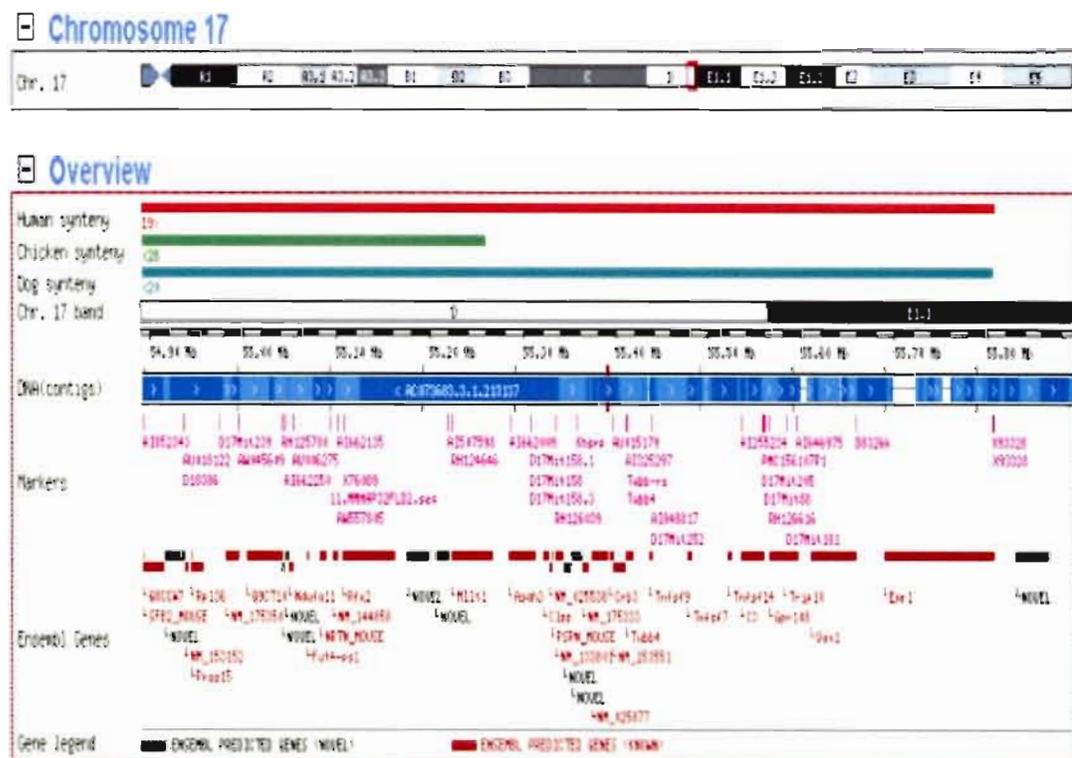


**Figure 15. Éluion des fragments amplifiés par PCR.** A: Electrophorèse d'un gel d'agarose 1.5%, coloré au bromure d'éthidium, illustrant les fragments d'ADN cellulaire de la tumeur 61.3 obtenus qui seront élués. 5 tubes de PCR nichées ont été migrés (puits 3 à 7), à coté des marqueurs de poids moléculaire ADN  $\lambda$ /Hind III, et 100pb (puits 1 et 2, respectivement). B : Gel d'agarose 1.75% migré à 40 volts pendant une nuit et coloré au bromure d'éthidium. Les 5 tubes de PCR constatés à gauche, ont été mis ensemble (puits 1). Puits 2 : marqueur de poids moléculaire de 100pb. C : Gel d'agarose 1.5%, coloré au bromure

d'éthidium, exposant les résultats de l'éluion des bandes amplifiées par la méthode de PCR-splinkerette pour la tumeur 61.3 (puits 4 à 7). Puits 1 : marqueur de poids moléculaire de 100pb, puits 2 et 3 : ADN du phage  $\lambda$  digéré par Hind III (250 et 500ng respectivement).

### 3.4 Criblage des séquences obtenues

Suite à l'éluion et clonage des fragments amplifiés, leur séquence a été criblée contre la banque de données du génome de la souris, Ensembl. La figure 16 présente un modèle de positionnement d'une des séquences.



**Figure 16. Exemple de localisation exacte de la séquence d'intégration Graffi 1.4 sur le chromosome de la souris et détermination des gènes qui sont à proximité. Analyse faite à l'aide du programme Ensembl.** La séquence génomique obtenue après avoir appliqué la méthode de PCR splinkerette est soumise à la banque de données du génome de la souris (Ensembl) pour obtenir des informations concernant sa localisation exacte (chromosome,

segment du chromosome et position exacte de l'intégration en Mb) dans le génome et les gènes qui se trouvent à proximité de la même autant en amont qu'en aval.

### 1.12 Sites d'intégration répertoriés grâce à la technique de PCR-splinkerette

Tumeur	Souche	Type de leucémie	Chromosome	Position	Site	Gènes à proximité
67.2	NFS	B	1	H6	189.46Mb	Ptpn14, Cenpf, Novel, Smyd2
40X	NFS	Mégac	2	A3	23.30Mb	<b>Evil</b> , Mds1
36.2	Balb/c	T	2	A3	26.42 Mb	<b>Notch1</b> , NM_153125, Novel, Inpp5e
36.3	Balb/c	Myel	2	E2	103.61Mb	<b>Lmo2, Pseudogene</b>
39.5	NFS	Mégac	2	E2	103.61Mb	<b>Lmo2, Pseudogene</b>
36.2	Balb/c	T	2	E5	117.19Mb	<b>Ras grp1</b> , NM_026620
58.8	NFS	Mégac	2	H3	165.38Mb	Prkcbp1, Ncoa3, Sulf2, Novel
61.5	NFS	T	4	A2	15.16Mb	<b>Tmem64</b>
67.2	NFS	B	4	A2	15.16Mb	<b>Tmem64</b>
40X	NFS	Mégac	4	A4	33.06Mb	<b>Mdn1, Ankrd6, Novel, casp8ap2</b>
67.2	NFS	B	4	A4	33.06Mb	<b>Mdn1, Ankrd6, Novel, casp8ap2</b>
39.3	NFS	Mégac	4	E1	14.61Mb	<b>Novel, Rex2</b>
40X	NFS	Mégac	4	E1	14.61Mb	<b>Novel, Rex2</b>
40X	NFS	Mégac	4	E2	152.44Mb	<b>Arpm2, Prdm16</b>
36.3	Balb/c	Myel	4	E2	152.44Mb	<b>Arpm2, Prdm16</b>
67.2	NFS	B	5	A3	23.30Mb	Galnt11, Galnt15
36.3	Balb/c	Myel	5	F	118.97Mb	Erp29
67.2	NFS	B	5	F	121.35Mb	My12, Ppp1cc,
67.2	NFS	B	5	G1	138.89Mb	Caln1, A330070ki3Rik
67.2	NFS	B	6	E1	102.74Mb	Cntn3
36.2	Balb/c	T	6	F2	125.38Mb	<b>Grec2f, Grec10, Drp1a, Eno2, Ptpn6, Grec3</b>
30.9	FVB	Mégac	6	F2	125.38Mb	<b>Grec2f, Grec10, Drp1a, Eno2, Ptpn6, Grec3</b>
39.3	NFS	Mégac	6	F2	125.38Mb	<b>Grec2f, Grec10, Drp1a, Eno2, Ptpn6, Grec3</b>

39.5	NFS	Mégac	6	F2	125.38Mb	<b>Grec2f,Grec10,Drp1a,Eno2, Ptpn6,Grec3</b>
40X	NFS	Mégac	6	F2	125.38Mb	<b>Grec2f,Grec10,Drp1a,Eno2, Ptpn6,Grec3</b>
67.2	NFS	B	6	F2	125.38Mb	<b>Grec2f,Grec10,Drp1a,Eno2, Ptpn6,Grec3</b>
40X	NFS	Mégac	7	B1	31.30Mb	Novel,chst8,200023B17Rik
67.2	NFS	B	7	E1	80.31Mb	Olfr301,Olfr303,Olfr304,Olfr299
67.2	NFS	B	7	F2	104.01Mb	Wee1,zfp143
67.2	NFS	B	7	F3	110.29Mb	Nucb2,Pik3c2a
30.8	FVB	Mégac	8	E1	119.92Mb	<b>Gse1,Q9DAA9,Q8C1N6</b>
1.3	NFS	B	8	E1	119.92Mb	<b>Gse1,Q9DAA9,Q8C1N6</b>
39.3	NFS	Mégac	8	E1	119.92Mb	<b>Gse1,Q9DAA9,Q8C1N6</b>
40X	NFS	Mégac	8	E1	119.92Mb	<b>Gse1,Q9DAA9,Q8C1N6</b>
61.5	NFS	T	8	E2	122.54Mb	Spg7,Rpl13,Dpep1,Rps12,Spire 2,Zfp276
61.3	NFS	T	9	B5.2	30.65Mb	Snx19,Adamts15,Novel
40X	NFS	Mégac	9	B	44.16Mb	Cb1,Usp2,Rnf26,Thy1
40X	NFS	Mégac	9	B	41.86Mb	Sor11,Q61977_mouse
67.2	NFS	B	9	F2	110.50Mb	Kif9,Ngp,Novel
67.2	NFS	B	10	A1	8.22 Mb	<b>Pseudogene, Sash 1</b>
36.3	Balb/c	Myel	10	A1	8.22 Mb	<b>Pseudogene, Sash 1</b>
30.8	FVB	Mégac	10	B5.2	69.69Mb	Novel, Q9CV60,Slc16a9
30.8	FVB	Mégac	12	F2	106.49Mb	Bag 5,CKpb, Kns2, NM_177374, NM_026511
61.5	NFS	T	13	A3.1	21.18Mb	<b>Hist 1h2bp,Hist2h4,Hist1h2ah</b>
67.2	NFS	B	13	A3.1	21.18Mb	<b>Hist 1h2bp,Hist2h4,Hist1h2ah</b>
30.8	FVB	Mégac	13	A4	31.29 Mb	Foxc1, Gmcs
1.3	NFS	B	14	B	19.65.Mb	<b>Zfp503, Vdac2,Comtd1, Myst4</b>
39.5	NFS	Mégac	14	B	19.65Mb	<b>Zfp503, Vdac2,Comtd1, Myst4</b>
40X	NFS	Mégac	14	C2	49.40 Mb	<b>NM_010245, D14Ertd500e,Skpb1,Rem2</b>
1.3	NFS	B	14	C2	49.40 Mb	<b>NM_010245, D14Ertd500e,Skpb1,Rem2</b>
30.9	FVB	Mégac	14	C2	49.40 Mb	<b>NM_010245, D14Ertd500e,Skpb1,Rem2</b>

39.3	NFS	Mégac	14	C2	49.40 Mb	NM_010245, D14Ert500e,Skpb1,Rem2
39.5	NFS	Mégac	14	C2	49.40 Mb	NM_010245, D14Ert500e,Skpb1,Rem2
36.2	Balb/c	T	15	D3	62.26Mb	Myc, Pvt1
30.9	FVB	Mégac	15	D3	62.49Mb	Myc, Pvt1
61.5	NFS	T	15	D3	62.05Mb	Myc, Pvt1
67.2	NFS	B	17	B2	32.76Mb	Clic1,Ddah2,Ng23,Msh5,Ly6g6d
30.8	FVB	Mégac	17	B3	34.62 Mb	H2-T23, H2T-10, Q8C475, pseudogene
30.8	FVB	Mégac	17	D	55.274Mb	Gtf2f1, Khsrp,Tnfsf9, Crb3, Tubb4
40X	NFS	Mégac	17	D	55.27Mb	Gtf2f1, Khsrp,Tnfsf9, Crb4, Tubb4
40X	NFS	Mégac	18	B2	30.51Mb	Pik3c3
39.5	NFS	Mégac	19	D2	55.45Mb	Tcf712,Zdhhc6,Vti1a

**Tableau II. Tableau représentant les différentes tumeurs, positions chromosomiques et gènes retrouvés lors de la recherche de sites communs d'intégration du rétrovirus Graffi 1.4 répertoriés par la méthode de splinkerettes.** On peut voir la souche de souris dans laquelle se développe la tumeur, ainsi que le type de leucémie induite. On peut constater également les chromosomes où les rétrovirus se sont intégrés, le segment du chromosome (ex : B5), ainsi que la position exacte en (Mb) de l'intégration. Enfin, les gènes qui se trouvent à proximité, en amont et en aval, du site d'intégration sont indiqués. Les oncogènes déjà connus sont spécifiés en rouge. Les caractères bleus indiquent tous les sites communs d'intégration trouvés dans le cadre de ce projet. Les caractères mauves indiquent toutes les séquences endogènes trouvées.

Le tableau II récapitule tous les sites d'intégration du rétrovirus Graffi 1.4 obtenus suite à l'utilisation de la méthode de PCR splinkerette. Grâce au clonage et séquençage de ces sites, il a été possible de connaître leur position exacte dans le génome de *Mus musculus*, disponible sur le site de criblage Ensemble (<http://www.ensembl.org>). 12 tumeurs ont été analysées par PCR (30.8 et 30.9 dérivent de souris des souches FVB/n, 36.2 et 36.3 de la souche Balb/c, 1.3, 39.3, 39.5, 40X, 61.3, 61.5 et 67.2 proviennent de souris de souche NFS),

ce qui a permis de tirer un total de 63 séquences. Dans ce tableau, le numéro d'identification de la tumeur, la souche de provenance, le type de leucémie induit, ainsi que la localisation exacte du site d'intégration du rétrovirus donnée par le chromosome, la cytot bande et la position en Mb, sont indiqués. Il est aussi possible d'identifier les gènes qui se trouvent à proximité de l'intégration, soit en amont ou en aval, les oncogènes trouvés qui sont déjà connus dans la littérature, sont démarqués avec des caractères rouges et les sites communs d'intégration trouvés dans le cadre de ce projet sont indiqués par les caractères bleus.

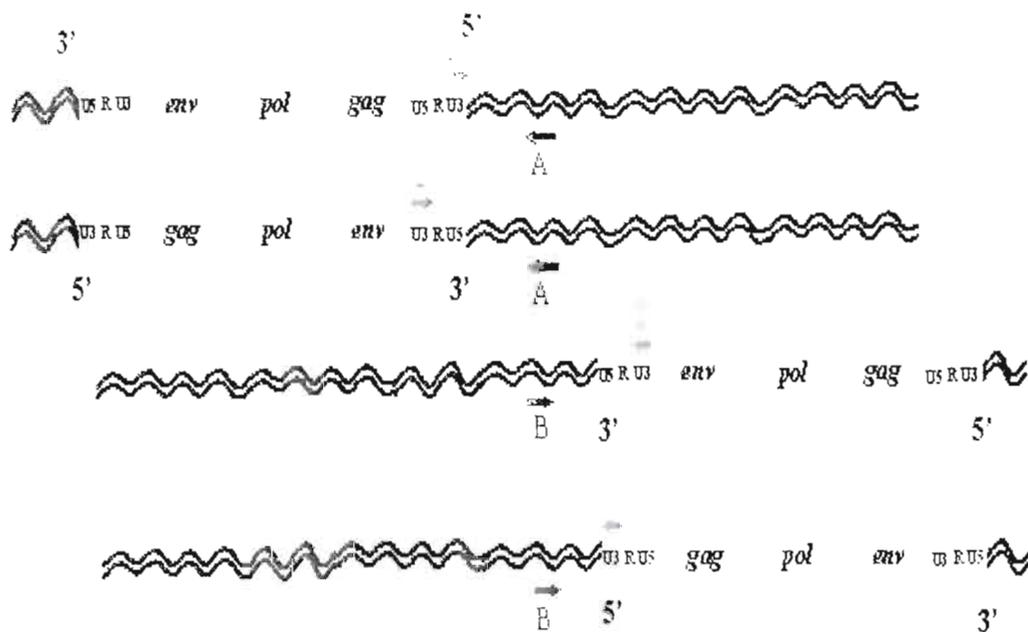
Nb intég.	Chromosome	Position	Site	Gènes à proximité
2	2	E2	103.61 Mb	<b>Lmo2</b> , Pseudogene
2	4	E2	152.44 Mb	<b>Arpm2</b> , Prdm16
6	6	F2	125.38 Mb	<b>Grcc2f</b> , Grcc10, Drp1a, Eno2, <b>Ptprn6</b> , Grcc3
4	8	E1	119.92Mb	<b>Gse1</b> , Q9DAA9, Q8C1N6
3	15	D3	62.26Mb	<b>Myc</b> , Pvt1
1	2	E5	117.19 Mb	<b>Ras gpr1</b> , NM_026620
1	2	A3	23.30Mb	<b>Evi1</b> , Mds1
1	2	A3	26.42 Mb	<b>Notch1</b> , NM_153125, Novel, Inpp5e

**Tableau III : Tableau réunissant les sites communs d'intégration trouvés dans le cadre de ce projet.** Ce tableau résume les sites communs d'intégration trouvés dans ce projet. Il est possible de voir leur position exacte dans le génome de la souris, ainsi que les gènes trouvés à proximité d'après la banque du génome de la souris Ensembl. Les caractères rouges indiquent les oncogènes trouvés qui sont déjà connus dans la littérature.

### 3.6 Vérification des sites communs d'intégration potentiels

L'analyse des séquences données par le programme Ensembl a permis de déterminer la position de l'intégration du rétrovirus par rapport à la séquence cellulaire (intégration du

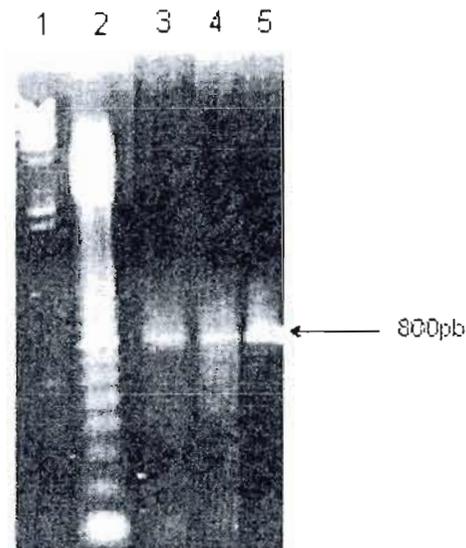
rétrovirus soit en amont ou en aval). Avec cette information, il est possible de vérifier par PCR l'existence d'un site commun d'intégration du rétrovirus Graffi. Les deux amorces utilisées pour ce faire se trouvent dans l'ADN cellulaire de la tumeur et dans la région U3 de Graffi 1.4.



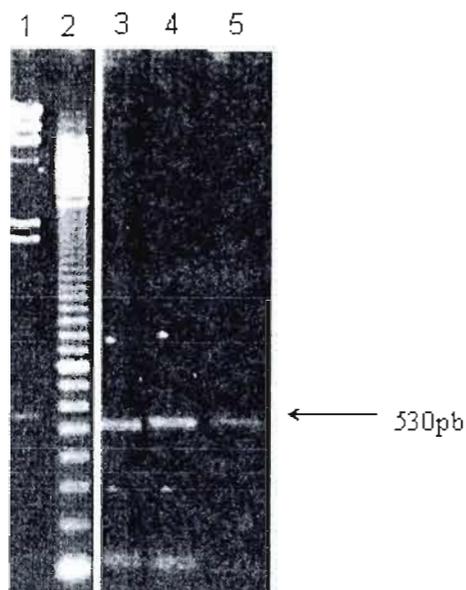
**Figure 17. Représentation des orientations possibles du rétrovirus par rapport à la séquence d'ADN cellulaire.** Numéros en mauve : Positions possibles de l'amorce située dans la région U3 du rétrovirus. Numéros en vert : Positions possibles des amorces situées dans l'ADN cellulaire de la tumeur.

### 3.6.1 Vérification par PCR des sites communs d'intégration potentiels

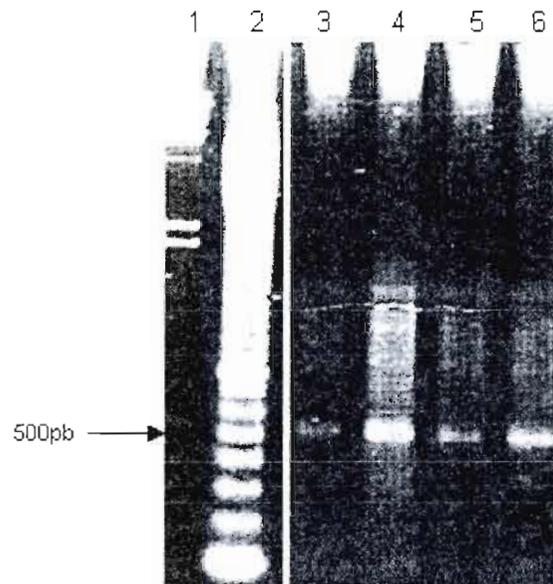
Après avoir choisi les amorces appropriées à l'ADN cellulaire de la tumeur et la portion U3 du rétrovirus Graffi 1.4, des réactions de PCR ont été effectuées afin de vérifier l'existence d'un site commun d'intégration en utilisant comme matrice l'ADN cellulaire des tumeurs impliquées dans l'intégration commun. Les résultats ont été les suivants :



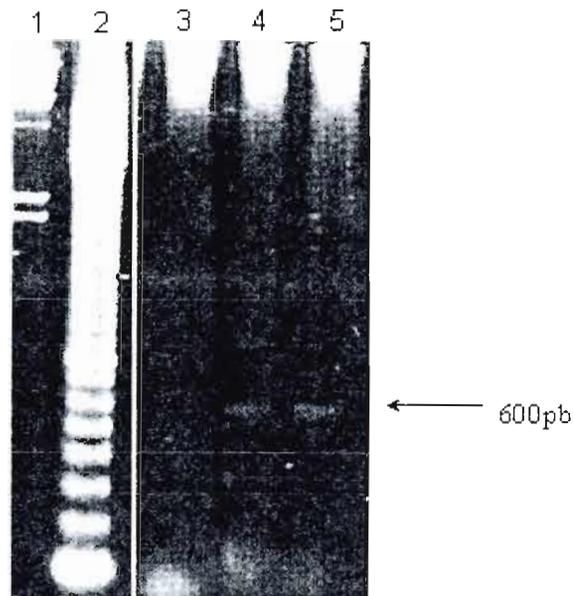
**Figure 18. Résultats de la vérification par PCR du site commun d'intégration potentiel du rétrovirus Graffi dans la région génomique 10B5.2 69.69Mb, impliquant les tumeurs 30.8 et 30.9 provenant de la souche FVB.** Afin de vérifier la présence du rétrovirus Graffi 1.4 dans les ADN génomiques des tumeurs 30.8 et 30.9, une PCR a été réalisée en utilisant une amorce située dans l'ADN génomique adjacent le provirus et une autre située dans la portion U3 du rétrovirus. Les résultats des ADN tumorales 30.8 et 30.9 sont comparés avec l'ADN contrôle non tumorale provenant de la souche de souris dans laquelle se développe la tumeur. Gel d'agarose 1.5% coloré au bromure d'éthidium. Puits 1.  $\lambda$ Hind III, puits 2. Marqueur de poids moléculaire de 100pb, puits 3 : ADN contrôle provenant de la souche FVB, puits 4. ADN de la tumeur 30.9, puits 5. ADN de la tumeur 30.8.



**Figure 19. Résultats de la vérification par PCR du site commun d'intégration potentiel du rétrovirus Grafvi dans la région génomique 14B 19.65Mb, impliquant les tumeurs 1.3 et 39.5 provenant de la souche NFS.** Afin de vérifier la présence du rétrovirus Grafvi 1.4 dans les ADN génomiques des tumeurs 1.3 et 39.5, une PCR a été réalisée en utilisant une amorce située dans l'ADN génomique adjacent le provirus et une autre située dans la portion U3 du rétrovirus. Les résultats des ADN tumorales 1.3 et 39.5 sont comparés avec l'ADN contrôle non tumorale provenant de la souche de souris dans laquelle se développe la tumeur. Gel d'agarose 1%, coloré au bromure d'éthidium. Puits 1.  $\lambda$ Hind III, puits 2. Marqueur de poids moléculaire de 100pb, puits 3 : ADN contrôle provenant de la souche NFS, puits 4. ADN de la tumeur 1.3, puits 5. ADN de la tumeur 39.5.

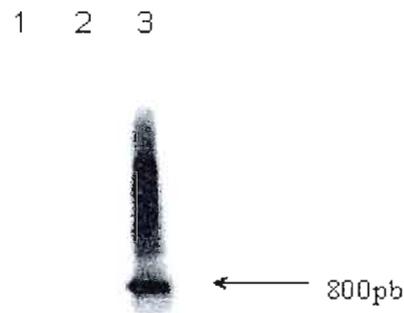


**Figure 20. Résultats de la vérification par PCR du site commun d'intégration potentiel du rétrovirus Graffi dans la région génomique 17D 55.27Mb, impliquant les tumeurs 30.8 et 40X provenant des souches FVB et NFS respectivement.** Afin de vérifier la présence du rétrovirus Graffi 1.4 dans les ADN génomiques des tumeurs 30.8 et 40X, une PCR a été réalisée en utilisant une amorce située dans l'ADN génomique adjacent le provirus et une autre située dans la portion U3 du rétrovirus. Les résultats des ADN tumorales 30.8 et 40X sont comparés avec l'ADN contrôle non tumorale provenant de la souche de souris dans laquelle se développe la tumeur. Gel d'agarose 1%, coloré au bromure d'éthidium. Puits 1.  $\lambda$ /Hind III, puits 2. Marqueur de poids moléculaire de 100pb, puits 3 : ADN contrôle provenant de la souche FVB, puits 4. ADN de la tumeur 30.8, puits 5. ADN contrôle provenant de la souche NFS, puits 6. ADN de la tumeur 40.X.



**Figure 21. Résultats de la vérification par PCR du site commun d'intégration potentiel du rétrovirus Graffi dans la région génomique 4E1 14.61Mb, impliquant les tumeurs 39.3 et 40X provenant de la souche NFS.** Afin de vérifier la présence du rétrovirus Graffi 1.4 dans les ADN génomiques des tumeurs 39.3 et 40.X, une PCR a été réalisée en utilisant une amorce située dans l'ADN génomique adjacent le provirus et une autre située dans la portion U3 du rétrovirus. Les résultats des ADN tumorales 39.3 et 40X sont comparés avec l'ADN contrôle non tumorale provenant de la souche de souris dans laquelle se développe la tumeur. Gel d'agarose 1%, coloré au bromure d'éthidium. Puits 1.  $\lambda$ /Hind III, puits 2. Marqueur de poids moléculaire de 100pb, puits 3 : ADN contrôle provenant de la souche NFS, puits 4. ADN de la tumeur 39.3, puits 5. ADN de la tumeur 40.X.

**3.7 Vérification par hybridation Southern du site d'intégration potentiel trouvé sur le chromosome 10 B5.2.**



**Figure 22.** Hybridation Southern de la PCR présentée à la figure 18. Cette hybridation a été faite à l'aide d'une sonde spécifique dérivée de l'ADN cellulaire des tumeurs 30.8 et 30.9, obtenu par la technique de PCR splinkerette. Une sonde génomique unique dérivée de la séquence de l'ADN génomique adjacent le provirus a été conçue afin de vérifier la véracité du site d'intégration potentiel sur le chromosome 10 B5.2. Les résultats de l'hybridation Southern comparent les ADN tumorales 30.8 et 30.9 avec l'ADN contrôlé non tumorale provenant de la souche de souris dans laquelle se développe la tumeur. Puits 1 : ADN contrôlé provenant de la souche FVB, puits 2. ADN de la tumeur 30.9, puits 3. ADN de la tumeur 30.8.

## CHAPITRE IV. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons utilisé la méthode de PCR-splinkerette pour identifier les séquences flanquant l'intégration du rétrovirus Graffi 1.4. En analysant ces séquences, il est possible d'examiner les gènes situés à proximité et qui pourraient contribuer à l'apparition des leucémies. Étant donné le vaste spectre de leucémies que ce rétrovirus induit, il est un excellent modèle pour étudier les effets que son intégration pourrait avoir dans l'expression des gènes spécifiques de certaines leucémies. Il y a eu plusieurs étapes à mettre au point tout au long de ce projet. Une analyse précise des procédés dont nous avons dû tenir compte pour bien réussir à cibler les sites d'intégration rétroviraux, ainsi que les résultats les plus pertinents obtenus durant la réalisation de ce projet de maîtrise seront donnés dans le texte suivant.

Afin d'appliquer d'une façon efficace la méthode de PCR splinkerette, il faut d'abord s'assurer de la bonne qualité de l'ADN tumoral de départ. Un ADN libre de protéines et en quantité suffisante, garantie que le matériel de base est fiable pour standardiser la technique. La détermination exacte de la concentration de l'ADN génomique tumoral a été un facteur difficile dû à l'inexactitude du spectrophotomètre utilisé.

Comme il a été décrit précédemment dans ce projet, l'amplification des sites d'intégration du rétrovirus Graffi 1.4 par la méthode de PCR splinkerette se fait en utilisant deux amorces spécifiques. Une de celles-ci est fournie par la splinkerette (oligo # 627, CAEV) et l'autre est située dans la région U3 du rétrovirus Graffi. De cette façon, il est possible d'amplifier par PCR l'ADN génomique de la tumeur se trouvant entre l'ADN du virus intégré et la splinkerette. La détermination de l'amorce rétrovirale à utiliser pour amplifier les sites d'intégration *de novo* du rétrovirus Graffi dans les tumeurs, a été un aspect très important pour la réussite de la méthode. En fait, il est connu que le génome murin possède plus de 200 copies de rétrovirus endogènes. Étant donné la similitude entre la région U3 de Graffi 1.4 avec celle des rétrovirus endogènes présents chez la souris, il a été obligatoire de concevoir des amorces spécifiques à la région U3 de Graffi. De cette façon, on était en

mesure d'amplifier les nouvelles intégrations du rétrovirus et non pas celles qui sont déjà présentes dans les séquences endogènes de l'ADN génomique.

Pour ce faire, des tests d'alignement comprenant la région U3 de Graffi vs différentes séquences de rétrovirus endogènes présentes chez les souches NFS, Balb et *mus musculus* (C57BL/6, C57BL/6J, SC-3, C57BL/10), ont été faits. Il n'a pas été possible de trouver dans la littérature des séquences endogènes appartenant à la souche FVB. Cependant, on a pu constater que les séquences des rétrovirus endogènes se ressemblaient entre elles, peu importe la souche. Donc, malgré le fait de ne pas avoir accès aux séquences des rétrovirus endogènes de la souche FVB, il a été possible de concevoir des amorces spécifiques à la région U3 de Graffi 1.4. Ces oligonucléotides sont situés dans 4 régions (figure 5) de la séquence U3 de Graffi, qui partagent une faible homologie avec les rétrovirus endogènes.

Après avoir conçu des amorces spécifiques à la région U3 de Graffi 1.4, nous avons examiné laquelle de ces amorces était la plus susceptible d'amplifier spécifiquement les intégrations exogènes (de novo) du rétrovirus Graffi. En même temps ce test a permis de confirmer les résultats obtenus dans les alignements. La figure 6 illustre les tests faits sur une des amorces. La comparaison du patron d'amplification de l'ADN tumoral vs non tumoral a permis de choisir la meilleure amorce. Cette figure montre les résultats obtenus après une première PCR. Il est difficile de visualiser les fragments amplifiés. En fait, les premières PCR réalisées après avoir utilisé la méthode des splinkerettes ne permettent pas d'apercevoir les fragments amplifiés. Ce n'est qu'en faisant une hybridation Southern qu'on peut tirer des conclusions par rapport à la spécificité de l'amorce.

La figure 7 montre une hybridation Southern faite à l'aide d'une sonde spécifique à la portion U3 de Graffi 1.4. Cette expérience permet de confirmer que l'amorce s'apparie de façon spécifique aux séquences rétrovirales exogènes. Également cette hybridation réaffirme que les amplicons contiennent l'ADN proviral intégré à proximité de l'ADN cellulaire de la tumeur. Les bruits de fond amplifiés à la première PCR pour les ADN contrôles (puits 1, 2 et 3) ne reflètent pas une prédisposition de cette amorce à s'apparier aux séquences endogènes.

Ces tests ont été réalisés pour chacune des amorces conçues dans la région U3 de Graffi (résultats non montrés).

Suite à la vérification de la spécificité des amorces pour les intégrations du rétrovirus Graffi, des tests pour évaluer la meilleure température d'appariement ( $T_m$ ) des amorces rétrovirales et splinkerette (CAEV oligo#627) avec l'ADN génomique de la tumeur ont été faits. Les figures 8 et 9 démontrent les résultats des gradients de température faits sur une première et deuxième PCR splinkerette, respectivement. La détermination de la température d'appariement des amorces avec l'ADN tumoral a été une étape importante à mettre au point pour s'assurer d'utiliser une température optimale, celle à laquelle les amorces vont aller s'apparier spécifiquement à l'ADN du rétrovirus Graffi 1.4. La plus haute température d'appariement qui permettait encore de visualiser clairement les fragments amplifiés a été choisie afin d'augmenter l'astringence de la réaction de PCR et ainsi sa spécificité.

Il est possible de constater que le gradient de température effectué sur la première PCR (figure 8) ne permet pas de bien distinguer les fragments amplifiés. D'autres facteurs qui pourraient influencer le rendement de la réaction de PCR, tels que la concentration de  $MgCl_2$  n'ont pas encore été ajustés à cette étape. Cependant, il est possible de remarquer que l'efficacité de la réaction de PCR augmente jusqu'à atteindre une certaine température pour ensuite diminuer. Dans le cas de la PCR nichée (figure 9), les fragments amplifiés pendant la première PCR sont clairement visibles, même si la concentration de  $MgCl_2$  n'est pas optimisée. Le gradient de température de cette PCR nichée permet de réaffirmer le choix de la température à utiliser pour cibler de façon spécifique les intégrations du rétrovirus Graffi.

La vérification par hybridation Southern des fragments amplifiés par PCR a été un élément clé pour confirmer que ceux-ci contiennent un bout de LTR du rétrovirus Graffi 1.4 et plus précisément sa portion U3. Les figures 10 et 11 exhibent les résultats obtenus après avoir hybridé la première et deuxième PCR splinkerette, respectivement, avec une sonde dérivée de la région U3 du rétrovirus Graffi 1.4. Les fragments qui étaient difficilement visibles durant la première PCR (figure 10) deviennent détectables en les hybridant avec la sonde U3. C'est le même cas pour la deuxième PCR (figure 11). Seulement quelques unes

des bandes amplifiées hybrident avec la sonde, ce qui suggère que d'autres fragments qui ne sont pas spécifiques aux intégrations du rétrovirus Graffi 1.4 ont été amplifiés pendant la réaction de PCR. Cette hybridation, permet de cibler de façon spécifique les fragments d'intérêt. Également, des nouveaux fragments qui n'apparaissent pas à la première PCR sont détectés pendant la PCR nichée et vice-versa. Cette différence dans le patron de migration entre les deux PCR est difficile à saisir puisque sur gel d'agarose la première PCR ne permet pas de visualiser des bandes contrairement à la deuxième PCR. C'est certainement à l'hybridation qu'on peut visualiser les fragments spécifiques.

La figure 12 présente les résultats de la mise au point d'un autre facteur important dont il faut tenir compte pour améliorer le rendement de la réaction de PCR : la concentration de  $MgCl_2$ . Il est démontré qu'une concentration incorrecte de magnésium peut réduire ou empêcher complètement l'amplification du produit de PCR. Afin de contourner ce problème, des gradients de  $MgCl_2$  ont été faits et une concentration optimale de 2.0 mM de  $MgCl_2$  a été choisie. Il est possible de voir qu'à cette concentration, le bruit de fond diminue considérablement, ce qui facilite le clonage ultérieur de ces bandes.

La figure 13 compare les patrons de migration des fragments obtenus après une première (à gauche) et une deuxième PCR (à droite). Comme il a été décrit précédemment, c'est à la deuxième PCR que les fragments amplifiés sont visibles. Logiquement, il devrait y avoir une différence de taille entre les fragments amplifiés dans les deux PCR. Cette différence serait d'environ 256 pb, dû à la distance existant entre l'amorce nichée par rapport à celle utilisée dans la première PCR. En confrontant le patron de migration des ADN provenant de cellules vs les ADN contrôles provenant des différentes souches de souris normales, il est possible de voir que quelques bandes migrent à la même hauteur dans les deux cas. Avec un gel plus concentré et un marqueur de poids moléculaire de 100 pb, on arrive à voir qu'il existe une différence de taille. Néanmoins, la position à laquelle une bande migre sur gel ne reflète ni sa séquence, ni sa composition. Donc, on ne peut pas conclure que ce sont les mêmes bandes.

Après avoir ajusté toutes les variables qui pouvaient influencer la réaction de PCR, tels que : la concentration de l'ADN, la température d'appariement des amorces, la concentration du  $MgCl_2$ , il est possible d'obtenir des PCR nichées comme celles montrées aux figures 13 (à droite) et 14. Il faut mentionner que, même si les conditions étaient déjà optimisées pour l'ADN d'une tumeur, le rendement de la PCR variait considérablement en changeant d'ADN tumoral, ce qui obligeait à ajuster tous les paramètres de nouveau. Également, les résultats obtenus pour chacune des PCR (première PCR et PCR nichée) pour le même ADN n'étaient pas reproductibles à chaque essai. Les patrons d'amplification n'étaient pas semblables bien qu'on gardait les mêmes conditions de PCR, ajustées précédemment. L'inexactitude dans la détermination de la concentration de l'ADN matrice affectait largement l'efficacité de la réaction et la clarté des fragments amplifiés.

La figure 15 réunit les résultats des étapes à réaliser afin d'éluier les fragments amplifiés suite à l'application de la méthode de PCR-splinkerette. On peut constater que seulement quatre des cinq bandes visibles sur PCR ont été éluées avec succès. En fait, les bandes de haut poids moléculaire sont peu visibles sur gel et leur élution et clonage subséquent sont laborieux. Une raison pour expliquer ceci est que le temps d'élongation utilisé dans la réaction de PCR est de 3.5 min, ce qui ne favorise pas l'amplification des fragments de haut poids moléculaire. Un détail intéressant dans le processus d'élution est qu'une bande (intégration rétrovirale) peut être composée de plusieurs bandes (plusieurs intégrations rétrovirales), ce qui rend difficile la détermination du poids moléculaire exact de chaque fragment amplifié. Le nombre d'intégrations rétrovirales qui peuvent être amplifiées par la méthode de PCR splinkerette peut varier, étant donné que l'enzyme BamHI ne coupe pas à l'intérieur de toutes les intégrations rétrovirales.

Suite à l'élution des fragments amplifiés par PCR, ceux-ci ont été clonés et séquencés. Les séquences obtenues sont analysées afin de s'assurer qu'elles contiennent l'ADN génomique avec la portion U3 du rétrovirus Graffi, d'un côté et la splinkerette de l'autre. Il est possible de vérifier ceci en utilisant le programme d'alignement de séquences de NCBI (National Center for Biotechnology Information). La méthode de PCR splinkerette permet de retrouver dans les séquences obtenues, les amorces utilisées pour amplifier les

intégrations rétrovirales, soit celles situées dans la portion U3 du rétrovirus, ainsi que celles fournies par la splinkerette (CAEV, oligo #627). Ces amorces sont suivies des séquences connues. L'amorce utilisée pour la PCR nichée qui est située dans la région U3, est suivie d'environ 31pb appartenant au début de la portion U3 du LTR en 5' de Graffi 1.4, et de la même manière, 34 pb correspondant à l'oligo splinkerette 2 (#591) suivent l'amorce splinkerette (CAEV, oligo #627). Donc, il est possible de repérer ces séquences dans les fragments amplifiés, ce qui confirme qu'ils proviennent de l'intégration du rétrovirus Graffi 1.4 dans l'ADN tumoral.

Des séquences qui ne sont pas spécifiques aux nouvelles intégrations du rétrovirus Graffi 1.4, ont été obtenues. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'amorce U3 peut s'apparier de façon non spécifique à des séquences rétrovirales endogènes dont les séquences LTR seraient très homologues à la région U3 de Graffi 1.4. En fait, en criblant la séquence de 375pb de la région U3 contre le génome de la souris, il y a 348 sites qui partagent une homologie qui varie entre 85 et 97%, avec le génome de *mus musculus*. (Annexe F et G). Donc, il est probable que l'enzyme BamHI ait coupé dans l'ADN génomique qui flanque cette séquence endogène, ce qui a permis à la splinkerette de se lier à ce fragment. En plus, si l'amorce rétrovirale réussit à s'apparier avec des séquences endogènes homologues à la région U3 de Graffi 1.4, celles-ci seront amplifiées. Ces séquences peuvent être confirmées de deux façons 1. En vérifiant si leur séquence correspond à celles obtenues en criblant la région U3 de Graffi contre le génome de la souris et 2. En criblant la séquence dans la banque des données de la souris (ENSEMBL) et en vérifiant si l'ADN qui se trouve en amont ou en aval de cette séquence coïncide complètement avec la région U3 de Graffi 1.4.

La figure 16 illustre un exemple de la localisation exacte d'une des séquences criblées sur le chromosome murin, avec la banque de données du génome de la souris, ENSEMBL. Ce programme permet aussi d'identifier les gènes qui sont à proximité de l'intégration rétrovirale. Tous les sites d'intégration et sites communs d'intégration trouvés dans ce projet sont répertoriés dans les tableaux II et III. La plupart de ces gènes codent pour des facteurs de transcription ou des protéines qui régulent la transcription. D'autres incluent des protéines qui remodelent la chromatine, des kinases, des phosphatases, des cytokines et

leur récepteur, des protéines Ras et ses régulateurs, des molécules de signalisation, des protéines impliquées dans l'apoptose, des protéines qui attachent l'actine, facteurs d'épissage et protéines qui contrôlent le cycle cellulaire.

Dans le cas de certaines intégrations comme, par exemple, celles trouvées au niveau des chromosomes 2A3 (23.30Mb), 2A3 (26.42Mb), 2E2 (103.61Mb), 2E5 (117.19Mb), 6F2 (125.38Mb), 8E1 (119.92Mb), 15D3 (62.26Mb) et 4E2 (152.44Mb), les intégrations se font à proximité de gènes déjà reconnus comme étant des oncogènes. Ainsi, on a trouvé des intégrations à côté des oncogènes, *Evi1*, *Notch-1*, *Lmo2*, *RasGrp1*, *Ptpn6*, *Gse1*, *Myc* et *Prdm16*. Les oncogènes *Evi-1* et *Notch-1* et *Myc* ont déjà été associés au rétrovirus Graffi 1.4 auparavant (Erkeland *et al.*, 2004).

Les intégrations trouvées sur les régions chromosomiques 4A2, 4A4, 10A1, 13A3.1 et 14C2, ont cependant été identifiées comme des séquences endogènes. Ces séquences démontrent que même après avoir fait une analyse exhaustive pour choisir l'amorce plus spécifique à la région U3 de Graffi, l'homologie que ce dernier partage avec les séquences endogènes présentes dans l'ADN de la souris rend l'identification des nouveaux sites d'intégration de ce virus très ardue. Malgré cette contrainte, nous avons réussi à identifier plusieurs sites d'intégration de Graffi qui n'avaient pas été découverts dans des études précédentes.

Si deux tumeurs d'origine différente ont une intégration rétrovirale au même endroit dans le génome, on peut dire qu'il s'agit d'un site commun d'intégration (CIS). Si les gènes qui se trouvent autour de cette intégration n'ont pas été identifiés dans la banque de sites communs d'intégration RTCGD (retroviral tagged cancer gene database), on peut considérer cette région de l'ADN génomique comme un nouveau site commun d'intégration. Le tableau II résume les loci qui sont des cibles d'intégrations rétrovirales dans plus d'une tumeur, trouvés au cours de ce travail. Les sites communs d'intégration sur les chromosomes 2E2, 4E2, 6F2, 8E1, 15D3, 2E5 et 2A3 se trouvent à proximité des gènes qui ont déjà été rapportés dans la littérature comme étant des oncogènes connus. Les gènes environnant ces intégrations sont: *Lmo2* (Lim domain only 2), *Prdm 16* (PR domain containing 16), *Ptpn6*

(Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 6), *Gsel* (Genetic suppressor element 1), *Myc* ((Myelocytomatosis Oncogene), *RasGrp1* (RAS guanyl releasing protein 1), *Evi1* (Ecotropic viral integration site 1) et *Notch1* (Notch gene homolog 1) respectivement.

Nous avons aussi remarqué quatre régions susceptibles de présenter plus d'une intégration dans le même locus, sur les régions chromosomiques 10B5.2, 17D, 14B et 4E1. En analysant leur séquence, il a été possible de déterminer que le rétrovirus Graffi s'était intégré au nucléotide près dans chacun des cas. Par exemple dans le cas de l'intégration trouvée sur le chromosome 10 (région B5.2), le rétrovirus Graffi s'est intégré au même endroit du génome, au nucléotide près dans les deux tumeurs (30.8 et 30.9 d'origine FVB) impliquées dans le développement de la leucémie. La probabilité qu'un rétrovirus s'intègre à la même position à deux reprises dans le génome est faible. En 1994, Ott, *et al.*, a reporté après l'analyse de 14 tumeurs causées par le rétrovirus leucémogène murin 10A1, l'intégration de ce dernier dans l'exon 1 du gène *Fli-1* à la même position, dans toutes les tumeurs testées. Également, Barbeau *et al.*, en 1996 a rapporté des intégrations du rétrovirus Cas-Br-E à l'intérieur d'une région de 35 nt dans l'extrémité 3' de l'exon 1 du gène *Fli-1*. Donc, afin de vérifier les possibles sites communs d'intégration, des PCR ont été réalisées en utilisant une amorce située dans la région U3 du rétrovirus Graffi et une amorce spécifique à la séquence génomique de l'ADN tumoral, obtenue après l'application de la technique de PCR-splinkerette. La figure 17 illustre les possibles orientations d'intégration du rétrovirus par rapport à la séquence d'ADN cellulaire. L'analyse de cette séquence à l'aide du programme Ensembl permet de déterminer si le rétrovirus se trouve en amont ou en aval de celle-ci. De cette façon, il est possible de concevoir des amorces qui permettront de déterminer si le rétrovirus s'est intégré dans la même région de l'ADN génomique des tumeurs impliquées.

La figure 18 montre les résultats de la vérification par PCR du site commun d'intégration potentiel du rétrovirus Graffi dans la région génomique 10B5.2 69.69Mb, impliquant les tumeurs 30.8 et 30.9 provenant de la souche FVB. On remarque qu'on obtient une bande de 800 pb ce qui correspond à la taille du fragment d'ADN génomique qu'on devrait amplifier. Par contre ce fragment est aussi présent dans l'ADN contrôle (ADN

provenant de la souche FVB, qui n'a pas subi une infection par le rétrovirus Graffi 1.4). Ce résultat incite à penser que les fragments amplifiés dans les ADN tumoraux sont des séquences endogènes non répertoriées dans Ensembl. Pour éclaircir ceci, une hybridation Southern a été faite. La sonde utilisée a été dérivée de l'ADN génomique tumoral à laquelle on a enlevé les portions U3 et splinkerette pour augmenter sa spécificité. Si les fragments amplifiés par la méthode de PCR splinkerette correspondent aux séquences endogènes, on s'attendrait à ce que la sonde unique (sonde dérivée de l'ADN génomique tumoral) hybride autant aux ADN tumoraux qu'avec l'ADN contrôle. Mais si ceci n'est pas le cas, elle n'hybridera qu'avec les ADN tumoraux.

La figure 22 démontre les résultats de l'hybridation avec la sonde unique génomique. On remarque que cette sonde a hybridé seulement à l'ADN de la tumeur 30.8, ce qui prouve que la région 10B5.2 69.69Mb n'est malheureusement pas un véritable site commun d'intégration. Le fait que la sonde n'ait pas hybridé avec l'ADN contrôle démontre que le fragment amplifié par la méthode des splinkerettes pour l'ADN de la tumeur 30.8 n'est pas une séquence endogène de Graffi 1.4. Cependant, cette manipulation permet aussi de mettre en évidence que les régions d'intégration du rétrovirus, amplifiées par cette même technique pour les deux tumeurs, ne sont pas les mêmes. Donc, il se peut que le fragment d'ADN génomique amplifié pour la tumeur 30.9 soit un artefact possiblement produit durant l'étape de clonage des fragments.

Pour vérifier la véracité des autres sites communs d'intégration potentiels, des PCR ont été réalisées sur les régions 17D 55.27Mb, 14B 19.65Mb et 4E1 146.12Mb. (Figures 19, 20, 21 respectivement). Les figures 19 et 20, représentent des résultats préliminaires obtenus pour les régions génomiques 14B et 17D. Il est possible de constater que les fragments attendus sont présents aussi dans l'ADN tumoral. Concernant les résultats de PCR pour les intégrations trouvées sur le chromosome 4 E1, un fragment a été amplifié dans les deux tumeurs impliquées et celui-ci n'est pas présent dans l'ADN contrôle. Cependant, la taille du fragment ne correspond pas à celle qu'on devrait obtenir. En fait on devrait amplifier un fragment d'environ 443 pb, ce qui n'est pas le cas puisque nous en obtenons un de 600 pb. Un gel d'agarose 1.5%, permet difficilement d'établir avec certitude cette différence. Celle-ci

peut être dû au fait que nous utilisons des tumeurs issues de souches de souris (FVB, NFS, Balb/c), différentes par rapport à celle de la banque de données du génome de la souris (C57BL/6, C57BL/6J). Donc des différences de taille pour les fragments obtenus pourraient être significatives. Des analyses plus approfondies devraient être faites, pour mettre au clair les résultats obtenus. Ces derniers devraient être réconfirmés par Southern blot car il s'avère le test le plus fiable pour confirmer les résultats.

L'intégration du rétrovirus Graffi 1.4 dans la région 17D 55.27Mb, se fait à proximité du gène *Rex2* (RNA exonuclease 2) et d'un nouveau gène appelé *Novel*.

La protéine codée par le gène *Rex2* appartient à la famille ARNase D des exonucleases, lesquelles sont nécessaires pour la maturation des différents ARN. Spécifiquement *Rex2* participe à la maturation de l'ARNsn U4, agissant comme une exouridylylase qui fait le clivage final de l'extrémité 3' de celui-ci. Des mutations dans la protéine *Rex2* mènent à l'accumulation des molécules d'ARNsn légèrement plus allongées. Les protéines *Rex2*, contiennent un domaine putative C-terminal Endonuclease/Exonuclease/Phosphate (EPP) ainsi qu'un domaine 5'→3' exonuclease (Van Hoof *et al.*, 2000).

La description de la fonction du gène appelé *Novel* n'est pas connue. Cependant, ce gène code pour une protéine appartenant à la famille des protéines de haute mobilité HMG box2 (HMG :High mobility group proteins), nommées ainsi d'après leur mobilité électrophorétique sur des gels de polyacrylamide. Ces dernières sont des composants non histoniques de la chromatine, lesquelles lient préférentiellement le petit sillon de l'ADN simple brin et déroulent l'ADN double brin. Bien qu'elles ne soient pas spécifiques à une séquence, elles possèdent une grande affinité pour l'ADN plié ou tordu et plient l'ADN linéaire. Les protéines HMG box2 semblent jouer un rôle architectural important dans l'assemblage de complexes de nucléoprotéines dans une variété de processus biologiques, comme par exemple, l'initiation de la transcription et la réparation de l'ADN (Thomas, 2001).

Les gènes *Vdac2* (Voltage dependent anion channel 2), *Comtd1* (Catechol-o-methyltransferase domain containing 1), *Zfp503* (Zinc finger protein 503) et *Myst4* (histone acetyltransferase monocytic leukemia 4 ou monocytic leukemia zinc finger protein-related factor (MORF)) entourent l'intégration du rétrovirus Graffi 1.4 dans la région 14B 19.65Mb. Puisqu'il n'est pas possible de savoir avec certitude en ce moment lequel de ces gènes participe directement au développement de la tumeur et son mécanisme d'action, le gène *Myst4* semble être directement associé à la leucémogénèse. La protéine MORF codée par ce gène fait partie de la famille des histones acétyltransférases. Ces dernières transfèrent un groupe acétyle de l'Acetyl-CoA au groupe amine ε de la lysine à l'intérieur de l'extrémité NH<sub>2</sub> des histones qui lient les phosphates de l'ADN. MORF acétyle préférentiellement les histones H3 et H4 en tant que monomères libres et aussi lorsque H4 est assemblée dans les nucléosomes. L'acétylation de ses queues d'histones réduit l'affinité des nucléosomes pour l'ADN, probablement en permettant aux segments d'ADN de devenir plus accessibles à d'autres protéines comme les facteurs de transcription (Champagne *et al.*, 1999). Des translocations chromosomiques t(10;16)(q22;p13) et t(11;17)(q23;q21), impliquant le gène *Myst4* sont associées au développement de la leucémie myéloblastique aiguë, suggérant le rôle de ce gène dans l'hématopoïèse. (Murati *et al.*, 2004). Ces réarrangements résultent en gènes fusionnés dont leurs transcrits ont une activité histone acétyltransférase dérégulée qui engendre une régulation transcriptionnelle altérée. Donc, MORF peut contribuer à l'oncogenèse soit par l'acétylation des histones ou des facteurs de transcription ou par l'interaction avec des complexes de transcription par l'intermédiaire des domaines NH<sub>2</sub> et COOH terminaux (Moore *et al.*, 2004).

L'intégration du rétrovirus Graffi 1.4 dans la région 4E1 146.12Mb, à proximité des gènes *Gtf2f1* (general transcription factor IIF), *Khsrp* (KH type splicing regulatory protein) et *Tnfsf9* (tumor necrosis factor superfamily number 9).

Le facteur de transcription TFIIF est un facteur général d'initiation de la transcription qui lie l'ARN polymérase II et la recrute au complexe d'initiation en collaboration avec TFIIB. De plus, il stimule l'élongation de la transcription aidé par l'ARN polymérase II (Aso *et al.*, 1992).

La protéine Ksrp, active l'épissage à travers des séquences activatrices introniques. Elle est hautement exprimée chez les cellules neuronales et est requise pour l'épissage spécifique de l'exon N1 de c-src (système modèle pour l'étude de la régulation de l'épissage chez les neurones) (Ring *et al.*, 1999). Il a été démontré que cette protéine peut jouer un rôle dans la modulation de la prolifération et différenciation des lymphocytes T à travers de la voie de signalisation Wnt/ beta-caténine (Deng *et al.*, 2005).

*TNFSF9* (4-1BB), est un membre de la superfamille de ligands du facteur de nécrose tumoral (TNF) qui est exprimé dans certaines CPA (cellules presentatrices d'antigènes), telles que les cellules dendritiques matures, les cellules B et les macrophages activés. Son expression est constitutive chez les monocytes et peut être induite dans les lymphocytes T primaires. Il est aussi exprimé dans des lignées lymphocytaires T CD4 et CD8. Les diverses activités biologiques impliquant *TNFSF9* sont principalement liées à la prolifération cellulaire, différenciation, apoptose et régulation de l'activation cellulaire y compris la réponse immune et les réactions inflammatoires, aussi bien que la pathologie d'une série de maladies humaines (Dong *et al.*, 2005).

Le rôle direct avec le développement de la leucémie des gènes impliqués dans les possibles sites communs d'intégration mentionnés ci-dessus resterait à tester. En regardant par RT-PCR lequel de ceux-ci est dérégulé suite à l'intégration rétrovirale, on peut tenter d'élucider les voies de signalisation dans lesquelles ils sont impliqués. De cette façon, on pourrait comprendre leur mécanisme d'action dans le développement de la tumeur.

#### 4.1 ONCOGÈNES IMPORTANTS

Au cours de ce travail, il a été possible de retrouver les oncogènes *Gsel*, *Ras* *Grp1*, *Ptpn6*, *Prdm16* et *Lmo2*, lesquels n'ont pas été associés au rétrovirus Graffi 1.4 auparavant. Une brève description de la fonction de chacun, sera donnée dans les paragraphes suivants.

#### 4.1.1 *Gsel* (Genetic suppressor element 1)

Peu d'information est disponible sur ce gène. Cependant il est connu que les éléments suppresseurs génétiques (GSE: genetic suppressor elements) sont de petits fragments de gènes, lesquels codent pour des ARN antisens ainsi que des peptides qui agissent d'une façon dominante. Les GSE, inhibent la fonction du gène duquel ils sont dérivés pour empêcher l'expression des molécules de surface associées au pouvoir envahissant des cellules cancéreuses (Gudkov *et al.*, 1994). Ces éléments peuvent être isolés d'un gène unique ou à partir d'un complexe multigénique en construisant une librairie de fragments aléatoires courts du gène cible dans un vecteur d'expression suivi par une sélection de l'expression du phénotype désiré dans un système cellulaire approprié. La sélection d'un GSE à partir d'un gène unique permet de développer des inhibiteurs spécifiques et efficaces de la fonction du gène et d'identifier les domaines protéiques fonctionnels. Cette approche a été utilisée afin de cloner et analyser des gènes suppresseurs de tumeurs ainsi que leur cibles tumorales spécifiques pour les futures drogues anticancéreuses (Roninson *et al.*, 1995).

#### 4.1.2 *Ras Grp 1* (RAS guanyl releasing protein 1)

*Rasgrp1* est un facteur d'échange du nucléotide guanine qui active les Ras GTPases (des commutateurs moléculaires universels qui agissent en tant que temporisateurs cinétiques des événements de transduction de signaux). Ce gène est exprimé majoritairement chez les thymocytes et les lymphocytes T matures, mais est également exprimé dans quelques lignées cellulaires de cellules B non matures. *Rasgrp1* est activé en aval des récepteurs d'antigènes des lymphocytes T et B. Ce gène, fourni des signaux aux cellules T non matures qui confèrent prolifération et survie, mais *Rasgrp1* favorise également la suppression des cellules T matures médiée par le récepteur de cellules T (Guilbault et Kay, 2004).

Des souris homozygotes pour des mutations spontanées et nulles du gène *Rasgrp1* exhibent un syndrome auto-immun lymphoprolifératif dans lequel les cellules T n'activent

pas Ras. Aussi ces souris présentent une rate et des nodules lymphatiques hypertrophiés (MGI. Mouse Genome Informatics).

#### 4.1.3 *Ptpn6* (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type)

La protéine tyrosine phosphatase PTPN6 est une protéine cytoplasmique de 68 KDa exprimée principalement durant le développement des cellules hématopoïétiques, la prolifération et les voies de signalisation mitogéniques médiées par des récepteurs. Par des événements de déphosphorylation ciblée, cette protéine régule à la baisse un large spectre de molécules qui favorisent la croissance. Parmi celles-ci, on retrouve, la protéine tyrosine kinase Kit, activée afin de susciter une importante cascade d'événements intracellulaires suite à la liaison de son ligand à ce récepteur sur les cellules souches.

Le rôle de *PTPN6* dans l'hématopoïèse a été démontré chez des souris homozygotes pour la mutation spontanée motheaten (*Ptpn6<sup>mo</sup>*). Ces souris développent des maladies auto-immunes sévères, des anomalies hématopoïétiques incluant la prolifération excessive et accumulation des populations myélomonocytiques (Beghini *et al.*, 2000).

#### 4.1.4 *Prdm16* (transcription factor MEL1)

*PRDM16* code pour une protéine à doigts de zinc de 170 kDa avec deux domaines de liaison à l'ADN (faits de 3 et 7 doigts de zinc) et un domaine PR (positive regulatory domain). Ce gène est exprimé chez les cellules leucémiques contenant une translocation t(1;3)(p36;q21), laquelle est associée à la maladie MDS/AML (myelodysplastic syndrome/acute myelogenous leukemia). Les produits protéiques des gènes impliqués dans cette translocation (*RPN1/PRDM16*) sont perturbés et manquent le domaine PR. La surexpression des protéines à doigt de zinc manquant ce domaine est considérée comme un des facteurs principaux dans la pathogenèse de certaines leucémies (Lahortiga *et al.*, 2004, Mochizuki *et al.*, 2000).

#### 4.1.5 *Lmo2* (LIM domain only 2)

L'oncogène des cellules T, *Lmo2* a été identifié pour la première fois comme une cible des translocations chromosomiques dans des leucémies aiguës des cellules T humaines. Ce gène code pour une protéine qui comporte deux domaines LIM semblables à des doigts de zinc dont leur fonction est reliée aux interactions entre protéines. Ces domaines se lient aux protéines telles que TAL1/SCL et LDB1 et aux complexes de liaison à l'ADN qui s'attachent aux sites cible chez les cellules hématopoïétiques normales ou des cellules tumorales de type T. Une caractéristique remarquable du gène *Lmo2* est sa participation exclusivement dans des malignités de lymphocytes T, lorsqu'il est exprimé anormalement (McCormack *et al.*, 2003).

En raison des divers rôles pour *Lmo2* dans l'hématopoïèse, il a été proposé que *Lmo2* agisse en tant que molécule de pontage qui facilite la formation des différents complexes multimériques qui régulent la transcription de différents gènes dans les étapes de l'hématopoïèse (Yamada *et al.*, 2000).

## CHAPITRE V

### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES FUTURES

La mutagenèse insertionnelle est le mécanisme par lequel les rétrovirus non défectifs peuvent causer l'oncogenèse et est aussi responsable des altérations trouvées dans plusieurs gènes impliqués dans la transformation leucémique (Denicourt *et al* 1999). Le rétrovirus leucémogène murin Graffi 1.4 représente un outil important de recherche pour mieux comprendre le processus de cancérisation lié à ce type de mutagenèse. Dans le but de rechercher des sites d'intégration virale qui pourraient être impliqués dans le développement des différents types de leucémies induites par le rétrovirus Graffi, la technique de PCR-splinkerette a été utilisée. Cette technique a permis l'amplification directe de l'ADN cellulaire adjacent au provirus à l'aide d'une séquence «linker» double brin, comportant un bout cohésif et une structure en épingle à cheveux (qui prévient une amplification non spécifique par PCR) sur l'un de ses brins, appelée splinkerette.

En analysant la séquence de l'ADN cellulaire obtenu, il a été possible de repérer les gènes qui se trouvent à proximité de l'intégration rétrovirale, lesquels, en étant dérégulés, pourraient engendrer l'apparition de la leucémie.

Au cours de ce projet, nous avons analysé 63 sites d'intégration rétroviraux (RISs) à partir de 12 tumeurs provenant des souches NFS, FVB et Balb/c. Les tumeurs analysées donnent des leucémies de type T, B, myéloïde et mégacaryocytaire.

Le criblage des séquences de ces RIS contre la banque de données du génome de la souris nous a permis de trouver huit loci qui sont des cibles d'intégration rétrovirale dans plus d'une tumeur (sites communs d'intégration rétrovirale, CISs). Ces loci sont trouvés sur les chromosomes, 2A3, 2E2, 2 E5, 4E2, 6F2, 15D3 et 8E1 de souris. Les oncogènes *Evi1*, *Notch1*, *Lmo2*, *RasGrp1*, *Ptpn6*, *Gse1*, *Myc* et *Prdm16* se trouvent respectivement à

proximité de ces régions. Quelques uns de ceux derniers n'avaient pas été associés au rétrovirus Graffi 1.4 auparavant.

Également, trois régions susceptibles de posséder plus d'une intégration dans le même locus ont été identifiées sur les chromosomes 17D, 14B, 4E. Cependant, quelques ambiguïtés dans les résultats ne permettent pas d'affirmer pour l'instant qu'il s'agisse de véritables sites communs d'intégration. Des améliorations au niveau de la spécificité des réactions de PCR et des hybridations Southern afin de prouver la véracité de ces possibles sites communs d'intégration, permettrait d'éclaircir ceci. Une fois que les sites communs d'intégration soient confirmés, l'état d'expression des gènes entourant l'intégration pourra être déterminé à l'aide de techniques comme la RT-PCR, ce qui pourrait donner un indice sur les gènes qui agissent comme des premières intervenants dans le processus de formation de la tumeur.

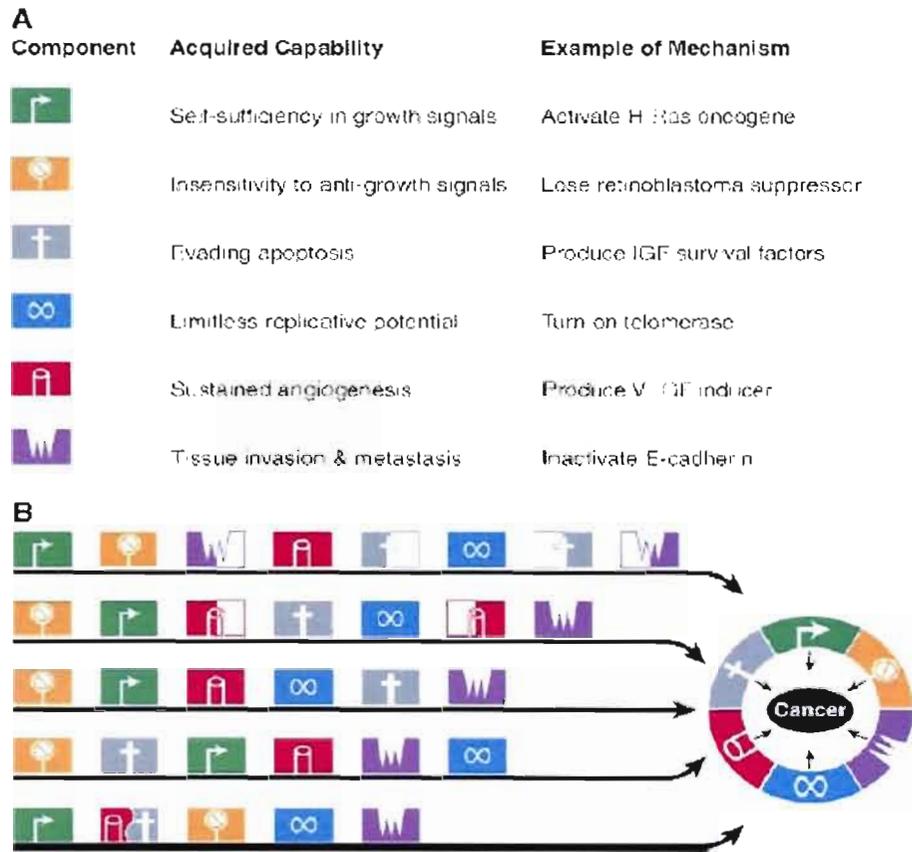
Finalement, cette méthode a permis de retrouver, à proximité de certaines CISs, les oncogènes, *Myc*, *Evi-1* et *Notch-1*, qui avaient déjà été associés au rétrovirus Graffi 1.4 comme des sites communs d'intégration.

La méthode de PCR splinkerette s'est avérée une technique très efficace pour repérer les sites communs d'intégration du rétrovirus Graffi 1.4. Cependant, des facteurs comme la similitude existante entre la région U3 du rétrovirus Graffi 1.4 et les séquences endogènes présentes dans le génome de la souris ont rendu compliqué le choix des amorces spécifiques à la région U3 du rétrovirus Graffi, ainsi que le ciblage spécifique des intégrations exogènes. Le clonage de toutes les séquences endogènes présentes dans les ADN contrôles (NFS, FVB et Balb/c), permettrait d'avoir un registre des séquences à éviter d'amplifier.

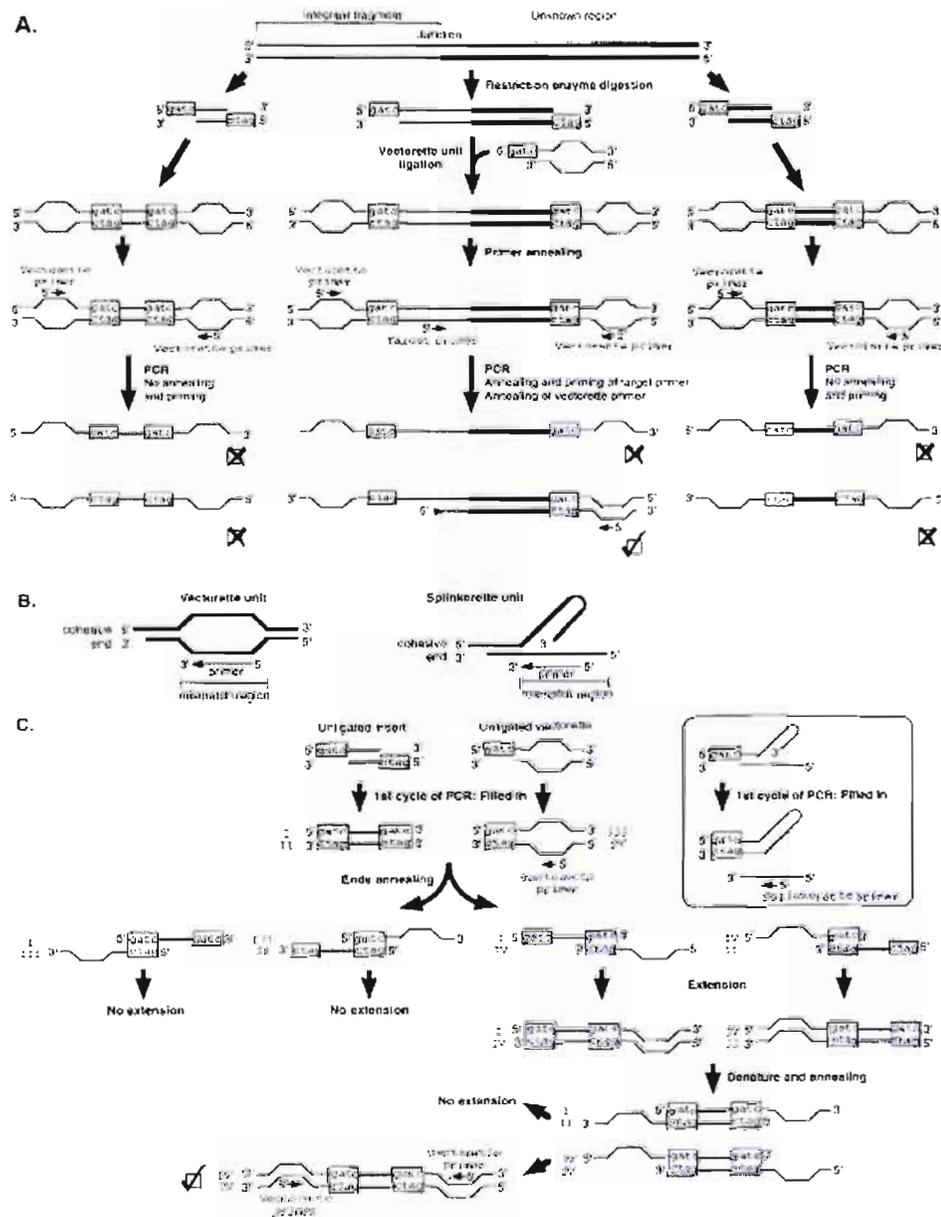
Des améliorations dans les approches méthodologiques, telles que le séquençage direct des fragments amplifiés par PCR, aideraient à augmenter l'efficacité de la méthode. De cette façon, il serait possible d'analyser plus de tumeurs et d'éviter les étapes de clonage, qui peuvent être laborieuses et générer des contaminants.

L'analyse de plus de tumeurs induites par le rétrovirus Graffi 1.4, en améliorant les facteurs exposés ci-dessus, permettra d'augmenter les chances de reconfirmer la présence des sites répertoriés dans cette étude, ce qui amènerait à trouver des nouveaux sites communs d'intégration et des oncogènes impliqués dans les leucémies chez la souris et ultimement chez l'humain.

## ANNEXES



**Annexe A. Voies parallèles de la tumorigénèse.** Bien que nous pensons que pratiquement tous les cancers doivent acquérir les mêmes six capacités (A), leur moyen de le faire change de manière chronologiquement significative (B). Ainsi, l'ordre dans lequel ces possibilités sont acquises semble probablement tout à fait variable à travers le spectre des types et des sous-types de cancer. D'ailleurs, dans quelques tumeurs, une lésion génétique particulière peut conférer plusieurs possibilités simultanément, diminuant le nombre d'étapes distinctes mutagéniques exigées pour accomplir la tumorigénèse. Ainsi, la perte de fonction du gène suppresseur p53 peut faciliter l'angiogénèse et la résistance à l'apoptose (par exemple, dans la voie de cinq étapes montrée), aussi bien que permettre la caractéristique de l'instabilité génomique. Dans d'autres tumeurs, des capacités peuvent seulement être acquises par la collaboration de deux ou plus changements génétiques distincts, augmentant de ce fait le nombre d'étapes nécessaires pour l'accomplissement de la progression tumorale. Ainsi, dans la voie présentée de huit étapes, invasion/métastase et résistance à l'apoptose sont acquis dans deux étapes (Tiré de Hanahan et Weinberg, 2000).

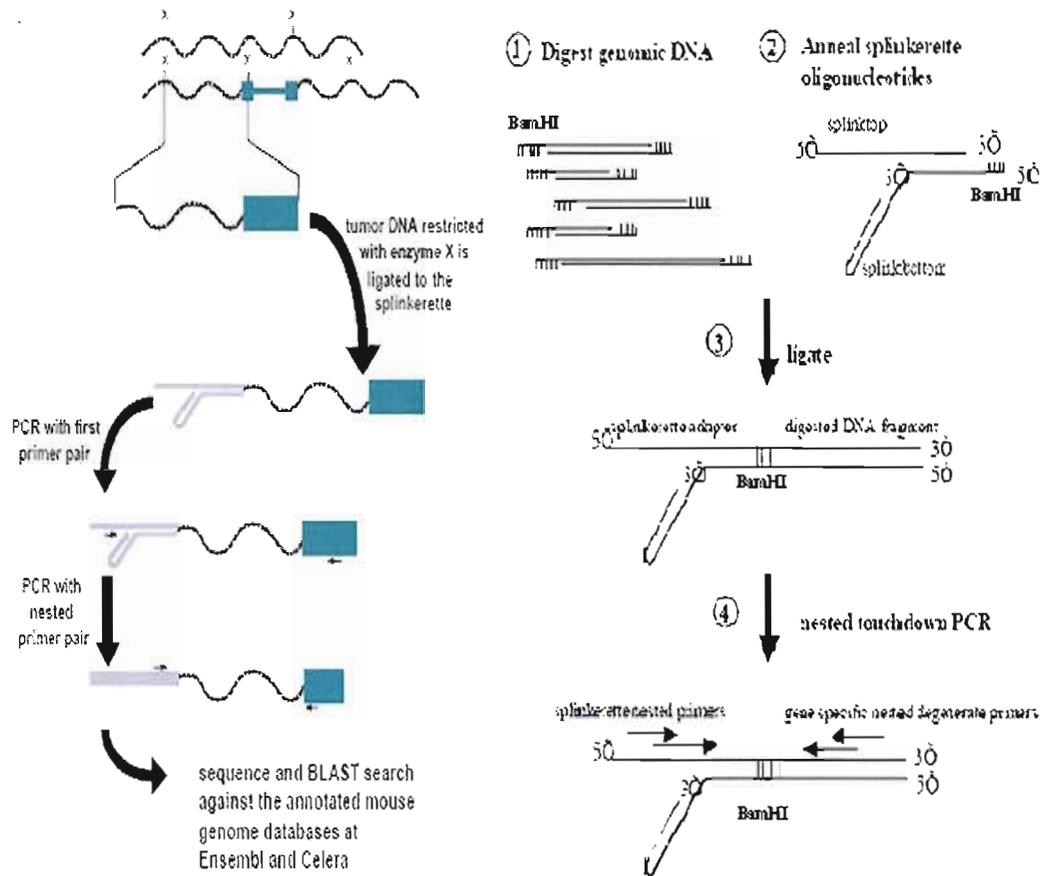


**Annexe B. Vectorette vs splinkerette PCR.** (A) Les deux brins complémentaires d'ADN sont représentés par les lignes grises et noires. Les lignes épaisses et minces représentent la séquence génomique inconnue et le fragment intégrant, respectivement. La vectorette est montrée dans la figure. Les amorces sont montrées par des flèches. (B) Diagramme schématique comparant la vectorette et la splinkerette. (C) Diagramme montrant l'effet que le «end-repair priming» a sur l'amplification par PCR vectorette (Tiré de Hui *et al.*, 1998).

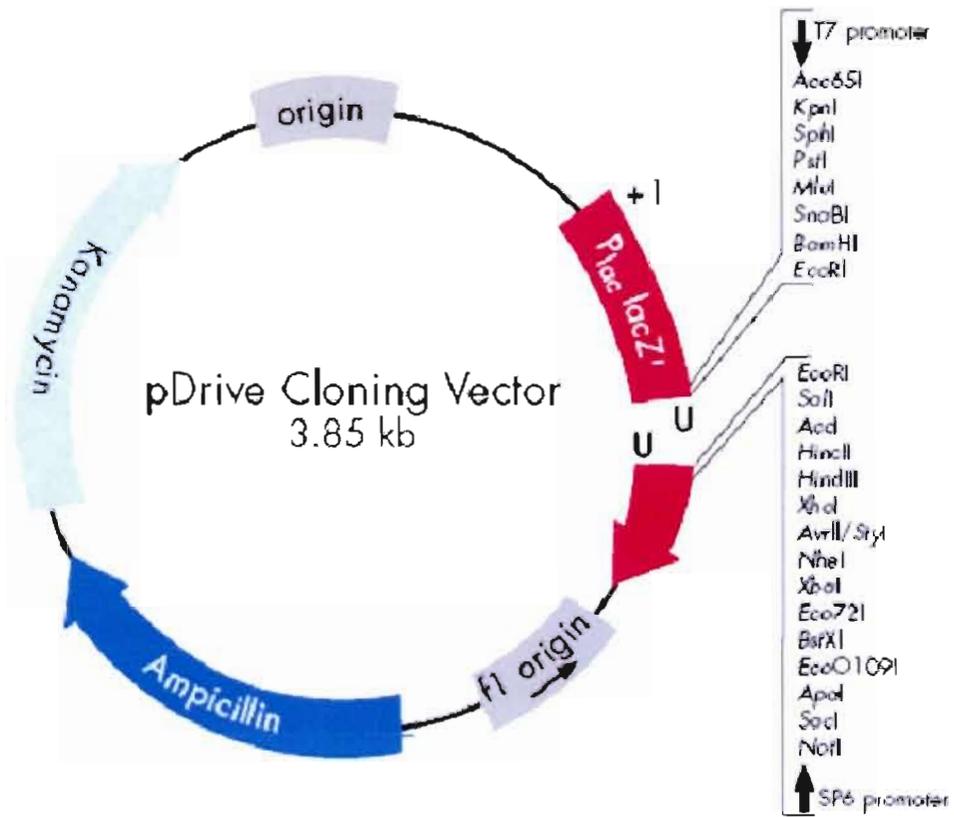
Method	DNA digestion	Ligation	Amount of DNA used	Steps to optimize	Nonspecific products (false positive)	Sensitivity
Inverse PCR (IPCR) (fig. 1)	yes	self-ligation (intramolecular circularization)	D: 2–5 µg L: 0.25–5 ng µl	1. requires large amount of DNA sample 2. DNA concentration of self-ligation	from 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-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.

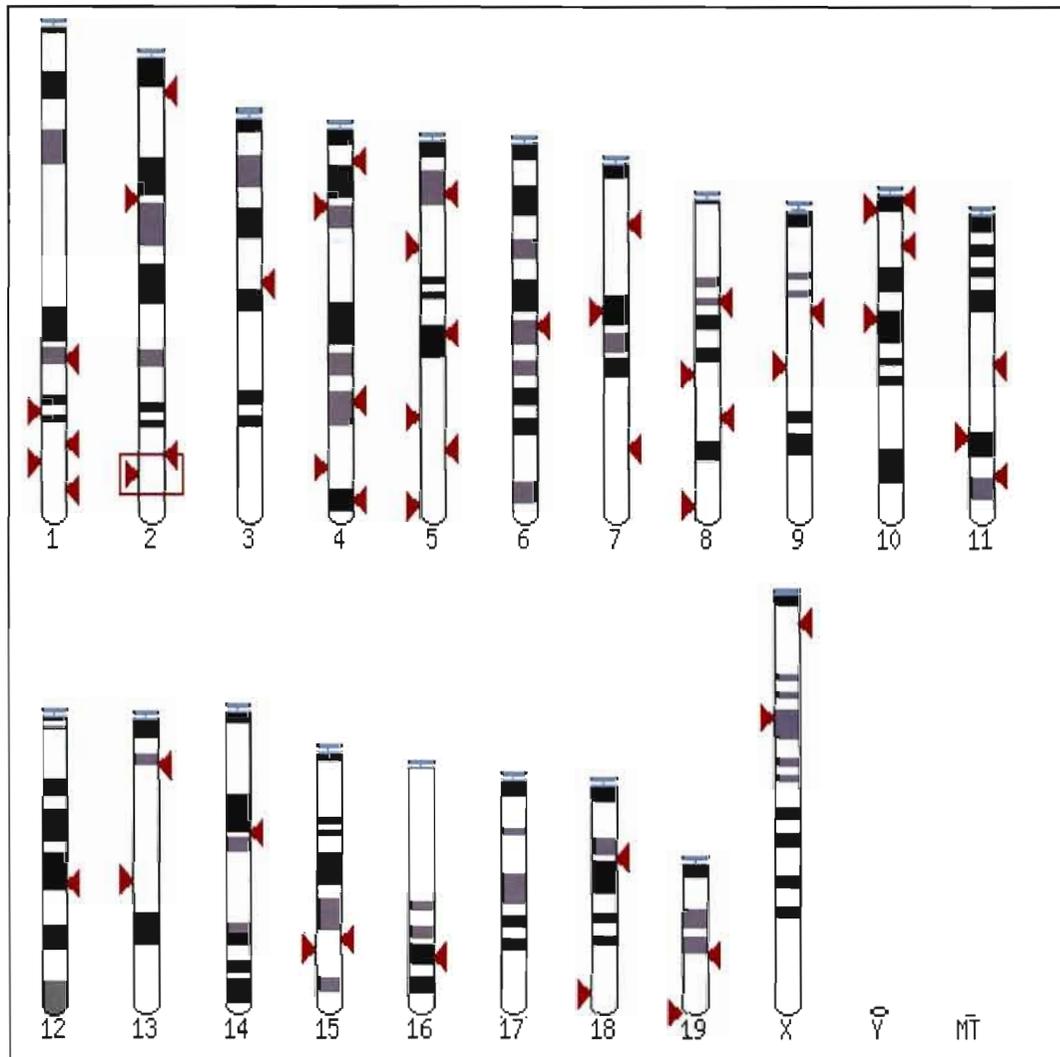
**Annexe C. Résumé des principales techniques utilisées pour amplifier l'ADN inconnu flanquant une intégration rétrovirale (Tiré de Hui *et al.*, 1998).**



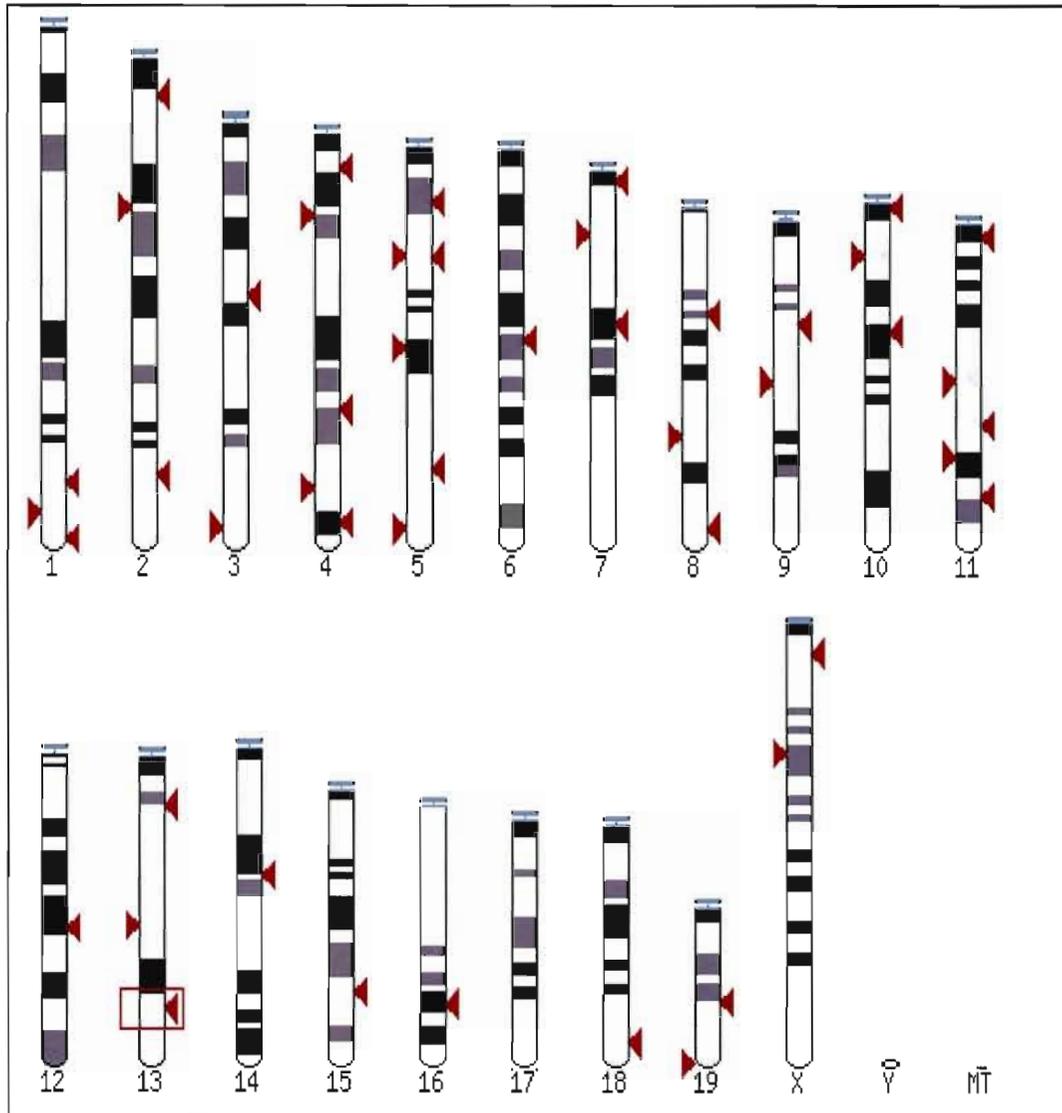
**Annexe D. Principe de la technique de PCR splinkerette.** La splinkerette est attachée par ligation aux bouts cohésifs des fragments d'ADN génomique de la tumeur digérée par l'enzyme BamHI. Par la suite, une amplification par PCR du fragment d'intérêt est faite en utilisant une amorce située dans le rétrovirus (en vert) et l'amorce spécifique à la splinkerette (en gris). La séquence obtenue peut être criblée contre la banque de données du génome de la souris Ensembl pour repérer les gènes à proximité.



Annexe E. Cartographie du vecteur pDrive (Qiagen, Canada)



**Annexe F. Résultats du criblage de la séquence de la région U3 de Graffi 1.4 contre le génome de *Mus musculus*.** 348 séquences dans le génome de la souris partagent une homologie significative avec les 375pb de la région U3 de Graffi 1.4. L'encadré représente la meilleure homologie (<http://www.ensembl.org>)



**Annexe G. Résultats du criblage de la séquence du rétrovirus Graffi 1.4 entier contre le génome de *Mus musculus*.** 952 séquences dans le génome de la souris partagent une homologie significative avec les 8259pb de la séquence du virus Graffi 1.4 entier. L'encadré représente la meilleure homologie (<http://www.ensembl.org>)

## BIBLIOGRAPHIE

- 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.
- AMATI B, ALEVIZOPOULOS K, VLACH J. 1998. Myc and the cell cycle. Frontiers in Biosciences.Vol.3:p.250-68.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. <http://www.cancer.org>
- ARNOLD, C. et HODGSON, I.J. 1991. Vectorette PCR: a Novel Approach to Genomic Walking. PCR Methods Appl. Vol.: 1 (1), p. 39-42.
- ARTAVANIS-TSAKONAS S, RAND MD, LAKE RJ: Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science 1999, Vol.284, p.770-776
- ASKEW, D. S., C. BARTHOLOMEW, AND J. N. IHLE. 1993. Insertional mutagenesis and the transformation of hematopoietic stem cells. Hematol. Pathol. Vol.7.p.1-22
- ASO T., TSAI P., KAWAGUCHI T.MENNINGER J.C.,KITAJIMA SHIGETACA.,YASUCOCHI YUKIO., WARD D.C., WEISSMAN S.M.1992. Assignment of the human GTF2F1 gene to chromosome 19p13.3. Genomics. Vol.16, p.252-253.
- ATHANASIOU M, MAVROTHALASSITIS G, SUN-HOFFMAN L AND BLAIR DG. 2000. Fli-1 is a suppressor of erythroid differentiation in human hematopoietic cells.Leukemia, vol.14 (3), p. 439-445.
- AUSTEN M, LUSCHER B, LUSCHER-FIRZLAFF JM.1997. Characterization of the transcriptional regulator YY1: the bipartite transactivation domain is independent of interaction with the TATA box-binding protein, transcription factor IIB, TAFII55, or cAMP-responsive element-binding protein (CPB)- binding protein. J Biol Chem. Vol.272, p.1709-1717.
- BARBEAU B.,BERGERON DOMINIQUE, BEAULIEU M.,NADJEM ZAHIDA., RASSART E. 1996. Characterization of the human and mouse Fli-1 promoter regions.Biochimica et Biophysica Acta..Vol.1307.p.220-232.
- BEGHINI A., RIPAMONTI C.B., PETERLONGO P., ROVERSI G., CAIROLIR., MORRA E. ET LARIZZA L. 2000. RNA hyperediting and alternative splicing of hematopoietic cell phosphatase (*PTPN6*) gene in acute myeloid leukemia. Human Molecular Genetics, Vol. 9(15).p.2297-2304.

- BEN DAVID Y, GIDDENS EB, BERNSTEIN A.1990. Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine Leukemia virus. Proc.Natl Acad Sci U.S.A.Vol 87 (4).p.1332-6
- BISHOP, JM .1991. Molecular themes in oncogenesis. Cell.Vol.64.p.271-282.
- BLAIR D.G and ATHANASIOU MEROPI.2000. Ets and retroviruses-transduction and activation of members of the Ets oncogene family in viral oncogenesis.Oncogene. Vol.19, p.6472-6481
- BORG KE., ZHANG M, HEGGE D, STEPHEN RL., BUCKLEY DJ., MAGNUSON N S., BUCKLEY AR.1999. Prolactin Regulation of *pim-1* Expression: Positive and Negative Promoter Elements. Endocrinology.Vol. 140(12).p.5659-5668.
- BROMHAM L.2002. The human zoo: endogenous retroviruses in the human genome. Trends in Ecology & Evolution.Vol.17(2).p.91-97.
- BUTERA S.T. 2001. Retrovirus Culture. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group.p.1-3
- CHAMPAGNE N, BERTOS NR, PELLETIER N. 1999. Identification of a human histone acetyltransferase related to monocytic leukemia zinc finger protein. J Biol Chem.Vol.274.p.28528-36
- COFFIN J.M., and MOORE,C. 1990. Determination of 3' end processing in retroelements Trends Genet.Vol.6.p.276-277
- COFFIN, J. M., HUGHES, S. H., VARMUS, H. E. 1997. Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, États-Unis, 842 p.
- CREWS S, BARTH R, HOOD L, PREHN J, et CALAME K. 1982. Mouse c-myc oncogene is located on chromosome 15 and translocated on chromosome 12 in plasmacytomas. Science.Vol.218.p.1319-1321.
- CROSS, M., DEXTER, TM.1991. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. Cell. Vol.64(2).p.271-80
- CULLEN B.R., LOMEDICO P.T and JU G.1984. Transcriptional interference in avian retroviruses--implications for the promoter insertion model of leukaemogenesis. Nature. Vol.307.p.241-245
- DENHARDT, D.T.1966. A Membrane Filter Technique for the Detection of Complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol 23.p.641-646.
- CULLEN BR.1992. Mechanisms of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. Microbiological reviews.Vol.56.p.375-394.

- DENG Y.Y., HUANG Z.X., ZHOU C.J., WANG J.W., YOU Y., SONG Z.Q., XIANG M.M., ZHONG B.Y., HAO F. 2005. Gene profiling involved in immature CD4+T lymphocyte responsible for systemic lupus erythematosus. *Molecular Immunology*. Vol.43. p.1497-1507.
- DENICOURT C., KOZAK C.A., RASSART E. 2003. *Gris 1*, a new common integration site in Graffi murine leukemia virus-induced leukemias: overexpression of a truncated cyclin D2 due to alternative splicing. *J. Virol.* Vol.77. p.37-44.
- DENICOURT C., EDOUARD E. and RASSART E. 1999. Oncogene activation in myeloid leukemias by Graffi Murine Leukemia Virus Proviral Integration. *Journal of Virology*. Vol.73. p.4439-4442
- DEREK C. RADISKY AND MINA J. BISSEL 2004. Respect Thy Neighbor! .*Science*. Vol.303. p.775-777.
- DESGROSELLERS L., JOLICOEUR P. 1984. The tandem direct repeats within the long terminal repeat of murine leukemia viruses are the primary determinant of their leukemogenic potential. *J. Virol.* Vol.52. p.954-952
- 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.
- DONG O.M., MA L.J., ZHANG G.B. , WU Y.F., SHEN J.Y. , CHEN, CHEN Y.J., PU X.K., HANG S.Y. , et ZHANG X.G. 2005. Cloning, Structural Organization and Chromosomal Mapping of Rat Costimulatory Molecule 4-1BBL. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. Vol 37(10). p.694-701
- DORSAM ST., FERRELL CM., DORSAM DP., DERYNCK MK., VIJAPURKAR U., KHODABAKHSH D., PAU B., BERNSTEIN H., HAQQ CM., LARGMAN C., AND LAWRENCE HJ., The transcriptome of the leukemogenic homeoprotein HOXA9 in human hematopoietic cells. 2004. *Blood*. Vol. 103 (5). p. 1676-1684.
- DUDLEY JP, MERTZ JA, RAJAN L, LOZANO M, BROUSSARD DR. 2002. What retroviruses teach us about the involvement of *c-Myc* in leukemias and lymphomas. *Leukemia*. Vol.16. p. 1086-1098.
- DUDLEY JP. 2003. Tag, you're hit: retroviral insertions identify genes involved in cancer. *Trends in Molecular Medicine*. Vol.9(2). p.43-45

- EISBACHER M., HOLMES ML., NEWTON A., HOGG PJ., KHACHIGIAN L M., CROSSLEY M., CHONG BH. 2003. Protein-Protein Interaction between Fli-1 and GATA-1 Mediates Synergistic Expression of Megakaryocyte-Specific Genes through Cooperative DNA Binding. *Molecular and Cellular Biology*. Vol.23 (10). p. 3427-3441
- ERKELAND, S. J., M. VALKHOF, C. HEIJMANS-ANTONISSEN, R. DELWEL, P. J. VALK, M. H. HERMANS, and I. P. TOUW. 2003. The gene encoding the transcriptional regulator Yin Yang 1(YY1) is a myeloid transforming gene interfering with neutrophilic differentiation. *Blood*. Vol.101.p.1111–1117.
- ERKELAND, STEFAN J., VALKHOF MARIJKE., HEIJMANS-ANTONISSEN CLAUDIA., VANHOVEN-BEIJEN ANTOINETTE., DELWEL RUUD., HERMANS MIRJAM H.A., and TOUW IVO P.2004. Large Scale Identification of Disease Genes Involved in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Virology*. Vol.78(4).p.1971-1980.
- FAN H.1997. Leukemogenesis by Moloney Murine Leukemia Virus: A multistep process. *Trends Microbiol*. Vol.5.p.74-82
- GISSELBRECHT S. 2003. Oncogènes et leucémies: Historique et perspectives. *Medecine/Sciences*. Vol.19.p.201-10.
- GRAFFI A.1957. Chloroleukemia in mice. *Ann NY Acad Sci*. Vol.68.p.540-558
- GUDKOV AV, KAZAROV AR, THIMMAPAYA R, AXENOVICH SA, MAZO IA, RONINSON IB.1994. Cloning mammalian genes by expression selection of genetic suppressor elements: association of kinesin with drug resistance and cell immortalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol.91(9).p.3744-8.
- GUILBAULT B; KAY RJ.2004. RasGRP1 sensitizes an immature B cell line to antigen receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*. Vol.279(19).p.19523-30.
- HALLIER M., LERGA A., BARNACHE S, TAVITIAN A., AND MOREAU-GACHELIN F.,1998. The Transcription Factor Spi-1/PU.1 Interacts with the Potential Splicing Factor TLS. *J Biol Chem*, Vol. 273 (9).p.4838-4842
- HANAHAN D., WEINBERG R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. Vol.100.p.57-70.
- 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.
- IHLE JN, MORISHITA K, MATSUGI T, BARTHOLOMEW C.1990. Insertional mutagenesis and transformation of hematopoietic stem cells. *Prog Clin Biol Res*. Vol.352.p.329-37.

- JOLICOEUR P., DESGROSEILLERS L., KOZAK C., LEMAY G., RASSART E., VILLEMUR R., VILLENEUVE L. 1988. Utilisation des retrovirus pour comprendre les mecanismes moleculaires du cancer. L'union Medical du Canada. p.93-96
- JONKER, J., AND A. BERNIS. 1996. Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol.1287. p.29-57
- KERKHOFF, E., AND E. B. ZIFF. 1995. Cyclin D2 and Ha-Ras transformed rat embryo fibroblasts exhibit a novel deregulation of cell size control and early S phase arrest in low serum. *EMBO J.* Vol.14. p.1892-1903.
- KLEMSZ MJ, MAKI RA, PAPAYANNOPOULOU T, MOORE J AND HROMAS R. 1993. J. Characterization of the ets oncogene family member, fli-1. *Biol.Chem.* Vol.268. p.5769-5773.
- KOHLER M., BAUKNECHT T., GRIMM M., BIRMELIN G., KOMMOSS F., WAGNER E. 1992. Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in human ovarian carcinomas. *Eur. J. Cancer.* Vol. 28A: p.1432-1437.
- KUNG H.J., BOERKOEL C., CARTER TH. 1991. Retroviral mutagenesis of cellular oncogenes: a review with insights into mechanisms of insertional activation. *Curr. Top. Microbiol Immunol.* Vol.171. p.1-25
- LAHORTIGA, I, AGIRRE, X, BELLONI, E, VAZQUEZ, I, LARRAYOZ, M J, GASPARINI, P, COCO, F L, PELICCI, P G, CALASANZ, M J, ODERO, M.D. 2004. Molecular characterization of a t(1;3)(p36;q21) in a patient with MDS. MEL1 is widely expressed in normal tissues, including bone marrow, and it is not overexpressed in the t(1;3) cells. *Oncogene.* Vol.23(1). p.311-6.
- LAWRENCE HJ., HELGASON CD., SAUVAGEAU G., FONG S, IZON DJ, HUMPHRIES KR., AND LARGMAN C., 1997. Mice Bearing a Targeted Interruption of the Homeobox Gene *HOXA9* Have Defects in Myeloid, Erythroid, and Lymphoid Hematopoiesis. *Blood.* Vol. 89(6). p.1922-1930.
- LEE CR, CERVI D, TRUONG AH, LI YJ, SARKAR A, BEN-DAVID Y. 2003. Friend virus-induced erythroleukemias: a unique and well-defined mouse model for the development of leukemia. *Anticancer Res.* Vol.23(3A). p.2159-66.
- LEGOUY E, DEPINHO R, ZIMMERMAN D, FERRIER P, COLLUM R. 1987. Structure and expression of myc-family genes. *Nuclear oncogenes.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. p 144-151.
- LUND, A.H. TURNER G, TRUBETSKOY A, VERHOEVEN E, WIENTJENS E, HULSMAN D, RUSSELL R, DEPINHO RA, LENZ J, VAN LOHUIZEN M. 2002. Genome-wide retroviral insertional tagging of genes involved in cancer in Cdkn2a-deficient mice. *Nat. Genet.* Vol.32. p.160-165

- MCCORMACK M.P., FORSTER A., DRYNAN L., PANNELL R., ET RABBITS T.H.2003. The *LMO2* T-Cell Oncogene Is Activated via Chromosomal Translocations or Retroviral Insertion during Gene Therapy but Has No Mandatory Role in Normal T-Cell Development. *Molecular and cellular biology*. Vol. 23 (24).p. 9003–9013.
- MIKKERS, H., ALLEN, J., KNIPSCHER, P., ROMEYN, L., HART, A., VINK E., BERNIS A. 2002. High-Throughput Retroviral Tagging to Identify Components of Specific Signaling Pathways in Cancer. *Nature Genetics*.Vol.32 (1). p.153-159.
- MOCHIZUKI, N, SHIMIZU, S, NAGASAWA, T, TANAKA, H, TANIWAKI, M, YOKOTA, J, MORISHITA, K. 2000. A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVI1 gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. *Blood*. Vol.96(9).p. 3209-14.
- MOORE S.D.,HERRICK, S.R.,INCE, T.A., KLEINMAN, M.S.,CIN P.D., MORTON, C.C.,QUADEI B.J. 1994. Uterine leiomyomata with t(10;17) disrupt the histone acetyltransferase MORF. *Cancer Research*.Vol.64(16) p.5570–5577.
- MORISHITA K, PARGANAS E, BARTHOLOMEW C, SACCHI N, VALENTINE MB,RAIMONDISC, LeBEAU MM, IHLE JN.1990. The human Evi-1 gene is located on chromosome 3q24-q28 but is not rearranged in three cases of acute nonlymphocytic leukemias containing t(3;5) (q25;q34) translocations. *Oncogene Res*. Vol. 5.p.221-231.
- MURATI A., ADÉLAIDE J., MOZZICONACCI M.J., POPOVICI C., CARBUCCIA N.,LETESSIER A., BIRG F., BIRNBAUM D., CHAFANET M POPOVICI C.,CARBUCCIA N., LETESSIER A.,BIRG F., BIRNBAUM D., CHAFANET M. 2004. Variant MYST4-CBP gene fusion in a t(10;16) acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*.Vol.125.p.601–604
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- NAVARRO C.C.2001. Inhibición de las etapas tempranas del ciclo replicativo del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), mecanismo de acción y posible estrategia terapéutica. Memoria de la tesis para optar el título de Doctor en ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Barcelona.Bellaterra, marzo, 2001
- NEW ENGLAND BIOLABS INC.2002. New England Biolabs Inc.2005-06 Catalog & Technical Reference. Ontario, Mississauga. <http://www.neb.com>
- OTT, D.,KELLER, J., and REIN, A. 1994. 10A1 MuLV induces a murine leukemia that expresses hematopoietic stem cell markers by a mechanism that includes fli-1 integration. *Virology*.Vol.205(2).p.563-8.

- PEDERSEN S.F. and DUCH M. 2001. Retroviral Replication. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group.p.1-7.
- PERRY A. 2001. Oncogenes. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group.p.1-8.
- PIMENTEL, E. 1985. Oncogenes and human cancer.Cancer Genet Cytogenet. Vol.14 (3-4).p.347-68.
- RADTKE F AND RAJ K. 2003. The role of notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?. Nature reviews cancer.Vol.3.p.756-767.
- RADTKE F, WILSON A, MANCINI S JC AND MCDONALD H R. 2004. Notch regulation of lymphocyte development and function. Nature Immunology.Vol.5.(3).p.247-253.
- RASSART E.,HOUDE J.,DENICOURT C.,RU M.,BARAT C., EDOUARD E.,POLIQUIN L., and BERGERON D.1996. Molecular analysis and characterization of two myeloid leukemia murine retroviruses.Curr.Topics Microbiol.Immunol. Vol 211.p.201-210
- RASSART E., 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
- RING H Z., VAMEGHI-MEYERS V.,NIKOLIC J.M., MIN H.,BLACK D.L.,FRANCKE U. 1999. Mapping of the KHSRP gene to a region of conserved synteny of human chromosome 19p13.3 and mouse chromosome 17.Genomics.Vol 56 (3). p.350-352.
- RONINSON IB., GUDKOV AV., HOLZMAYER TA., KIRSCHLING DJ., KAZAROV AR., ZELNICK CR, MAZO IA., AXENOVICH S. ET THIMMAPAYA R. 1995. Genetic suppressor elements: new tools for molecular oncology--thirteenth Cornelius P. Rhoads Memorial Award Lecture. Cancer Research. Vol 55(18).p.4023-4028.
- RU M., HUSTIK,C and RASSART E.1993. Graffi murine leukemia virus:molecular cloning and characterization of the myeloid leukemia inducing agent.J.Virol.Vol.67.p.4722-4731.
- RUSSELL M, THOMPSON F, SPIER C, TAETLE R. 1993. Expression of the EVI1 gene in chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Leukemia. Vol.7.p.1654-1657.
- SAMBROOK J.,RUSSELL,D.W.2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3<sup>e</sup> édition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SAUVAGEAU G, LANSDORP PM, EAVES CJ, HOGGE DE, DRAGOWSKA WH, REID DS, LARGMAN C, LAWRENCE HJ, HUMPHRIES RK.1994. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34<sup>+</sup> subpopulations of human bone marrow cells. Proc Natl Acad Sci U S A..Vol.91.p. 12223-12227.

- SCHULER, MARTIN, BOSSY-WETZEL, ELLA, GOLDENSTEIN, JOSHUA, FITZGERALD, PATRICK, AND DOUGLAS GREEN. 2000. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome C release. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 275(10).p. 7337-42.
- SCOTT C. KOGAN , JERROLD M. WARD, MIRIAM R. ANVER, JULES J. BERMAN, JULES J. BERMAN, CORY BRAYTON, ROBERT D. CARDIFF, JOHN S. CARTER, SHERRI DE CORONADO, JAMES R. DOWNING, TORGNY N. FREDRICKSON, DIANE C. HAINES, ALAN W. HARRIS, NANCY LEE HARRIS, HIROSHI HIAI, ELAINE S. JAFFE, LAN C. M. MACLENNAN, PIER PAOLO PANDOLFI, PAUL K. PATTENGAL, ARCHIBAL S. PERKINS, R. MARK SIMPSON, MARK S. TUTTLE, JOHANNE F. WONG, AND HERBERT C. MRSEIII (2002). Bethesda proposals for classification of non lymphoid hematopoietic neoplasms in mice. *Blood*. Vol.100.p. 238-245.
- SHANNON K. 1995. The Ras signaling pathway and the molecular basis of myeloid leukemogenesis. *Curr. Top. In Hematol*. Vol.2.p. 305-308.
- SHARP, P.A., BERK,A.J., BERGET,S.M. 1980. Transcriptional Maps of Adenovirus. *Methods Enzymol*. Vol 65.p.750-768.
- SITBON M., DENESBRE C., DARDALHON V.,BATTINI J.L., MOUGEL.M. 2001. Les retrovirus leucémogènes murins: pathogènes, gènes et outils génétiques. *Virology*. Vol.5.p.265-293.
- SODROSKI JG, GOH WC, ROSEN CA, SALAHUDDIN SZ, ALDOVINI A, FRANCHINI G, WONG-STAAAL F, GALLO RC, SUGAMURA K, HINUMA Y,. 1985. Trans-Activation of the human T-cell leukemia virus long terminal repeat correlates with expression of the x-lor protein. *J Virol*. Vol.55(3).p.831-5.
- STARCK J., DOUBEIKOVSKI A., SARRAZIN S.,GONNET C.,RAO G, SKOULTCHI A.,GODET J.,DUSANTER-FOURT I., AND MORLE F. 1999. Spi-1/PU.1 Is a Positive Regulator of the Fli-1 Gene Involved in Inhibition of Erythroid Differentiation in Friend Erythroleukemic Cell Lines. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 19 (1).p. 121-135.
- SUZUKI, T. SHEN H, AKAGI K, MORSE HC, MALLEY JD, NAIMAN DQ, JENKINS N.A, COPELAND NG. 2002. New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. *Nat. Genet*. Vol.32. p.166-174.
- THE LEUKEMIA AND LYMPHOMA SOCIETY. 2004. Leukemia Facts & Statistics, Leukemia, Lymphoma, Myeloma, Facts 2004, In Press. <http://www.leukemia-lymphoma.org/>
- THE WELCOME TRUST SANGER INSTITUTE. The European Bioinformatics Institute (EBI). 2004. Project Ensembl. <http://www.ensembl.org>.

- THOMAS J. 2001. HMG1 and 2: Architectural DNA-binding proteins. *Biochemical society transactions*. Vol.29. p.395-401
- TSICHLIS, P.N and LAZO, P.A.1991. Virus-host interactions and the pathogenesis of murine and human oncogenic retroviruses.*Current Topics in Microbiology and Immunology*.Vol.171.p.95-171.
- VAN HOOFF A., LENNERTZ P., and PARKER R.2000. Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeas. *EMBO J*.Vol19(6):1357-1365.
- VAN LOHUIZEN, M. and BERNS,A. 1990. Tumorigenesis by slow-transforming retroviruses-an update.*Biochim.Biophys.Acta*.Vol.1032.p.213-235
- VOISIN V., BARAT C., HOANG T., RASSART E., 2006. Novel insights into the pathogenesis of the Graffi Murine Leukemia Retrovirus. *Journal of Virology*.Vol.80 (8).p.4026-4037.
- WALLACE-BRODEUR, R.R. AND LOVE, S.W. 1999. Clinical Implications of p53 mutations. *Cellular and Molecular Life Sciences*.Vol 54.p. 64-75.
- WEIDHAAS J.B.,ANGELICHIO E.Y.,FENNER S., and COFFIN J.M.,2000. Relationship between retroviral DNA integration and gene expression. *Journal of Virology*.p.8382-8389.
- WOLFF, I. 1997. Contribution of oncogenes and tumor suppressor genes to myeloid leukemia. *Biochim Biophys. Acta*.Vol.1332.p.f67-f104
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. CLASSIFICATION OF NEOPLASMS DISEASES OF THE HEMATOPOIETIC AND LYMPHOID TISSUES CDRAFT(1997). *American Journal of Surgical Pathology*.Vol 21 (1).p. 114-121.  
[http://www.dartmouth.edu/~nlevuy/WHO\\_classification.html](http://www.dartmouth.edu/~nlevuy/WHO_classification.html)
- XI ZF, RUSSELL M, WOODWARD S, THOMPSON F, WAGNER L AND TAETLE R.1997. Expression of the Zn finger gene, EVI-1, in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*.Vol.11.p. 212-220.
- YAMADA Y.,PANNELL R.,FORSTER A., ET RABBITTS T.H.2000. The oncogenic LIM-only transcription factor Lmo2 regulates angiogenesis but not vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*.Vol.97(1).p.320-324.
- YAO YL, DUPONT BR, GHOSH S, FANG Y, LEACH RJ, SETO E.. Cloning, chromosomal localization and promoter analysis of the human transcription factor YY1.1998. *Nucleic Acids Res*.Vol.26.p.3776-3783