

Année 2008



**Etude bibliographique de l'implication des *Retrovirus*
endogènes chez les mammifères et pathologies associées.**

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

le.....

par

Baptiste Jacques Philippe MULOT

Né le 06 Juin 1978 à Domont (Val-d'Oise)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Dr Sophie ALCON-LE PODER

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Assesseur : Dr Pascal ARNE

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard
Professeurs honoraires: MM. BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques, CLERC Bernard

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISSON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

<p>-UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur* Mme ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henri, Maître de conférences</p> <p>-UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur</p> <p>-UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. BRUGERE Henri, Professeur Mme COMBRISSON Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences</p> <p>-UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * M. TISSIER Renaud, Maître de conférences M. PERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p>-UNITE : BIOCHIMIE M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences</p>	<p>- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences</p> <p>-DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur</p> <p>-UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Mlle ABITBOL Marie, Maître de conférences</p> <p>-DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p> <p>-DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Ingénieur Professeur agrégé certifié</p>
---	--

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Maître de conférences

<p>- UNITE DE MEDECINE M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Melle PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel</p> <p>-UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mlle CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Melle DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)</p>	<p>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mme RAVARY Béangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE RADIOLOGIE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel</p> <p>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE Mlle CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur M. POLACK Bruno, Maître de conférences* M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel Mlle HALOS Lénéig, Maître de conférences</p> <p>-UNITE DE NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur * M. GRANDJEAN Dominique, Professeur</p>
--	--

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences

<p>-UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences</p> <p>-UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : BIostatISTIQUES M. SANAA Moez, Maître de conférences</p>	<p>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAII ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP) M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences</p>
--	--

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique * Responsable de l'Unité Mme GIRAUDET Aude Clinique équine, Ingénieur de recherche

A Monsieur le Professeur

Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

A Madame Sophie Alcon-Le Poder

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, qui a dirigé ce travail.

Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance, pour ses compétences et sa disponibilité.

A Monsieur Pascal Arné

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, qui a accepté de juger cette thèse et de faire partie du jury,

Qu'il trouve ici mes sincères remerciements.

A mon grand-père Papy, le docteur Jacques Déchy,

Parce que, même s'il est parti trop tôt pour me voir réaliser mon rêve, il est celui qui m'a guidé tout au long du chemin. Ce travail lui est dédié.

A ma marraine Chantal,

Ma deuxième maman, je sais que malgré tout elle n'est jamais loin de moi. J'aime à penser qu'elle aurait été fière de moi aujourd'hui.

A mes parents,

Pour vous remercier de ce que je suis aujourd'hui, un peu grâce à moi et beaucoup grâce à vous. Parce que ce travail c'est aussi votre réussite. Pour vous dire tout simplement que je vous aime.

A Flavie, à Quentin,

Parce que l'enfance aurait été moins drôle sans les deux petits "jumeaux" et que c'est toujours plus agréable d'avoir quelqu'un avec qui se demander ce qu'on va acheter pour les anniversaires et noëls. Parce que, malgré tout ce qui peut nous séparer ou nous rapprocher, je sais que nous serons toujours là les uns pour les autres.

A ma grand-mère Manou,

Pour m'avoir offert le plus bel endroit sur terre et le seul où je me sente vraiment chez moi: votre Val-André.

A mes grands-parents Mamie et Papus,

Parce que je ne serais pas arrivé jusque là sans vous. Vous êtes les grands-parents petits plats et câlins comme on les aime et il fait toujours bon vivre chez vous, en particulier quand on cherche un oasis de tranquillité.

A ma filleule Juliette,

Ce peu d'années qui nous séparent ont créé un lien fort. Sache que même si la vie est faite de doutes et de craintes, et quelque soit le temps nécessaire pour y arriver, il y a toujours de belles choses au bout. Je serais toujours fier de toi.

A mon filleul Alphonse,

Parce que malgré la chanson, je veillerais à ce que la vie soit la plus belle possible. Parce que te voir grandir est un émerveillement permanent.

A toute la famille Déchy,

Chacun a participé à sa manière à un moment de ma vie et j'espère bien que les grandes réunions du clan, même si elles impressionnent toujours les pièces rapportées, continueront d'avoir lieu. On compte sur toi tonton Hub.

Au Docteur Hubert Déchy,

Il en fallait un à chaque génération, c'est tombé sur moi. Merci pour ton soutien permanent et pour ta motivation. Tu restes l'exemple que j'essaie de suivre.

A toute la famille "à la mode de Bretagne",

Les liens familiaux dépassent parfois les liens du sang.

A ceux du 28 Avril,

A Alix, parce que tu es ma sœur de coeur, "celle que j'ai choisie, celle que je ressens". Et que depuis les bancs des cours de latin jusqu'aux Oscar, après avoir traversé vents et tempêtes, tu es celle qui me connaît le mieux.

A Brice, une chose que j'ai apprise hors des salles de cours est à quel point l'amitié peut être forte et intense. A Christelle, pour être à la fois une amie et une grande soeur. Merci à vous d'être là. Merci de partager tant de choses. Vous faites partie de ma famille.

A Caroline, que ce soit à Paris, Londres ou New York, la distance n'a jamais pu briser notre amitié. Tu es ma Pamela. Et des quatre coins du globe, nous nous retrouverons de toute façon toujours à la Rotonde.

A Julien, depuis la prépa, nos routes n'ont cessé de se suivre, les hauts et bas de la vie ont créé des liens qui, je l'espère, ne se déferont jamais. Tu fais partie de moi comme toute ta petite famille, Elsa, Mathias et Ronan.

A mes amis, ma famille d'adoption: Alice, Céline, Claire, Damien, David, Dorothée, Emilie H, Emilie L, Emmanuelle, Erwann, Gilles, Gwendal, Hélène, Laetitia, Marie C, Marie E, Marie-Hélène, Matthieu, Nicolas, Paul, Pierre, Robert, Romain, Sophie, Spyros, Thomas, Vincent, Xavier, ma nouvelle famille beauvalienne et tous les autres. Vous savez que vous comptez tous, chacun à sa manière et pour des raisons différentes. Vous occupez maintenant, et depuis longtemps pour certains, une place importante dans ma vie.

A Romain. Merci de partager ton trésor avec moi et pour tout ce que tu m'as appris. Merci pour cette collaboration forte et les belles choses qui restent à venir.

A Mme Françoise Delord et Rodolphe Delord. Merci de m'avoir accueilli au sein de votre famille.

Aux cliniques des Acacias, de la République, de Villeparisis, du Dr Klein et au Wildlife Safari. En particulier aux Drs Hernandez, Kaiser, Lacaze, LeSann, McClean, Poisson, Quinton et Schamberger. Vous avez fait partie intégrante de ma formation professionnelle et, plus que ça, vous m'avez aidé à me construire.

Table des matières

TABLE DES MATIERES	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
TABLE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION	11
PREMIER CHAPITRE: LES <i>RETROVIRUS</i> ENDOGENES	13
I. LES VIRUS : GENERALITES	15
A. <i>Structure des particules virales</i>	16
B. <i>Caractéristiques structurales des virions</i>	17
C. <i>Classification</i>	18
II. LES <i>RETROVIRUS</i>	20
A. <i>Généralités</i>	20
B. <i>Cycle réplcatif</i>	22
1. Etape 1 : rôle du complexe glycoprotéique externe SU	22
2. Etape 2 : rôle de la glycoprotéine transmembranaire TM	22
3. Etape 3 : rôle de la protéine reverse transcriptase RT	22
4. Etape 4 : entrée dans le noyau cellulaire	22
5. Etape 5 : rôle de la protéine Intégrase IN.....	23
6. Etape 6 : transcription et traduction par les protéines cellulaires	23
7. Etape 7 : rôle majeur de la protéine <i>gag</i>	23
C. <i>Propriétés oncogènes</i>	25
D. <i>Historique de la découverte des Retrovirus</i>	28
E. <i>Classification</i>	29
III. LES <i>RETROVIRUS</i> ENDOGENES.....	32
A. <i>Historique</i>	33
B. <i>Etude des Retrovirus endogènes (ERV)</i>	34
C. <i>Intégration et évolution</i>	35
D. <i>Implication de la présence des ERV</i>	36
1. Effet « passif »	36
2. Effet « actif »	37

DEUXIEME CHAPITRE: LES <i>RETROVIRUS</i> ENDOGENES DE LA LEUCEMIE MURINE	43
I. LES <i>RETROVIRUS</i> ENDOGENES DE LA LEUCEMIE MURINE	45
A. <i>Historique et généralités</i>	45
B. <i>Classification</i>	46
1. Virus écotropes	46
2. Virus xénotropes.....	47
3. Virus amphotropes.....	47
4. Virus polytropes et associés.....	47
C. <i>Régulation</i>	48
II. MUTATIONS DU GENOME MURIN DUES A LA PRESENCE DE PROVIRUS	49
III. VIRUS POLYTROPES ET MINK CELL FOCUS-FORMING VIRUS.....	50
A. <i>Présentation des MCF</i>	50
B. <i>Formation des MCF par recombinaison</i>	51
C. <i>Pouvoir oncogène des MCF</i>	55
IV. LE COMPLEXE VIRAL FRIEND (FRIEND VIRUS COMPLEX FVC).....	56
V. MALADIES AUTO-IMMUNES ASSOCIEES A L'EXPRESSION DES VIRUS ENDOGENES	59
VI. RESISTANCE AUX INFECTIONS PAR MuLV ET DERIVES.....	59
A. <i>Résistance immunitaire</i>	60
B. <i>Altération des récepteurs cellulaires de surface</i>	60
C. <i>Compétition au niveau des récepteurs</i>	61
1. Résistance par le gène Fv-4	61
2. Résistance par le gène Rmcf	63
3. Résistance par le gène Rmcf2	63
D. <i>Blocage du cycle réplicatif: résistance par le gène Fv-1</i>	63
E. <i>Cas particulier: intervention au sein du processus oncogène du virus</i>	66
VII. CONCLUSION	67
TROISIEME CHAPITRE: VIRUS DES TUMEURS MAMMAIRES MURINES	69
I. GENERALITES	71
II. REGULATION DE L'EXPRESSION DE MMTV	74
A. <i>Régulation par les phénomènes de méthylation</i>	74
B. <i>Régulation hormonale</i>	77
III. NOTION DE SUPER-ANTIGENE (SAG)	83
IV. MECANISME D'INFECTION PAR MMTV EXOGENE	86
V. MECANISMES DE L'ONCOGENESE	89
A. <i>Action directe: activation par insertion</i>	89
B. <i>Action directe: implication du domaine env</i>	91
C. <i>Action directe: implication du domaine gag</i>	91
D. <i>Utilisation de caractéristiques propres à la cellule hôte</i>	92

VI. MULTIPLICATION SPONTANEE DES SEQUENCES ENDOGENES DANS LES CELLULES TUMORALES	93
VII. PHENOMENES DE RESISTANCE	94
VIII. INDUCTION D'UNE PERMISSIVITE	95
IX. RECOMBINAISSONS ENTRE FORMES EXOGENE ET ENDOGENE.....	95
X. CONCLUSION.....	99
QUATRIEME CHAPITRE: VIRUS DE LA LEUCEMIE FELINE	101
I. GENERALITES	103
A. <i>Etiologie</i>	103
B. <i>Répartition</i>	103
C. <i>Transmission</i>	103
D. <i>Pathogénèse</i>	104
E. <i>Aspects cliniques</i>	104
F. <i>Diagnostic</i>	105
G. <i>Traitement</i>	105
H. <i>Prévention</i>	105
II. ORIGINE ET PHYLOGENIE DU ENFeLV	106
III. ABSENCE D'EFFET PATHOGENE DE ENFeLV	109
IV. QUATRE SOUS-GROUPES EMERGEANT D'UNE SEULE FORME PROVIRALE	110
V. SPECIFICITE DES RECEPTEURS POUR CHAQUE RECOMBINANT	111
A. <i>Sous-groupe A</i>	112
B. <i>Sous-groupe B</i>	112
C. <i>Sous-groupe C</i>	113
D. <i>Sous-groupe T</i>	113
VI. RESISTANCE AUX INFECTIONS PAR FeLV-B SEUL INDUITES PAR ENFeLV	114
VII. INHIBITION INITIEE PAR LE FeLV-B DE L'INFECTION PAR LE FeLV-A	116
VIII. IMPLICATION DE ENFeLV DANS LA PATHOGENICITE DU FeLV-T	117
IX. CONCLUSION	120
CINQUIEME CHAPITRE: JAASGIEKTE SHEEP RETROVIRUS	121
I. GENERALITES SUR L'ADENOMATOSE PULMONAIRE DES OVINS OU JAAGSIEKTE	123
II. ORIGINE ET DISTRIBUTION DE ENJSRV	125
A. <i>Distribution du enJSRV au sein des mammifères</i>	125
B. <i>Distribution de enJSRV au sein du génome ovin</i>	126
C. <i>Variation du génome et du tropisme d'enJSRV et exJSRV</i>	126
III. ONCOGENESE ET IMPLICATION DU ENJSRV	127
A. <i>L'exJSRV est associé aux tumeurs pulmonaires des ovins</i>	127
B. <i>Implication du enJSRV dans l'oncogénèse</i>	127
C. <i>Mécanisme de l'oncogénèse induite par exJSRV</i>	130

IV. L'ENJSRV : UNE PROTECTION NATURELLE CONTRE L'EXJSRV	131
A. Blocage de l'entrée du exJSRV dans la cellule.....	131
1. L'exJSRV et l'enJSRV utilisent le même récepteur	131
2. L'enJSRV bloque l'entrée du exJSRV dans les cellules où il est présent.....	131
3. Conclusion.....	131
B. Blocage du cycle réplcatif du exJSRV	132
1. L'enJSRV ne peut pas libérer de particules virales dans le milieu extracellulaire.....	132
2. L'enJSRV bloque la libération cellulaire du exJSRV.....	132
C. Conclusion.....	134
V. L'ENJSRV PERMET UNE IMMUNOTOLERANCE ENVERS L'EXJSRV	135
A. Une réponse immunitaire absente	135
B. L'hypothèse d'une transformation des cellules immunitaires par l'exJSRV.....	136
C. Une immunotolérance induite par enJSRV.....	137
D. Discussion	138
VI. ROLE DU ENJSRV DANS LE PROCESSUS DE MORPHOGENESE PLACENTAIRE	138
A. Expression majeure de enJSRV au sein du tractus génital.....	138
B. Placentation chez les ovins.....	139
C. Corrélation entre placentation et expression de enJSRV et HYAL-2	140
D. Mise en évidence de l'association entre l'enJSRV et la placentation.....	143
E. Interactions hormonales	144
VII. CONCLUSION	147
SIXIEME CHAPITRE: RETROVIRUS ENDOGENE DU KOALA – UN MODELE D'ENDOGENEISATION	
RECENTE.....	149
I. KOALA	151
A. Histoire du koala	151
B. Classification	152
II. LA DECOUVERTE D'UN RETROVIRUS	152
III. DU STATUT D'EXOGENE A ENDOGENE.....	155
IV. ORIGINE DU KORV	158
V. IMPLICATION CLINIQUE DE LA PRESENCE DU KORV	163
A. Corrélation entre charge virale et statut médical.....	163
B. Propriétés immunosuppressives.....	164
C. Sélection et variété des espèces hôtes.....	166
D. Perspectives de recherche thérapeutique.....	167
VI. CONCLUSION	170
CONCLUSION	171
BIBLIOGRAPHIE	175

Table des illustrations

FIGURE 1. COUPE SCHEMATIQUE D'UNE PARTICULE VIRALE.	16
FIGURE 2. ORGANISATION DES DIFFERENTS <i>RETROVIRUS</i>	21
FIGURE 3. CYCLE DE REPLICATION RETROVIRAL.	24
FIGURE 4. COMPARAISON DES FORMES ARN ET ADN DU GENOME VIRAL.	25
FIGURE 5. PHYLOGENIE DES <i>RETROVIRUS</i>	31
FIGURE 6. HERV COMME REGULATEURS DE L'EXPRESSION DU GENOME HOTE.	40
FIGURE 7. MODELE PROPOSE POUR LA GENERATION DE VIRUS POLYTROPES DE CLASSE I.	53
FIGURE 8. LE COMPLEXE RETROVIRAL FRIEND ET SON MECANISME D'INDUCTION DE LEUCEMIE.	58
FIGURE 9. SCHEMA DU MECANISME D'INTERFERENCE FV4 SUR L'INFECTION PAR MULV.	62
FIGURE 10. SCHEMA DES TROIS MECANISMES D'INTERFERENCE POSSIBLES INDUITS PAR L'EXPRESSION DE FV-1.	65
FIGURE 11. ORGANISATION NUCLEOSOMIQUE DU LTR DE MMTV.	78
FIGURE 12. RECRUTEMENT DU COMPLEXE BRG1 POUR L'ACTIVATION PAR LES GLUCOCORTICOÏDES DU PROMOTEUR DE MMTV.	80
FIGURE 13. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA LOCALISATION DES ELEMENTS REGULATEURS DANS LE LTR DE MMTV.	82
FIGURE 14. MODELE DE L'INTERACTION TRIMOLECULAIRE IMPLIQUANT LE TCR, LE CMH DE CLASSE II ET SOIT UN ANTIGENE PEPTIDIQUE CLASSIQUE (A GAUCHE) SOIT UN SUPER-ANTIGENE (A DROITE).	84
FIGURE 15. EFFETS DE LA SUPPRESSION DES CELLULES DENDRITIQUES (CD11c+) SUR L'ACTIVATION ET L'INFECTION DES CELLULES B ET T DEPENDANTES DU EXMMTV.	88
FIGURE 16. ANALYSE DE LA STRUCTURE DE RECOMBINANTS DE MMTV NOUVELLEMENT INTEGRES TROUVES DANS LES TUMEURS DES GLANDES MAMMAIRES DES SOURIS C3H/HE ^N INFECTEES PAR EXMMTV.	97
FIGURE 17. MODELE DE PRODUCTION D'UN RECOMBINANT DE MMTV TROUVE DANS LES TUMEURS MAMMAIRES. ..	98
FIGURE 18. CARTOGRAPHIE CHROMOSOMIQUE RESUMANT LES POSITIONS CHROMOSOMIQUES DES COPIES DE ENFeLV DETERMINEES PAR LA TECHNIQUE FISH CHEZ QUATRE CHATS DOMESTIQUES.	108
FIGURE 19. RESUME DE LA SPECIFICITE POUR LES RECEPTEURS PIT DES <i>RETROVIRUS</i> DE TYPE C FELIN, MURIN ET PRIMATE.	113
FIGURE 20. EXPRESSION DES SEQUENCES DU ENFeLV DANS DES LIGNEES CELLULAIRES DE LYMPHOME ET DES TISSUS LYMPHOÏDES SAINS FELINS.	115
FIGURE 21. MODELES DE DETERMINANTS DE ENV POUR LA SPECIFICITE VERS LES RECEPTEURS "CLASSIQUES" ET "NON CLASSIQUES".	118
FIGURE 22. STRUCTURE GENOMIQUE DES BETARETROVIRUS OVINS ENDOGENES ET EXOGENES.	129
FIGURE 23. BLOCAGES INDUITS PAR L'ENJSRV SUR LE CYCLE REPLICATIF DU JSRV.	135

FIGURE 24. HYPOTHESE SUR LE ROLE BIOLOGIQUE DE ENV ENJSRV ET HYAL-2 AU SEIN DE LA DIFFERENTIATION DU TROPHOBLASTE CHEZ LE MOUTON.....	142
FIGURE 25. EFFETS DU CYCLE OESTRAL ET DU DEBUT DE GESTATION SUR L'EXPRESSION DES ARNm DU ENJSRV AU SEIN DE L'ENDOMETRE OVIN.....	145
FIGURE 26. EFFETS DE LA PROGESTERONE SUR L'ACTIVITE DES LTR DE DIFFERENTES SOUCHES DU ENJSRV DANS DES TRANSFECTIONS UTILISANT DES CELLULES D'EPITHELIUM DE LA LUMIERE DE L'ENDOMETRE OVIN.....	146
FIGURE 27. MODELE PROPOSE POUR L'EVOLUTION DES BETARETROVIRUS CHEZ LE MOUTON.	148
FIGURE 28. ALIGNEMENT MULTIPLE D'UN ECHANTILLON REPRESENTATIF DE VIRUS LIES AU VIRUS DE LEUCEMIE MURINE (MLV) UTILISES DANS LES ETUDES PHYLOGENIQUES.....	154
FIGURE 29. HERITABILITE DES MODELES D'INSERTION DU KORV. MISE EN EVIDENCE D'UNE HERITABILITE DU RETROVIRUS.....	157
FIGURE 30. KORV COMPARE A D'AUTRES VIRUS LIES AU MURINE LEUKEMIA VIRUS.....	158
FIGURE 31. ARBRE PHYLOGENIQUE DE DIFFERENTS RETROVIRUS BASE SUR UNE REGION DE 280 ACIDES AMINES CODANT POUR LA REVERSE TRANSCRIPTASE ET LA PROTEASE RETROVIRALE.....	159
FIGURE 32. PREVALENCE DE KORV AU SEIN DES DIVERSES POPULATIONS DE KOALA.....	161
FIGURES 33. COMPARAISON DE LA CHARGE VIRALE ET DE L'ETAT MEDICAL DES ANIMAUX.	164
FIGURE 34. INFLUENCE DE PREPARATIONS PURIFIEES DU KORV ET MOCK SUR LA PRODUCTION DE IL-10.	165
FIGURE 35. COMPARAISON DES DOMAINES D'ENVELOPPE DE GALV ET KORV.....	166
FIGURE 36. ACTIVITE NEUTRALISANTE D'UN SERUM DE RAT EN COMPARAISON D'UN SERUM PRE-IMMUN.	168
FIGURE 37. SCHEMA RESUMANT LES DIFFERENTS ROLES DES RETROVIRUS ENDOGENES.....	173
TABLEAU 1. CRITERES DEFINISSANT LES ACIDES NUCLEIQUES VIRAUX.....	17
TABLEAU 2. CLASSIFICATION DES VIRUS.....	19
TABLEAU 3. HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE DES RETROVIRUS.....	28
TABLEAU 4. CLASSIFICATION DES RETROVIRUS.....	30
TABLEAU 5. HISTORIQUE DES DECOUVERTES DES RETROVIRUS ENDOGENES.	33
TABLEAU 6. RESUME DES METHYLATIONS DES GENES PROVIRAUX DE ENMMTV AU SEIN DE DIFFERENTS ORGANES.	75
TABLEAU 7. SPECIFICITES DE CHAINE Vb DES SUPER-ANTIGENES DE MMTV.	85
TABLEAU 8. RESULTATS DES ETUDES DE CO-INFECTION FELV-A/FELV-B.	116
TABLEAU 9. CLASSIFICATION CLASSIQUE.....	152
TABLEAU 10. INFECTION IN VIVO DE RATS AVEC TROIS SOURCES DIFFERENTES DE KORV.....	169

Table des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
Akv	<i>loci</i> contenant un provirus de MuLV chez les souris AKR
APO	adénomatose pulmonaire des ovins
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
BaEV	<i>Retrovirus</i> endogène du babouin
BAG	BRG1 associated factor (facteur associé à BRG1)
Bxv-1	provirus xénotrope participant à la formation des MCF
CA	capside
CAAT	courte séquence nucléotidique
CD4	cluster of differentiation 4 (marqueur de différenciation 4)
CD8	cluster of differentiation 8 (marqueur de différenciation 8)
ConA	Concavaline-A
CT	queue cytoplasmique
Cys-His	complexe cystidine-histadine
EcoRI	enzyme de restriction
enJS56A1	provirus de JSRV
enJS5F16	provirus de JSRV
ENTV	enzootic nasal tumour virus (virus des tumeurs nasales enzootiques)
<i>env</i>	domaine d'enveloppe
Epo-R	récepteur à érythropoïétine
ERV	endogenous <i>Retrovirus</i> (<i>Retrovirus</i> endogène)
F-MuLV/Fr-MuLV	Friend –MuLV (virus MuLV découvert par Friend)
Felix	FeLV infection « x-cessory » factor (facteur accessoire d'infection par FeLV)
FeLV en/ex	virus de la leucémie féline endogène/exogène
Fgf	fibroblast growth factor (facteur de croissance des fibroblastes)
FLVCR	protéine de membrane réceptrice de FeLV-C
Fv	<i>loci</i> du génome murin

FVC	Friend virus complex (complexe du virus Friend)
<i>gag</i>	group antigen
GaLV	gibbon ape leukaemia virus
gp21E	glycoprotéine d'enveloppe 21
gp70	glycoprotéine 70
GR	glucocorticoid receptor (récepteur aux glucocorticoïdes)
GRO	growth-related oncogene (oncogène lié à la croissance)
H1	histone 1
HIV	human immunodeficiency virus (virus de l'immunodéficience humaine)
HRE	hormone responsive element (élément réceptif aux hormones)
HTLV-BLV	Virus de la leucémie des cellules T humaine – virus de la leucémie bovine
HYAL-2	hyaluronoglucosaminidase 2
IFN	interféron
IgG	immunoglobuline G
IL-	interleukine
IN	intégrase
int	gène int
iPT	virus polytrophe intermédiaire
ITAM	immunoreceptor tyrosine - based activation motif (motif d'activation des immunorécepteurs à base de Tyrosine)
JSRV en/ex	<i>Retrovirus</i> Jaagsiekte ("maladie chassante") du mouton endogène/exogène
kb	kilobase
KoRV	<i>Retrovirus</i> du koala
LINE	Long interspersed sequences (séquences longues parsemées)
LSA	complexe leucémie-lymphosarcome
LTR	long terminal repeat (répétition longue terminale)
M-MuLV/Mo-MuLV	Moloney-MuLV
MA	matrice
MAO	oligonucléotide morpholino antisens
MCF	mink cell focus-forming virus (virus formant des foci cellulaires du vison)
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MHC	complexe majeur d'histocompatibilité
MMTV	virus des tumeurs mammaires de la souris
mPT	virus polytrophe modifié
Mtv	<i>loci</i> contenant un provirus de MuLV

MuLV/MLV	virus de la leucémie murine
NB	<i>nota bene</i>
NC	structure nucléoprotéique
NF1	nuclear factor 1 (facteur nucléaire 1)
NRE	negative regulatory elements (éléments de régulation négative)
OPA	adénocarcinome pulmonaire ovin
ORF	open reading frame (cadre ouvert de lecture)
OTF	OCTA transcription factor (facteur de transcription OCTA)
p15E	protéine d'enveloppe 15
p27	protéine 27
PCR	polymerase chain reaction (réaction en chaîne de polymérase)
PIC	complexe de pré-intégration
PiT1	inorganic phosphate symporter ((huPiT: human PiT; FePiT: feline PiT)
PiT2	related phosphate symporter
<i>pol</i>	polymérase
pro	protéase du virion
PT	virus polytrophe
R-MuLV	Rauscher-MuLV
RD-114	<i>Retrovirus</i> endogène félin
Rmcf	gène murin
Ron	récepteur hétérodimérique à tyrosine kinase
RT	transcriptase reverse
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction (transcriptase reverse-réaction en chaîne de polymérase)
SAG	super antigène
ScaI	enzyme de restriction
Sf-Stk	forme tronquée de Stk
SFFV	spleen focus-forming virus (virus formant des foci au sein de la rate)
SIV	virus de l'immunodéficience simienne
SRV	<i>Retrovirus</i> simien de type D
SSV	virus du sarcome simien
Stk	récepteur à tyrosine kinase
SU	composant de surface de la protéine d'enveloppe
TATA	courte séquence nucléotidique
TBP	TATA binding protein (protéine se liant à la séquence TATA)

TCR	récepteur des cellules T
Tfr	transferrin receptor (récepteur à transférine)
TLR	Toll-like receptor (récepteur semblable au récepteur Toll)
TM	transmembran – domaine transmembranaire
TNF	tumour necrosis factor (facteur de nécrose des tumeurs)
U3	domaine du LTR
VR 1,2,3,A,B,...	région variable
XPR	récepteur pour les virus xénotropes

Introduction

Le génome des vertébrés est constitué en grande partie d'éléments « parasites » dénommés rétro-éléments. *Retrovirus* endogènes, rétrotransposons, LINE (long interspersed sequences: rétrotransposons de classe II) et autres représentent jusqu'à 45 % de l'ADN génomique.

Parmi ceux-ci, les *Retrovirus* endogènes, qui sont d'anciens virus exogènes ayant colonisé le génome de l'hôte et qui se transmettent verticalement selon le modèle mendélien, peuvent représenter jusqu'à 8 % de l'ADN.

On peut donc se demander pourquoi et comment ces agents *a priori* infectieux se sont retrouvés faisant partie du soi. On peut aussi s'interroger sur l'implication que va avoir la présence de ces éléments « parasites », dont certains ayant toujours des homologues exogènes pathogènes, sur l'hôte. Les *Retrovirus* ont fortement intéressé la recherche humaine ces dernières années, étudiant leur possible implication dans certaines affections tumorales, immunitaires et neurologiques, recherchant une transmission possible lors des xénotransplantations et veillant à écarter tout risque de contamination lors de l'utilisation des *Retrovirus* comme vecteurs pour la thérapie génique mais c'est pour le moment uniquement sur le modèle animal que l'on a pu démontrer de réelles associations cliniques.

Nous avons donc décidé ici de faire une synthèse des connaissances actuelles sur l'implication que peuvent avoir ces *Retrovirus* endogènes chez les mammifères et les pathologies associées. Nous commencerons donc par revoir les caractéristiques générales de ces *Retrovirus* endogènes puis nous étudierons quatre espèces où un voire plusieurs rôles ont été mis en évidence: souris (*Mus musculus*), chat (*Felis silvestris*), mouton (*Ovis aries*) et koala (*Phascolarctos cinereus*). Nous avons volontairement écarté de cette étude le cas du porc, qui a été fortement étudié dans le cadre des xénotransplantations, mais chez qui aucune implication clinique n'a été démontrée.

Premier chapitre: Les *Retrovirus* Endogènes

I. Les virus : généralités

La définition d'un virus selon le petit Larousse illustré est la suivante: "virus: [virys] n.m. (mot lat., poison) micro-organisme invisible au microscope optique, traversant les filtres qui arrêtent habituellement les bactéries, possédant un seul type d'acide nucléique à A.R.N. ou à A.D.N., et parasite obligatoire des cellules eucaryotes." [Maubourguet, P., Péchoin, D., Demay, F. *et al.*, 1990].

Un virus est donc une entité biologique qui nécessite une cellule hôte, dont il utilise les constituants pour se multiplier. Les virus sont des objets particuliers, infectieux, constitués au minimum d'un acide nucléique et de protéines [Wikipedia, 2007d].

En 1953, Lwoff définit le concept de virion : "particule virale mature et infectieuse libre dans le milieu extérieur, phase ultime de la biosynthèse des virus" qui doit être transmise à (doit infecter) une cellule vivante pour permettre l'expression des gènes et la réplication du génome viral par la cellule infectée [Herbein, G. 2003].

Il décrit en même temps les quatre caractéristiques essentielles qui vont définir les virus :

- le virion ne contient qu'"un seul type d'acide nucléique" (ADN ou ARN) que l'on nomme "génome viral";
- il "se reproduit uniquement à partir de son matériel génétique par réplication de son génome";
- il passe obligatoirement par une phase de "parasitisme intracellulaire": "aucun système enzymatique ou énergétique" propre ne lui "permettant d'assurer son auto-réplication": sa reproduction s'effectue au sein d'une cellule hôte vivante. Cette interaction entre la particule virale et l'hôte peut avoir deux conséquences: soit la mort de la cellule ou lyse cellulaire, soit l'apparition de lésions cellulaires non létales dénommée persistance_virale ;
- enfin, il présente une structure particulière symétrique caractéristique [Herbein, G. 2003].

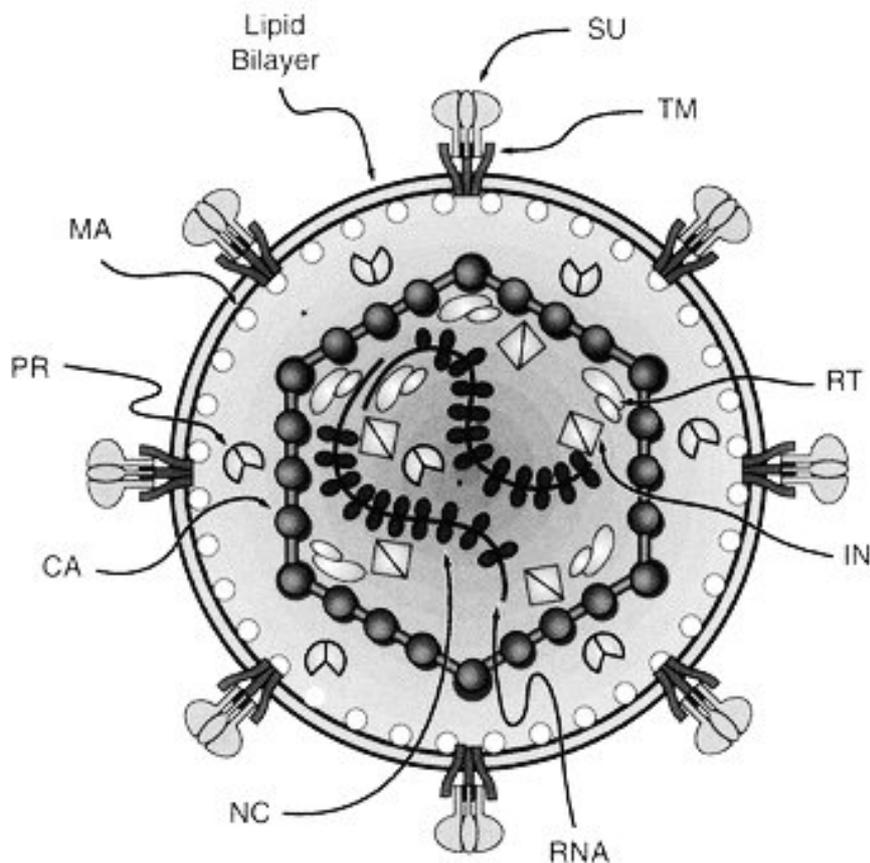
A. Structure des particules virales

Deux éléments sont constants et obligatoires dans la structure du virus : le génome (nature nucléotidique) et la capside (nature protéique) (Figure 1).

Un virus nu est un virus constitué uniquement de son acide nucléique associé à la capside; si celle-ci est entourée d'une bicouche lipidique, on utilise alors le terme de virus enveloppé. On trouve parfois une structure intermédiaire entre la nucléocapside et l'enveloppe : le tégument [Herbein, G. 2003].

Certaines protéines sont liées à l'acide nucléique viral, ce sont les nucléoprotéines. L'association acide nucléique + protéines constitue la nucléocapside [Herbein, G. 2003].

Figure 1. Coupe schématique d'une particule virale. D'après Coffin, J. M. *et al.* 1997a. SU: protéine de surface; TM: protéine transmembranaire; MA: matrice; lipid bilayer: bicouche lipidique; PR: protéase; CA: capside; RT: transcriptase reverse; IN: intégrase; NC: structure nucléoprotéique; RNA: acide ribonucléique.



B. Caractéristiques structurales des virions [Herbein, G. 2003].

Les acides nucléiques viraux sont définis par 5 critères résumés dans le tableau suivant.

Tableau 1. Critères définissant les acides nucléiques viraux. D'après Herbein, G. 2003.

Nature	ADN ou ARN
Taille	Longueur de la chaîne, masse moléculaire, nombre de paires de bases et capacité approximative de codage
Composition en bases	Essentiellement la proportion de GC, mais aussi l'existence de séquences répétitives, de segment polyadénylés, de bases ou de sucres anormaux, d'extrémités palindromiques
Structure	Monocaténaires, bicaténaires ou avec fragments subgénomiques
Topologie	Linéaire ou circulaire

La structure de la capsid virale repose sur deux principes :

- d'une part les acides nucléiques viraux codent des sous unités protéiques qui s'assemblent en une métastructure. Ces sous unités protéiques associées aux acides nucléiques du virion ont tendance à s'assembler spontanément pour adopter la configuration qui correspond à l'état le plus stable où l'énergie est minimale : principe de l'autoassemblage, ce qui implique que toutes les sous-unités soient identiques;
- d'autre part une distorsion de l'arrangement (jusqu'à 4 ou 5 degrés) est compatible avec une structure stable : principe de quasi-équivalence.

Ces deux principes impliquent qu'il n'existe que deux structures géométriques possibles:

- soit une structure à symétrie hélicoïdale, virus à nucléocapside hélicoïdale (les sous unités protéiques constituent à elles seules des unités morphologiques),
- soit une structure à symétrie cubique, virus à nucléocapside cubique ou icosaédrique (les sous unités protéiques se groupent en unités morphologiques : capsomères, visibles en microscopie électronique).

L'enveloppe virale, non présente chez tous les virus, a une composition macromoléculaire complexe, lipido-glucido-protéique: ceci lui confère une sensibilité à différents agents physiques et chimiques et donc une fragilité face au milieu extérieur et aux milieux hostiles de l'organisme.

Cette enveloppe provient la plupart du temps des systèmes membranaires de la cellule hôte. Elle peut être originaire de la membrane cellulaire (feuillet interne), des systèmes membranaires intra-cytoplasmiques (réticulum endoplasmique ou appareil de Golgi) ou bien de la membrane plasmique.

Ceci confère à l'enveloppe virale une spécificité dans sa structure antigénique puisqu'elle contient aussi bien des constituants cellulaires (antigènes de la cellule hôte) que des constituants qui codent le génome viral (protéines d'enveloppe).

C. Classification

La classification de Lwoff, Horne et Tournier – système L.H.T (1962) repose sur la nature de l'acide nucléique (ADN (D) ou ARN (R)), la symétrie de la nucléocapside (hélicoïdale (H), cubique (C) ou mixte), la présence (E) ou absence (N) d'une enveloppe et le nombre de capsomères ou diamètre. La classification est résumée dans le Tableau 2.

Tableau 2. Classification des virus. D'après Herbein, G. 2003.

Virus à ARN	symétrie hélicoïdale (enveloppé et simple brin)	une molécule d'ARN	enveloppés	<i>Coronaviridae</i>
				<i>Paramyxoviridae</i>
				<i>Rhabdoviridae</i>
				<i>Filoviridae</i>
		ARN segmenté	enveloppés	<i>Orthomyxoviridae</i>
				<i>Arenaviridae</i>
	<i>Bunyaviridae</i>			
	symétrie cubique	simple brin	non enveloppés	<i>Picornaviridae</i>
				<i>Caliciviridae</i>
				<i>Astroviridae</i>
		double brin segmenté	non enveloppés	<i>Togaviridae</i>
				<i>Flaviviridae</i>
<i>Reoviridae</i>				
deux copies simple brin	enveloppés	<i>Retroviridae</i>		
Virus à ADN	symétrie cubique, réplication noyau	simple brin	non enveloppés	<i>Parvoviridae</i>
		double brin	non enveloppés	<i>Papoviridae</i>
				<i>Adenoviridae</i>
		double brin	enveloppés	<i>Herpesviridae</i>
	<i>Hepadnaviridae</i>			
	symétrie complexe, réplication cytoplasme	double brin	enveloppés et non enveloppés	<i>Poxviridae</i>

II. Les *Retrovirus*

A. Généralités

Les *Retrovirus* sont des virus enveloppés, à ARN positif monocaténaire diploïde. La taille du virion varie entre 80 et 100 nanomètres de diamètre. L'ARN mesure entre 7 et 12 kb, il est linéaire, composé d'un seul brin, non segmenté, à polarité positive. L'enveloppe lipidique externe comprend les glycoprotéines virales. La forme et la localisation du cœur protéique sont caractéristiques des différents genres de la famille. L'organisation du génome viral présente trois domaines conservés de manière systématique dans la famille des *Retroviridae* [Coffin, J. M. *et al.* 1997a] (Figure 2).

Le domaine *gag* ("group antigen") dirige la synthèse des protéines internes du virion qui forment la matrice (MA), la capsid (CA) et les structures nucléoprotéiques (NC).

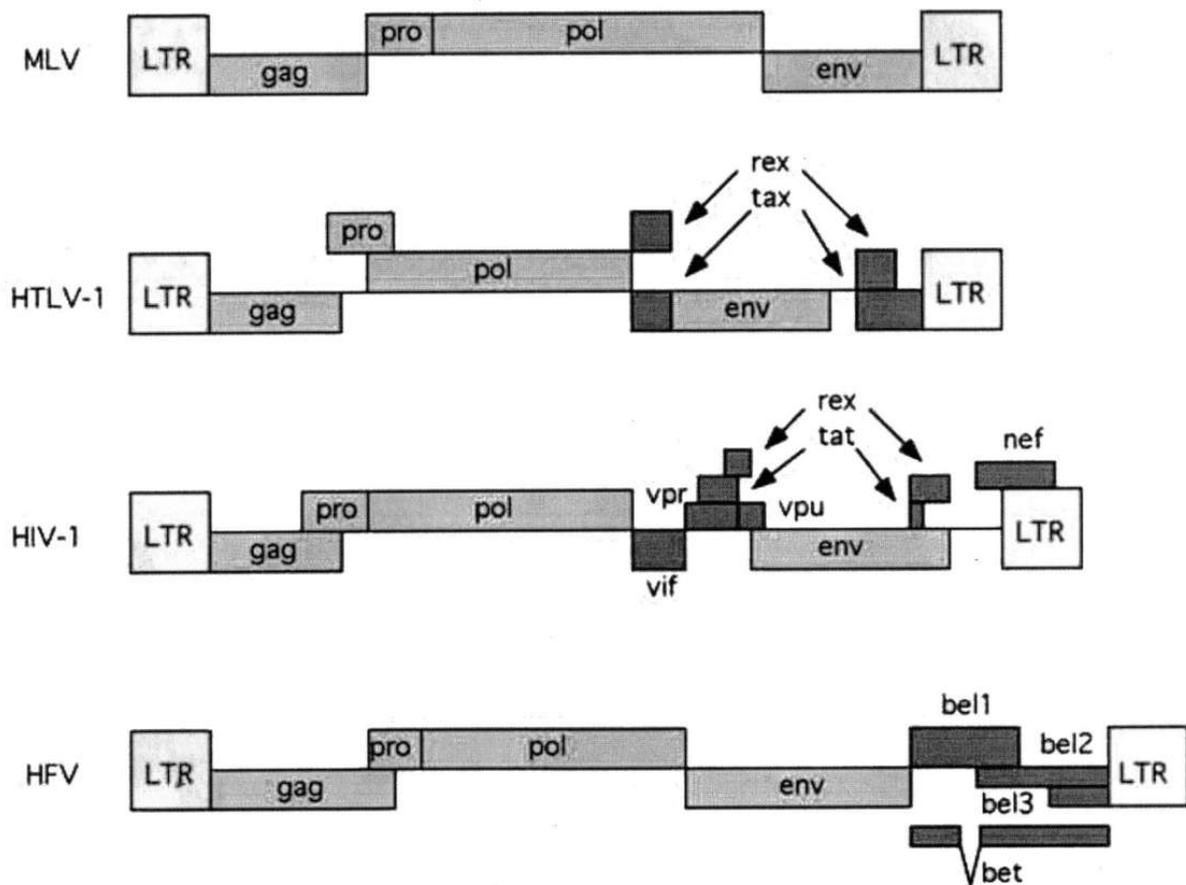
Le domaine *pol* ("polymerase") est à l'origine de la synthèse de l'enzyme de transcription reverse (RT) et de l'intégrase (IN).

Le domaine *env* ("envelope") code les protéines de surface (SU) et transmembranaires (TM) de l'enveloppe virale.

Le domaine *pro* responsable de la protéase du virion est souvent lié à *pol* [Coffin, J. M. *et al.* 1997a].

Le trait caractéristique important des *Retrovirus* est leur stratégie répllicative. En effet, il y a transcription reverse de l'ARN en ADN linéaire double brin et intégration du génome viral au génome de la cellule cible.

Figure 2. Organisation des différents *Retrovirus*. D'après Guyader, M. MLV: virus de la leucémie murine; HTLV-1: virus à tropisme lymphocytaire T humain 1; HIV-1: virus de l'immunodéficience humaine 1; HFV: virus spumeux humain; LTR: séquence terminale longue répétée; rex, tax, vpr, vif, vpu, nef, bel1, bel2, bel3 et bet: séquences codant, après épissage de l'ARNm, respectivement les protéines rex, tax, vpr, vif, vpu, nef, bel1, bel2, bel3 et bet.



B. Cycle répliatif [Coffin, J. M. *et al.* 1997a ; Guyader, M. ; Nisole, S and Saïb, A. 2004] (Figure 3)

1. Etape 1 : rôle du complexe glycoprotéique externe SU

La reconnaissance et la fixation du virus sur les récepteurs de la cellule hôte se fait par le biais de ses glycoprotéines de membrane, notamment la protéine SU. L'interaction entre les membranes virale et cellulaire est extrêmement spécifique : elle constitue le principal déterminant du tropisme du virus, définit les espèces animales et les cellules cibles.

2. Etape 2 : rôle de la glycoprotéine transmembranaire TM

La protéine TM est responsable de la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire.

3. Etape 3 : rôle de la protéine reverse transcriptase RT

Le génome ARN (qui est contenu dans un cœur complexe de protéines non glycosylées) subit une décapsidation et une transcription reverse. Celle-ci est une transcription en ADN double brin qui implique deux sauts de la RT depuis l'extrémité 5' terminale vers l'extrémité 3' terminale de la molécule d'ARN d'origine. On a alors duplication des séquences localisées aux extrémités 5' et 3' de l'ARN. Ces séquences fusionnent aux deux extrémités de l'ADN, formant les Long Terminal Repeat (LTR) qui régulent l'expression virale et la réplication (Figure 4).

4. Etape 4 : entrée dans le noyau cellulaire

Le transport du génome viral vers le noyau peut se faire soit en mode passif (pour la majorité des oncovirus) avec nécessité de division cellulaire, soit en mode actif (pour les lentivirus)

avec intégration indépendamment de la division cellulaire.

5. Etape 5 : rôle de la protéine Intégrase IN

L'ADN viral est intégré au génome cellulaire pour former un provirus. Cette intégration ne permute pas l'ordre linéaire de la séquence provirale (LTR-*gag-pol-env*-LTR) et bien que considérée comme étant aléatoire jusqu'à récemment semble être relativement ciblée. Le nombre de sites possible pour l'intégration est important.

6. Etape 6 : transcription et traduction par les protéines cellulaires

Le génome viral est transcrit puis traduit (il y a expression par la RNA polymerase II et réplication par les enzymes cellulaires. Le contrôle de la transcription provirale est effectué par les LTR) : la transcription du provirus engendre des ARNm épissés et non épissés ainsi qu'un génome ARN viral entier. Dans le cas des *Retrovirus* simples, le contrôle de la transcription est effectué par interactions des facteurs cellulaires avec l'ADN des LTR ; dans le cas des *Retrovirus* complexes, ils ont un rôle plus actif : ils encodent une protéine "Trans" (facteur activant) qui influence le niveau de transcription et la part relative des produits des différents gènes: il y a donc une stratégie de contrôle de l'expression génique.

7. Etape 7 : rôle majeur de la protéine *gag*

On a assemblage et bourgeonnement des particules virales : les produits de la traduction et l'ARN viral sont assemblés à la périphérie de la cellule en particules virales qui sont libérées de la cellule par bourgeonnement de la membrane plasmique. Le bourgeonnement est suivi d'un clivage protéolytique des polyprotéines du virion par une protéase virale et des protéases cellulaires.

Figure 3. Cycle de répllication rétroviral. D'après Coffin, J. M. *et al.* 1997a.

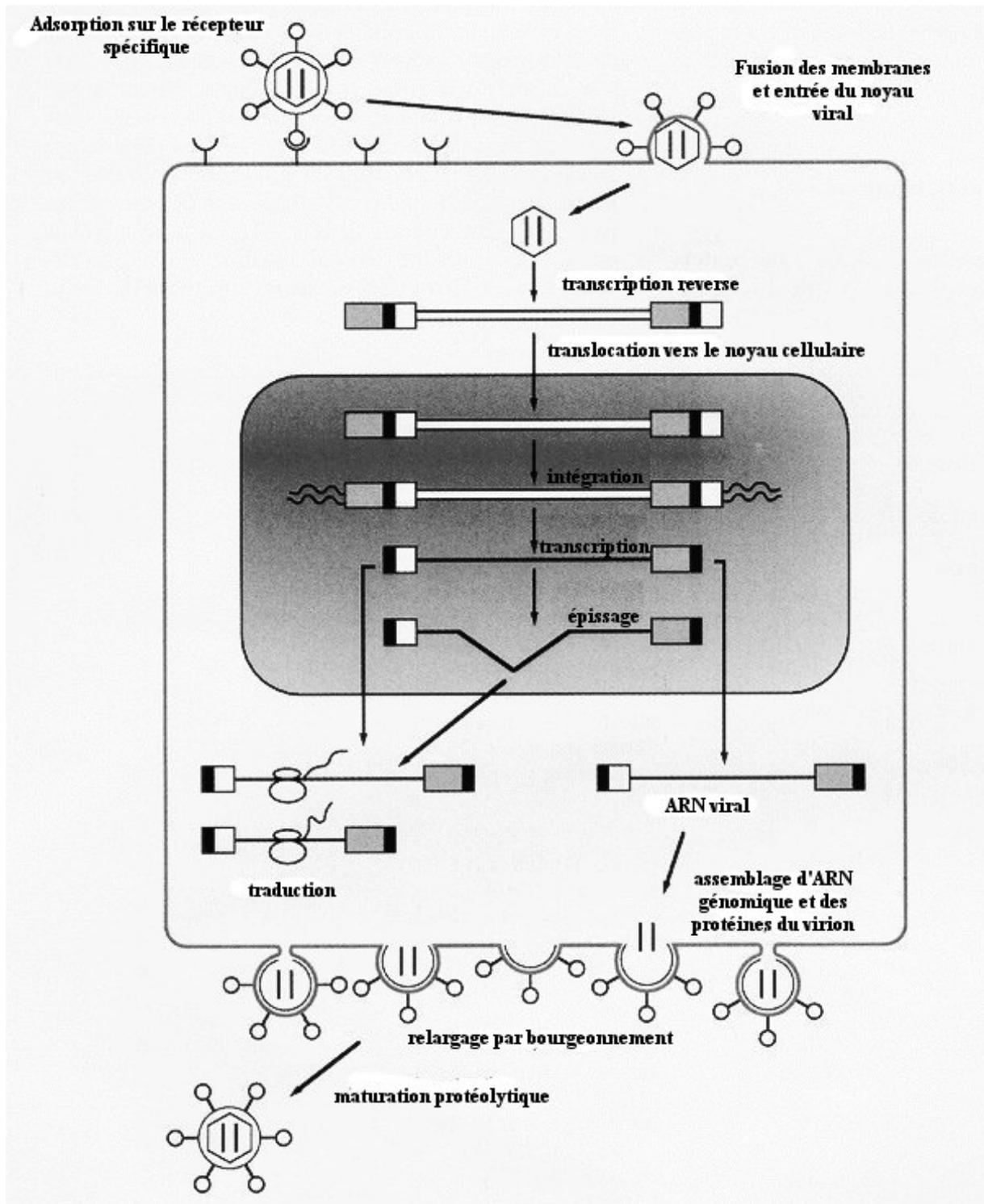
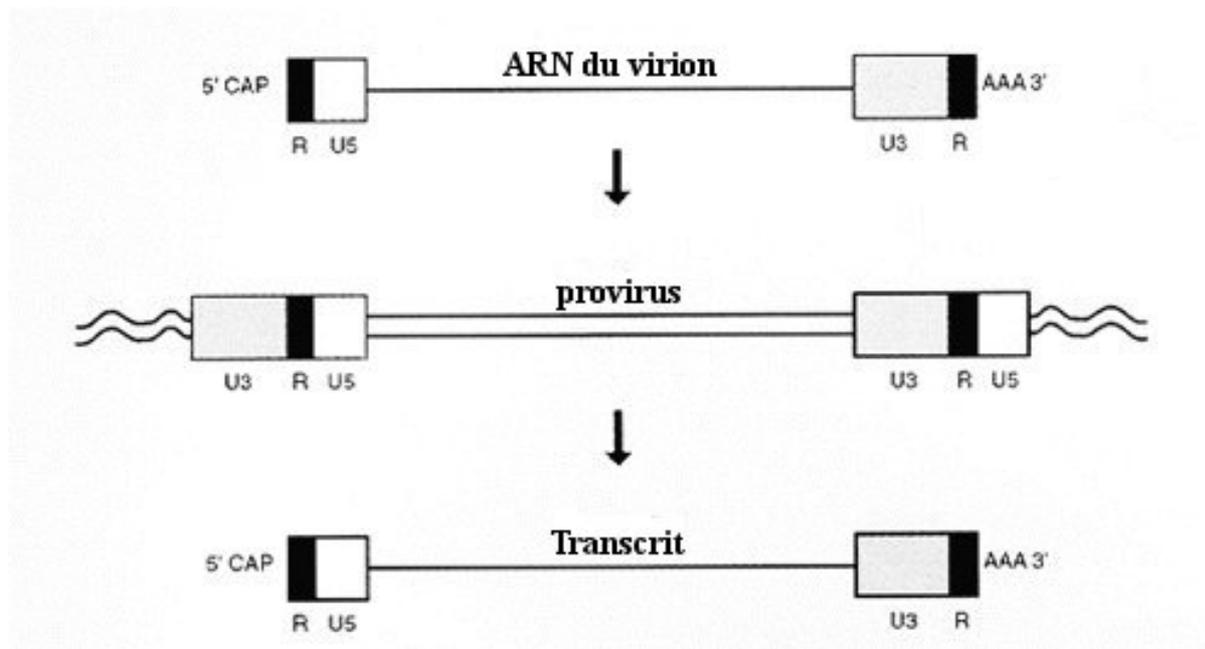


Figure 4. Comparaison des formes ARN et ADN du génome viral. D'après Coffin, J. M. *et al.* 1997a. U3: séquence Unique en 3' de l'ARN; R: séquence Répétée aux deux extrémités de l'ARN; U5: séquence Unique en 5' de l'ARN; U3+R+U5= LTR;



C. Propriétés oncogènes [Coffin, J. M. *et al.* 1997a ; Palmarini, M. and Fan, H. 2001a]

Les *Retrovirus* ont développé des mécanismes uniques de pathogénicité, d'une part par le transfert et l'activation de la transcription de gènes cellulaires spécifiques, d'autre part, par la recombinaison génétique entre génome viral et cellulaire ou entre génomes viraux. Ces caractéristiques peuvent conduire au développement de tumeurs.

Les particules rétrovirales contiennent deux copies du génome liées par des régions proches des extrémités 5' : ils sont diploïdes (caractéristique propre aux *Retrovirus*). Une des conséquences directes est la formation de virions hétérozygotes dans les cellules infectées par deux *Retrovirus* ou plus ayant un lien mais génétiquement distincts ; dans le cycle infectieux suivant, il y a formation de recombinants stables par transcription reverse. Le *ratio* de recombinants entre *Retrovirus* apparentés est important. Ces échanges génétiques entre virus, associés à l'intégration du génome viral au génome cellulaire et aux possibilités de recombinaisons, expliquent la présence de gènes cellulaires chez certains *Retrovirus*. Ceci a seulement été observé chez les *Retrovirus* simples mais pas chez les *Retrovirus* complexes. Le gène cellulaire intégré est alors contrôlé par la séquence LTR du virus.

Ces virus recombinants sont généralement défectifs pour la réplication, nécessitant la présence, dans la même cellule, d'un provirus compétent pour la réplication appelé virus auxiliaire qui code toutes les protéines enzymatiques et structurales du virus. Ce mécanisme de recombinaison est un des deux mécanismes principaux par lesquels les *Retrovirus* exercent un pouvoir oncogène. En effet, le gène incorporé peut porter un haut degré de tumorigénécité.

Dans le cas des *Retrovirus* carcinogènes à action rapide, un protooncogène cellulaire a été intégré au génome viral. Ce protooncogène est en général un gène régulateur de croissance muté qui a été conservé sur de longues périodes de l'évolution car vraisemblablement indispensable à certaines fonctions cellulaires fondamentales (c-onc). Une fois inséré au sein du génome viral, la surexpression ou l'expression inappropriée, combinée à des mutations de ce gène (dénommé v-onc après intégration) résultent dans l'augmentation d'un signal positif de croissance. L'oncogène est le médiateur de la transformation néoplasique mais c'est son homologue cellulaire qui est activé lors de l'insertion du provirus. On a ainsi synthèse de protéines (oncoprotéines) qui ont le potentiel de transformer une cellule normale en cellule néoplasique. Ces *Retrovirus* carcinogènes à action rapide sont probablement parmi les carcinogènes les plus puissants trouvés dans la nature. Mais ils sont finalement assez rares au sein des tumeurs induites par des *Retrovirus* pour plusieurs raisons. D'une part la capture d'un oncogène est un événement aléatoire et donc rare. De plus l'issue létale rapide de la maladie limite en général la propagation de l'infection. D'autre part, il n'y a pas vraiment de sélection positive d'un point de vue de l'évolution d'un *Retrovirus* qui ne peut pas se répliquer mais qui porte un oncogène.

La majorité des *Retrovirus* oncogènes ne portent pas d'oncogène cellulaire au sein de leur génome. Ce sont des virus à action lente avec une période d'incubation résultant en un phénomène néoplasique se développant habituellement sur plusieurs mois. Ces *Retrovirus* ne transforment pas les cellules en culture mais peuvent tout de même induire *in vivo* des tumeurs après une longue période latente. Ces *Retrovirus* sont compétents pour la réplication. L'induction de tumeurs se déroule vraisemblablement à travers plusieurs étapes encore mal définies, plusieurs ayant des similitudes avec des cancers non viro-induits. Le mécanisme le mieux compris est l'activation par les séquences LTR de protooncogènes cellulaires. On parle d'activation par insertion, activation cis ou insertion mutagène. Dans ces tumeurs, un provirus est intégré à proximité d'un protooncogène cellulaire, ce qui induit une surexpression de ce protooncogène. Les *Retrovirus* qui agissent ainsi induisent des tumeurs après une longue période d'incubation puisque l'intégration virale est essentiellement un événement aléatoire. De nombreuses séries d'infections successives sont souvent

nécessaires avant que l'intégration à proximité d'un protooncogène (à quelques kilobases jusqu'à une centaine de kb de distance) ne se produise dans une cellule.

Une action carcinogène par inactivation des gènes suppresseurs de tumeur est extrêmement rare. En effet, à la différence de l'activation de protooncogènes, la suppression de fonction des gènes suppresseurs nécessite que les deux copies du gène soient endommagées ou perdues.

Il existe d'autres mécanismes d'oncogenèse plus particuliers qui concernent les virus HTLV/BLV (human T-cell leukaemia virus/bovine leukaemia virus) et le Friend murine leukaemia virus. Les premiers, HTLV et BLV, ne présentent pas d'oncogènes et ne montrent pas de sites d'intégration commun au sein des tumeurs induites. Les tumeurs sont monoclonales ou oligoclonales et l'expression virale dans ces cellules est minimale. Les tumeurs apparaissent après une longue période d'incubation (plusieurs années). Ces virus codent une protéine transactivatrice "Tax" qui, en plus de l'activation de la transcription virale, active aussi l'expression de gènes cellulaires impliqués dans la croissance et la différenciation de cellules T, comme l'interleukine 2 (IL-2), les récepteurs à IL-2, IL-3 et les facteurs de stimulation des colonies de granulocytes et des macrophages. La protéine Tax conduirait à l'hyperprolifération des lymphocytes T, qui progresseraient jusqu'au stade final de cellule leucémique par des mécanismes complémentaires. Les tumeurs induites par le Friend murine leukemia virus seraient dues à la protéine virale modifiée "env" qui imite un composant de la voie de signalisation de l'érythropoïétine.

Comme on peut le voir, deux mécanismes principaux permettent aux *Retrovirus* une action oncogène mais il existe une grande variété des mécanismes qui, pour la plupart, sont encore à l'étude.

L'utilisation de mutants permet de définir la fonction des gènes viraux, de fournir des marqueurs pour la construction d'une carte génétique et de révéler l'origine cellulaire des oncogènes rétroviraux. Ceci a principalement pour but de comprendre d'une part le fonctionnement des *Retrovirus* dans le cadre des maladies humaines et de comprendre les phénomènes cancérigènes naturels ou induits chez l'homme. Deux types de mutations essentiellement sont utilisées : mutations au sein de l'oncogène affectant seulement les transformations induites par le virus et donc l'oncogenèse ou mutations dans *gag/pol/env* interférant en premier avec la croissance virale.

D. Historique de la découverte des Retrovirus

L'histoire de l'étude des *Retrovirus* a débutée au début du 20^e siècle. Elle est résumée dans le tableau suivant (Tableau 3).

Tableau 3. Historique de la découverte des *Retrovirus*. D'après Coffin, J. M. *et al.* 1997a.

1908	Découverte du virus de la leucose aviaire par Ellermann et Bang.
1911	Découverte du virus du sarcome de Rous. Premiers <i>Retrovirus</i> mis en évidence chez les oiseaux.
1936	Découverte de <i>Retrovirus</i> chez la souris (premier mammifère) par Bittner.
1957	Travaux de Gross sur le virus de la leucémie murine.
1954-57	Découverte des Lentivirus.
1954	Découverte des Spumavirus.
1963	Mises en évidence des virus auxiliaires (qui permettent la réplication) et des virus déficients (ont acquis un pouvoir oncogène mais sont non répliquants).
1967	Première découverte des <i>Retrovirus</i> endogènes (ERV) chez le poulet.
1970	Découverte de la reverse transcriptase par Temin et Mizutani.
1976	Découverte du gène oncogène "src", provenant des gènes cellulaires par Stehelin.
1977	Découverte de Human T-cell leukemia virus 1 (premier virus oncogène humain découvert).
1980	Découverte du SIDA et début des recherches sur le Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH).
1990	Nombreux travaux sur les <i>Retrovirus</i> endogènes, par crainte d'une transmission lors des xénotransplantations et dans l'espoir d'utiliser des <i>Retrovirus</i> comme vecteur génétique.

E. Classification (Figure 5)

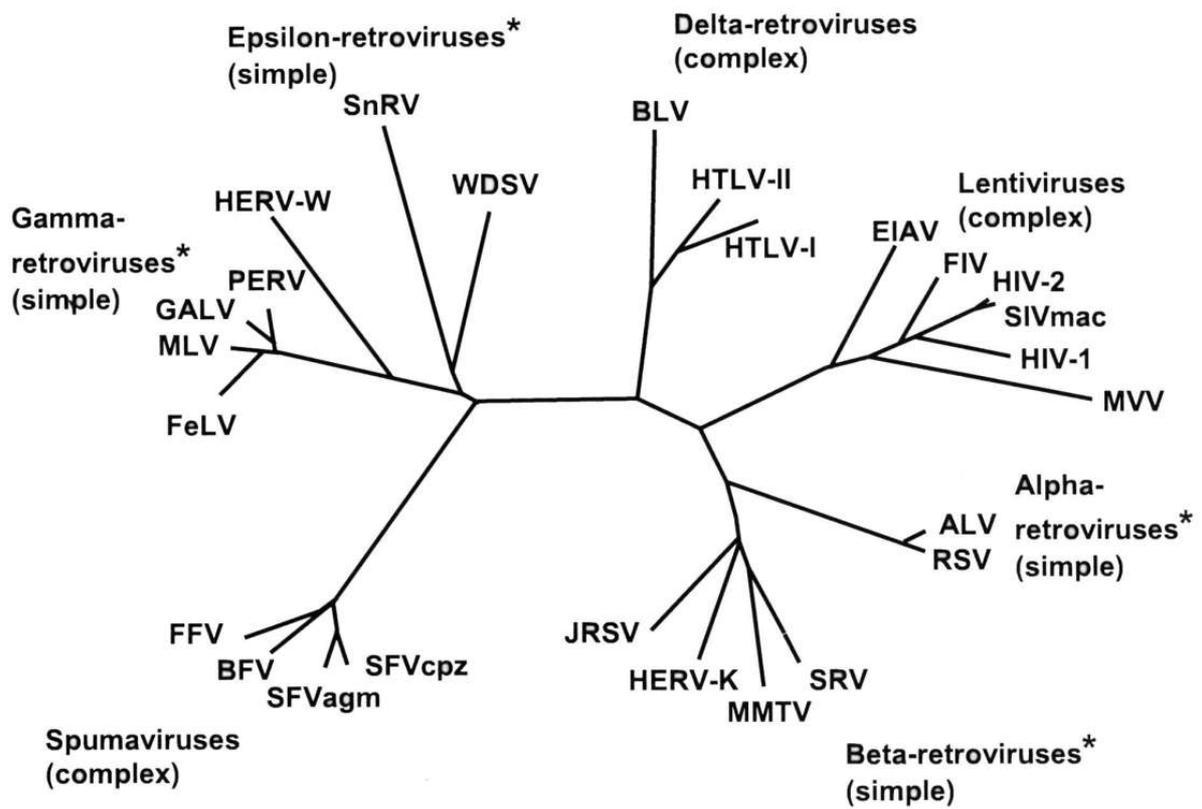
Le tableau suivant (Tableau 4) résume la classification des *Retrovirus*. Parmi ceux-ci, 5 genres sont oncogènes: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus* et *Epsilonretrovirus*. Seul le genre *Deltaretrovirus* possède un génome complexe.

Au sein des genres, une classification historique en fonction de la morphologie est appliquée. La morphologie de type B correspond à des particules extracellulaires enveloppées avec un noyau condensé, acentrique et des pics d'enveloppe proéminents ; la morphologie de type C est comme le type B mais avec un cœur central et des pics peu visibles ; enfin la morphologie de type D est en général légèrement plus large avec des pics moins proéminents [MicrobiologyBytes. 2007].

Tableau 4. Classification des *Retrovirus*. D'après Wikipedia, 2007c.

<u>Orthoretrovirinae</u>	<i>Alpharetrovirus</i> (génomme simple, présence de virus endogènes)	Virus de la myéloblastose aviaire Virus du sarcome murin Virus de la leucose aviaire
	<i>Betaretrovirus</i> (génomme simple, présence de virus endogènes)	Virus des tumeurs mammaires murines Rétrovirus Jaagsiekte du mouton
	<i>Gammaretrovirus</i> (génomme simple, présence de virus endogènes)	Virus de la leucémie murine Virus de la leucémie féline Virus du sarcome félin Virus du réticulo-endothélium aviaire
	<i>Deltaretrovirus</i> (génomme complexe)	Virus de la leucémie bovine Virus à tropisme lymphocytaire T humain
	<i>Epsilonretrovirus</i> (génomme simple, présence de virus endogènes)	Virus Walleye du sarcome dermal
	<i>Lentivirus</i> (génomme complexe)	Virus de l'immunodéficience bovine Virus de l'anémie infectieuse équine Virus de l'immunodéficience féline Virus du complexe arthrite-encéphalomyélite caprin Virus Maedi-Visna Virus de l'immunodéficience humaine Virus de l'immunodéficience simienne
<u>Spumaretrovirinae</u>	<i>Spumavirus</i> (génomme complexe, pas de virus endogènes observés à ce jour)	Virus spumeux du chimpanzé Virus spumeux humain Virus spumeux simien Virus syncitial félin Virus syncitial bovin

Figure 5. Phylogénie des *Retrovirus*. D'après Weiss, R. A. 2006. Les genres incluant des génomes endogènes sont marqués d'un astérisque.



III. Les *Retrovirus* endogènes

Les *Retrovirus* endogènes sont des virus ayant colonisé le génome d'une espèce hôte. En effet, l'une des particularités des *Retrovirus* est leur intégration au génome de la cellule cible pour leur réplication. La formation du provirus, c'est-à-dire du génome viral intégré au génome de la cellule cible est normalement un phénomène éphémère disparaissant avec la mort cellulaire (lyse cellulaire ou mort de l'individu). Dans certains cas particuliers, essentiellement lors de la colonisation par le virus de cellules germinales, on peut alors observer une transmission du provirus à la descendance. C'est ce phénomène que l'on appelle endogénisation, avec intégration permanente progressive du virus à tout ou partie des individus d'une espèce. Des études récentes [Herniou *et al.* 1998] ont montré que ce phénomène était retrouvé au moins chez tous les vertébrés. Ces phénomènes d'endogénisation peuvent remonter à plusieurs millions d'années et l'on estime l'âge approximatif du phénomène en fonction de la présence du provirus chez différentes espèces et la datation de leur(s) divergence(s).

A. Historique

Les rétrovirus endogènes sont étudiés depuis seulement un demi-siècle. Le tableau 5 résume de manière chronologique les découvertes majeures qui ont été faites jusqu'à aujourd'hui.

Tableau 5. Historique des découvertes des *Retrovirus* endogènes. D'après Weiss, R. A. 2006.

1951	Découverte du Virus de la leucémie murine. Démonstration du caractère héréditaire des antigènes liés à la portion <i>gag</i> du génome de certains <i>Retrovirus</i> par Payne et Chubb et de l'existence d'une production endogène d'une enveloppe virale par Weiss.
1969	Observation par Aaronson <i>et al.</i> d'une production spontanée de MLV par des cultures de cellules murines non infectées. Mise en évidence par Bentvelzen <i>et al.</i> du caractère endogène du Virus des tumeurs mammaires murin (MMTV) et de son association avec les tumeurs mammaires héréditaires des souris GR.
1970	Démonstration du caractère héréditaire concomitant de <i>gag</i> et <i>env</i> par Payne et Weiss et mise en évidence de la production spontanée de virus par des cellules de poulet par Vogt et Friis. Mise en évidence par Weiss <i>et al.</i> de la production de virus par des cellules normales lors du traitement par des agents activateurs. Mise en évidence d'une transmission inter-espèce d'un <i>Retrovirus</i> endogène (Benveniste et Todaro, 1974) : parenté très spécifique du BaEV (babouins) et du RD114 (chat), vraisemblablement transmission du babouin au chat.
1990	Recherches sur la transmission possible des <i>Retrovirus</i> endogènes du porc à l'homme lors des xénotransplantations.

B. Etude des Retrovirus endogènes (ERV) [Coffin, J. M. et al. 1997b]

La découverte des techniques de Southern blot (ou buvardage de Southern: technique d'hybridation de fragments d'ADN, obtenus grâce à des enzymes de restriction, avec des sondes à ADN marquées radioactivement ou par fluorescence) a permis d'explorer la présence et les propriétés des *Retrovirus* endogènes. En particulier deux types de fragments de restriction ont été mis en évidence à l'aide d'amorces virales. Le premier, appelé fragment interne, ne contient que de l'ADN proviral. Il est surtout utile pour comparer la structure de différents provirus mais ne donne que peu d'information pour leur identification. Le second, appelé fragment de jonction, contient de l'ADN proviral et de l'ADN cellulaire adjacent. Il est peu efficace dans l'étude de la structure provirale mais il permet une reconnaissance individuelle. Ces amorces/sondes ont permis, entre autre, au tout début de l'étude des *Retrovirus* endogènes, de constater que leur structure de base était identique à leurs homologues exogènes.

L'utilisation du modèle "souris" a permis de progresser de manière extrêmement rapide dans l'étude des *Retrovirus* endogènes de part la vitesse d'obtention de nouvelles générations et a montré tout d'abord que chaque souche murine possède un nombre unique et caractéristique d'ERV.

Peu de ERV sont retrouvés chez toutes les souches de souris mais aucun n'est retrouvé exclusivement chez une souche. De plus, tous les polymorphismes sont le résultat d'événements d'intégration distincts et non d'un polymorphisme des sites de restriction. En outre, l'intégration des provirus se fait de manière complètement aléatoire au sein du génome hôte. Enfin, les provirus sont stables, montrant un faible degré d'évolution.

Des expérimentations ont permis d'intégrer artificiellement des provirus au sein du génome de certaines lignées de souris ce qui a permis de comprendre le rôle de la méthylation dans le contrôle des gènes, l'impact du site d'intégration sur le niveau d'expression des gènes viraux et le rôle des mutations ponctuelles sur le contrôle de la réplication virale. Ces intégrations artificielles permettent aussi d'envisager leur utilisation comme marqueurs chromosomiques ou marqueurs de lignées et enfin, ce qui intéresse de plus en plus la thérapie génique actuelle, l'utilisation de ces *Retrovirus* comme vecteurs pour introduire de nouveaux gènes au sein des lignées cellulaires germinales.

C. Intégration et évolution [Coffin, J. M. *et al.* 1997b]

Comme nous l'avons déjà dit, l'intégration des ERV se fait au cours du cycle répliatif viral. La particularité des *Retrovirus* étant d'intégrer leur génome au sein du génome de la cellule hôte, la réalisation de cette étape au sein des cellules germinales permet la transmission verticale du provirus. La transmission aux lignées successives et les croisements entre lignées permettent ensuite de disperser l'ERV au sein d'une espèce. Ces événements se déroulent sur plusieurs milliers voir millions d'années.

Les ERV sont en général très stables au sein du génome ; l'intégration à de nouveaux *loci* est cependant un processus en perpétuelle évolution. Il y a une augmentation du nombre de copies au sein du génome qui s'effectue avec le temps, de manière plus importante pour les provirus écotropes (virus se répliquant au sein des cellules de l'hôte car ayant la capacité d'entrer dans la cellule) que pour les non-écotropes. On s'accorde aujourd'hui sur le fait que l'intégration d'un ERV à un nouveau *locus* et l'augmentation du nombre de ses copies au sein d'un même génome se fait majoritairement par infection d'origine extracellulaire (c'est-à-dire par la réalisation d'un cycle viral complet). Le fait que certains ERV, tel que les ERV xénotropes (virus ne se répliquant pas au sein des cellules de l'hôte car n'ayant pas la capacité d'entrer dans la cellule), qui ont perdu la faculté de reconnaître les récepteurs des cellules hôtes, vraisemblablement suite à la réponse de l'organisme à une colonisation massive, puissent quand même faire preuve d'amplification s'explique d'une part par l'utilisation de récepteurs différents et, d'autre part, par l'utilisation du complexe SU fourni par un autre *Retrovirus* ou un autre gène cellulaire. On notera toutefois que l'amplification du nombre de copies s'effectue aussi sans infection d'origine extracellulaire mais par rétro-transposition intracellulaire (la séquence d'ARNm que code le provirus permet de nouveau la transcription et l'intégration d'ADN grâce à la transcriptase reverse). Le degré d'amplification est variable, reflet des forces de sélection imposées par le virus sur son hôte et vice-versa. L'amplification provirale cessera quand le génome proviral d'origine aura accumulé suffisamment de mutations pour ne plus être infectieux. De plus l'amplification cessera aussi si le provirus est perdu lors d'une recombinaison homologue entre LTR ou si l'hôte développe des mécanismes pour limiter l'intégration au sein de son génome. La recombinaison homologue entre LTR est un phénomène couramment observé. En réalité, ce que l'on pensait être une disparition/excision du provirus de la lignée germinale est une recombinaison des deux LTR homologues qui ne laissent place qu'à un

seul LTR. La présence d'un grand nombre (plusieurs milliers) de LTR d'anciens provirus au sein du génome de la souris, aussi retrouvé au sein du génome humain, peut laisser envisager que ceci est une façon naturelle du génome d'alléger sa charge provirale.

Dans chaque espèce, on retrouve des similitudes au niveau des ERV. En réalité, chaque groupe de provirus endogènes appartenant à une espèce a été acquis par infection inter-espèce d'un virus généralement d'origine inconnue plutôt que par une co-évolution d'un même ERV au sein de différentes espèces hôtes. La descendance du provirus initial doit donc plutôt être considérée comme différentes étapes dans l'évolution du virus que comme différentes versions d'un même virus initial.

D. Implication de la présence des ERV [Coffin, J. M. *et al.* 1997b]

1. Effet « passif »

Les provirus ne sont pas uniquement des morceaux d'ADN inertes qui entraînent des mutations en interrompant une séquence du génome de l'hôte. Tout d'abord, leur part est estimée à environ 8 % du génome des vertébrés. Pour leur très grande majorité, ces provirus sont silencieux, ce qui signifie qu'ils ne produisent pas de particules virales. Leur présence en tant que parasites de l'ADN hôte n'affecte pas nécessairement l'expression du génome. Par contre ces segments peuvent jouer un rôle dans le modelage de celui-ci car ils sont une source de polymorphisme. Lors de l'expression du génome hôte, et suite à des recombinaisons, ils peuvent ainsi transformer la séquence. Ces provirus représentent une source neuve de séquences impliquées, de manière plus ou moins claire pour le moment, dans l'évolution du génome.

De plus, même si ils sont silencieux, ces provirus contiennent des séquences cis et trans qui normalement conduisent et contrôlent la synthèse et l'utilisation de leurs propres gènes. Ces séquences peuvent avoir un impact sur la transcription des gènes de l'hôte. Ils peuvent aussi fournir de nouveaux promoteurs et amplificateurs, altérer par leur présence l'épissage de l'ARN, entre autre en ajoutant un nouveau signal terminal, et interrompre les séquences codantes. Ils peuvent, de même, aider à la transcription de régions jusqu'à présent non définies du génome.

Les mutations des lignées germinales causées par l'intégration provirale sont généralement récessives, contrairement à l'effet dominant observé dans le cas des tumeurs. Les insertions d'inactivation sont généralement mais pas exclusivement observées au sein des introns.

Les utilisations de ces phénomènes sont nombreuses. L'identification de nouveaux provirus au cours d'insertions spontanées peut fournir un moyen d'identifier et de cloner les gènes importants dans les mécanismes de développement entre autres. Une compréhension précise de la manière avec laquelle les éléments endogènes individuels peuvent affecter l'activité d'un gène hôte devrait permettre le développement de nouvelles stratégies pour la découverte de gènes et de leur fonctionnement. Les rétroéléments sont des outils qui permettent d'établir, enfin, une carte génétique.

2. Effet « actif » (Figure 6)

L'étude de l'expression des provirus endogènes a monopolisé l'attention depuis la découverte des ERV. Elle a été décrite chez toutes les espèces étudiées même si les provirus endogènes sont généralement silencieux.

De nombreuses infections par les *Retrovirus* entraînent la formation de tumeurs ou de maladies du système immunitaire; il était donc raisonnable d'envisager que la présence des ERV puisse être à l'origine de certaines de ces maladies. Bien qu'un lien ait pu être démontré chez certains animaux comme la souris, le chat, le mouton ou le koala par exemple, il a été jusqu'à présent impossible de démontrer un quelconque lien de cause à effet chez l'homme, même si certaines associations restent encore à l'état de très forte hypothèse. En effet, la question de l'implication des *Retrovirus* dans l'étiologie de maladies auto-immunes humaines reste encore très controversée. Les patients infectés par le HIV-1 ou le HTLV-1 peuvent développer des symptômes similaires à ceux des maladies auto-immunes. Une partie des patients atteints de ces maladies, incluant le syndrome de Sjögrens et la sclérose en plaques, montrent un faible niveau d'anticorps contre les antigènes de *gag* sans mise en évidence d'une infection par un virus exogène humain connu.

Une autre raison de l'intensification des études concernant les ERV est, en plus des associations directes chez l'homme, les conséquences que pourraient avoir sur celui-ci deux innovations de la médecine moderne : les xénotransplantations et l'utilisation de *Retrovirus* comme vecteurs de gènes pour la thérapie. En effet, la présence d'ERV au sein des transplants ou des vecteurs pourrait soit induire de manière directe une pathologie soit permettre la recombinaison

avec des ERV humains (HERV) qui pourraient alors devenir pathogènes. Pour le moment, aucune maladie associée à des ERV causée par les xénotransplantations n'a pu être établie.

D'une manière générale, dans certains cas, l'expression peut amener la réplication de particules virales infectieuses et se manifester par une virémie ; dans d'autres, elle correspond à la production de gènes indépendants et de leurs produits dans certains types spécifiques de cellules. L'expression peut avoir un certain nombre de conséquences depuis la formation de tumeurs induites par le virus à la protection contre des infections virales exogènes. En effet, l'expression des ERV peut influencer l'issue d'une infection par un virus exogène de différentes façons, aussi bien bénéfiques que nuisibles pour l'hôte. Ceci inclut une modulation de la réponse immunitaire au virus exogène, une acquisition de nouveaux gènes viraux par recombinaison avec le virus exogène (l'expression de deux provirus dans la même cellule peut amener à un mélange phénotypique et un co-assemblage de l'ADN viral), un blocage des récepteurs cellulaires au virus ou une occultation des cellules cibles potentielles.

La présence de certains ERV peut, effectivement, conférer un effet bénéfique à l'hôte en permettant une résistance aux super-infections par des virus exogènes. Entre autre, l'expression du gène *env* de l'ERV bloque l'interaction du virus exogène avec ses récepteurs cellulaires. Par contre, l'expression de séquences *env* endogènes (de même que des mutations au sein des récepteurs) peut aussi représenter une pression sélective importante sur l'évolution virale en forçant l'utilisation de récepteurs alternatifs et entraînant par conséquence des changements dans le gène *env* du virus exogène. On peut donc retrouver pour un même ERV, des effets contrastés vis-à-vis de son homologue exogène (cf. Jaagsiekte Sheep RetroVirus).

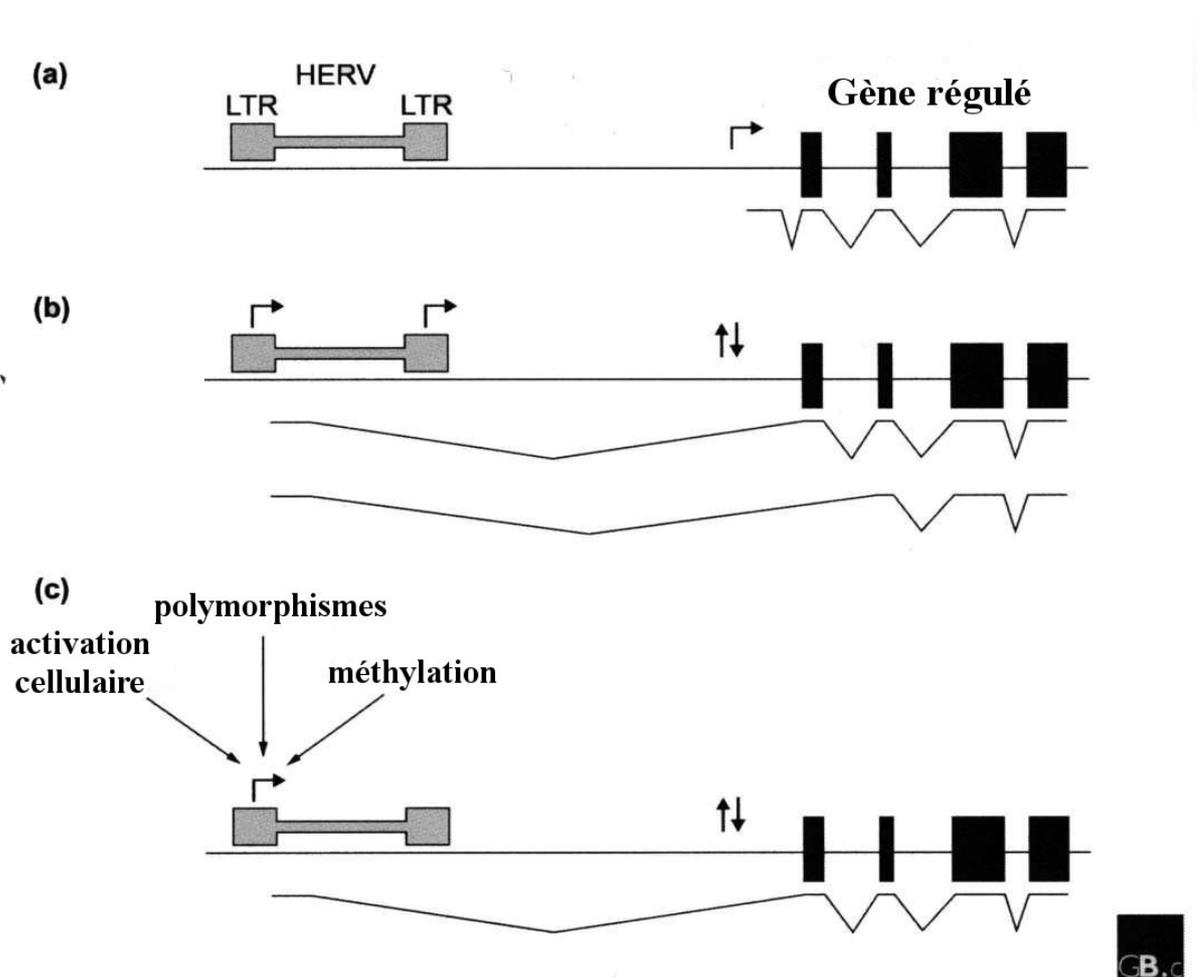
Enfin, très récemment, on a pu mettre en évidence un effet bénéfique et essentiel des ERV. Il a été démontré chez certaines espèces que des ERV avaient un rôle indispensable pour la gestation, dans l'acceptation du fœtus/embryon par l'organisme maternel et dans le processus de mise en place de l'interface entre les deux entités. Il apparaîtrait que les ERV aient joué ici un rôle important voire essentiel dans l'évolution des espèces et du placenta [Coffin, J. M. *et al.* 1997b].

Sans expression il n'y a pas de mouvements des éléments endogènes et pas d'activation ou d'inactivation des gènes par insertion. Il est difficile d'expliquer le mécanisme d'expression virale endogène lié à un provirus individuel. En effet le nombre important de provirus retrouvés au sein d'une même famille empêche d'identifier quel membre s'exprime et si le mécanisme d'expression est propre à la famille ou seulement à un membre. On sait maintenant que les LTR ont un rôle important dans le déterminisme du tropisme tissulaire pour la réplication virale, et donc un rôle clef

dans le contrôle de l'expression d'éléments endogènes. Les gènes de l'hôte ont aussi un rôle majeur dans le contrôle de cette expression.

Un des plus importants facteurs de contrôle est la position du provirus au sein du chromosome. La méthylation de l'ADN initiée par l'hôte joue aussi vraisemblablement un rôle déterminant dans l'expression provirale même si il n'est pas certain que la méthylation ne soit une conséquence de l'expression. Une des hypothèses est que la méthylation a évolué du système de reconnaissance immunitaire chez les bactéries dans le but de réprimer les éléments transposables et rétroviraux nouvellement acquis.

Figure 6. HERV comme régulateurs de l'expression du génome hôte. D'après Griffiths, D. J. 2001. Les LTR peuvent influencer l'expression des gènes cellulaires voisins; les exons cellulaires sont indiqués par les boîtes noires, le *Retrovirus* endogène humain – HERV – est indiqué en gris; a: transcrit normal du promoteur cellulaire; b: un transcrit alternatif initié par le LTR du HERV, l'extrémité 5' ou 3' peut être utilisée, l'expression du gène cellulaire peut être activée ou rendue silencieuse par ce mécanisme; c: l'activité du LTR du HERV peut être modulée par d'autres facteurs comme la méthylation, le polymorphisme ou l'état d'activation de la cellule.



En conclusion, nous venons de voir que les *Retrovirus* peuvent s'intégrer de manière permanente au génome de leur hôte et laisser ainsi un homologue endogène faisant partie du soi de l'hôte. Même si l'étude de ces *Retrovirus* endogènes est encore assez récente, il a été possible de démontrer un rôle pathogène de ces inserts chez certaines espèces animales mais pas encore chez l'homme. Le rôle joué par ces ERV au sein de l'évolution des espèces, de la pathologie et des mécanismes de défense n'est pas complètement appréhendé pour le moment mais on peut voir déjà que ces ERV ont été et sont essentiels pour l'évolution même si ils peuvent avoir certains effets nuisibles. L'étude des effets bénéfiques et néfastes déjà démontrés chez les animaux permet, d'une part, de mieux comprendre les mécanismes d'action des *Retrovirus* en général et d'étudier entre autre des moyens de défense et, d'autre part, permet d'envisager le rôle que ces ERV peuvent avoir chez l'homme.

N.B : Au sein des *Retroviridae*, on a retrouvé des éléments endogènes seulement chez les genres simples et les *Spumavirus*. Il n'a pas à ce jour été mis en évidence de virus endogènes chez les *Lentivirus* et les *Deltaretrovirus*. Par contre deux autres familles virales proches entre elles (ADN, double brin, enveloppés), *Herpesviridae* et *Hepadnaviridae* pourraient être étudiées conjointement aux *Retroviridae*. En effet, les *Hepadnaviridae* ont un cycle répliatif, avec entre autre l'utilisation d'une reverse transcriptase, qui pourrait amener à l'intégration de virus endogènes. De plus, certaines publications ont montré la présence de génomes d'*Herpesvirus* intégré au génome humain et transmissible à la descendance [Daibata, M. *et al.* 1999].

**Deuxième chapitre: Les *Retrovirus* endogènes de la
leucémie murine**

I. Les *Retrovirus* endogènes de la leucémie murine

A. Historique et généralités [Risser, R. and Horowitz, J. M. 1983]

Gross, en 1951, a isolé le premier virus avec une action leucémogène à partir d'un lymphome spontané chez les souris AKR. Vingt ans plus tard, Rowe et Hartley démontraient que les souris AKR transmettaient des gènes à leur descendance qui spécifiaient l'activation et la structure moléculaire de souches particulières du virus de la leucémie murine (MuLV) et que ces gènes étaient des déterminants majeurs dans le développement des lymphomes spontanés.

Trois virus majeurs ont été découverts durant ces années là. Ces virus sont responsables de l'induction de lymphomes de manière aiguë: le virus de la leucémie murine de Moloney (M-MuLV ou Mo-MuLV), celui de Rauscher (R-MuLV) et celui de Friend (F-MuLV ou Fr-MuLV) qui sont distinguables de ceux retrouvés chez les souris de laboratoire mais fortement apparentés à ceux isolés des souris sauvages.

Le MuLV a pu être isolé de toutes les souris de laboratoire et de la majorité des souris sauvages.

Les provirus endogènes sont distribués de manière très large au sein du génome murin, en effet des provirus sont retrouvés sur différents chromosomes [Jolicoeur, P. *et al.* 1980]. En particulier, les provirus écotropes (virus ne se répliquant qu'au sein des cellules murines et ne pouvant infecter les cellules d'autres espèces) sont retrouvés en nombre limité mais variable en fonction des souches murines. Ils présentent une grande stabilité et semblent avoir intégré le génome avant la séparation des différentes souches [Jenkins, N. A. *et al.* 1982].

L'expression des différentes classes de MuLV diffère énormément d'une souche murine à l'autre et d'une classe de MuLV à l'autre. De même, la pathologie associée à ces expressions est variée et dépend d'un nombre de facteurs importants.

B. Classification

L'ensemble des MuLV endogènes retrouvés au sein du génome sont extrêmement homologues. Le domaine *env* semble être le plus polymorphe tandis que le domaine *pol* est le plus conservé. Le domaine *gag* montre un polymorphisme modéré [Risser, R. and Horowitz, J. M. 1983].

Un caractère important des MuLV est leur capacité à varier génétiquement soit par mutation soit par recombinaison, de manière relativement fréquente [Risser, R. and Horowitz, J. M. 1983].

Il a été observé que les différents virus isolés ne se répliquent pas de la même manière sur des cellules issues d'espèces éloignées. Cette différence d'infection cellulaire a servi de base pour la classification des MuLV. En fait, cette hétérogénéité d'infection s'explique par des protéines d'enveloppe gp70 différentes qui se lient à des récepteurs cellulaires distincts et permettent donc l'infection cellulaire ou non en fonction de la présence dudit récepteur [Risser, R. and Horowitz, J. M. 1983].

1. Virus écotropes

Les virus écotropes ne se répliquent que dans des cellules murines et n'infectent pas les cellules d'autres espèces. Ces virus écotropes peuvent être subdivisés en trois groupes, virus à tropisme B, à tropisme N et à tropisme NB, groupes détaillés ultérieurement au chapitre VI. D [Risser, R. and Horowitz, J. M. 1983].

Les virus écotropes ont une distribution non homogène au sein des sous-espèces murines, certaines souches ne possédant pas de virus écotrope endogène tandis que d'autres en possèdent plusieurs généralement associés à une forte incidence des lymphomes chez ces souches [Risser, R. and Horowitz, J. M. 1983].

Les virus écotropes sont trouvés sous forme exogène et sous forme endogène [Evans, L. H. *et al.* 2003].

Le récepteur cellulaire pour les virus écotropes est le transporteur pour acides aminés cationiques CAT-1 [Levy, J. A. 1999].

2. Virus xénotropes

Les virus xénotropes ne se cultivent que sur cellules d'espèces autres que la souris (exemple vison, lapin, homme, canard) mais ne se répliquent pas au sein des cellules murines. Néanmoins, malgré l'absence d'action directe par défaut de réplication, les virus xénotropes jouent un rôle important, comme nous le verrons plus en détail ultérieurement, en servant de source de séquences recombinantes pour d'autres provirus endogènes, entre autres en fournissant des séquences nécessaires à la réplication de virus défectifs [Risser, R. and Horowitz, J. M. 1983].

Les virus xénotropes sont beaucoup plus variés et fréquents que les virus écotropes au sein des sous-espèces murines [Risser, R. and Horowitz, J. M. 1983]. On peut imaginer que ces virus xénotropes sont les premiers à avoir intégré le génome murin et qu'un mécanisme de résistance par modification des récepteurs cellulaires a permis aux souches murines de se protéger des infections endogènes de ces virus.

Le récepteur pour les virus xénotropes est le récepteur XPR, un transporteur à phosphates. Celui-ci est aussi le récepteur pour les virus polytropes [Levy, J. A. 1999]. On verra ultérieurement qu'un certain polymorphisme au sein du gène codant ce récepteur permet d'empêcher l'entrée des virus xénotropes au sein des cellules murines, alors que celles-ci peuvent être infectées par les virus polytropes.

3. Virus amphotropes

Ce sont des virus qui peuvent infecter aussi bien les cellules murines que celles d'autres espèces. Ces MuLV sont exclusivement exogènes.

Le récepteur pour les virus amphotropes est le symporteur à phosphate sodium-dépendant Pit-2 [Levy, J. A. 1999].

4. Virus polytropes et associés

Ces virus se répliquent aussi bien sur les cellules murines que les cellules non murines. Ils ne sont pas neutralisés par les anticorps dirigés contre les virus écotropes ni contre les virus

xénotropes et n'interfèrent pas avec les infections dues aux virus écotropes et très faiblement avec les infections dues aux virus xénotropes [Risser, R. and Horowitz, J. M. 1983].

Les virus polytropes sont divisés en trois catégories: virus polytropes, virus polytropes modifiés et virus polytropes intermédiaires [Evans, L. H. *et al.* 2003].

Les virus polytropes sont générés par recombinaison d'un virus écotrope exogène ou endogène avec un certain nombre de virus endogènes. Ils sont retrouvés à l'état de provirus endogènes (à la différence des virus amphotropes qui sont exclusivement exogènes) et participent alors à la formation de virus recombinants, entre autres les virus MCF- Mink cell focus-forming virus (voir plus en aval dans le texte) [Evans, L. H. *et al.* 2003; Stoye, J. P. and Coffin, J. M. 1987].

Ces virus ont été fixés relativement récemment au cours de l'évolution du génome murin puisqu'ils ne sont retrouvés que chez un certain nombre de souches du genre *Mus*. Ils sont toutefois plus anciens que les virus écotropes endogènes puisque ceux-ci sont moins largement distribués et amplifiés. L'étude de ces provirus polytropes indique que leur polymorphisme est essentiellement dû à un mélange indépendant de provirus présents au sein des souris utilisées pour créer les lignées croisées avant le début des croisements [Frankel, W. N. *et al.* 1989b].

Le récepteur pour les virus polytropes est le récepteur XPR, un transporteur de phosphates [Levy, J. A. 1999].

C. Régulation

Les provirus endogènes existent à l'état exprimé et non exprimé et leur localisation en plusieurs sites au sein du génome murin leur confère des probabilités différentes d'être spontanément exprimés. Deux facteurs essentiels vont jouer sur cette expression spontanée:

- d'une part les séquences d'ADN de l'hôte encadrant le provirus vont avoir un impact sur le niveau d'expression de celui-ci;
- d'autre part des séquences du provirus vont pouvoir influencer son activité [Risser, R. and Horowitz, J. M. 1983].

II. Mutations du génome murin dues à la présence de provirus

La présence d'ADN étranger au génome cellulaire, en l'occurrence un provirus, au milieu de séquences d'ADN hôte peut modifier cette séquence avec plusieurs conséquences. Cette modification peut n'avoir aucun impact sur la transcription de l'ADN comme elle peut stopper celle-ci et donc masquer la présence d'un gène cellulaire.

La présence de nombreux provirus endogènes de MuLV au sein du génome murin a fait suspecter depuis longtemps leurs implications dans différentes mutations retrouvées chez la souris.

Deux provirus xénotropes sont suspectés dans deux mutations courantes de la souris. La première est la mutation entraînant une dégénérescence rétinienne, nommée mutation rd; la seconde est la mutation non agouti, nommée mutation a, qui est retrouvée lorsque le provirus xénotrope associé est présent au niveau du *locus* correspondant [Frankel, W. N., *et al.* 1989a].

Une autre mutation connue est la mutation hr (mutation des souris glabres). Les souris portant les deux allèles hr montrent une croissance folliculaire normale jusqu'à l'âge de 3 à 4 semaines puis développent une alopecie totale et sont alors plus sensibles aux ultraviolets et aux néoplasmes cutanés induits par carcinogènes que ne le sont des individus rasés. Cette mutation est due à la présence d'un provirus endogène au *locus* concerné [Cachon-Gonzalez, M. B. *et al.* 1994].

De nombreuses autres mutations ont été imputées à la présence de provirus mais la proximité du *locus* muté et d'un provirus ne prouve pas systématiquement l'implication de ce dernier.

III. Virus polytropes et mink cell focus-forming virus

A. Présentation des MCF

En étudiant le processus cancérigène à l'origine des leucémies murines, on s'est aperçu que les virus présents au sein des cellules tumorales n'étaient pas les virus endogènes originels correspondant aux provirus décrits dans l'ADN murin mais des virus recombinants [Herr, W. and Gilbert, W. 1983].

Ceux-ci présentent la particularité d'infecter les cellules hôtes des virus écotropes et xénotropes et de produire des foci caractéristiques (amas cellulaires avec absence d'inhibition de contact, lieux d'apoptose cellulaire conséquence de l'effet cytopathogène du virus) quand ils infectent des cellules pulmonaires de vison d'où le nom de mink cell focus-forming virus (MCF) [Hartley, J. W. *et al.* 1977].

Ces provirus recombinants ont une caractéristique commune réunissant la présence de séquences gp70 non-écotropes et de séquences p15E écotropes au sein du gène d'enveloppe.

Deux classes sont distinguées: les virus de classe I sont thymotropes et de nombreux isolats accélèrent l'apparition de la leucémie lorsqu'ils sont inoculés à de jeunes souriceaux; les virus de classe II sont non oncogènes [Herr, W. and Gilbert, W. 1983].

Il semble que ces virus recombinants soient formés au stade pré-leucémique au niveau du thymus, une grande quantité de virus libres dans la cellule étant retrouvés à ce moment là. Au stade leucémique, ces virus sont retrouvés sous forme de provirus intégré à l'ADN cellulaire. Les virions non intégrés sont majoritairement retrouvés au niveau des cellules T immatures du thymus [Herr, W. and Gilbert, W. 1984].

Vraisemblablement, différents processus de recombinaison entre des séquences écotropes et xénotropes aboutissent à la production d'un virus leucémogène MCF. Celui-ci va entraîner une infection massive des cellules T immatures, population majoritaire du thymus. A l'issue de nombreux cycles réplicatifs infectieux et probablement d'une mutation insertionnelle, une tumeur monoclonale se développe contenant plusieurs provirus acquis de manière somatique. On retrouve en l'occurrence des provirus recombinants extrêmement homogènes au sein d'un thymus leucémique

alors qu'une certaine hétérogénéité est retrouvée entre différents thymus leucémiques [Herr, W. and Gilbert, W. 1984].

B. Formation des MCF par recombinaison

En réalité, les virus recombinants MCF semblent être une étape obligatoire au sein du processus oncogène des virus de la leucémie murine (MuLV) écotropes. On a vu que l'ADN murin contenait plusieurs provirus écotropes endogènes, tel que les provirus Akv (provirus présents chez les souris AKR), et, en outre, qu'ils peuvent être infectés par différents virus écotropes exogènes comme le Friend-MuLV et le Moloney-MuLV [Evans, L. H. and Cloyd, M. W. 1984].

L'Akv est à l'origine de lymphomes et/ou accélère la formation de ceux-ci tandis que le Friend-MuLV est responsable de leucémies érythrocytaires et le Moloney-MuLV est à l'origine de leucémies lymphocytaires [Evans, L. H. and Cloyd, M. W. 1984]. De plus, les MCF sont impliqués dans certains désordres neurologiques [Evans, L. H. *et al.* 2003; Portis, J. L. *et al.* 1995].

Ces différents virus écotropes, endogènes ou exogènes, se recombinent avec des séquences endogènes pour former les virus recombinants MCF [Evans, L. H. and Cloyd, M. W. 1984].

Le processus de recombinaison qui est mis en jeu ici est un processus assez complexe. Les premières études qui ont essayé de déterminer l'origine précise des séquences composant les MCF ont montré que la structure générale était celle du virus écotrope infectieux, avec des gènes LTR et *env* modifiés [Quint, W. *et al.* 1984]. En effet la séquence U3 et une partie de la séquence p15E (protéine TM) proviennent d'un virus endogène xénotrope et la séquence gp70 (protéine SU) provient d'un virus endogène différent [Quint, W. *et al.* 1984]. La séquence LTR modifiée conférerait le potentiel oncogène ainsi que le tropisme tissulaire [Rosen, C. A. *et al.* 1985] tandis que la conservation d'une partie de la séquence p15E permettrait de conserver le potentiel écotrope avec une séquence gp70 qui augmenterait l'infectiosité du virus [Quint, W. *et al.* 1984; Thomas, C. Y. *et al.* 1984].

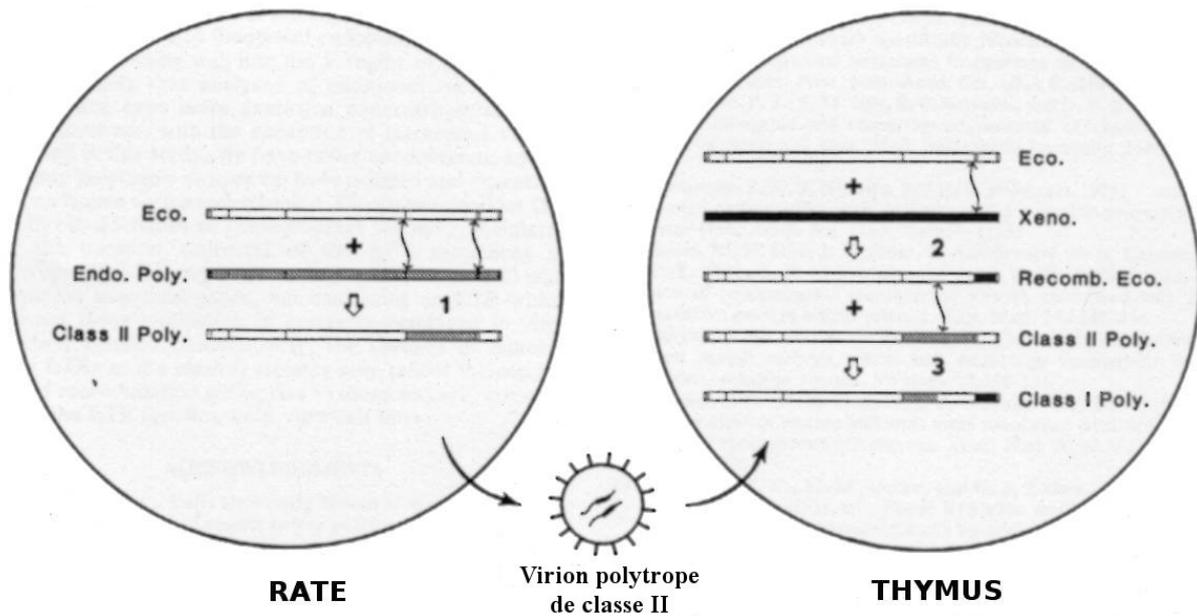
En fait, la séquence 5' du gène *env* incluant la plus grande partie de la région codant gp70 est la première région qui est modifiée par recombinaison. Dans un second temps la séquence 3' de la région codant p15E s'étendant en 3' jusqu'à inclure la région U3 du LTR est substituée. Il apparaît ainsi suivant ce schéma que les deux classes de MCF décrites plus haut soient en fait deux étapes

séquentielles de formation des MCF. En effet, les MCF de classe II seraient en réalité une étape intermédiaire puisqu'ils partagent la région codant gp70 modifiée avec les MCF de classe I mais ils possèdent toujours le LTR d'origine écotrope [Evans, L. H. and Malik, F. G. 1987].

Les MCF de classe II apparaissent de plus précocement (quelques semaines) au niveau de la rate et du thymus, les MCF de classe I étant retrouvés plus tard (quelques mois) uniquement au sein du thymus.

Plusieurs schémas sont alors possibles. Le premier est que le virus écotrope se recombine avec un virus endogène polytrope pour acquérir la séquence en 5' gp70 et former ainsi les MCF de classe II. Ce même virus se recombine au sein du thymus pour acquérir d'un virus endogène xénotrope la région recouvrant p15E et U3. Ces deux virus recombinés se recombinent ensuite ensemble au sein du thymus pour donner les MCF de classe I (Figure 7). Le deuxième schéma est que les MCF de classe II infectant le thymus se recombinent directement avec une séquence endogène xénotrope pour donner les MCF de classe I [Evans, L. H. and Malik, F. G. 1987].

Figure 7. Modèle proposé pour la génération de virus polytropes de classe I. D'après Evans, L. H. and Malik, F. G. 1987. Le modèle proposé inclus trois étapes de recombinaison impliquant trois provirus endogènes et deux recombinants intermédiaires; Eco.: virus écotrope, Endo. Poly.: virus polytrope endogène, Class I/II Poly.: virus polytrope de classe I/II, Xeno.: virus xénotrope, Recomb. Eco.: virus recombinaison écotrope. Eco.: virus recombinaison écotrope.



Dans le cas des MCF produits après recombinaison de l'Akv, nous retrouvons les différentes étapes vues précédemment: héritage de trois provirus parentaux, expression et réplication d'un virus écotrope, infection de cellules exprimant Bxv-1 (virus xénotrope endogène), recombinaison pour acquérir des séquences LTR altérées, infection de cellules exprimant un virus polytrope endogène, recombinaison pour acquérir les séquences *env* modifiées, duplication des séquences accentuatrices du LTR, réplication du virus recombinaison au sein du thymus et enfin transformation des cellules T et croissance tumorale [Stoye, J. P. *et al.* 1991].

On voit ici que la formation des MCF implique donc la présence de trois provirus différents, le passage par deux processus de recombinaison et une duplication du LTR.

En dépit de la complexité du processus, au moins 90 % des souris AKR meurent de thymomes induits par les MCF, ce qui implique que des virus recombinants possédant une structure précisément définie sont générés sur un mode constant et reproductible. Or les événements de recombinaisons ne sont pas des mécanismes programmés mais se déroulent de manière aléatoire: on peut penser que certains produits de recombinaison sont très fortement sélectionnés sur la base des propriétés biologiques conférées par leurs différents composants [Stoye, J. P. *et al.* 1991].

Dans le cas présent, c'est vraisemblablement la région p15E/LTR qui est modifiée en premier, par recombinaison avec le provirus xénotrope Bxv-1, contrairement au cas des MCF produits par recombinaison avec des virus écotropes exogènes. On retrouve par contre le déroulement de la première recombinaison dans un organe autre que le thymus (rate ou moelle osseuse) et au sein des cellules B. Cette première phase ne peut se dérouler que dans un organe exprimant fortement le virus xénotrope puisque celui-ci est incapable d'infecter d'autres cellules. La deuxième recombinaison se déroule au sein du thymus avec un provirus polytrope [Stoye, J. P. *et al.* 1991].

Ce qui semble être communément admis, c'est l'origine monoclonale de la tumeur. On peut imaginer que l'activité aléatoire de recombinaison produit des MCF légèrement différents. Au sein d'une cellule thymocyte immature, il va y avoir intégration et mutation insertionnelle avec activation de facteurs de croissance. C'est donc cette cellule avec ce recombinant particulier qui va être multipliée [Stoye, J. P. *et al.* 1991].

La substitution de la séquence gp70 par une séquence équivalente provenant d'un virus polytrope va permettre l'utilisation de récepteurs cellulaires différents pour l'entrée dans la cellule. Cela favorisera par la suite des infections multiples d'une même cellule. Ces infections répétées vont accélérer le processus malin en augmentant la probabilité de l'activation d'un oncogène par le LTR et/ou l'activation d'une voie régulatrice au sein de la cellule [Evans, L. H. *et al.* 2003; Rulli, K. *et al.* 2001].

L'étude des séquences polytropes recombinant avec le virus écotrope a montré que d'une manière générale peu de provirus endogènes sont à l'origine de cette portion des MCF. On peut se demander pourquoi, alors que les provirus endogènes ont des séquences relativement homologues, tout du moins pour le gène *env*, peu sont sélectionnées par le virus écotrope. En fait, le processus de recombinaison nécessite une forte homologie entre les séquences se substituant. De plus, une

pression sélective va être exercée sur le recombinant quant à sa capacité à coder, en particulier, une protéine SU fonctionnelle et reconnue. Un certain nombre de recombinants ne seront donc pas sélectionnés car codant une protéine SU non fonctionnelle ou désavantageuse [Alamgir, A. S. M. *et al.* 2005].

Comme nous l'avons vu, les processus de recombinaison permettent de modifier les pseudotypes d'un virus et donc d'accroître le nombre de récepteurs cellulaires d'entrée accessibles à ce virus et d'accentuer ainsi son potentiel infectieux. Il a été observé que ces phénomènes de recombinaison peuvent se dérouler plusieurs fois dans la construction des MCF, des virus polytropes en général. On peut donc imaginer qu'un nombre important de virus recombinants peut ainsi être généré, amplifiant les potentialités de schémas pathogènes qui en résultent [Alamgir, A. S. M. *et al.* 2005].

C. Pouvoir oncogène des MCF

Le tropisme et le pouvoir oncogène des virus MCF sont liés à une séquence accentuatrice doublée présente au sein de la région U3 du LTR [DesGroseillers, L. and Jolicoeur, P. 1984]. Parallèlement le gène d'enveloppe *env* semble jouer un rôle complémentaire dans le pouvoir oncogène du virus [Devare, S. G. *et al.* 1978].

En réalité, une seule copie de cette séquence accentuatrice est nécessaire pour conférer le tropisme thymique du virus [Holland, C. A. *et al.* 1989]. Par contre la présence de deux copies semble être importante pour le mécanisme moléculaire de transformation des cellules par le virus [Holland, C. A. *et al.* 1989]. Il est intéressant de noter que la séquence U3 du virus endogène à l'origine de la séquence U3 du MCF ne contient qu'une seule copie; on a donc duplication de la séquence U3 au cours de la recombinaison.

Une autre séquence ayant une activité de transcription et codant un déterminant de la spécificité pathologique du virus est une région riche en GC proximale aux deux copies accentuatrices [Manley, N. R. *et al.* 1989].

La double copie accentuatrice et la région riche en GC comportent de nombreux sites de liaison à des protéines cellulaires. Ces sites de liaison semblent être responsables de la spécificité des différents MCF [Manley, N. R. *et al.* 1989]. Les sites de liaison retrouvés sont le site de liaison pour le Facteur Nucléaire 1 (NF1), FVb1, FVb2, FVa, FVc, GRE, LVa, LVb, LVc et CORE (site de

liaison pour la protéine d'activation 3 AP-3 et la protéine se liant à l'accentuateur/CCAAT) avec des divergences entre les différents MCF [Manley, N. R. *et al.* 1989; Speck, N. A. and Baltimore, D. 1987]. En particulier, LVb et CORE jouent un rôle important dans la spécificité du virus, aussi bien vis-à-vis des cellules infectées que dans l'induction du processus pathogène [Speck, N. A. *et al.* 1990].

Un autre acteur de l'effet leucémogène du virus est la protéine d'enveloppe gp70. Cette protéine se lie au récepteur de l'érythropoïétine (Epo-R) ainsi qu'à différents récepteurs de la même famille. Cette interaction favorise la croissance cellulaire et assure ainsi une prolifération prolongée des cellules infectées [Li, J-P. and Baltimore, D. 1991].

Ainsi, d'après ces deux éléments, on peut voir que la spécificité du virus dépend d'une part du type cellulaire dans lequel sa région accentuatrice va être exprimée mais aussi du type cellulaire qui va exprimer le récepteur hormonal correspondant à gp70 [Li, J-P. and Baltimore, D. 1991].

Dans les événements précoces participant à l'action leucémogène des virus MCF, il semble que ceux-ci induisent une apoptose des cellules du thymus. Les cellules survivant à l'apoptose sont les cellules qui évolueront en cellules malignes. Il y a destruction des cellules jusqu'à ce que l'insertion du provirus induise une mutation qui inhibe l'apoptose et favorise la croissance cellulaire [Yoshimura, F. K. *et al.* 2000].

IV. Le complexe viral Friend (Friend virus complex FVC)

La leucémie érythrocytaire induite par le complexe viral Friend évolue en une maladie à plusieurs étapes avec une hyperplasie aiguë des progéniteurs érythroïdes entraînant une production massive de cellules érythroïdes différenciées suivie plus tard par une multiplication des blastes [Kosmider, O. and Moreau-Gachelin, F. 2006; Moreau-Gachelin, F. 2006].

Le complexe viral Friend est composé de deux virus: le spleen focus-forming virus (SFFV) (virus formant des foci au niveau de la rate) déficient pour la réplication et le Friend murine leukemia virus (F-MuLV) compétent pour la réplication (virus auxiliaire). Le SFFV est responsable de la phase aiguë de la maladie [Kosmider, O. and Moreau-Gachelin, F. 2006; Moreau-Gachelin, F. 2006]. C'est en réalité un recombinant composé d'une séquence homologue au virus écotope F-MuLV et d'une séquence homologue à des virus xénotropes endogènes murins [Troxler, D. H. *et al.* 1977].

Deux souches de SFFV ont été identifiées induisant soit une polyglobulie (SFFVp) soit une anémie (SFFVa) [Kosmider, O. and Moreau-Gachelin, F. 2006; Moreau-Gachelin, F. 2006].

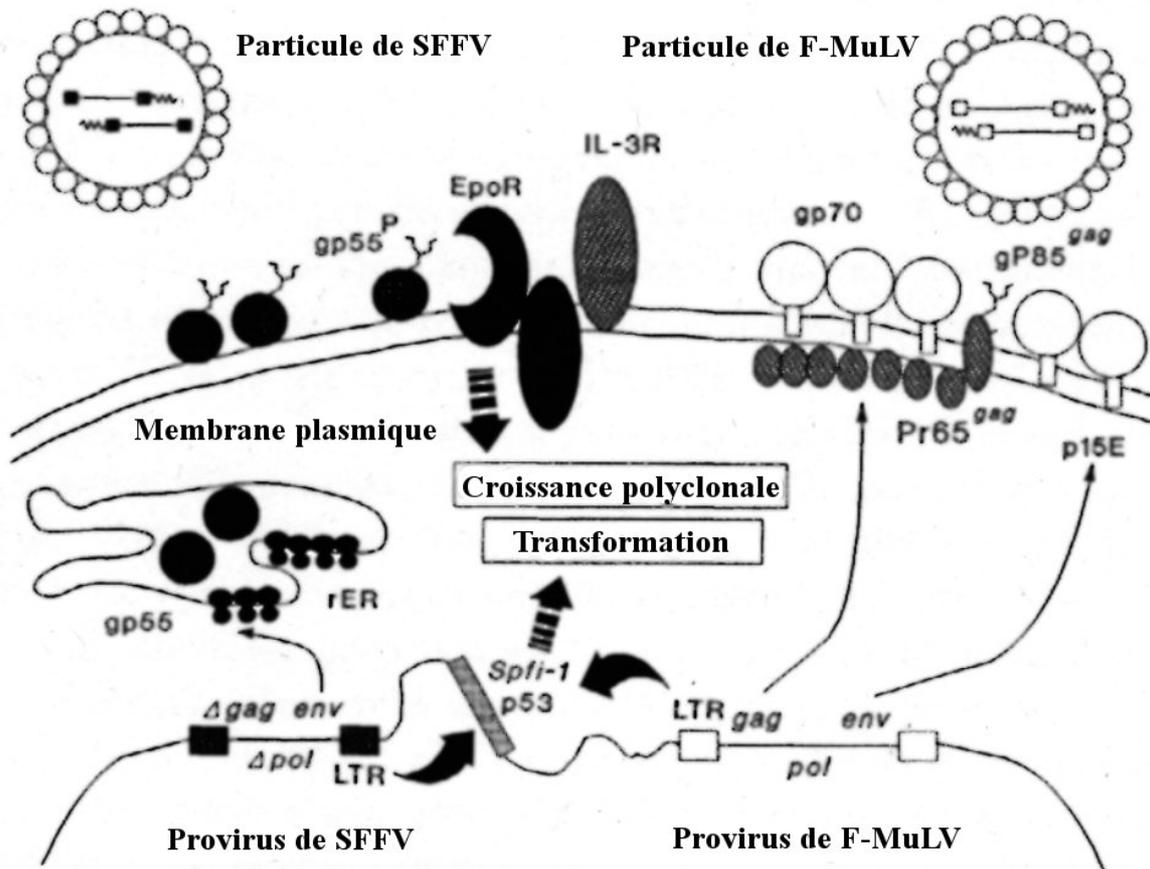
La pathogénicité des deux souches est déterminée par la protéine d'enveloppe gp55. Cette dernière interagit avec le récepteur de l'érythropoïétine et la forme tronquée du récepteur à tyrosine kinase des cellules souches (sf-Stk) induisant une activation constitutive des signaux amenant à une dérégulation de la prolifération et de la différenciation des cellules érythroïdes [Kosmider, O. and Moreau-Gachelin, F. 2006]. Dans les phases plus avancées de la maladie, des proérythroblastes cancérigènes envahissent les tissus hématopoïétiques [Kosmider, O. and Moreau-Gachelin, F. 2006; Moreau-Gachelin, F. 2006].

La différenciation des cellules souches est clonale et est associée à une insertion mutagène du SFFV au sein du *locus* Spfi-1. Le produit du gène spfi-1 est le facteur de transcription PU.1. Il participe à l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques, joue un rôle clef dans le développement lymphoïde et myéloïde mais est normalement silencieux au cours de la différenciation érythroïde normale [Kosmider, O. and Moreau-Gachelin, F. 2006; Moreau-Gachelin, F. 2006].

Un autre processus intervenant au cours des phases tardives de la maladie est la mutation de p53 résultant en l'annulation de ses fonctions suppressives de tumeur et permettant la survie illégitime de proérythroblastes possédant des aberrations génétiques [Kosmider, O. and Moreau-Gachelin, F. 2006; Moreau-Gachelin, F. 2006].

On peut donc voir ici que le processus cancérigène nécessite plusieurs étapes, en l'occurrence deux. Tout d'abord une mutation dérégulant la différenciation cellulaire et une mutation stimulant une prolifération cellulaire inappropriée. La complémentarité de ces deux événements est essentielle au processus leucémogène (Figure 8).

Figure 8. Le complexe rétroviral Friend et son mécanisme d'induction de leucémie. D'après Miyazawa, M. and Fujisawa, R. 1994. [EpoR: récepteur à érythropoïétine; IL-3R: récepteur à interleukine 3; gp55: le produit du gène *env* de SFFV, gp55^P sa forme glycosylée exprimée à la surface des cellules infectées; rER: réticulum endoplasmique granuleux; Pr65^{gag}: précurseur des protéines de noyau de F-MuLV codées par le gène *gag*; gp85^{gag}: polyprotéine glycosylée de surface cellulaire codée par le gène *gag*; p15E: protéine d'ancrage membranaire codée par le gène *env*; Sphi-1: oncogène cellulaire; p53: gène de suppression tumoral; Δ: gènes supprimé].



V. Maladies auto-immunes associées à l'expression des virus endogènes [Miyazawa, M. and Fujisawa, R. 1994]

On a retrouvé dans certains cas des anticorps produits contre les antigènes rétroviraux exogènes et endogènes. Il a été démontré le dépôt de protéines gp70 virales provenant d'un virus xénotrope endogène dans les glomérules rénaux en même temps que des IgG et le facteur du complément C3 de l'hôte. Le développement de complexes immuns gp70-anti-gp70 a été associé à des glomérulonéphrites fatales.

Il a aussi été observé la destruction de cellules musculaires vasculaires amenant au développement de polyarthrite nécrosante associée à la production d'anticorps contre la protéine gp70 virale provenant d'un virus endogène écotrope.

Vraisemblablement le mécanisme par lequel ces séquences normalement tolérées, puisque faisant partie du soi induisent une réaction immunitaire est lié au processus de recombinaison et à la formation de provirus polytropes.

VI. Résistance aux infections par MuLV et dérivés

Pour contrer les différentes infections dues aux *Retrovirus*, on retrouve au sein des cellules murines différents gènes qui vont établir une résistance contre l'infection. Deux processus principaux participent à ce mécanisme: d'une part, une résistance induite par le système immunitaire de l'hôte, d'autre part une résistance endogène aux cellules potentiellement infectées. On connaît aujourd'hui trois voies d'action de ce dernier processus. Tout d'abord une altération des récepteurs de surface empêchant le virus de se lier à la cellule, d'autre part une compétition entre des protéines cellulaires et le virus au niveau des récepteurs de surface et enfin un blocage du cycle répliatif du virus après entrée dans la cellule.

A. Résistance immunitaire [Hasenkrug, K. J. and Chesebro, B. 1997; Miyazawa, M. and Fujisawa, R. 1994]

La souche du complexe viral Friend induisant une polyglobulie est responsable d'une immunodépression et d'une leucémie. Il a été observé qu'une réponse immunitaire adéquate peut permettre une récupération spontanée chez la souris avec un retour de la rate à une taille normale. Cette résistance immunitaire est conférée par au moins quatre gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et un gène indépendant de ce complexe.

La région H-2D du CMH a une influence importante sur cette réponse immunitaire puisqu'elle code les molécules de classe I présentatrices de l'antigène viral aux lymphocytes T cytotoxiques. De plus cette région influe sur la cinétique de la réponse spécifique au virus des cellules CD4+ T helper et contrôle la susceptibilité de l'hôte à l'immunodépression induite par le FVC.

Les gènes de classe II du CMH H-2A et H-2E jouent aussi un rôle important. H-2A influence la présentation de l'antigène aux cellules T CD4+ tandis que H-2E a un rôle plus complexe puisqu'il a en même temps une action positive sur le développement de la maladie mais également une action négative.

Enfin, la région H-2Qa-T1a joue aussi un rôle mais plus mineur dans la réponse immunitaire.

Ces quatre régions vont être actives ou non au sein de cette résistance immunitaire en fonction de l'allèle correspondant trouvé au sein du génome cellulaire.

Indépendamment du CMH, le gène Rfv-3 joue aussi un rôle essentiel mais pas suffisant dans ce mécanisme de résistance. Si l'allèle résistant est présent, Rfv-3 favorise la production d'anticorps antiviraux neutralisants qui permettent d'éliminer la virémie plasmatique après infection par le FVC.

B. Altération des récepteurs cellulaires de surface [Jung, Y. T. *et al.* 2002; Wu, T. *et al.* 2005]

Un des moyens de lutte de la cellule contre les *Retrovirus*, et les virus en général, est la modification des récepteurs cellulaires utilisés par les particules virales. Ainsi l'évolution et la

pression sélective peuvent induire une altération de ces récepteurs empêchant la fixation des protéines d'enveloppe virales.

Ce mécanisme est observé dans le cas des infections par les virus écotropes, xénotropes et polytropes murins.

Un polymorphisme du gène codant le récepteur mCAT-1 chez la souris *Mus dunni* entraîne une résistance à l'infection par le virus écotrope Moloney.

Les virus xénotropes et polytropes murins utilisent le même récepteur, XPR1. Il existe trois variants fonctionnels de ce récepteur. Le variant retrouvé chez les souris de laboratoire permet l'infection par les virus polytropes mais pas par les virus xénotropes. Le variant Sxv retrouvé chez de nombreuses espèces sauvages permet une infection efficace par le virus polytrope et une infection moins efficace par le virus xénotrope. Enfin, le variant Cas retrouvé chez l'espèce asiatique *Mus castaneus* ne permet d'infection ni par le virus polytrope ni par le virus xénotrope.

C. Compétition au niveau des récepteurs

1. Résistance par le gène Fv-4

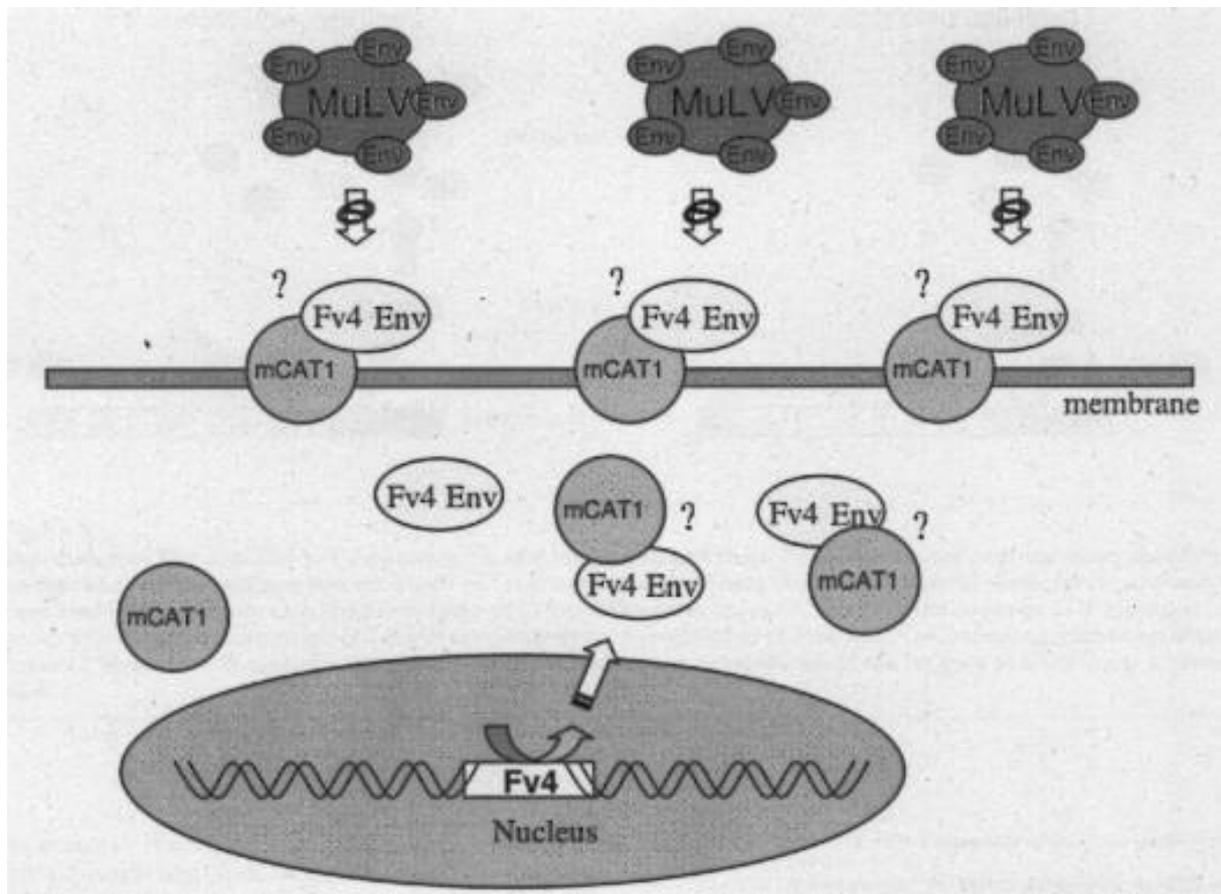
Il a été démontré que les souris portant l'allèle dominant de résistance au *locus* Fv-4 (Fv-4^r) ne développent pas de foci spléniques ni de splénomégalie après inoculation du complexe viral Friend, de même qu'elles ne favorisent pas la croissance des MuLV à tropisme N et B. De plus, elles montrent des résistances similaires aux virus endogènes écotropes [Kozak, C. A. *et al.* 1984].

Il apparaît que le *locus* Fv-4 est associé à une séquence unique correspondant au gène *env* écotrope. Cette séquence diffère des provirus endogènes écotropes trouvés chez la souris [Kozak, C. A. *et al.* 1984]. Elle est en fait constituée de la moitié 3' d'un provirus endogène MuLV (région 3' de *pol*, gène *env* complet, LTR en 3'). La portion 5' provient d'une séquence non originaire d'un MuLV: Fv-4 semble donc être un provirus tronqué [Ikeda, H. and Sugimura, H. 1989].

Cette séquence associée au *locus* Fv-4 produit une glycoprotéine de surface homologue à la protéine gp70 virale. La résistance liée à ce *locus* semble donc agir par compétition au niveau des récepteurs de surface cellulaires et elle interfère avec les virus écotropes exogènes et endogènes ainsi qu'avec une partie des recombinants MCF [Kozak, C. A. *et al.* 1984]. Cette compétition s'effectue par blocage des récepteurs cellulaires par la glycoprotéine d'enveloppe du gène Fv-4,

empêchant l'infection par le virus infectieux, selon le modèle classique de résistance aux superinfections [Ikeda, H. and Sugimura, H. 1989] (Figure 9).

Figure 9. Schéma du mécanisme d'interférence Fv4 sur l'infection par MuLV. D'après Nethe, M. *et al.* 2005. L'expression de Fv4 résulte en une production de protéines d'enveloppe au sein du cytoplasme. La liaison de cette protéine avec le récepteur mCAT1, dans le cytoplasme ou à la surface cellulaire empêche les protéines d'enveloppe de MuLV d'interagir avec mCAT1 soit parce que le récepteur est déjà occupé par Fv4 soit parce que celui n'a pas pu rejoindre la surface cellulaire.



2. Résistance par le gène Rmcf [Jung, Y. T. et al. 2002]

Les études portant sur un *locus* présentant un gène de résistance nommé Rmcf suggèrent que celui-ci procède par le même mécanisme que Fv-4. Les souris exprimant ce gène, situé sur le chromosome 5, sont résistantes aux infections par les virus polytropes MCF. De plus, ce gène augmente le temps de latence et/ou l'incidence des maladies normalement induites par l'émergence de virus MCF recombinants.

Le gène est homologue à un provirus polytrophe modifié. Il possède deux LTR et des séquences *env* et *gag*. Par contre la séquence *pol* est tronquée. Le mécanisme d'action passe par la synthèse d'une protéine d'enveloppe SU qui bloquerait les récepteurs cellulaires XPR1 limitant l'infection par d'autres virus utilisant les mêmes récepteurs, en l'occurrence les virus polytropes MCF.

3. Résistance par le gène Rmcf2

La séquence Rmcf2 est homologue à un provirus endogène xénotrophe. Il bloque l'infection par des virus polytropes. Il est composé d'une séquence presque complète (deux LTR, *gag*, *pol* et *env*) mais possède un codon stop au niveau du gène IN (gène codant la protéine intégrase). Son mécanisme d'action est très proche de celui du gène Rmcf [Wu, T. et al. 2005].

D. Blocage du cycle répliatif: résistance par le gène Fv-1

Deux allèles du gène Fv-1 (Fv-1^b et Fv-1ⁿ) interfèrent avec certaines classes de MuLV [Nethe, M. et al. 2005]. Fv-1 est un gène présent au sein du génome de toutes les souris de laboratoire et chez une partie des souris sauvages. Ces deux allèles ont été définis en fonction de leur présence chez deux souches murines: NIH et BALB [Pryciak, P. M. and Varmus, H. E. 1992]. Les cellules portant l'allèle Fv-1ⁿ sont résistantes à l'infection par les MuLV considérés à tropisme B tandis que les cellules portant l'allèle Fv-1^b sont résistantes à l'infection par les MuLV considérés à tropisme N [Nethe, M. et al. 2005]. Cette restriction est dominante, ainsi les cellules portant les allèles Fv-1^{n/b} sont résistantes aux MuLV des deux tropismes [Pryciak, P. M. and Varmus, H. E. 1992]. De plus, un troisième type de virus, les virus à tropisme NB, peuvent infecter aussi bien les

cellules exprimant l'allèle Fv-1^b que Fv-1ⁿ [Nethe, M. *et al.* 2005]. Les MuLV à tropisme N sont des virus générés par des provirus endogènes écotropes, tandis que les MuLV à tropisme B semblent être générés par recombinaison de provirus endogènes écotropes avec des provirus endogènes non écotropes apportant le déterminant B au virus [Boone, L. R. *et al.* 1988].

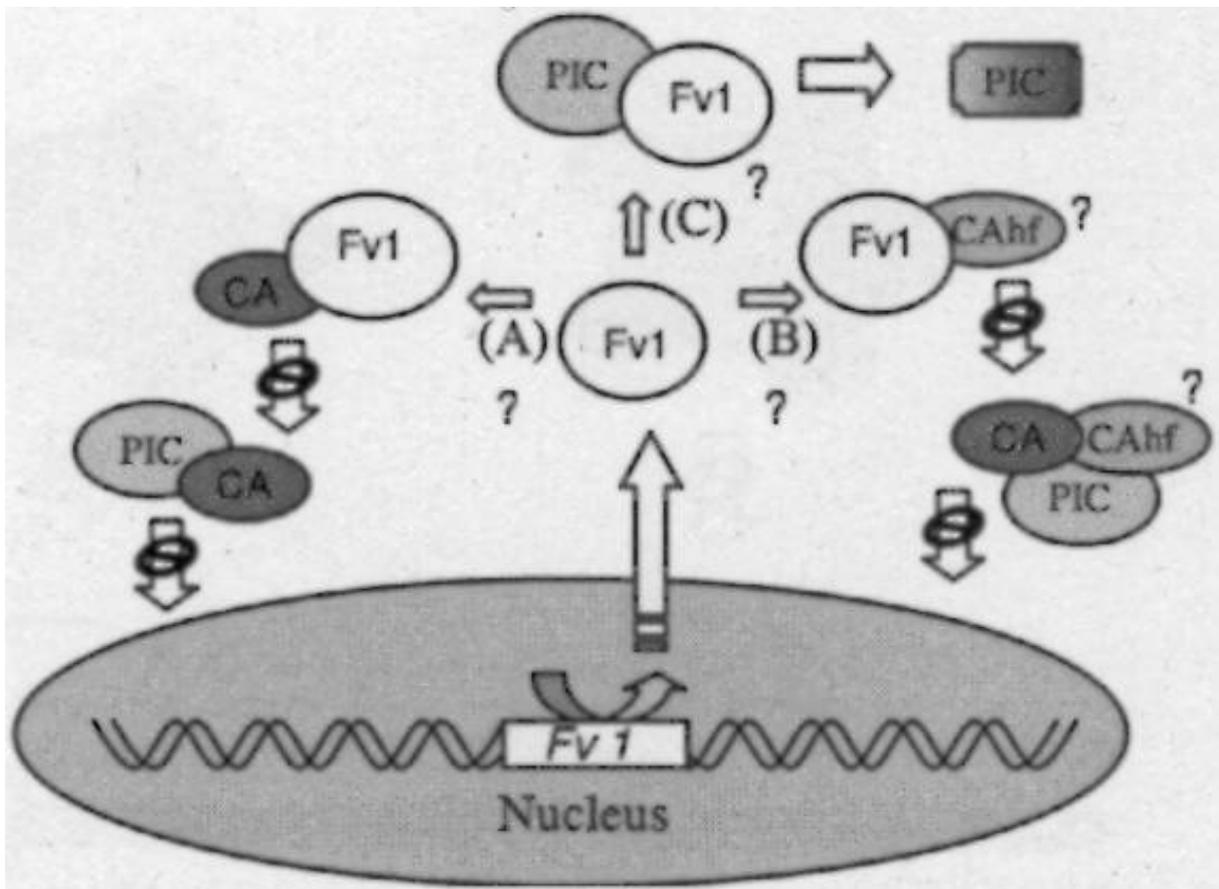
La restriction générée par Fv-1 a lieu après la pénétration du virus dans la cellule mais avant l'intégration du génome proviral [Nethe, M. *et al.* 2005].

En fait, la séquence Fv-1 est similaire au gène *gag*. Or on sait que les protéines codées par *gag* interagissent les unes avec les autres au cours du processus répliatif rétroviral, ce qui est essentiel pour l'assemblage du virion [Nethe, M. *et al.* 2005].

Vraisemblablement, des interactions entre la protéine homologue et celle codée par *gag* de Fv-1 et la protéine CA dérivée de *gag* viral sont impliquées dans le mécanisme de résistance [Nethe, M. *et al.* 2005].

CA semblerait agir comme un signal de transport pour le complexe de pré-intégration (PIC) pour faciliter son importation au sein du *nucleus*. La localisation du produit de Fv-1 suggère qu'il doit affecter le virion sur son chemin vers le *nucleus*. L'hypothèse la plus probable est que la protéine codée par Fv-1 se lie à CA d'une manière spécifique altérant ainsi la liaison de CA à PIC. PIC resterait ainsi séquestré au sein du compartiment cytoplasmique et ne serait alors pas capable de migrer vers le noyau. Néanmoins, une interaction directe de la protéine codée par Fv-1 sur PIC ne peut être exclue, modifiant sa conformation de manière à ce qu'il devienne non fonctionnel [Nethe, M. *et al.* 2005] (Figure 10).

Figure 10. Schéma des trois mécanismes d'interférence possibles induits par l'expression de Fv-1. D'après Nethe, M. *et al.* 2005. La voie A décrit l'attachement de la protéine codée par Fv-1 à CA, entraînant une restriction de la participation de CA dans l'intégration du complexe de pré-intégration (PIC); voie B, attachement de la protéine codée par Fv-1 à CAhf, facteur auxiliaire de CA, l'empêchant d'assister CA au cours de l'intégration de PIC; voie C: attachement direct de la protéine codée par Fv-1 au PIC, modifiant sa conformation et entraînant une restriction de processus ultérieur au cours de l'intégration.



E. Cas particulier: intervention au sein du processus oncogène du virus

L'allèle Fv-2^f atténue voire annule les effets de l'infection par le virus SFFV [Hoatlin, M. E. *et al.* 1990]. Fv-2 est en réalité Ron, un membre de la sous-famille Met des récepteurs à tyrosine kinases. Ron code le récepteur à tyrosine kinase Stk. Les cellules porteuses de l'allèle sensible de Fv-2 codent une forme tronquée de Stk: SF-Stk dont la production est corrélée à une susceptibilité à l'infection par le SFFV. La protéine produite à partir du transcrit de SF-Stk ne possède plus de domaine extracellulaire mais possède toujours un domaine transmembranaire et kinase. Cette perte du domaine extracellulaire peut être à l'origine d'une activation. SF-Stk est fortement apparentée à l'oncogène v-sea retrouvé chez certaines espèces d'oiseaux [Ney, P. A. and D'Andrea, A. D. 2000].

Au contraire, les cellules porteuses de l'allèle résistant ne produisent pas de SF-Stk ou en très petite quantité [Ney, P. A. and D'Andrea, A. D. 2000]. L'allèle Fv-2^r agit en empêchant la propagation du signal émanant du complexe gp55/EpoR. Fv-2^r coderait une protéine qui contrôle le signal mitogène émis par le récepteur de l'érythropoïétine (EpoR). Cette protéine peut être une sous-unité de EpoR, une transducine qui se lie de manière intermittente avec le complexe ligand/EpoR ou encore une protéine qui contrôle le métabolisme ou la répartition sur la surface cellulaire de EpoR [Hoatlin, M. E. *et al.* 1990].

VII. Conclusion

On a pu observer chez le modèle murin la relation directe entre la présence de virus endogènes et l'induction de processus oncogènes. Ce modèle a servi pour l'étude des événements précoces et tardifs menant à l'apparition de leucémies et lymphomes.

Malgré un rôle dans la résistance aux infections, ce qui caractérise le plus les MuLV endogènes est leur potentiel de recombinaison. La variété impressionnante de provirus endogènes, amplifiée par la variété de souches murines, permet d'appréhender un nombre certain de virus recombinants, quelques uns relativement bien compris à ce jour, mais avec beaucoup de questions en suspens. De plus, la vitesse de reproduction des souris liée à la vitesse de réplication des virus laisse entrevoir l'émergence hautement probable de nouveaux recombinants.

Le chapitre ici présent n'avait pas pour but de décrire l'ensemble des connaissances concernant le virus de la leucémie murine, mais de mettre en avant les caractéristiques générales qui ont été par la suite utilisées dans l'étude et la compréhension des autres *Retrovirus* en général, endogènes en particulier.

**Troisième chapitre: virus des tumeurs mammaires
murines**

I. Généralités

Le mouse mammary tumor virus (MMTV) ou virus des tumeurs mammaires de la souris est un *betaretrovirus* associé à des carcinomes mammaires chez les souches murines fréquemment utilisées en laboratoire [Günzburg, W. H. and Salmons, B. 1992]. Il a été le premier *Retrovirus* décrit chez les mammifères. C'est un carcinogène biologique qui induit des lésions pré-malignes et des tumeurs malignes des glandes mammaires par insertion mutagène [Callahan, R. and Smith, G. H. 2000].

L'expression du MMTV est spécifique du tissu mammaire et régulée en partie par le développement de ce tissu. Les protéines virales et les virions sont donc essentiellement produits dans les cellules alvéolaires des glandes mammaires pendant la gestation et au cours de leur tumorigénèse [Ponta, H. *et al.* 1985].

Le virus peut être transmis par deux voies différentes:

- soit par voie horizontale, les particules virales produites au niveau des glandes mammaires sont alors transmises par le biais du lait maternel au souriceau;
- soit par voie verticale, le virus est hérité de manière endogène, sur un mode mendélien, par les cellules de la lignée germinale [Günzburg, W. H. and Salmons, B. 1992].

Bien que les glandes mammaires soient le site principal d'expression du virus, d'autres organes et types cellulaires expriment le virus en quantité moindre, comme les poumons, le foie, les glandes salivaires, les vésicules séminales et/ou la prostate ainsi que les testicules. C'est la forme endogène du virus qui est alors exprimée [Günzburg, W. H. and Salmons, B. 1992].

Dès les premières études attachées à l'origine virale des tumeurs mammaires de la souris, il a été observé la présence de séquences provirales endogènes. Toutes les souches de souris étudiées contiennent en effet différentes copies de MMTV endogènes. Par contre, peu de séquences codent des virus infectieux, la plupart étant silencieuses ou codant seulement une des protéines virales [Groner, B. and Hynes, N. E. 1980].

Ces copies de MMTV endogènes sont retrouvées chez de nombreuses espèces murines sauvages, prouvant que ce n'est pas seulement une mutation de laboratoire mais bien une intégration qui a eu lieu par infection virale de l'espèce en milieu naturel [Imai, S. *et al.* 1994].

Environ vingt *loci* contenant des séquences endogènes de MMTV ont été génétiquement définis. Ils sont extrêmement similaires entre eux mais des polymorphismes mineurs entre les copies sont détectables lors d'analyses à l'aide d'enzyme de restriction. Occasionnellement des gènes proviraux incomplets contenant uniquement *env* ou un LTR sont détectés. Cette forte conservation des gènes proviraux peut refléter une intégration relativement récente [Ponta, H. *et al.* 1985].

C'est essentiellement chez la souche murine GR que l'expression complète du virus endogène a été observée. Le provirus ressemble fortement à l'ADN du virus exogène transmis par infection. Tous les traits caractéristiques des *Retrovirus* infectieux sont possédés par ce provirus endogène. De plus ces provirus sont indistinguables par carte de restriction de l'ADN synthétisé après infection par la forme exogène. Enfin les souris GR développent des tumeurs mammaires avec une fréquence élevée même lorsqu'elles sont protégées du risque d'infection par le lait maternel [Cohen, J. C. and Varmus, H. E. 1980]. Il a plus récemment été démontré que ces séquences endogènes exprimées de manière dominante étaient capables de produire des particules virales infectieuses retrouvées dans le lait [Callahan, R. and Smith, G. H. 2000].

En réalité, à ce jour uniquement trois *loci* semblent responsables d'une production virale infectieuse produite par des séquences endogènes [Kozak, C. *et al.* 1987].

Mtv-1 est exprimé en virus infectieux et est associé à des tumeurs d'occurrence tardive [Kozak, C. *et al.* 1987]. Mtv-2 est responsable d'une forte production virale amenant de hauts titres de virus dans le lait essentiellement à la première lactation avec l'apparition de tumeurs mammaires à haute fréquence et relativement précoces [Morris, D. W. *et al.* 1986]. Mtv-3 est transcrit mais ne produit que des protéines codées par *gag* [Ponta, H. *et al.* 1985]. Enfin Mtv-4 est un seul *locus* trouvé chez la souche suisse SHN et contrôle la production de virus infectieux et la formation de tumeurs mammaires précoces [Kozak, C. *et al.* 1987]. C'est le *locus* Mtv-2 que l'on retrouve chez la souche murine GR présentée en amont [Groner, B. and Hynes, N. E. 1980].

D'une manière générale, que ce soit le virus exogène ou endogène, on trouve une grande diversité dans le développement de la maladie chez les différentes souches murines. Ces différences peuvent être mises en rapport avec une variété des souches virales et des variations minimales de leur mode d'action. Chez les souches C3H, les femelles développent des tumeurs mammaires indépendantes de leur statut reproducteur et cela à un âge précoce (sept à dix mois). Les femelles que l'on a protégées de la forme à transmission horizontale développent des tumeurs plus tardivement, vers deux ans (implication de Mtv-1) [Callahan, R. and Smith, G. H. 2000]. Les

souches GR, BR6 et RIII développent aussi des tumeurs mais dépendantes du statut reproducteur puisque liées à la gestation et devenant par la suite indépendantes de la gestation.

L'étude du mouse mammary tumor virus et de ses versions exogènes et endogènes ne présente pas un réel intérêt médical pour la souris mais plutôt pour le modèle qu'il fournit à l'étude d'un *Retrovirus* responsable de tumeurs mammaires et la comparaison avec les mécanismes retrouvés chez l'homme et l'animal. De plus, le MMTV est un modèle pour les autres *betaretrovirus* que l'on peut retrouver chez les espèces animales ainsi que pour les différents mécanismes cancérigènes.

La frontière entre les formes exogène et endogène du virus est parfois mal comprise ou inexistante essentiellement dans leur action au sein des cellules mammaires, c'est pourquoi exceptionnellement dans ce chapitre, le virus pourra être décrit sans précision de l'origine de celui-ci (endo ou exo). Certaines fois, une précision sur l'origine sera apportée pour plus de clarté même si celle-ci est discutable; en effet, comme nous le verrons, la forme endogène transmise verticalement peut produire des particules virales qui vont être transmises horizontalement, et vont donc rentrer dans le cadre de la forme exogène du virus.

De plus, les différents *loci* proviraux *Mtv* peuvent correspondre soit à la forme endogène soit à la forme exogène, c'est pourquoi leur origine sera précisée quand nécessaire.

II. Régulation de l'expression de MMTV

A. Régulation par les phénomènes de méthylation

Bien que les provirus endogènes soient très similaires dans leur structure, on peut observer des différences souvent minimes dans leur expression. Cela suggère donc que les différences de leur activité biologique ne sont pas le résultat de leur séquence d'ADN primaire mais plutôt de facteurs régulateurs additionnels. Une des hypothèses est qu'une différence dans la structure de la chromatine, liée à la position du provirus au sein du chromosome, expliquerait ces différences d'expression [Ponta, H. *et al.* 1985].

Entre autre, la méthylation de l'ADN a été impliquée dans des modifications structurales corrélées à une atténuation de l'expression génique, probablement en jouant sur une configuration altérée de la chromatine [Ponta, H. *et al.* 1985; Günzburg, W. H. and Salmons, B. 1992]. En effet, une séquence définie d'ADN présente une méthylation spécifique du tissu et du *locus* où elle est présente et cette variation de méthylation dépendante de la position au sein du chromosome et de l'environnement cellulaire semble expliquer la variation d'expression de cette séquence [Ponta, H. *et al.* 1985]. On peut observer dans le Tableau 6 les différences de méthylation en fonction des tissus impliqués.

Tableau 6. Résumé des méthylations des gènes proviraux de enMMTV au sein de différents organes. D'après Ponta, H. *et al.* 1985. La répartition des méthylations a été étudiée en utilisant une technique de double digestion. La digestion par *EcoRI* permet de caractériser le *locus* du provirus; la digestion par *HpaII* permet de définir le statut de méthylation des copies. Le signe + indique un état méthylé tandis que le signe - un état hypométhylé.

souche murine	kb	loci	localisation chromo -somique	méthylation dans					
				foie	poumon	coeur	rate	glande mammaire	tumeur mammaire
GR	21.8	Mtv-3	11	+	§	§	-	-	-
	16.0	Mtv-19	1	+	+	+	-	+	-
	11.5	Mtv-19	1	+	+	+	§	+	-
	11.0	Mtv-2	18	+	+	+	+	§	-
	10.0	Mtv-20	4	-	-	-	-	-	-
	8.1	Mtv-20	4	-	-	-	-	-	-
	7.5	Mtv-8	18	+	+	+	+	+	+
	7.0	Mtv-2	18	+	+	+	+	§	-
	6.9	Mtv-3	11	+	§	+	-	-	-
	6.2	Mtv-8	18	+	+	+	+	+	+
expression d'ARN spécifique de MMTV				-	±	-	+	++	+++
C3H	14.5	Mtv-6		§				-	-
	7.5	Mtv-8	18	+				+	+
	6.2	Mtv-8	18	+				+	+
	5.9	Mtv-1	7	+				+	+
	5.4	Mtv-11		+				-	-
	4.2	Mtv-1	7	+				+	+
	1.4	Mtv-14	6						
O20	17.0			§	-	-	-		+
	13.0			+	+	+	+		-
	10.0			-	-	-	-		-
	7.5			+	§	§	-		-
	5.3			+	+	+	§		-
	4.8			+	+	+	§		-
expression d'ARN spécifique de MMTV				-	+	-	+		
FM/JmsA	17.0			+					§
	16.0			+					§
	12.5			+					§
	10.0			-					-
	9.0			+					+
	7.8			-					-
	7.7			+					+
	6.4			+					§
	5.7			+					+
4.6			+					+	
C57BL	9.6	Mtv-9	12	+			§		-
	7.5	Mtv-8	18	+			+		+
	7.1	Mtv-9	12	+			+		+
	6.2	Mtv-8	18	+			+		+
expression d'ARN spécifique de MMTV				-			+		+++
BALB/c	14.5	Mtv	16	+				-	-
	9.6	Mtv-9	12	+				-	-
	7.5	Mtv-8	18	+				+	+
	7.1	Mtv-9	12	+				+	+
	6.2	Mtv-8	18	+				+	+
expression d'ARN spécifique de MMTV				-				+	

Des expériences ont donc été entreprises pour corréler l'état de méthylation des *loci* proviraux individuels avec l'expression de enMMTV. Chez les adultes de la souche murine GR, au moins deux *loci*, Mtv-2 et Mtv-3 sont transcriptionnellement actifs. Les provirus associés avec ces *loci* sont hypométhylés dans les glandes mammaires alors qu'ils sont normalement méthylés dans les tissus hépatiques où ils ne sont pas exprimés. Une observation analogue a été faite en infectant des cellules avec des copies de enMMTV transcriptionnellement actives pour les comparer à des gènes endogènes transcriptionnellement inactifs au sein de ces mêmes cellules. Les gènes actifs étaient alors hypométhylés tandis que les gènes endogènes étaient eux largement méthylés. De manière similaire, on peut noter que les gènes de exMMTV retrouvés après infection par le lait sont eux aussi hypométhylés et transcriptionnellement actifs [Ponta, H. *et al.* 1985].

Puisque les séquences sont très similaires entre elles, les différences de méthylation sont plus probablement dues au site d'intégration du gène. En effet, les séquences exogènes semblent prendre une conformation au sein de la chromatine identique à l'ADN génomique cellulaire environnant. La méthylation est donc imposée par le site d'intégration [Ponta, H. *et al.* 1985].

La distribution de la méthylation est régulée pendant la différenciation cellulaire et on remarque une perte spécifique de méthylation dans les carcinomes mammaires. Il semble que cette perte de méthylation est une caractéristique générale des cellules à croissance rapide. Cela a été observé entre autre dans le cas des tumeurs mammaires [Ponta, H. *et al.* 1985].

L'hypométhylation forme donc un contrôle de l'expression des gènes MMTV endogènes, probablement à travers son influence sur la structure de la chromatine, influençant la capacité des facteurs de transcription à se lier aux séquences cibles. Cette méthylation semble empêcher entre autre l'expression de l'ADN proviral au sein des hépatocytes et participer à la transition des cellules mammaires d'un état réceptif aux hormones à un état non réceptif; en effet cette transition est accompagnée d'une diminution de l'expression du MMTV et une augmentation de la méthylation [Günzburg, W. H. and Salmons, B. 1992]. On signalera tout de même qu'elle semble être un prérequis mais pas une condition suffisante pour l'expression des gènes [Ponta, H. *et al.* 1985].

B. Régulation hormonale

Lors de l'étude de lignées cellulaires, une quantité accrue d'ARN viral synthétisé et de virions produits a pu être observée lors du traitement de ces cellules par des hormones glucocorticoïdes. Ainsi les *stimuli* hormonaux qui contrôlent le développement normal des glandes mammaires pourraient être impliqués dans les changements de structure de la chromatine et de méthylation de l'ADN observés pendant la différenciation cellulaire [Ponta, H. *et al.* 1985].

Les séquences impliquées dans la médiation de la stimulation par les glucocorticoïdes de la transcription du MMTV ont été localisées au sein du promoteur du MMTV situé dans la région U3 du LTR [Ponta, H. *et al.* 1985; Günzburg, W. H. and Salmons, B. 1992]. Ces séquences sont dénommées HRE pour Hormone Responsive Elements (éléments réceptifs aux hormones). Ce sont quatre sites de reconnaissance (deux distaux et deux proximaux) qui se superposent et auxquels les facteurs nucléaires activés par les glucocorticoïdes se lient, accentuant le taux de transcription de manière importante [Ponta, H. *et al.* 1985; Günzburg, W. H. and Salmons, B. 1992]. Il a été montré que ces séquences sont suffisantes pour la régulation hormonale de la transcription virale. Les HRE agissent sur plusieurs promoteurs hétérologues aussi bien en orientation sens qu'antisens. L'action hormonale est relativement insensible à la distance entre site de liaison et *locus* activé qui peut aller au-delà de 1100 nucléotides; ainsi les HRE peuvent être transposés en tant qu'éléments fonctionnels et agissent en 5' et 3', indépendamment de l'orientation et de la distance [Ponta, H. *et al.* 1985]. Un HRE peut donc être qualifié d'élément initiateur hormone-dépendant.

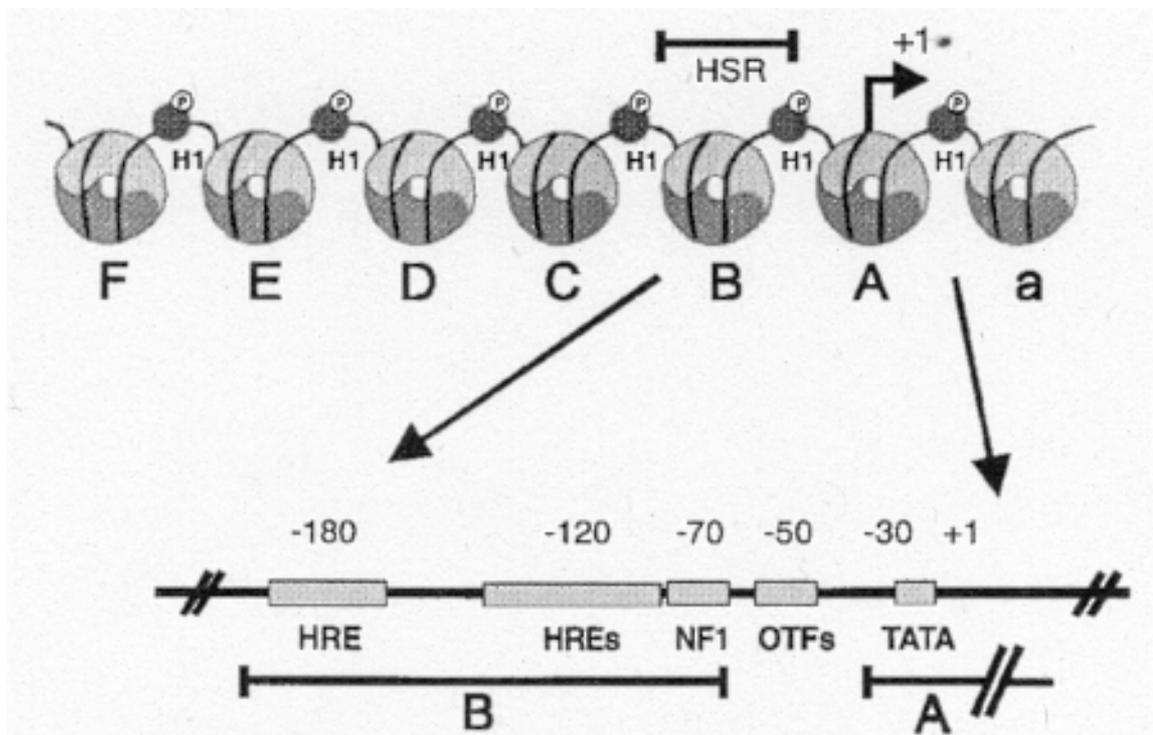
La compaction de l'ADN en chromatine fournit un niveau additionnel de régulation génomique chez les eucaryotes qui n'est pas disponible chez les procaryotes. Quand la chromatine est dans sa conformation la plus compacte, la plupart des promoteurs sont réprimés au niveau de la transcription et les facteurs de transcription ont un accès réduit à leur site de liaison [Deroo, B. J. and Archer, T. K. 2001].

L'élément de structure de base de la chromatine est le nucléosome qui consiste en une molécule d'ADN enroulée autour de deux macromolécules composées chacune de quatre histones. Chaque nucléosome est lié par l'histone H1 et cet ensemble permet la compaction de l'ADN en chromosome. Cet arrangement facilite le conditionnement de l'ADN mais représente en général une barrière pour la transcription. En effet, l'ADN conditionné en chromatine résiste aux attaques des

nucléases et inhibe la liaison des facteurs de transcription aux séquences reconnues [Deroo, B. J. and Archer, T. K. 2001].

Le fragment LTR de l'ADN rétroviral du MMTV est organisé en six nucléosomes (Figure 11). Les nucléosomes A et B contiennent le promoteur proximal et le nucléosome B contient quatre HRE qui permettent, comme on l'a vu, une forte activation du promoteur sous l'action des glucocorticoïdes. Le promoteur proximal contient aussi des sites de liaison pour le facteur nucléaire 1 (NF1), les facteurs de transcription liant à OCTA (OTF) et la protéine de liaison à la séquence TATA (TBP) [Deroo, B. J. and Archer, T. K. 2001].

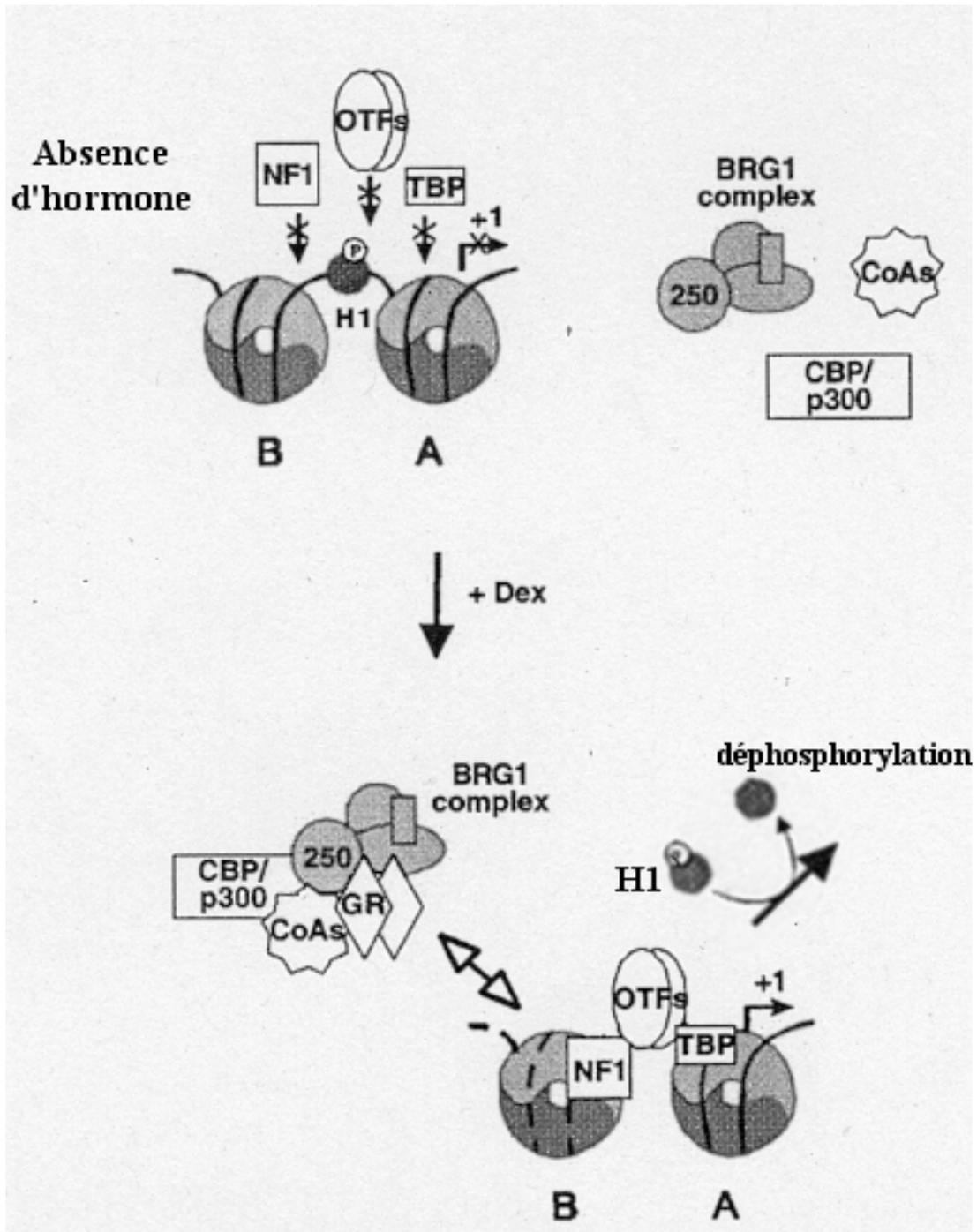
Figure 11. Organisation nucléosomique du LTR de MMTV. D'après Deroo, B. J. and Archer, T. K. 2001. Le LTR se répartit sur six nucléosomes; la région hypersensible aux actions hormonales (HSR) est située au niveau du nucléosome B; le promoteur proximal contient des sites de liaison pour les récepteurs aux hormones stéroïdes (HRE), le facteur nucléaire 1 (NF1), les facteurs de transcription octamer (OTF) et la protéine de liaison à TATA (TBP).



Le traitement par les glucocorticoïdes rend la région du nucléosome B hypersensible aux endonucléases. Avant le traitement par les glucocorticoïdes, la conformation répressive de la chromatine empêchait la liaison de NT1, OTF et TBP. Le traitement hormonal et la liaison du récepteur nucléaire aux glucocorticoïdes (GR) avec HRE altèrent l'architecture nucléosomique et induisent une transition structurelle du nucléosome B qui permet à NT1, OTF et TBP de se lier et ainsi la formation de complexes pré-initiateurs [Deroo, B. J. and Archer, T. K. 2001].

En fait, après liaison avec l'hormone, GR, qui est retrouvé dans le cytoplasme lorsqu'il est non lié, se déplace vers le noyau et s'associe au complexe de remodelage de la chromatine chez les mammifères BRG1/BRG1 Associated Factor (BAF) qui lui est présent dans le noyau (Figure 12). Ce complexe interagit avec HRE entraînant le déplacement des histones H1. Ce déplacement est activé par la phosphorylation de H1 qui vraisemblablement est initiée par le recrutement d'une protéine kinase par GR. On a alors altération de l'interaction de l'ADN avec les histones au cœur du nucléosome de manière à ce que la séquence soit plus sensible au clivage par les enzymes de restriction, nucléases et réactifs chimiques. Le site de liaison de NF1 sur le nucléosome B devient disponible et est alors occupé par la protéine, les protéines OTF se lient à leurs sites de liaison entre le nucléosome A et B pendant que la protéine TBP se lie au nucléosome A non modifié activant ainsi la transcription [Collingwood, T. N. *et al.* 1999; Deroo, B. J. and Archer, T. K. 2001].

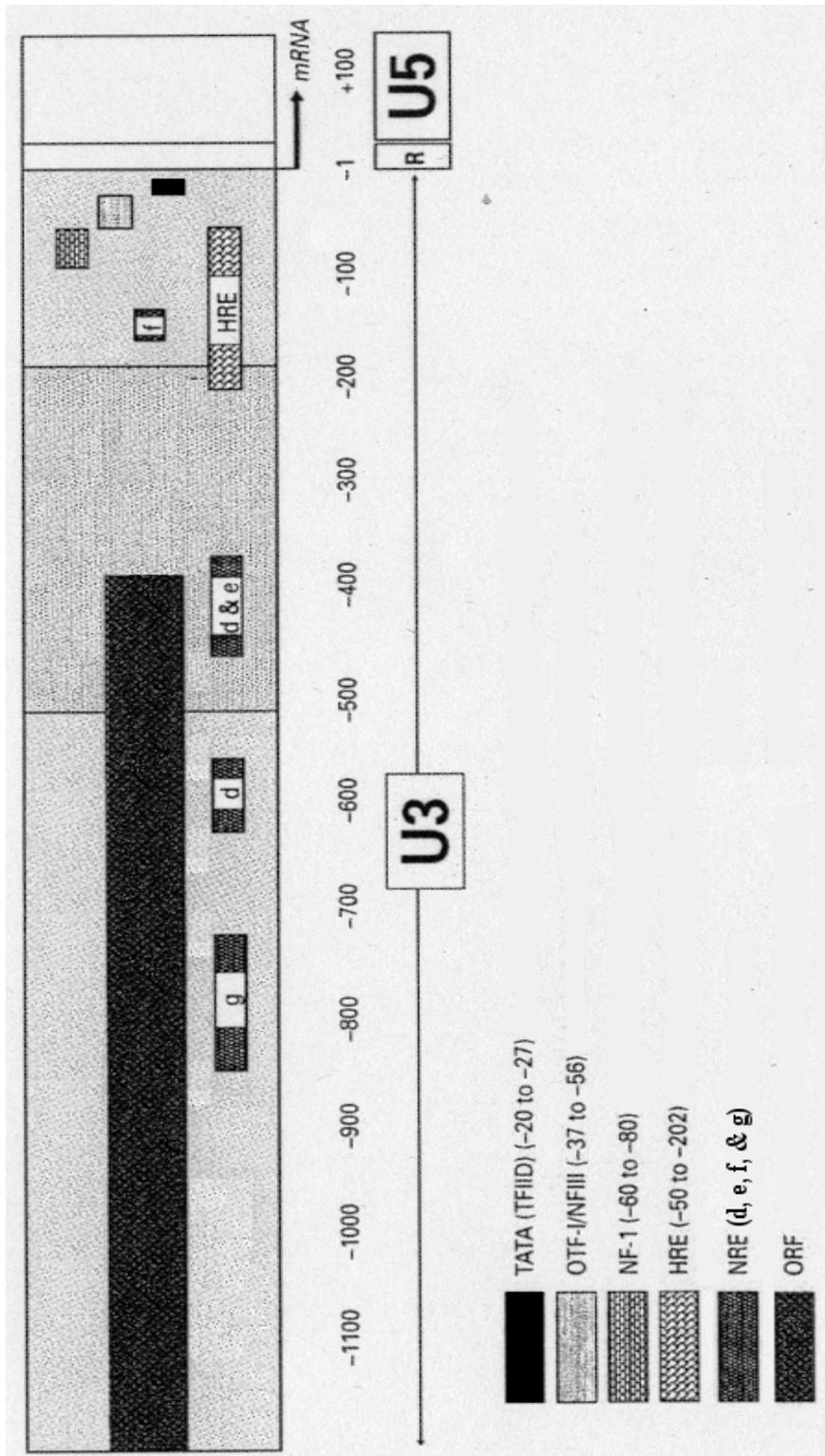
Figure 12. Recrutement du complexe BRG1 pour l'activation par les glucocorticoïdes du promoteur de MMTV. D'après Deroo, B. J. and Archer, T. K. 2001. A et B indiquent les deux premiers nucléosomes du LTR de MMTV qui contiennent le promoteur proximal; le nucléosome B contient 4 HRE; BRG1 complex, CBP/p300 et CoAs: co-activateurs des récepteurs à glucocorticoïdes, Dex: dexaméthasone; H1: histone 1; +1 indique le site d'initiation de la transcription.



Un autre facteur hormonal ayant une influence sur la transcription du MMTV est l'hormone prolactine. Cette hormone peptidique accentue en effet les effets des glucocorticoïdes sur l'expression des provirus. Malgré tout, ces effets peuvent aussi être indirects puisque la différenciation et la croissance des cellules mammaires influencent l'expression des gènes spécifiques aux tissus mammaires [Günzburg, W. H. and Salmons, B. 1992].

Entre les deux sites des HRE, on retrouve par contre des séquences régulant l'expression du MMTV de manière négative, les Negative Regulatory Elements (NRE) (Figure 13). Cela pourrait être déterminant pour la spécificité tissulaire. Entre autre, ces domaines permettent une régulation négative au sein du cerveau, des muscles squelettiques et du cœur [Günzburg, W. H. and Salmons, B. 1992].

Figure 13. Représentation schématique de la localisation des éléments régulateurs dans le LTR de MMTV. D'après Günzburg, W. H. and Salmons, B. 1992. Le LTR est divisé en trois régions: U3, R et U5. Le site d'initiation de la transcription est situé à la limite entre les régions U5 et R. Les éléments régulateurs sont localisés dans la région U3.



En conclusion, on peut voir ici qu'une des classes de facteurs impliqués dans le contrôle de l'expression du MMTV sont des régulateurs de transcription cellulaires qui peuvent agir positivement ou négativement. Les possibilités de combinaison de ces facteurs en fonction des types tissulaires et cellulaires particuliers ainsi que leurs actions conjointes déterminent le niveau d'expression du virus d'une manière analogue à celle décrite pour les gènes cellulaires.

III. Notion de super-antigène (SAG)

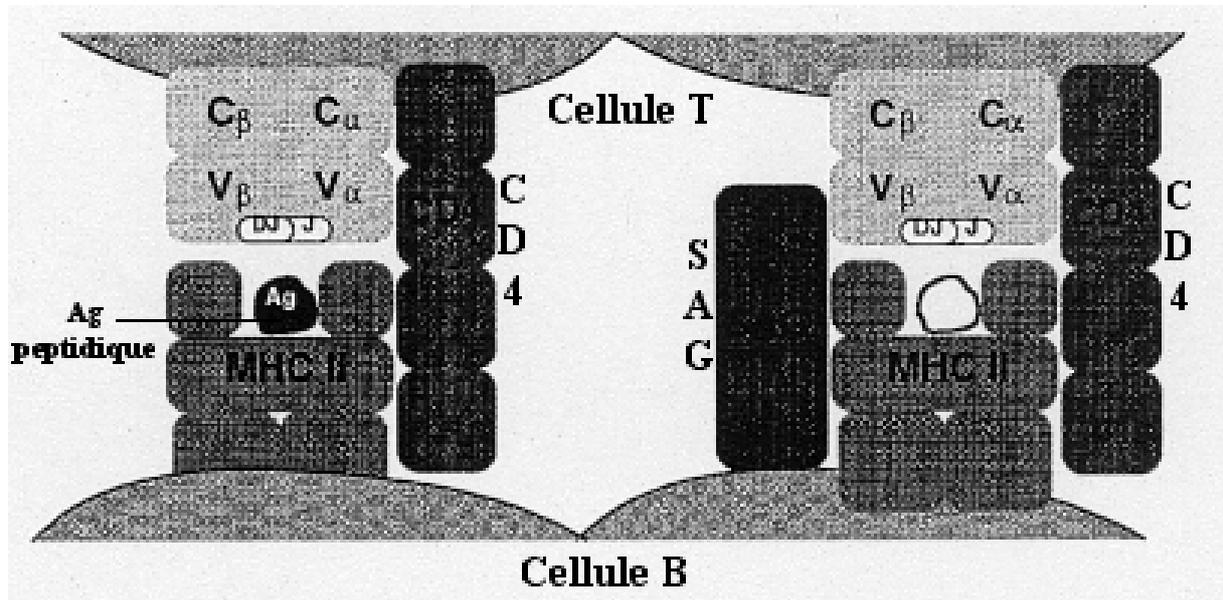
Lors des premières études concernant le MMTV, une particularité par rapport aux autres *Retrovirus* simples a été mise en évidence. En effet, son LTR est extraordinairement large et il contient un cadre de lecture ouvert codant une protéine [Ponta, H. *et al.* 1985].

En fait, ce cadre de lecture ouvert est situé dans la région U3 du LTR en 3' et code une protéine transmembranaire de type II avec un domaine C terminal extracellulaire et un domaine N terminal intracytoplasmique. Cette protéine est un super-antigène (SAG) [Huber, B. T. *et al.* 1996].

Les super-antigènes diffèrent des antigènes peptidiques conventionnels par quatre caractéristiques principales. Tout d'abord ils suscitent une forte réponse primaire; de plus la chaîne V β du récepteur des cellules T (TCR) est suffisante pour leur reconnaissance et tous les super-antigènes connus doivent être présentés par les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II; enfin, ils sont présentés sous leur forme brute sans transformation [Huber, B. T. *et al.* 1996].

En fait, les cellules du CMH de classe II présentent classiquement des peptides antigènes dégradés de protéines trouvées dans le milieu extracellulaire aux cellules T CD4+. Dans le cas des super-antigènes, ceux-ci sont présentés par les cellules CMH de classe II mais d'une manière atypique. Ils ne transitent pas en effet par les cellules du CMH mais se lient directement à leurs protéines de présentation et ils ne se lient pas au sillon de liaison au peptide des TCR mais à la région variable des chaînes V β des TCR (Figure 14). Il est vraisemblable que la chaîne V α affecte aussi l'interaction avec le super-antigène mais avec une importance plus faible. Ils ne nécessitent pas en outre les molécules accessoires CD4 ou CD8 [Irwin, M. J. and Gascoigne, R. J. 1993].

Figure 14. Modèle de l'interaction trimoléculaire impliquant le TCR, le CMH de classe II et soit un antigène peptidique classique (à gauche) soit un super-antigène (à droite). D'après Huber, B. T. *et al.* 1996.



L'activation des cellules T par les super-antigènes amène une prolifération et une activation massive de ces premières ainsi que la sécrétion de lymphokines dont le Tumor Necrosis Factor (TNF), les interleukines 1 et 2 (IL-1 et IL-2) et l'interféron γ . La forte prolifération des cellules T est suivie d'un rapide déclin. Ce déclin est spécifique des cellules exprimant une chaîne $V\beta$ précise [. Une autre conséquence de l'activation par un super-antigène est une anergie des cellules T. En effet, les cellules T ayant survécu à l'activation par le super-antigène deviendront par la suite anergiques aux stimulations futures par d'autres antigènes [Irwin, M. J. and Gascoigne, R. J. 1993].

Il est vraisemblable que les super-antigènes proviennent de l'intégration d'un gène cellulaire au sein du virus et que cette intégration ait été conservée parce qu'elle procure au virus un avantage certain lors de sa transmission [Hubert, B. T. *et al.* 1996]. En effet les super-antigènes sont des molécules qui aident à la perpétuation des microorganismes dont ils sont issus. Ils affectent le système immunitaire de l'hôte en le débilitant par hyperstimulation des lymphocytes. Ils causent en outre des délétions au sein du répertoire des cellules T et préviennent ainsi une réponse immune

protectrice. Enfin ils activent les cellules T amenant à une intégration virale ou une accentuation de la production de virions [Irwin, M. J. and Gascoigne, R. J. 1993].

Dans le cadre du MMTV, la présence de ce super-antigène va avoir plusieurs conséquences qui seront détaillées ultérieurement.

En effet, le super-antigène permet une infection initiale des cellules lymphoïdes par exMMTV. La stimulation initiale des cellules T va permettre en retour une stimulation des cellules B qui en se divisant vont créer un réservoir de cellules compétentes pour l'infection [Golovkina, T. V. *et al.* 1998].

De plus la majorité des Mtv endogènes ne produisent pas de particules virales mais la plupart contiennent au moins un LTR codant un super-antigène [Golovkina, T. V. 2000]. En l'occurrence, des super-antigènes ont été observés en action dans le thymus de souris nouveaux-nés avec une origine endogène [Irwin, M. J. and Gascoigne, R. J. 1993].

Enfin, alors que la séquence de la protéine SAG est hautement conservée chez les différentes souches, une petite portion de dix à quatorze acides aminés se trouvant dans le domaine C terminal présente un polymorphisme. Ce polymorphisme est lié à la spécificité du super-antigène pour les différentes variantes de la chaîne V β du TCR [Huber, B. T. *et al.* 1996]. On peut observer dans le Tableau 7 la spécificité pour les différentes chaînes V β de différents super-antigènes.

Tableau 7. Spécificités de chaîne V β des super-antigènes de MMTV. D'après Irwin, M. J. *et al.* 1993.

Super-antigènes rétroviraux		
Mtv SAG	Nom alternatif	Chaînes Vβ murines
1	MIs-4, MIs	3, 5
2		14
3		3, 5, 17
6	MIs-3, MIs	3, 5
7	MIs-1, MIs	6, 7, 8.1, 9
8	Dvb11.1	5, 11, 17
9	Etc-1, Dvb11.2	5, 11
11	Dvb11.3	5, 11
13	MIs-2, MIs	3, 5
27		3, 5
43		6, 7, 9
44		3, 5, 8.1, 9
SW	virus exogène	6, 7, 8.1
C3H, GR	virus exogène	14

IV. Mécanisme d'infection par MMTV exogène

L'exMMTV est produit par les glandes mammaires des femelles infectées. Il est transmis aux petits lors de la tétée. Il infecte donc un individu dont les glandes mammaires, tissu cible du virus, ne sont pas développées. Les cellules du tissu mammaire ne commenceront à se diviser qu'à la puberté. On retrouve ultérieurement le virus au niveau de ces cellules épithéliales mammaires. Il doit donc y avoir présence d'un second type cellulaire qui permet le transport du virus et sa réplication en attendant le développement des cellules cibles [Günzburg, W. H. and Salmons, B. 1992; Golovkina, T. V. *et al.* 1998].

En réalité, l'exMMTV initie une infection locale des cellules T et B rencontrées au sein des plaques de Peyer du tractus digestif, les cellules lymphoïdes ainsi infectées transportent alors le virus jusqu'aux cellules de l'épithélium mammaire en développement [Golovkina, T. V. *et al.* 1998].

L'activation des cellules T par le super-antigène décrit précédemment va provoquer la prolifération des cellules B développant un réservoir de cellules compétentes pour l'infection d'où l'exMMTV diffusera par la suite vers les autres sous-ensembles lymphocytaires (CD4+ et CD8+) au cours des semaines suivantes [Callahan, R. and Smith, G. H. 2000]. La protéine SU de l'exMMTV semble participer à la présentation du super-antigène aux cellules T. En effet, SU se lie au récepteur Tfr1 (ou CD71) pour servir d'intermédiaire dans l'entrée virale au sein des cellules hôtes. De plus SU se lie à TLR2 et TLR4 (Toll-like Receptors) [Bhadra, S. *et al.* 2006]. SU pourrait ainsi aussi jouer un rôle dans le transfert du virus entre différents lymphocytes [Golovkina, T. V. *et al.* 1994a].

Les cellules lymphoïdes infectées jouent donc un rôle critique dans l'infection des cellules épithéliales mammaires servant de réservoir amplificateur et de véhicule pour l'exMMTV au sein de l'organisme [Callahan, R. and Smith, G. H. 2000].

La suppression des cellules T ayant réagi avec le super-antigène est détectée au cours des deux premiers mois de vie et ne semble pas avoir d'impact sur la santé de l'animal [Callahan, R. and Smith, G. H. 2000].

Il est intéressant de noter que les provirus endogènes de MMTV s'expriment spontanément dans les cellules lymphoïdes. En effet leur expression se déroule en l'absence de stimulation hormonale, suggérant que soit les cellules B expriment un facteur qui favorise l'expression de l'enMMTV soit des facteurs inhibant l'expression de l'enMMTV ne sont pas actifs dans les cellules

B. On pourra remarquer que le LTR de MMTV contient un site de liaison pour OTF. OTF est justement impliqué dans l'expression de gènes spécifiques aux cellules B [Günzburg, W. H. and Salmons, B. 1992].

Alors que les études précédentes avaient envisagé une infection initiale des lymphocytes B qui allaient jouer le rôle de cellules présentatrices aux cellules T, il s'avère en réalité que ce sont les cellules dendritiques qui jouent ce rôle [Courreges, M. C. *et al.* 2007].

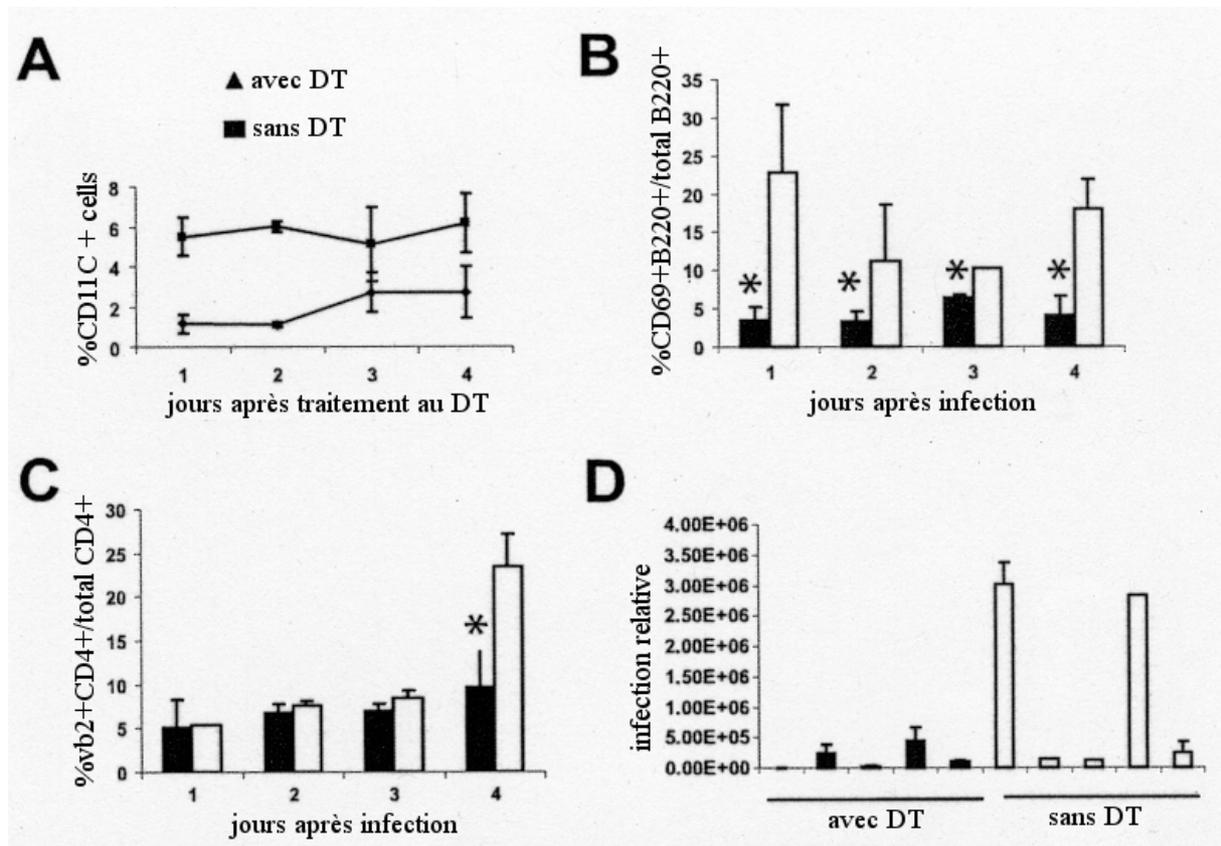
En effet ce sont les premières cellules à être infectées par l'exMMTV et elles sont capables de produire des virus infectieux qui peuvent être transmis à d'autres types cellulaires. De plus, après contact avec le virus, les cellules dendritiques deviennent plus matures et migrent en réponse à la protéine inflammatoire 3β [Courreges, M. C. *et al.* 2007].

Les cellules dendritiques jouent un rôle clef au sein du système immunitaire en tant qu'initiateurs et régulateurs de la réponse spécifique des cellules T à un antigène. Après contact avec un antigène et avec l'aide de signaux de maturation suscités par les phénomènes infectieux ou inflammatoires, les cellules dendritiques subissent un processus de transformation complexe. Ce processus culmine avec leur migration jusqu'aux organes lymphoïdes où les cellules matures peuvent efficacement présenter des peptides antigéniques transformés aux cellules T. Bien que les cellules dendritiques jouent un rôle essentiel dans les défenses immunitaires, il est de plus en plus évident qu'elles participent aussi à la pathogenèse de certaines maladies, particulièrement dans le cas d'infections virales [Courreges, M. C. *et al.* 2007]. La présence des cellules dendritiques aux sites d'entrée du virus peut être exploitée par celui-ci pour atteindre sa cible.

L'exMMTV interagit avec les cellules dendritiques. Il est établi que celles-ci sont les premières cellules rencontrées et infectées par le virus et qu'elles sont requises au stade précoce de l'infection (Figure 15). Elles interagissent avec le virus qui induit leur maturation et la régulation positive de l'expression en surface du récepteur d'entrée du virus le Transferrin Receptor (TfR1/CD71) *via* une interaction avec le Toll-like Receptor 4 (TLR4). La maturation et la migration des cellules dendritiques sont dépendantes de l'intégrité de ce récepteur. Celui-ci a aussi une importance dans la production d'un signal qui activera par la suite les cellules B. Suite à l'activation des cellules dendritiques, celles-ci deviennent plus sensibles au virus et migrent vers les nœuds lymphatiques de drainage où elles relâchent des chémokines, présentent le super-antigène aux cellules T et servent de réservoir initial au virus. Il est vraisemblable que l'interaction entre les

cellules dendritiques et le virus affecte aussi la réponse immunitaire de l'hôte [Courreges, M. C. *et al.* 2007].

Figure 15. Effets de la suppression des cellules dendritiques (CD11c+) sur l'activation et l'infection des cellules B et T dépendantes du exMMTV. D'après Courreges, M. C. *et al.* 2007. DT: toxine diphtérique, permet la suppression des cellules dendritiques. A: analyse du pourcentage de cellules dendritiques dans la rate en fonction du temps; B: analyse du pourcentage de cellules B activées; C: analyse du pourcentage de cellules T stimulées; D: quantification de l'ADN viral produit par les lymphocytes des nœuds lymphatiques de drainage chez deux lots de 5 souris. Dans chaque cas, les barres noires représentent les individus traités avec DT et les barres blanches les animaux non traités.



V. Mécanismes de l'oncogenèse

Les deux formes virales, exogène et endogène, peuvent provoquer de manière indépendante des tumeurs. L'action pathogène, et en l'occurrence oncogène, du MMTV dépend en partie de la position du provirus au sein des chromosomes. En effet, comme nous l'avons vu précédemment l'expression du provirus dépend de sa localisation au sein des chromosomes. En ce qui concerne les provirus d'origine exogène, leur intégration est un phénomène aléatoire mais il semble qu'ils intègrent majoritairement des sites où ils sont exprimés, cela étant régulé par des facteurs encore inconnus. Dans le cas des provirus d'origine endogène, il apparaît qu'un repositionnement de ceux-ci est nécessaire pour l'expression entière de leur pouvoir oncogène. Ce repositionnement peut se faire de deux façons: soit le provirus originel s'exprime d'emblée en particules virales infectieuses et alors une réintégration à des sites différents est possible lors de réinfection de la cellule hôte [Cohen, J. C. and Varmus, H. E. 1980]; soit il y a transposition et réarrangement permettant une transcription complète du provirus au sein du chromosome comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

L'action oncogène du MMTV est liée à deux phénomènes. D'une part un rôle direct du provirus avec l'activation de gènes cellulaires et l'action de ses gènes *env* et *gag* et d'autre part l'utilisation par le provirus de caractéristiques propres à la cellule hôte.

A. Action directe: activation par insertion

L'ADN viral ne semble pas contenir d'oncogène. Une conséquence de sa présence néanmoins est la formation de tumeurs mammaires. La physiologie et la latence de l'induction de ces tumeurs par le virus suggèrent donc que la transformation cellulaire s'effectue par un mécanisme indirect. L'intégration provirale est vraisemblablement non spécifique mais la détection de sites d'intégration de l'ADN proviral communs dans les cellules tumorales fait penser à un mécanisme d'activation de gènes cellulaires par insertion [Ponta, H. *et al.* 1985].

La première activation par insertion du MMTV qui a été étudiée concernait le *locus* "int". L'activation de transcrits "int" par intégration du MMTV s'effectue en effet à grande distance. Les

copies du MMTV peuvent être intégrées de n'importe quel côté du *locus* "int" mais une spécificité d'orientation de l'ADN proviral intégré ne modifiant pas le *locus* "int" semble exister. Le LTR en 5' de l'ADN proviral intégré est toujours trouvé proximale au gène *int*. L'activation transcriptionnelle du *locus* "int" peut donc dépendre de cette configuration particulière [Ponta, H. *et al.* 1985].

Des séquences promotrices présentes au sein du LTR du provirus stimulent les facteurs de transcription du gène adjacent ce qui suggère une initiation hormone-indépendante qui agirait dans l'activation du gène *int* [Ponta, H. *et al.* 1985].

En réalité, ce sont trois familles de gènes qui sont aujourd'hui reconnues comme activées par le provirus de MMTV.

Le gène *Wnt1* (anciennement *int1*) est responsable de l'augmentation de l'adhésion calcium-dépendante des cellules à travers une voie de transduction du signal cellulaire qui régule la taille du pool de β -caténine intracytoplasmique et stabilise sa liaison avec la cadherine [Callahan, R. and Smith, G. H. 2000].

Les gènes *Fgf* (Fibroblast growth factor) peuvent agir comme mitogènes, chimio-attracteurs et médiateurs de la différenciation cellulaire. Ce sont aussi des facteurs angiogènes *in vivo* [Callahan, R. and Smith, G. H. 2000].

La famille de gènes *Notch* code les protéines d'un récepteur transmembranaire qui est impliqué dans la détermination de la spécialisation cellulaire au cours du développement. Les gènes *Notch* sont réarrangés par le MMTV. On a alors sur-expression de la portion du gène codant le domaine intracellulaire de la protéine. L'expression de ce domaine représente un gain de fonction puisqu'il imite les conséquences de l'interaction entre la protéine *Notch* et son ligand [Callahan, R. and Smith, G. H. 2000].

Certains membres de ces familles collaborent donc à la dérégulation du contrôle normal de la croissance et de la différenciation des cellules mammaires au cours de l'induction tumorale quand ils sont activés par le MMTV [Callahan, R. and Smith, G. H. 2000].

Comme nous l'avons vu, l'intégration provirale n'est pas spécifique d'un site donc on peut considérer que plus il y a de virus produits, plus il y a de possibilités que l'ADN proviral s'intègre près d'un des proto-oncogènes cités.

B. Action directe: implication du domaine *env*

L'expression de *env* au sein des glandes mammaires a montré une augmentation de la différenciation des cellules épithéliales. En effet, l'expression de *env* en l'absence de toute autre protéine virale dans des cellules épithéliales mammaires normales immortalisées entraîne l'apparition de multiples traits caractéristiques de transformation cellulaire. Cette activité est dépendante d'un ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif = motif d'activation à base de Tyrosine des récepteurs immuns) fonctionnel au sein du domaine SU. Les ITAM sont des séquences hautement conservées trouvées au sein des récepteurs impliqués dans l'activation, la prolifération, la survie et la différenciation de cellules hématopoïétiques donnant les lymphocytes B et T, les mastocytes, les plaquettes et les lymphocytes NK [Ross, S. R. *et al.* 2006].

Une étape précoce dans l'induction tumorale induite par le MMTV nécessite donc la présence d'un ITAM dans la protéine codée par la séquence *env*, altérant ainsi la morphologie et la différenciation des cellules de la glande mammaire.

C. Action directe: implication du domaine *gag*

Chez certaines souches murines, il a été observé que le domaine *gag* avait un rôle dans l'accentuation du processus tumoral. L'interaction de *gag* avec un gène cellulaire dominant positionné sur le chromosome 14 nommé MTS accélère le processus et l'absence de cette protéine atténue la prolifération tumorale [Swanson, I. *et al.* 2006]. Le mécanisme par lequel cette interaction s'effectue est pour le moment inconnu.

D. Utilisation de caractéristiques propres à la cellule hôte [Callahan, R. and Smith, G. H. 2000]

On sait que l'infection par le MMTV se produit dans une variété d'autres tissus épithéliaux incluant les glandes salivaires, les reins, les poumons, les vésicules séminales, les épидидymes et les testicules. Cependant seul l'épithélium mammaire est transformé malignement suite à l'infection et la réplication du MMTV. Cela suggère que l'épithélium mammaire et le MMTV partagent une relation unique puisque l'insertion provirale et la réplication sont inséparables. La clef de ce puzzle semble être l'activité régénérative de l'épithélium mammaire comparée à celle des autres tissus.

Chez toutes les souches murines infectées par le MMTV, la fréquence des tumeurs mammaires est augmentée par la multiplication des gestations. Une explication est la présence et la persistance de cellules non différenciées pluripotentes qui sont autorégénératives et sujettes aux infections par le MMTV. En effet, les excroissances pré-malignes ne montrent pas de sénescence de signes de régénération ou d'involution post-lactation et, de plus, représentent des populations épithéliales qui ont atteint ou conservé une "immortalité" proliférative.

En fait, les tumeurs semblent être le résultat de l'expansion clonale de quelques cellules ayant acquis le génome proviral du MMTV. Cela implique que les hyperplasies et les tumeurs mammaires sont développées à partir de cellules épithéliales non différenciées spécifiques du tissu et sont constituées par des populations de cellules non différenciées mutantes et leur descendance. En effet, les cellules malignes sont les descendantes de cellules provenant de la régénération normale du tissu, compétentes pour la prolifération, mais dont la maturation est interrompue au cours de la différenciation.

Il semble possible que de subtiles différences présentes dans la séquence des LTR des différents MMTV puissent modifier leur interaction avec les facteurs de transcription nucléaires de manière à restreindre ou accentuer l'expression du MMTV dans certaines sous populations de cellules épithéliales mammaires. Alternativement, des différences au sein des protéines d'enveloppe pourraient modifier les interactions virales avec des récepteurs spécifiques aux différentes classes de cellules non différenciées de l'épithélium mammaire [Callahan, R. and Smith, G. H. 2000].

VI. Multiplication spontanée des séquences endogènes dans les cellules tumorales

Les génomes endogènes du MMTV sont génétiquement stables au sein des cellules saines des souches murines. Au contraire, ils sont fréquemment amplifiés au sein des cellules tumorales des lymphomes et tumeurs mammaires de souris. Les nouvelles séquences sont localisées dans un nouveau contexte d'ADN cellulaire. Ce procédé d'amplification se produit en un nombre limité de générations cellulaires et, à la différence de la réplication normale des *Retrovirus*, ne nécessite vraisemblablement pas de synthèse de virions [Groner, B. and Hynes, N. E. 1980; Dudley, J. and Risser, R. 1984].

Ces amplifications donnent parfois lieu à un nouveau réarrangement des gènes *gag* et *pol* ainsi qu'à l'apparition de nouveaux fragments de jonction entre les ADN cellulaire et viral. De manière inattendue, des nouveaux fragments de jonction très similaires sont retrouvés dans différentes cellules prélevées [Groner, B. and Hynes, N. E. 1980; Dudley, J. and Risser, R. 1984].

Deux mécanismes principaux sont proposés pour expliquer ces observations:

- soit on a amplification et réarrangement de l'ADN cellulaire adjacent aux provirus endogènes qui est une caractéristique des lignées cellulaires B et T tumorales
- soit il y a réintégration des génomes endogènes du MMTV par le biais d'intermédiaires ADN ou ARN en l'absence de production de virions matures ou de protéines ce qui implique une transcription reverse intracellulaire ou une transposition de l'ADN [Dudley, J. and Risser, R. 1984].

VII. Phénomènes de résistance

Trois mécanismes de résistance à l'infection par l'exMMTV ont été mis en évidence jusqu'à présent.

Un mécanisme est pour le moment encore peu expliqué. En effet, chez les souches murines I/LnJ, il y a un blocage de la transmission du virus des lymphocytes à l'épithélium mammaire. Il apparaît qu'un seul gène contrôle ce blocage qui limite l'induction de cellules tumorales en empêchant l'infection de l'épithélium [Golovkina, T. V. 2000].

Les deux mécanismes suivant sont mieux compris et impliquent tous les deux une même étape.

Comme nous l'avons vu précédemment, les protéines CMH de classe II sont essentielles à la présentation du super-antigène aux cellules T. Chez la souris, on trouve deux isotypes des protéines de classe II hétérodimériques, A α A β (I-A) et E α E β (I-E), les deux pouvant présenter les antigènes classiques mais I-E étant requis pour la présentation du super-antigène. Les souches murines possédant l'haplotype de CMH b, f, q ou s n'expriment pas la protéine I-E à cause de mutations dans le gène E α ou E β . Ces souches sont donc relativement résistantes à l'infection par l'exMMTV et aux tumeurs qui sont normalement induites [Golovkina, T. V. 2000].

Le troisième mécanisme est celui qui nous concerne le plus. Le génome murin contient de nombreuses copies endogènes du provirus du MMTV. Même si peu de provirus codent des particules virales infectieuses, nous avons vu que la grande majorité codait au moins le super-antigène. Il est donc vraisemblable qu'une pression de l'évolution ait amené à la préservation de ces gènes SAG intacts au sein du génome murin. En fait, ces SAG endogènes jouent un rôle protecteur contre les infections par les exMMTV [Huber, B. T. *et al.* 1996; Golovkina, T. V. 2000].

En effet, d'une manière générale, le super-antigène induit une destruction progressive des cellules T présentant une chaîne V β du TCR lui étant spécifique. La présence de protéines SAG endogènes entraîne donc une diminution du panel de cellules T disponibles, résultat de l'induction d'une auto-tolérance acquise au sein du thymus. La réserve de cellules T potentielles pour une infection ultérieure par le MMTV exogène codant un super-antigène avec la même spécificité se retrouve donc ainsi réduite. La transmission de virus infectieux sera donc entravée par manque de cellules T nécessaires [Huber, B. T. *et al.* 1996; Golovkina, T. V. 2000].

Un des effets négatif de cette résistance est le développement d'un polymorphisme des super-antigènes des exMMTV. En effet, le seul moyen pour un virus d'être amplifié chez un animal

qui possède un gène SAG endogène similaire est de présenter un SAG muté avec une spécificité de chaîne V β du TCR différente. Puisque l'évolution des *Retrovirus* est plus rapide que celle des cellules eucaryotes, les exMMTV infectieux oncogènes ont survécu par l'acquisition d'un polymorphisme au sein des gènes SAG [Huber, B. T. *et al.* 1996].

De manière intéressante, le génome des différentes souches de exMMTV est hautement conservé, excepté au niveau de la région U3 du LTR en 3', qui code le SAG, où un polymorphisme est observé [Huber, B. T. *et al.* 1996].

VIII. Induction d'une permissivité

Une protéine codée par le MMTV, SAG ou un produit pour le moment inconnu, semble induire une susceptibilité génétique unique en son genre pour certains virus et certaines bactéries, en manipulant par un mécanisme non connu actuellement le système immunitaire inné ou acquis [Bhadra, S. *et al.* 2006].

On sait déjà que le MMTV interagit avec le système immunitaire à travers SAG et SU. Or la susceptibilité aux agents pathogènes observée lors d'études semble être due au produit d'un seul gène, non codé par *env*, *gag* ou *pol*. Donc un gène inconnu ou le gène SAG semblent être responsables de cette susceptibilité. Cette susceptibilité est retrouvée lorsque le enMMTV est présent sous forme de copie unique [Bhadra, S. *et al.* 2006].

IX. Recombinaisons entre formes exogène et endogène [Golovkina, T. V. *et al.* 1994b]

Lors de l'infection des cellules épithéliales des glandes mammaires par le exMMTV, le virus exogène peut se retrouver exprimé parallèlement au provirus endogène qui chez certaines souches est hautement exprimé au sein de ces cellules. On peut donc imaginer que ces deux virus pourraient être coassemblés et former des recombinants.

Chez la souche murine C3H/HeN, le *locus* endogène *Mtv-1* est hautement transcrit mais très peu d'ARN viral est assemblé sous forme de virion. Lors de l'infection de cette souche par le virus

exogène MMTV (C3H), on retrouve dans le lait des particules virales contenant l'ARN de Mtv-1. Il y a donc eu coassemblage de l'ARN de Mtv-1 avec l'ARN de exMMTV (C3H). Puisque les différentes séquences du MMTV codent des protéines SAG avec une spécificité de cellules T différente, ces particules virales formées des deux ARN coassemblés possèdent donc la possibilité d'infecter aussi bien les cellules T présentant la chaîne V β du TCR spécifique à Mtv-1 que celles spécifiques à exMMTV (C3H). On a donc de par ce coassemblage, un élargissement des cellules cibles.

En outre, la présence des deux ARN au sein des particules virales peut résulter en des recombinaisons entre ceux-ci. En effet, Golovkina, T. V. *et al.* ont observé des provirus recombinants intégrés au sein des cellules de tumeur mammaire de la souche C3H/HeN (Figure 16 & 17). Une partie de ces recombinants possèdent une partie de leur gène *env* dérivée du provirus endogène. Si la recombinaison se produit au sein de la séquence codant la région C terminale de la protéine SAG, de nouvelles protéines avec une spécificité différente pour la chaîne V β vont émerger. Ces recombinaisons peuvent donc résulter en un élargissement des cellules T cibles.

On voit donc ici que le coassemblage et la recombinaison entre les séquences exogènes et endogènes aboutissent à un élargissement ou en tous cas à une modification du panel de cellules T cibles. On peut imaginer qu'une sélection de ces modifications pourrait donner lieu à un virus avec une plus grande pathogénicité ou une capacité plus importante à induire des tumeurs.

Figure 16. Analyse de la structure de recombinants de MMTV nouvellement intégrés trouvés dans les tumeurs des glandes mammaires des souris C3H/HeN infectées par exMMTV. D'après Golovkina, T. V. *et al.* 1994. A: ADN de tumeurs mammaires (2 à 8) et de rate d'une souris non infectée (1) analysés par digestion et southern blotting; B: carte des provirus endogènes trouvés chez les souris C3H/HeN et du provirus exMMTV(C3H). La présence de fragments de 2,3 et 1,5 kilobases est caractéristique de copies de exMMTV(C3H) nouvellement intégrées.

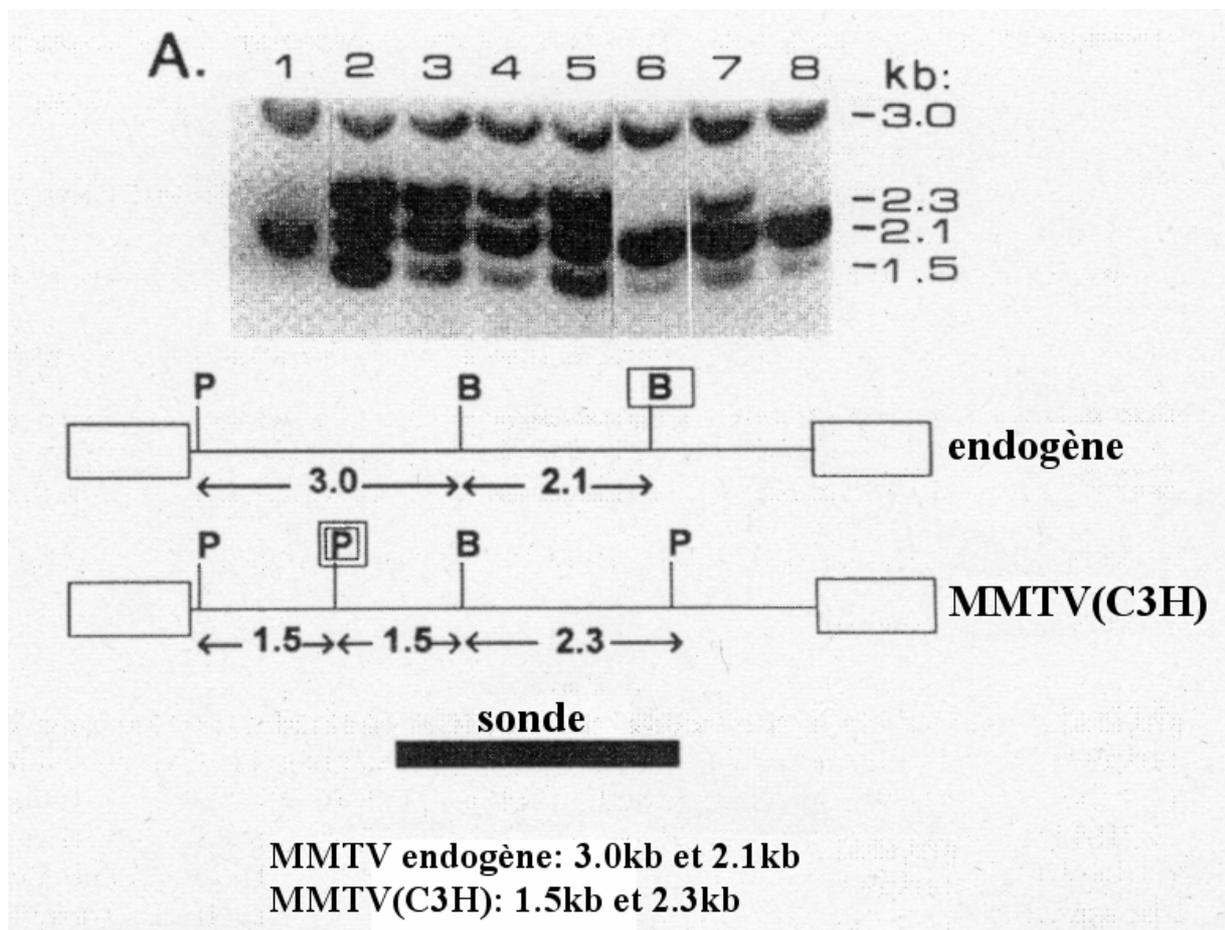
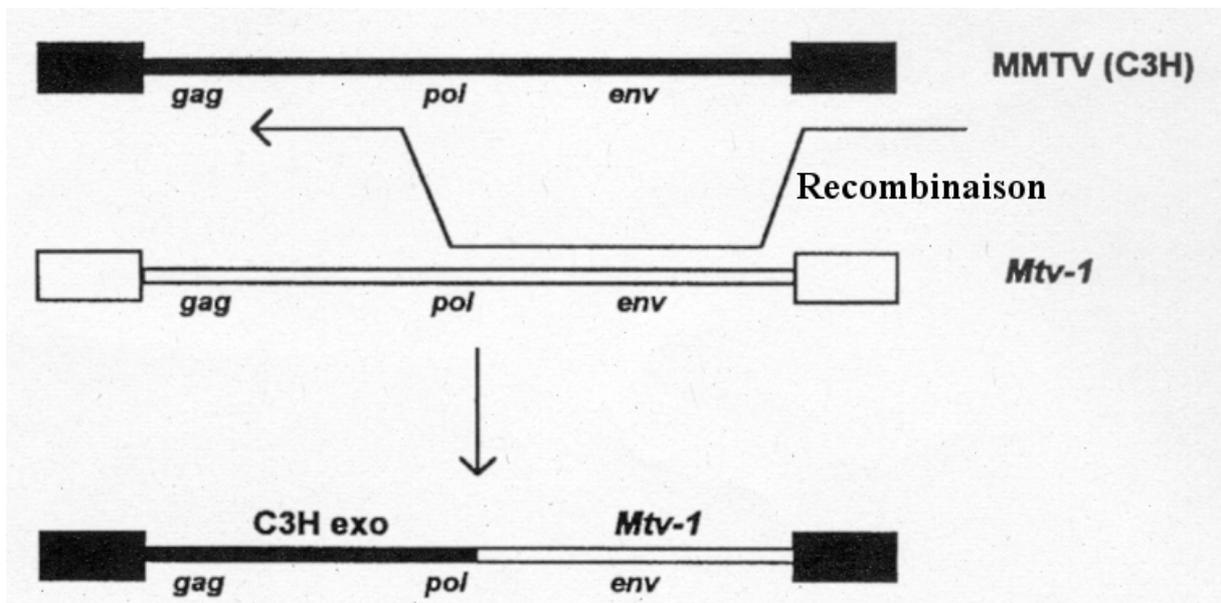


Figure 17. Modèle de production d'un recombinant de MMTV trouvé dans les tumeurs mammaires. D'après Golovkina, T. V. *et al.* 1994b.



X. Conclusion

Comme nous venons de le voir, la présence de provirus endogènes de MMTV a essentiellement un effet négatif. Certaines séquences d'une part codent des particules virales infectieuses, d'autre part permettent une évolution du virus exogène avec amplification de ses capacités pathogènes. En effet, elles permettent l'émergence de nouvelles souches virales par co-assemblage et recombinaison d'un côté, par pression sélective au niveau de la voie d'entrée de l'autre. Le rôle protecteur des provirus endogènes lié à la suppression des cellules servant à l'amplification et au transport apparaît finalement minime et on peut s'interroger sur la conservation de ces séquences au sein du génome murin. Ceci est appuyé par la découverte d'une fragilité vis-à-vis de l'infection par certaines bactéries et certains virus induite par le provirus endogène.

Le virus MMTV est très largement étudié comme modèle des cancers en général chez l'homme et du cancer du sein en particulier. Entre autre, la découverte d'une protection due à la protéine SAG endogène laisse envisager des perspectives thérapeutiques liées à cette propriété.

Quatrième chapitre: virus de la leucémie féline

I. Généralités

A. Etiologie [Wise, D. J. et al. 2005]

La leucose féline est due à un *Retrovirus*, le Feline Leukaemia Virus (FeLV), appartenant aux *gammaretrovirus*. Ce virus est représenté par quatre sous-groupes – A, B, C et T – basés sur des différences dans les protéines d'enveloppe. Les virus du sous-groupe A ne sont cultivés que sur cellules félines tandis que les virus des sous-groupes B et C sont cultivés sur cellules humaines, canines et de vison. En ce qui concerne le FeLV-T, son cas est plus particulier puisqu'il ne peut infecter comme nous le verrons en aval que les cellules exprimant le gène d'enveloppe de FeLV-B; des cultures sur cellules félines et humaines ont pu être réalisées.

Le FeLV-A est retrouvé chez tous les chats infectés naturellement par la leucose féline. Il est vraisemblablement moins pathogène que les trois autres sous-groupes. Le FeLV-B est isolé chez environ 50 % des animaux atteints; il n'est retrouvé qu'en présence du FeLV-A. Le FeLV-C est responsable d'une anémie fatale.

De fréquentes recombinaisons avec des gènes cellulaires de l'hôte créent des virus recombinants défectifs pour la réplication, virus sarcomatogènes félines (FeSV) qui sont isolés de fibrosarcomes chez les jeunes chats.

B. Répartition

La maladie a une répartition mondiale. Elle est une des maladies majeures et fréquentes chez le chat domestique et d'autres membres de la famille des *Felidae* incluant des félins sauvages [Wise, D. J. et al. 2005].

C. Transmission [Wise, D. J. et al. 2005]

Le virus est présent dans les sécrétions respiratoires et orales ainsi que dans l'urine et les fèces. L'infection se fait par ingestion et la propagation se fait par contact direct et indirect ainsi que

par la voie transplacentaire. La salive est particulièrement infectieuse: les morsures et le nettoyage mutuel sont les moyens courants de propagation.

Le colostrum protège vraisemblablement les chatons pendant le premier mois de vie. Les chatons plus âgés sont particulièrement sensibles avec toutefois une sensibilité diminuant avec l'âge.

D. Pathogenèse

On observe tout d'abord une infection initiale avec un virus se répliquant dans les tissus lymphoïdes environnants. Puis vient une phase de virémie primaire ou transitoire. Le virus se réplique entre autres dans les tissus lymphatiques systémiques et la moelle osseuse. Enfin on assiste à une phase de virémie secondaire ou persistante. Il y a infection extensive de la moelle osseuse, l'estomac, le pharynx, l'œsophage, les glandes salivaires, la vessie et l'appareil respiratoire. A ce moment là, on peut encore avoir élimination du virus. Si ce n'est pas le cas, on atteint une phase d'infection latente ou d'infection persistante productive. Si on entre en phase d'infection aiguë, il y a excrétion du virus dans la salive, les fèces, l'urine et les sécrétions respiratoires [Wise, D. J. *et al.* 2005].

E. Aspects cliniques [Wise, D. J. *et al.* 2005]

Certains chats infectés par le virus FeLV développent une réponse immune et l'éliminent complètement sans aucun signe clinique. Un faible pourcentage sont virémiques durant une période variable mais restent asymptomatiques et éventuellement éliminent le virus. Les animaux dont la réponse immunitaire est insuffisante restent infectés de manière persistante et vont développer l'une des formes néoplasique ou non de la maladie.

Environ 80 % des animaux porteurs du virus vont décéder dans les 3 ans.

Les signes cliniques varient en fonction des différentes formes de la maladie et sont liés à la nature, l'étendue et la localisation des lésions. Deux formes majeures sont retrouvées:

- la forme néoplasique concerne environ 20 % des animaux infectés de manière permanente.

Différents types de lymphosarcomes se développent: tractus digestif, thymiques, multicentriques ou leucémies lymphoïdes. Les signes cliniques généraux sont une léthargie, une anorexie et une perte de poids.

- la forme non néoplasique peut se manifester par une immunodépression qui favorise l'émergence de maladies opportunistes (bactérienne, fongique, protozoaire ou virale), par un désordre du système reproducteur, une glomérulonéphrite ou des anémies.

F. Diagnostic

Plusieurs moyens diagnostiques existent. Ils reposent majoritairement sur la détection d'un antigène, la protéine de capsid p27, commun aux sous-groupes [Wise, D. J. *et al.* 2005] ou la détection du virus par RT-PCR.

G. Traitement

Actuellement, l'arsenal thérapeutique est composé de traitement palliatif, chimiothérapie et rayons pour les formes néoplasiques (non curatif) et d'agents antiviraux qui peuvent retarder l'apparition des signes cliniques [Wise, D. J. *et al.* 2005].

H. Prévention

Il existe différents types de vaccins pour protéger contre le FeLV: virus inactivé, sous-unités virales inactivées, protéines virales recombinantes et vecteurs viraux recombinants vivants. Néanmoins aucun de ces vaccins ne confère une protection à 100 %, vraisemblablement au mieux on obtient une protection de 80 % [Jarrett, O. 2003]. Les deux types de vaccins les plus couramment utilisés actuellement sont basés sur une protéine virale recombinante et un vecteur viral recombinant vivant. Le premier utilise la protéine d'enveloppe gp70 comme vecteur d'immunité. Cette protéine est synthétisée par des bactéries *Escherichia coli* recombinantes. La protéine synthétique obtenue, nommée p45, est mélangée à de l'hydroxyde d'aluminium et une fraction purifiée du Quil A (adjuvants d'immunité) [Baychelier, P. 1994]. Le deuxième est un virus canarypox recombiné qui exprime les gènes *env* et *gag* du FeLV-A [EMEA. 2005].

II. Origine et phylogénie du enFeLV

L'étude de la leucose féline a mis en évidence la présence de séquences endogènes homologues au virus FeLV au sein du génome félin. Nous verrons par la suite que ces séquences vont interagir avec le virus exogène de différentes manières.

Ces séquences sont retrouvées chez tous les individus de la sous-espèce *Felis sylvestris catus* (chat domestique) mais sont aussi présentes chez trois espèces de la famille des félidés: *Felis sylvestris* (chat sauvage européen), *Felis margarita* (chat des sables) et *Felis chaus* (chat de la jungle ou chat des marais). Ces espèces sont toutes originaires du bassin méditerranéen. Par contre elles ne sont pas observées chez des espèces plus éloignées géographiquement et donc, par voie de fait, phylogénétiquement [Benveniste, R. E. *et al.* 1975].

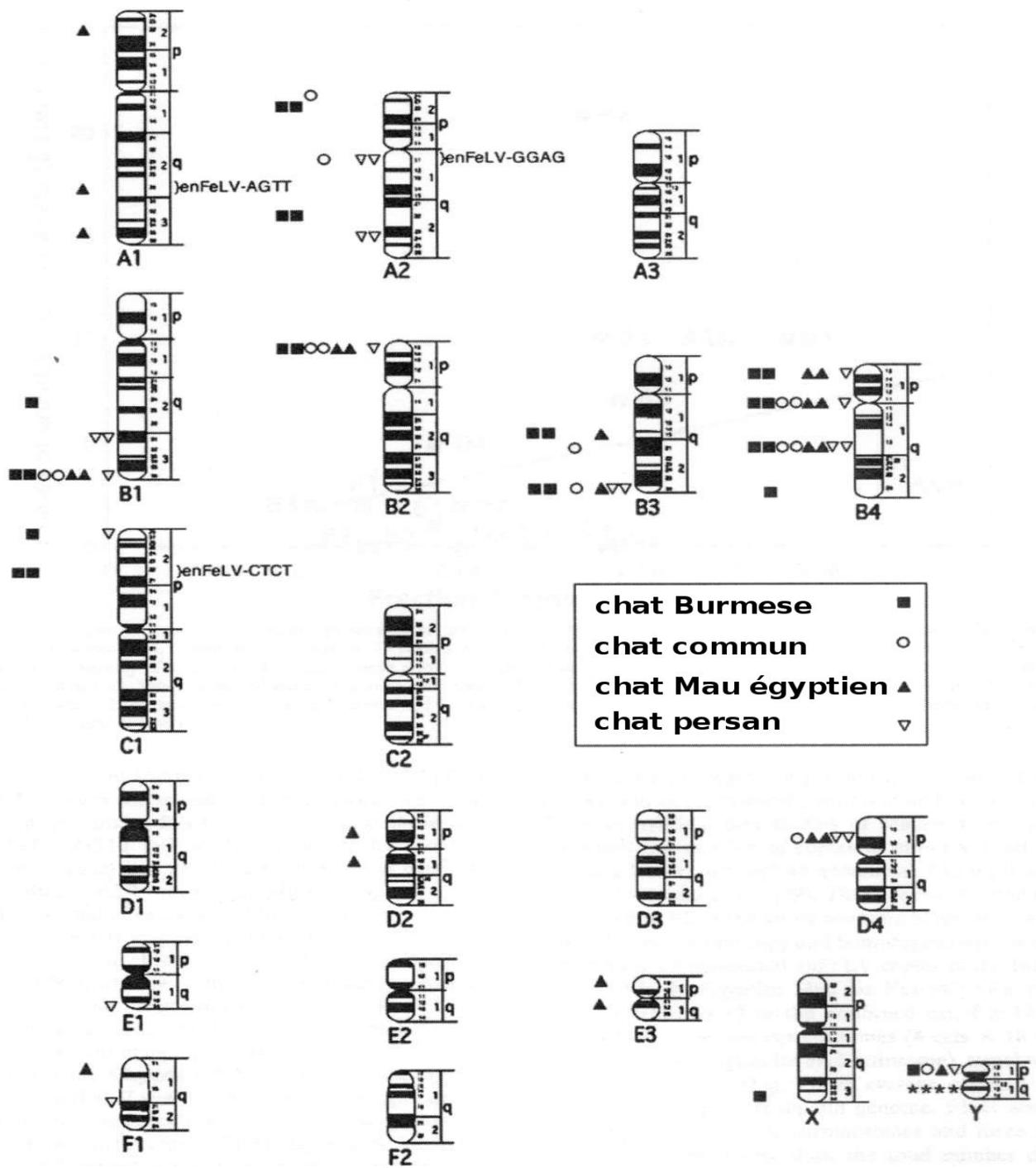
Ces séquences ne sont retrouvées par contre chez aucun autre mammifère à l'exception de quelques rongeurs, et essentiellement le rat (*Rattus rattus* et *Rattus norvegicus*) [Benveniste, R. E. *et al.* 1975]. On peut donc supposer qu'il y a eu transmission après divergence des espèces de la famille des *Felidae* mais avant séparation des quatre espèces citées précédemment. Une hypothèse est que le virus ait été transmis à un ancêtre commun de ces quatre espèces par le rat.

Il est aussi intéressant de noter que l'on retrouve aussi chez les félins un virus endogène RD-114 (appartenant aussi aux virus de type C) qui a été transmis à un ancêtre du chat domestique mais cette fois par les primates.

Au sein de la population de chats domestiques, on peut observer un grand nombre de copies du génome de la séquence endogène (enFeLV). Il est surtout remarquable de noter qu'il y a un grand polymorphisme des *loci* entre différents individus (variations intra spécifiques et sites hétérozygotes) (Figure 18). Ce polymorphisme important des provirus suggère que de multiples intégrations ou translocations ont du avoir lieu au sein du génome des chats domestiques récemment [Roca, A. L. *et al.* 2005]. En effet, Roca *et al.* avaient montré auparavant que des provirus avaient dû intégrer relativement récemment le génome des chats domestiques car contrairement à ce que nous avons pu voir plus haut, certaines séquences du enFeLV ne sont retrouvées que chez *Felis sylvestris catus* et chez aucune espèce voisine sauvage [Roca, A. L. *et al.* 2004]. De nombreux *loci* sont retrouvés au niveau des télomères qui sont des régions dynamiques et propices aux recombinaisons [Roca, A. L. *et al.* 2005].

Le nombre important d'hétérozygotes confirme le fait que les *loci* ne sont pas fixés, et que les croisements entre individus vont augmenter ce polymorphisme. On peut se demander quelle conséquence peut avoir ce polymorphisme et la part d'hétérozygotie dans les interactions qu'a l'enFeLV avec son homologue exogène au sein d'une population [Roca, A. L. *et al.* 2005].

Figure 18. Cartographie chromosomique résumant les positions chromosomiques des copies de enFeLV déterminées par la technique FISH chez quatre chats domestiques. D'après Roca, A. L. *et al.* 2005. Les différents chromosomes sont nommés individuellement d'une lettre suivie d'un chiffre; chaque icône représente une race de chat différente; les *loci* homozygotes sont représentés par une double icône; une seule icône représente un *locus* hétérozygote; les astérisques au niveau du chromosome Y indiquent que chaque chat possédait deux à quatre sites pour enFeLV sur Yq.



III. Absence d'effet pathogène de enFeLV [Ghosh, S. K. *et al.* 2000]

Le virus FeLV peut, dans un stade clinique avancé, induire des tumeurs. L'étude de ce virus et de son action oncogène a permis de montrer qu'il ne portait pas d'oncogène dans sa séquence. Il est par contre admis que la région U3 des LTR, qui contient des sites de liaison pour différents facteurs de transcription, joue un rôle clef dans la pathogénèse de la maladie. La région U3 agit en trans, c'est-à-dire qu'elle agit au moyen de facteurs de transcription et donc que son action ne dépend pas de sa position au sein du génome. Il est de plus évident que ce rôle est dépendant de la capacité du LTR à générer un transcrit ARN spécifique.

Les copies du enFeLV sont variées et certaines comportent les séquences complètes propres aux provirus (LTR-*gag-pol-env*-LTR). Néanmoins, aucune n'est capable d'une production de particules virales.

Il a été démontré que les séquences LTR du enFeLV ne trans-activent pas l'expression des gènes cellulaires activés par le FeLV exogène (exFeLV) et de plus aucun transcrit ARN n'est retrouvé lors de l'infection de cellules en culture. Il a été vérifié que cette absence de transcrit n'était pas liée au type cellulaire ni à la place du LTR au sein du génome (présence d'un facteur de répression voisin).

Par l'absence de particules virales observée, l'absence d'effet pathogène lors d'infection cellulaire par l'enFeLV seul et l'absence de schéma d'activation similaire à l'exFeLV, il est raisonnable de conclure que les séquences endogènes du FeLV n'ont pas d'effet pathogène direct sur l'hôte.

IV. Quatre sous-groupes émergeant d'une seule forme provirale

Le virus de la leucose féline peut être divisé en quatre sous-groupes: FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C et FeLV-T qui montrent des récepteurs cellulaires et une pathogénicité différentes. Le FeLV-A est faiblement pathogène mais hautement transmissible, les FeLV-B, FeLV-C et FeLV-T ne sont retrouvés qu'en présence du FeLV-A mais le FeLV-B est fréquemment observé dans les cas de lymphomes, le FeLV-C dans les cas d'anémie sévère avec hypoplasie érythroïde, enfin le FeLV-T est cytopathique avec un tropisme pour les cellules T.

L'étude d'isolats du FeLV prélevés sur des chats infectés a montré que l'on retrouvait toujours B et C associés au sous-groupe A. Cette interdépendance des sous-groupes a soulevé plusieurs hypothèses dont l'une est que les sous-groupes B et C sont des recombinants du sous-groupe A.

L'étude de la séquence du FeLV-A et du FeLV-B a montré une grande homologie à l'exception d'une portion de l'extrémité 5' du gène *env*. C'est principalement dans la région codant la protéine gp70 que les changements les plus importants sont trouvés et essentiellement dans la séquence N terminale. Par contre, des sondes formées à partir du gène *env* du sous-groupe B ont montré une forte homologie (99 %) avec ce gène issu des provirus endogènes félines [Stewart, M. A. *et al.* 1986]. Ceci amène l'hypothèse que le FeLV-B est en fait un recombinant du FeLV-A et du *Retrovirus* endogène.

Par l'utilisation de cellules de fibroblastes embryonnaires, il a pu être mis en évidence que l'infection par le FeLV-A pouvait générer des particules virales homologues au FeLV-B [Overbaugh, J. *et al.* 1988].

Plus récemment une étude utilisant un marqueur fluorescent (Green Fluorescent protein reporter, GFP) a démontré que le FeLV-B provient d'une recombinaison entre le FeLV-A et le gène *env* endogène [Chang, Z. *et al.* 2001].

L'infection par le FeLV et le développement d'une virémie chez le chat sont suivis d'une période latente de 2 à 3 ans avant l'apparition de symptômes néoplasiques. Ceux-ci sont majoritairement intégrés dans le complexe leucémie-lymphosarcome (LSA). Il a été démontré que le FeLV-B était présent chez seulement 33 % des chats porteurs sains mais retrouvé à 57 % et plus

chez les animaux ayant déclaré le complexe LSA [Sheets, R. L. *et al.* 1993]. On peut donc supposer que cette période de latence est la durée nécessaire à la formation par recombinaison et la réplication du FeLV-B. On peut s'interroger sur l'implication que peut avoir le FeLV-B dans le syndrome néoplasique. Peut-être que les changements dans les protéines d'enveloppe, qui confèrent entre autre un élargissement du spectre des récepteurs cibles, permettent au FeLV-B d'échapper à la réponse immune de l'hôte. Il est évident par contre que, comme pour les autres sous-groupes, le mécanisme pathogène est principalement ou en partie dû à l'interaction de *env* avec le récepteur cellulaire.

Le FeLV-C est retrouvé exclusivement chez des animaux présentant une anémie arégénérative par aplasie médullaire [Abkowitz, J. L. *et al.* 1987]. Il est présent toujours conjointement au FeLV-A et sa pathogénicité est liée à la présence de ce dernier. Ce sous-groupe provient d'une mutation dans la région Vr1 de *env* du FeLV-A [Rigby, M. A. *et al.* 1992]. Le FeLV-C n'a pas de lien avec les séquences endogènes du FeLV au sein du génome.

Le FeLV-T est aussi issu d'une recombinaison "classique" du FeLV-A et son cas sera étudié au chapitre VIII.

V. Spécificité des récepteurs pour chaque recombinant

Dès qu'une cellule est infectée par un virus, les récepteurs membranaires sont inhibés pour prévenir de futures infections: ce processus est appelé interférence de super-infection. La capacité relative d'un virus à engendrer cette interférence a été utilisée pour définir les virus qui utilisent les mêmes récepteurs. C'est l'analyse de cette interférence de super-infection qui a permis de définir quatre sous-groupes au sein des FeLV, chaque sous-groupe utilisant un ou des récepteurs spécifiques [Mendoza, R. *et al.* 2006].

A. Sous-groupe A

Le sous-groupe A du FeLV est la forme la plus transmissible du virus. Elle est faiblement pathogène mais génère comme nous venons de le voir les différents sous-groupes fortement pathogènes. Bien que premier sous-groupe à avoir été observé, le récepteur pour le FeLV-A n'avait jusqu'à présent pas été décrit. Il s'agit en fait d'une protéine codée par une séquence de 3,5 kilobases et qui est très fortement homologue à la protéine de transport humaine pour la thiamine (human thiamine transport protein huTHTR1). Ce récepteur sera donc nommé feTHTR1. Il est présent au sein des cellules rénales, hépatiques et de l'intestin grêle ainsi que dans les cellules du système lymphoïde [Mendoza, R., *et al.* 2006].

B. Sous-groupe B

Takeuchi *et al.* ont étudié le récepteur impliqué dans l'adhésion et l'entrée du sous-groupe B au sein de la cellule. Ils ont mis en évidence l'utilisation d'un même récepteur pour le gibbon ape leukemia virus (GALV) et le sous-groupe B du FeLV. Ce récepteur est une protéine possédant plusieurs domaines transmembranaires, homologue au transporteur à phosphate retrouvé chez *Neurospora crassa* [Takeuchi, Y. *et al.* 1992].

Ce domaine est aussi homologue à HuPit1 (human Pit1) qui a servi pour les premières études recherchant le récepteur spécifique du FeLV-B [Boomer, S. *et al.* 1997]. Il a été démontré par la suite que l'homologue félin FePit1 était bien le récepteur spécifique du FeLV-B [Anderson, M. M., *et al.* 2001]. FePit1 est une protéine comprenant plusieurs domaines transmembranaires.

La séquence *env* du FeLV-B est issue d'un provirus endogène. Ce sont trois domaines au sein de cette séquence qui déterminent la reconnaissance de ce récepteur: deux régions variables de la région N terminale de SU (VRA et VRB) et une portion de la région C terminale de SU [Boomer, S. *et al.* 1997] (Figure 19).

On peut voir qu'en fonction des recombinants du FeLV-B, et principalement en fonction des modifications de ces trois régions, le FeLV-B peut en fait utiliser FePit1 ou FePit2. Il semble qu'une mutation au sein de la région VRA soit responsable de la liaison avec Pit2 [Anderson, M. M. *et al.* 2001].

Figure 19. Résumé de la spécificité pour les récepteurs Pit des *Retrovirus* de type C félin, murin et primate. D'après Boomer, S. *et al.* 1997. Les schémas représentent l'utilisation du récepteur du FeLV-A, trois recombinants du sous-groupe B, du GALV et de deux séquences du MuLV. La structure de SU est schématisée sur la gauche; la séquence du FeLV-A est représentée en blanc, celle spécifique au FeLV-B en noir, les séquences des MuLV et GALV sont représentées en différentes teintes de gris pour montrer leur divergence.

	Récepteurs Pit		
	Pit1 humain	Pit2 humain	Pit2 hamster
FeLV-A SU	non	non	non
FeLV-B SU	oui	non	oui
FeLV-B VRAVRB	oui	oui	oui
FeLV-B VRA	oui	non	non
A-MuLV	non	oui	oui
MuLV-10A1	oui	oui	oui
GALV	oui	non	oui

C. Sous-groupe C

Le récepteur au sous-groupe C est une protéine de membrane nommée FLVCR qui a de nombreuses homologues avec les transporteurs à D-glucarate décrits chez certaines bactéries. Il joue vraisemblablement un rôle dans l'effet pathogène du FeLV-C [Quigley, J. G. *et al.* 2000].

D. Sous-groupe T

Le récepteur du sous-groupe T est abordé de manière plus complète dans le chapitre VIII. C'est en réalité un système complexe mettant en jeu le récepteur Pit1 et un co-facteur, FELIX, issu d'un provirus endogène.

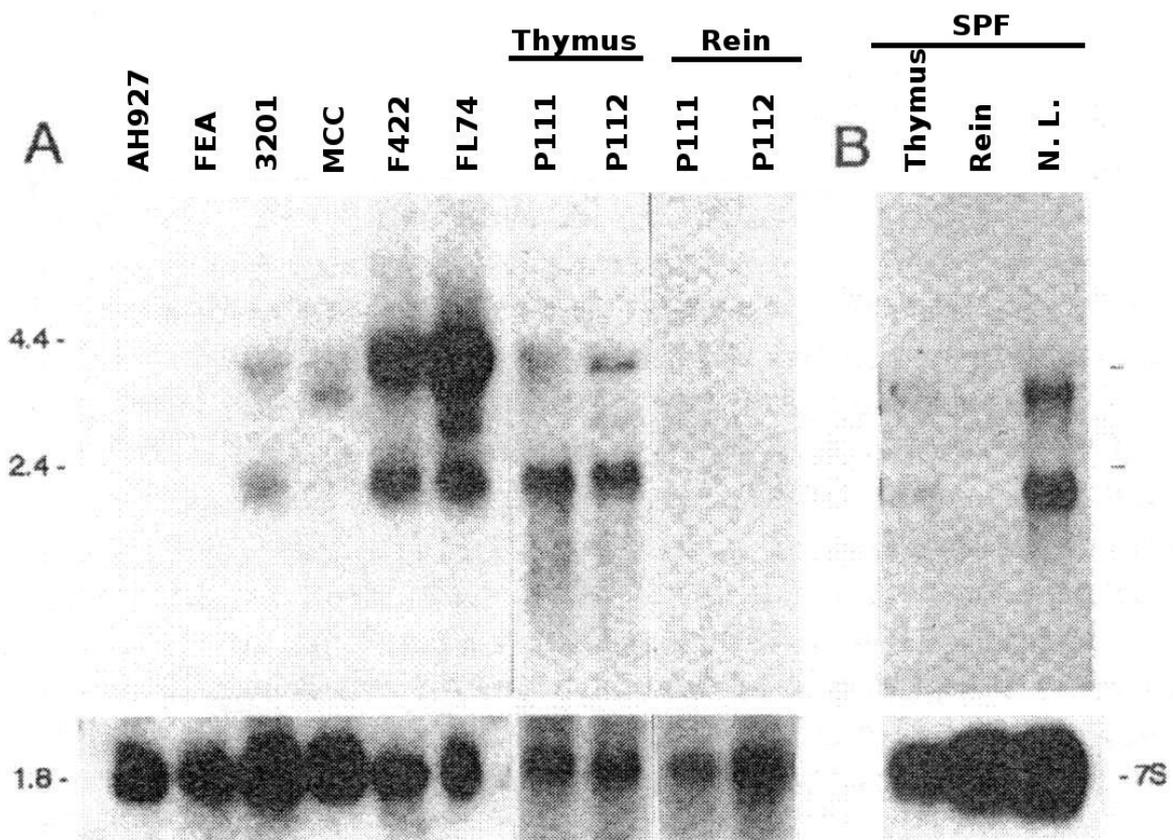
VI. Résistance aux infections par FeLV-B seul induites par enFeLV [McDougall, A. S. *et al.* 1994]

Il apparaît que l'infection par le sous-groupe B du FeLV tout seul, non associé, soit empêchée par le provirus endogène, au moins dans les organes où il s'exprime: rate, intestin grêle, moelle osseuse, thymus et nœuds lymphatiques; ce qui laisse au FeLV-B la possibilité d'infecter localement les glandes salivaires et l'épithélium vésical par exemple mais compromet l'apparition d'une virémie (Figure 20).

L'hypothèse principale est que l'expression d'une protéine SU endogène (peut-être tronquée), hautement homologue à celle du FeLV-B (de par l'origine du gène *env* chez celui-ci), bloque les récepteurs utilisés par le FeLV-B. Le sous-groupe A, toujours observé simultanément au sous-groupe B, jouerait le rôle de virus auxiliaire. Le mécanisme en jeu ici est pour le moment encore inconnu.

Il est intéressant de noter que la protéine produite par la séquence *env* du *Retrovirus* endogène est un médiateur soluble, ce qui implique qu'il peut induire une résistance contre le FeLV-B sur des cellules n'exprimant pas *env*.

Figure 20. Expression des séquences du enFeLV dans des lignées cellulaires de lymphome et des tissus lymphoïdes sains félines. D'après McDougall, A. S. *et al.* 1994. Les échantillons d'ARN sont dérivés de fibroblastes félines (AH927 et FEA), de lignées cellulaires de lymphomes T issus de chats FeLV négatifs (3201 et MCC), de lignées cellulaires de lymphomes T issus de chats FeLV positifs (F422 et FL74) et de tissus de chats sains infectés par le FeLV (P111 et P112) et d'un chat domestique indemne d'agents pathogènes spécifiés (SPF); N. L.: nœuds lymphatiques; les sondes enU3 (A) et B/S (B) correspondant à la séquence *env* ont été utilisées; la ligne basse montre des hybridations avec les sondes GAPDH (A) et spécifiques de l'ARN murin 7S (B), servant de contrôle.



VII. Inhibition initiée par le FeLV-B de l'infection par le FeLV-A [Phipps, A. J. *et al.* 2000]

Dans une étude destinée à observer le rôle du FeLV-B dans les syndromes néoplasiques, une co-inoculation des FeLV-B et FeLV-A a montré une inhibition du pouvoir pathogène du FeLV-A. En effet les animaux infectés par les deux sous-groupes simultanément ont montré proportionnellement une virémie diminuée ou absente et une baisse du taux d'animaux développant les signes classiques de la maladie (Tableau 8).

Il est possible que l'expression limitée du FeLV-B, qui dans ce cas n'est pas produit dans la cellule par recombinaison du FeLV-A mais est injecté directement, au sein d'un petit nombre de tissus puisse agir comme un vaccin vivant. Il y aurait alors induction d'une réponse immunitaire capable de protéger contre l'infection par le FeLV-A. Puisque les FeLV-B et FeLV-A sont homologues pour une grande partie de leurs séquences, une réaction croisée est envisageable.

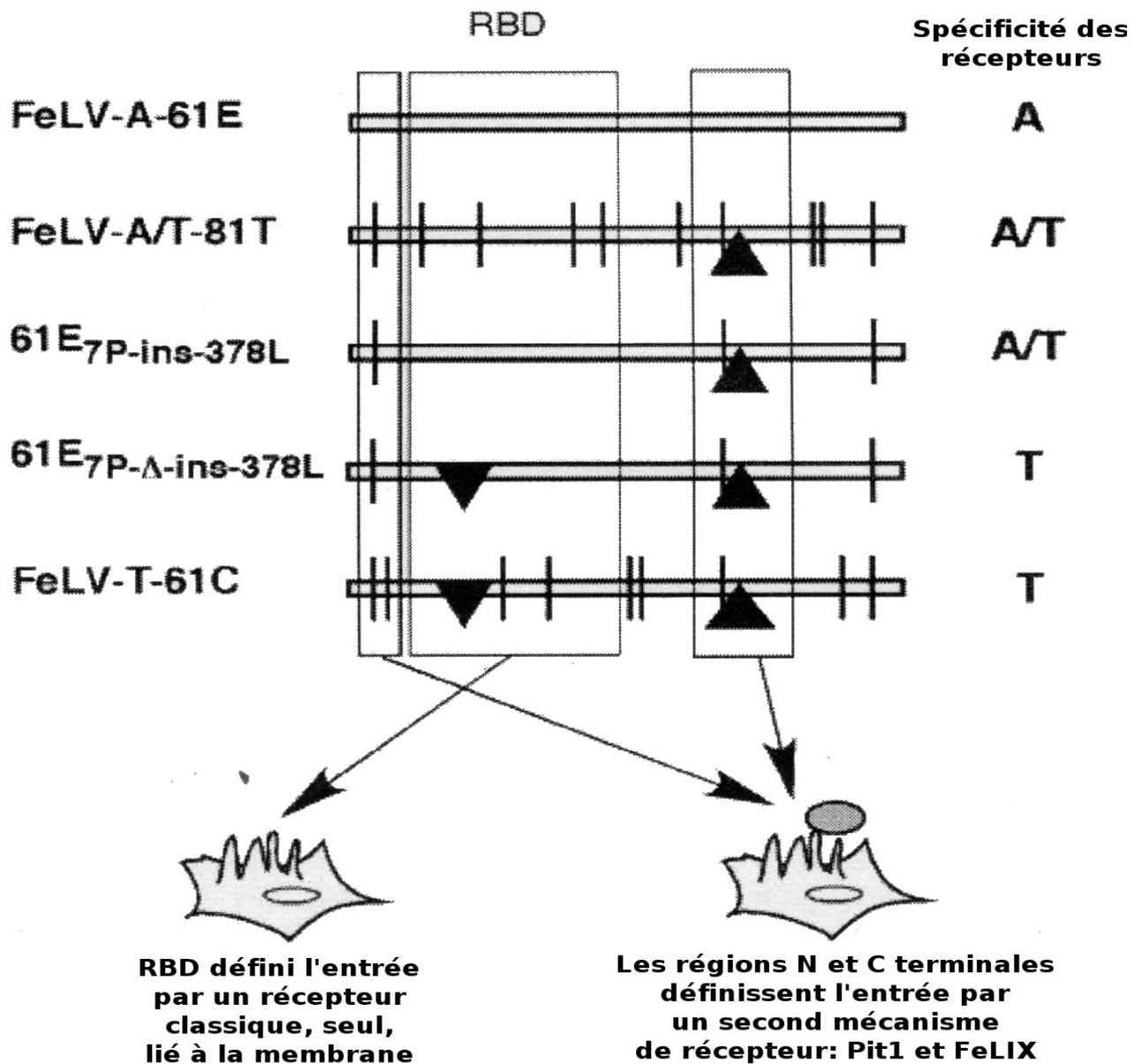
Tableau 8. Résultats des études de co-infection FeLV-A/FeLV-B. D'après Phipps, A. J. *et al.* 2000. a: les chats sont inoculés par voie intradermique avec le FeLV-A ou par voie intrapéritonéale avec des fortes et faibles doses de FeLV-B; b: la période de mise en compétition est soit néonatale – 24 ou 48 heures *postpartum* – soit à 14 jours; c: le statut FeLV est déterminé par détection de p27 dans le plasma en utilisant un kit commercial ELISA (Symbiotics, San Diego, CA, USA); d: un chaton du groupe A et un du groupe B ont été euthanasiés à 4 et 10 semaines pour des raisons non liées à l'étude.

	Groupe	Virus en compétition ^a et durée de la compétition ^b		Nombre de chats FeLV positifs ^c	
		FeLV-A	FeLV-1B3 haute dose		FeLV-1B3 faible dose
Expérience 1	A	—	nouveau-né	0 sur 4 ^d	
	B	nouveau-né	—	4 sur 4 ^d	
	C	nouveau-né	14 jours	2 sur 5	
Expérience 2	D	—	—	0 sur 7	
	E	nouveau-né	—	6 sur 6	
	F	nouveau-né	—	14 jours	7 sur 7
	G	nouveau-né	—	nouveau-né	2 sur 7

VIII. Implication de enFeLV dans la pathogénicité du FeLV-T

En étudiant l'apparition de variants du sous-groupe FeLV-A après infection cellulaire, Rohn *et al.* ont mis en évidence un variant (nommé 81T) qui est cytopathogène pour les cellules T et induit l'apparition d'un syncytium, ce qui n'avait jamais été observé jusqu'à présent parmi les variants de FeLV [Rohn, J. L. *et al.* 1998]. L'effet cytopathogène est considéré comme étant une évolution nécessaire pour les virus induisant une immunodéficience (HIV, SIV par exemple) [Lauring, A. S. *et al.* 2001]. Ce virus est répliatif même si sa vitesse de réplication est relativement lente comparée aux autres variants. Il est créé par des mutations principalement dans l'unité de surface des protéines d'enveloppe du FeLV-A [Rohn, J. L. *et al.* 1998] mais d'une manière générale au sein du gène *env*; ce sont ces mutations qui sont responsables de l'effet cytopathogène du virus [Lauring, A. S. *et al.* 2001]. Il a la capacité d'induire une superinfection, qui vraisemblablement joue un rôle clef dans l'action cytopathogène des *Retrovirus* [Rohn, J. L. *et al.* 1998]. La Figure 21 montre les homologies entre 81T et des clones du FeLV-A et les mutations qui confèrent au FeLV-T son tropisme et son utilisation de récepteurs particuliers.

Figure 21. Modèles de déterminants de env pour la spécificité vers les récepteurs "classiques" et "non classiques". (Le Receptor Binding Domain RBD est spécifique de l'entrée par les récepteurs "classiques". Des modifications dans les acides aminés de la région N terminale et l'insertion de quatre acides aminés dans la région C terminale sont requis pour l'entrée par les récepteurs "non classiques"). D'après Cheng, H. H. *et al.* 2006. Les différents clones indiqués à gauche représentent des variations des FeLV-A et FeLV-T pour lesquels la séquence *env* a été modifiée; les lignes verticales indiquent les positions approximatives des mutations de l'ADN résultant en un seul changement d'acide aminé; les triangles indiquent la position approximative de l'insertion composée de quatre acides aminés GESQ au sein de la portion C terminale; les triangles inversés indiquent des délétions.



Les sous-groupes classiquement connus de FeLV induisent normalement une résistance cellulaire aux virus homologues par compétition au niveau des récepteurs cellulaires. On s'est aperçu que 81T (nommé par la suite FeLV-T) pouvait réinfecter des cellules auparavant infectées par un homologue. De plus il est apparu que son entrée dans la cellule pouvait vraisemblablement se faire grâce à deux récepteurs distincts [Rohn, J. L. *et al.* 1998].

En réalité, le FeLV-T nécessite un récepteur et un co-récepteur ou co-facteur pour entrer dans la cellule. En effet le FeLV-T est associé aux récepteurs Pit1, déjà utilisés par le FeLV-B, et nécessite une protéine exprimée par la cellule pour infecter cette dernière. Cette protéine, dénommée FeLIX (pour FeLV infection "X-cessory" factor) est en fait un transcrit de provirus endogène. C'est une protéine d'enveloppe amputée du domaine transmembranaire TM. Ce co-facteur se lie à la membrane mais peut aussi apparaître sous forme de protéine soluble extracellulaire même si c'est sa première forme qui semble être liée à son rôle dans l'entrée du FeLV-T. Il est intéressant de noter que FeLIX est exprimée à un très haut niveau dans les cellules T, cibles privilégiées du FeLV-T et on donc peut envisager de lui attribuer la sélection du tropisme de ce dernier. Puisque FeLIX peut être retrouvé sous forme de protéine soluble, il pourrait aussi jouer un rôle dans la déplétion lymphoïde sévère observée chez les chats infectés par le FeLV-T [Anderson, M. M., *et al.* 2000].

FeLIX participerait au processus d'entrée du FeLV-T dans la cellule soit en se liant au récepteur membranaire Pit1 et en modifiant ainsi sa conformation pour qu'il puisse se lier au FeLV-T, soit en se liant directement au FeLV-T et en modifiant sa conformation pour qu'il puisse se lier à Pit1 [Lauring, A. S. *et al.* 2002].

FeLIX est extrêmement homologue à la protéine d'enveloppe du FeLV-B (elle-même provenant, comme nous l'avons vu, d'un gène issu d'un provirus endogène). La protéine SU du FeLV-B peut elle aussi jouer *in vitro* le rôle de co-facteur pour l'entrée du FeLV-T dans la cellule [Lauring, A. S. *et al.* 2001]. On peut craindre qu'une co-infection ou une co-évolution des FeLV-B et FeLV-T puisse étendre le tropisme de ce dernier et accélérer le développement de l'immunodéficience induite par le FeLV [Lauring, A. S. *et al.* 2001].

Alors que généralement les rétrovirus simples intègrent la cellule par le biais d'un seul récepteur qui est nécessaire et suffisant, et qui définit le sous-groupe du virus, le FeLV-T utilise un

nouveau mécanisme qui implique deux structures et qui réduit ainsi le panel cellulaire cible du virus. Parallèlement, cette spécificité est associée à une pathogénicité augmentée du virus. On observe une nouvelle implication des séquences endogènes des *Retrovirus*, qui sont essentielles ici à l'action pathogène du virus.

N.B: le mink cell focus-forming murine leukemia virus et les *Retrovirus* endogènes porcins utilisent aussi ce mécanisme de récepteur/co-facteur mais ils peuvent aussi entrer dans la cellule par le biais d'un système simple nécessitant un seul récepteur [Cheng, H. H. *et al.* 2006].

IX. Conclusion

Nous avons pu voir ici que la différence majeure entre les sous-groupes du virus de la leucose féline, et qui définit justement ces sous-groupes, se situe dans la séquence *env*. Ces différences vont conférer un tropisme et une pathogénicité différents aux quatre types viraux. Bien que ces variations de séquence soient dans la plupart des cas dues à des recombinaisons et des mutations/délétions/insertions, le cas du FeLV-B est particulier dans la mesure où une recombinaison du sous-groupe A avec une séquence endogène est à l'origine de sa divergence. Le *Retrovirus* endogène fait évoluer son homologue exogène vers une pathogénicité accentuée.

De plus, même si le FeLV-T est une mutation du FeLV-A, son intégration dans la cellule est conditionnée à l'action d'un cofacteur qui est d'origine endogène. Le FeLV-T constitue pour le moment l'évolution la plus pathogène du FeLV, et sa réplication n'est rendue possible que par la présence du *Retrovirus* endogène.

L'enFeLV joue ici un rôle majeur dans deux évolutions pathogéniques de la maladie.

Certaines actions de résistance induites par l'enFeLV, directes et indirectes, ont pu être observées mais elles sont vraisemblablement négligeables.

Cinquième chapitre: Jaasgiekte Sheep *Retro Virus*

Le Jaagsiekte Sheep *RetroVirus* (JSRV) (Jaagsiekte: provient de l'Afrikaans, signifie "maladie chassante") est l'agent responsable d'une des maladies infectieuses majeure des ovins : l'adénomatose pulmonaire des ovins (APO) ou ovine pulmonary adenocarcinoma (OPA). Le JSRV induit la transformation des cellules épithéliales différenciées de la partie distale de l'appareil respiratoire (principalement les pneumocytes de type II responsables de la synthèse, de la sécrétion et du recyclage du surfactant pulmonaire et les cellules de Clara responsables du métabolisme des agents étrangers [Leroux, C. et Archer, F. 2007]). Il est aussi responsable d'adénocarcinome du poumon chez le mouton. Cette maladie est apparentée cliniquement, radiologiquement et histologiquement au cancer bronchioloalvéolaire humain, une forme particulière d'adénocarcinome pulmonaire [Palmarini, M. and Fan, H. 2001a]. Certaines études ont même retrouvé la présence du JSRV chez l'homme, sans pour le moment identifier d'association avec des tumeurs pulmonaires [Morozov, V. A., *et al.* 2004].

La capacité des *Retrovirus* à intégrer le génome de la cellule hôte leur permet de dérégler la machinerie de ces cellules et de nombreux *Retrovirus* sont ainsi responsables de cancers des tissus cibles.

L'étude du JSRV peut permettre d'une part de comprendre et de traiter une des maladies infectieuses majeure des ovins et caprins, d'autre part de comprendre le processus d'oncogenèse pulmonaire chez l'homme, amenant à l'amélioration du diagnostic et du traitement.

L'originalité du JSRV réside dans son mécanisme de transformation de la cellule hôte.

I. Généralités sur l'adénomatose pulmonaire des ovins ou Jaagsiekte

L'adénomatose pulmonaire des ovins est une maladie virale, contagieuse, qui résulte en des tumeurs pulmonaires chez les ovins et parfois chez les caprins. L'impact économique peut être dramatique puisque le taux de mortalité peut monter jusqu'à 60 % après exposition au virus JSRV qui appartient aux *betaretrovirus*.

La maladie est retrouvée en Europe continentale, au Royaume-Uni, Afrique, Inde, Chine, Moyen-orient, Amérique du Nord et certaines régions de l'Amérique du Sud.

Le virus se propage par voie aérienne, avec contamination directe ou par aérosols des animaux. Le virus est retrouvé dans les exsudats respiratoires des animaux infectés. Il n'y a pas d'évidence de transmission *in utero*, même si les nouveau-nés semblent particulièrement sensibles.

La période d'incubation varie de neuf mois à trois ans. Les signes cliniques sont : émaciation progressive, perte de poids et dyspnée sévère. En général, il y a présence d'un écoulement nasal mucoïde plus ou moins important. Des râles humides sont entendus à l'auscultation respiratoire, mais pas de toux caractéristique. Les symptômes évoluent lentement. La mort survient après 2 à 6 mois, souvent suite à une surinfection bactérienne.

Le diagnostic différentiel inclut la maladie de Maedi-Visna, les pneumonies bactériennes et les infestations parasitaires pulmonaires (strongyloses,...).

A l'autopsie, les poumons sont en général de taille augmentée, ne collapent pas à l'ouverture de la cage thoracique. Un liquide spumeux est retrouvé dans la trachée et les bronches, et des tumeurs nodulaires sont présentes dans le parenchyme pulmonaire. Ces tumeurs varient de la taille de petits nodules jusqu'à des masses denses. Les bordures de la masse sont bien délimitées, de consistance ferme, de couleur grise à rose-gris. A la coupe, la surface est luisante et granulaire. Un liquide spumeux peut être récupéré. La grande majorité des tumeurs se situent aux pôles apical, cardiaque et ventral des lobes diaphragmatiques. Des métastases sont parfois retrouvées dans les nœuds lymphatiques voisins mais les tumeurs ne s'étendent pas habituellement. Une pneumonie secondaire et une pleurésie fibrineuse peuvent être trouvées.

La majorité des cas apparaissent sur des individus de plus de 2 ans. Le pic d'incidence est retrouvé sur des animaux de 3 à 4 ans. Après une primo-infection, le taux de mortalité est en général assez élevé : jusqu'à 60 % des animaux d'un troupeau peuvent mourir au cours des 3 premières années. Par la suite, les pertes diminuent jusqu'à 1 à 3 % par an, la maladie restant en général endémique au sein du troupeau pour une longue période.

Il n'y a ni traitement ni vaccin disponibles [Sargison, N. 2003 ; OIE. 2003].

II. Origine et distribution de enJSRV

L'étude de l'adénomatose pulmonaire ovine a permis de mettre en évidence une étiologie virale. En effet, la maladie est due à un *Retrovirus* (exJSRV) appartenant aux *betaretrovirus*. Aux cours des premières recherches effectuées sur ce virus, on a pu observer la présence d'un homologue endogène (enJSRV) [Hecht, S. J. *et al.* 1996].

Les exJSRV et enJSRV sont vraisemblablement des chimères de *Retrovirus* anciennement de type D et de type B. En effet les séquences *gag*, *pro* et *pol* montrent une forte homologie avec les *Retrovirus* simien de type D (SRV) alors que *env* montre une très forte homologie avec le Mouse mammary tumour virus (MMTV) [York, D. F. *et al.* 1992].

A. Distribution du enJSRV au sein des mammifères

Ce virus endogène est retrouvé chez toutes les espèces ovines et caprines domestiques ainsi que chez des espèces sauvages. On a pu mettre en outre en évidence sa présence chez de nombreux membres de l'ordre des Artiodactyles, et principalement chez de nombreuses espèces de la famille des Bovidae [Hecht, S. J. *et al.* 1996].

Les études phylogénétiques suggèrent que enJSRV est un *Retrovirus* endogène récent avec un homologue exogène actif qui a vraisemblablement infecté en premier les petits ruminants puis s'est répandu aux autres espèces de la famille des Bovidae. Il a été observé une différence plus importante entre les provirus de deux espèces bovines qu'entre leurs provirus et ceux retrouvés chez le mouton ce qui vient appuyer cette théorie [Morozov, V. A. *et al.* 2007].

Le JSRV est très fortement homologue à un autre *Retrovirus* retrouvé chez les petits ruminants : l'enzootic nasal tumour virus (ENTV) (virus enzootique des tumeurs nasales) qui induit l'apparition de tumeurs nasales [Cousens, C. *et al.* 1999]. La séquence endogène du JSRV retrouvée dans le génome ovin est fortement homologue à la séquence de l'exJSRV; en revanche la séquence du enJSRV retrouvée au sein du génome caprin présente plus d'homologie avec la séquence de l'exENTV [Morozov, V. A. *et al.* 2007].

B. Distribution de enJSRV au sein du génome ovin [Carlson, J. *et al.* 2003]

La distribution au sein du génome apparaît comme relativement stable. L'étude de différentes espèces montre qu'il n'y a vraisemblablement pas eu de grands mouvements depuis quelques milliers d'années.

L'enJSRV peut être retrouvé à 7 positions chromosomiques chez les ovins et 8 chez les caprins. Seulement deux positions sont identiques ce qui suggère que certaines copies de l'enJSRV ont intégré le génome après spéciation. Une observation inhabituelle est la présence de deux *loci* qui contiennent plusieurs copies du génome proviral. Il semblerait que ces copies soient en configuration tandem répétée.

C. Variation du génome et du tropisme d'enJSRV et exJSRV

Un des problèmes posé par la présence d'un *Retrovirus* exogène et de son homologue endogène est de différencier les deux pour l'étude de l'implication clinique de chacun des virus.

Il a été montré que ces deux virus peuvent être différenciés principalement par leur séquence U3 [Bai, J. *et al.* 1996]. En effet, cette séquence est plus longue dans le provirus endogène et la comparaison entre la séquence endogène et la séquence exogène montre seulement 74 % d'homologie [Palmarini, M. *et al.* 2000]. Une hypothèse majeure est que l'exJSRV dérive de l'enJSRV suite à une mutation de la région U3 du LTR et d'autres régions (VR1, VR2 et VR3) du génome proviral durant l'évolution [Bai, J. *et al.* 1996].

Les deux régions VR1 et VR2 se situent au sein de la séquence *gag*. VR1 en particulier contient une portion riche en proline dans la forme exogène qui est absente de la forme endogène. Une troisième région VR3 est retrouvée dans la portion carboxy-terminale de la protéine transmembranaire [Palmarini, M. *et al.* 2000].

Les différences observées au sein des LTR des deux formes, principalement au sein de la région U3, expliquent que ceux-ci soient les déterminants principaux d'une différence de tropisme et en particulier du tropisme pour les cellules épithéliales différenciées du poumon de l'exJSRV [Palmarini, M. *et al.* 2000].

On observe en fait que l'exJSRV a un tropisme exclusif pour les cellules pulmonaires tandis que l'enJSRV s'exprime essentiellement dans les cellules du tractus génital [Palmarini, M. *et al.* 2000].

III. Oncogenèse et implication du enJSRV

A. L'exJSRV est associé aux tumeurs pulmonaires des ovins

Pour différencier les séquences des enJSRV et exJSRV, un site de restriction (séquence nucléotidique reconnue par les enzymes de restriction et servant de site de coupure au sein de l'ADN) *ScaI* a été mis en évidence, uniquement présent dans l'exJSRV et absent de l'enJSRV. On a ainsi pu observer la présence d'ARN du exJSRV uniquement au sein des tumeurs, des fluides pulmonaires et des nœuds lymphatiques drainant la région pulmonaire des animaux atteints d'APO [Palmarini, M. *et al.* 1996] ce qui implique que les cellules épithéliales tumorales sont le site de réplication majeur du exJSRV. La démonstration de la présence du provirus exJSRV uniquement au sein de l'ADN des cellules tumorales prouve que ce virus est associé au phénomène néoplasique. Des études précédentes avaient montré que l'APO pouvait être induite chez des animaux sains par injection de fluides pulmonaires et de cellules tumorales provenant d'animaux malades. On a pu montrer que l'utilisation de clones du exJSRV permettait d'induire la maladie chez des animaux sains infectés artificiellement. L'exJSRV est nécessaire et suffisant pour induire l'adénomatose pulmonaire ovine [Palmarini, M. *et al.* 1999].

B. Implication du enJSRV dans l'oncogenèse

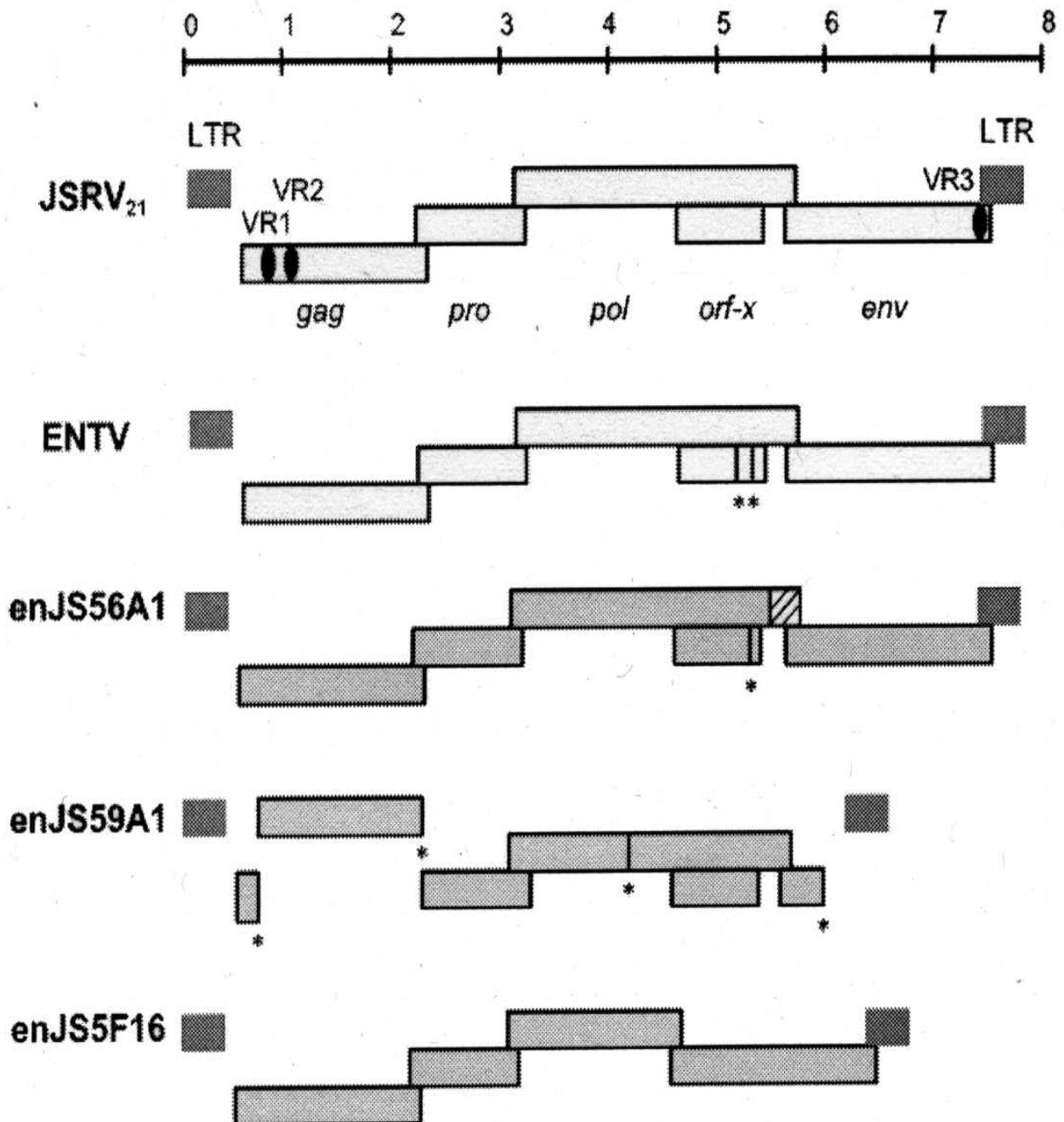
On a vu précédemment que l'exJSRV était nécessaire et suffisant pour induire les tumeurs. De plus nous venons de voir que les enJSRV et exJSRV ont un tropisme différents, l'enJSRV s'exprimant peu au sein des cellules pulmonaires.

L'étude de la structure provirale des enJSRV et de leur expression a permis de montrer que, bien que certaines copies possèdent un génome proviral complet et que toutes les copies possèdent un cadre de lecture pour un ou plusieurs gènes de structure, ils sont incapables de former des particules virales [Palmarini, M. *et al.* 2000] (Figure 22).

Jusqu'à présent il a été observé que l'enJSRV n'induisait pas de carcinomes pulmonaires spontanés [Bai, J. *et al.* 1996].

Vraisemblablement l'enJSRV n'a pas d'implication directe au sein du processus tumoral. On ne peut cependant pas exclure une action indirecte par le biais du exJSRV mais qui n'a pour le moment pas été étudiée ni démontrée.

Figure 22. Structure génomique des betarétrovirus ovins endogènes et exogènes. D'après Palmarini, M. *et al.* 2004. La barre numérotée indique la distance en kilobases. Les codons stop prématurés sont indiqués par une barre verticale soulignée d'un astérisque. Les régions principales de divergence entre les *betaretrovirus* ovins (VR1, VR2 et VR3) sont marquées d'un ovale noir dans le génome des JSRV; JSRV₂₁ et ENTV représentent les formes exogènes; enJS56A1, enJS59A1 et enJS5F16 représentent différentes copies de la forme endogène.



C. Mécanisme de l'oncogénèse induite par exJSRV

Les *Retrovirus* oncogènes agissent généralement soit par l'acquisition et l'expression d'un oncogène dérivé de l'hôte, soit par une insertion activatrice d'un oncogène cellulaire ou enfin par l'expression d'oncogènes viraux auxiliaires. L'exJSRV n'exprime pas d'oncogène dérivé ni d'oncogène auxiliaire. De plus, il peut induire des tumeurs en 10 jours, ce qui est nettement plus court que les cas typiques induits suite à une insertion activatrice [Wootton, S. K. *et al.* 2005].

Il a été montré que le gène *env* du exJSRV était suffisant pour induire des adénocarcinomes chez la souris similaires à ceux décrits chez le mouton. La protéine d'enveloppe ne présente pas d'homologies avec des protéines cellulaires ce qui limite la possibilité d'acquisition de tout ou partie d'un oncogène cellulaire. Les récepteurs HYAL-2 trouvés chez la souris ne se lient pas avec les protéines d'enveloppe du exJSRV. Il est donc évident que l'interaction entre exJSRV et HYAL-2 n'est pas requise pour l'oncogénèse même si cela peut en faciliter l'induction [Wootton S. K. *et al.* 2005].

Par contre, la queue cytoplasmique (CT) du domaine transmembranaire (TM) est le déterminant majeur de la transformation cellulaire induite par *env* [Varela, M. *et al.* 2006] dans un processus récepteur-indépendant.

Il apparaît que la protéine d'enveloppe du exJSRV interagit directement avec la protéine Ron tyrosine kinase, qui est un régulateur-inhibiteur de l'inflammation, important aussi dans les fonctions du trophoblaste, et qui est normalement régulé par les récepteurs HYAL-2. De plus, la protéine d'enveloppe du enJSRV interagit aussi avec la protéine Ron tyrosine kinase en bloquant son autophosphorylation [Varela, M. *et al.* 2006].

Les interactions entre HYAL-2, Ron, les protéines d'enveloppe des exJSRV et enJSRV ne sont pas encore très claires, de même que leur rôle dans la pathogénèse du exJSRV et leur participation dans la placentation (abordée en aval).

IV. L'enJSRV : une protection naturelle contre l'exJSRV

A. Blocage de l'entrée du exJSRV dans la cellule

1. L'exJSRV et l'enJSRV utilisent le même récepteur

Spencer *et al.* ont montré, en utilisant des cellules murines NIH 3T3-HYAL2 (cellules murines exprimant le récepteur humain HYAL-2 que l'exJSRV et l'enJSRV utilisent le même récepteur cellulaire HYAL-2 pour entrer dans la cellule. En effet, des cellules NIH 3T3 n'exprimant pas HYAL-2 ne permettent pas l'entrée de vecteurs portant la protéine d'enveloppe des deux *Retrovirus* tandis que des cellules modifiées NIH 3T3-HYAL-2 sont permissives à ces vecteurs [Spencer, T. E. *et al.* 2003].

2. L'enJSRV bloque l'entrée du exJSRV dans les cellules où il est présent

Palmarini *et al.* ont étudié l'infection de lignées cellulaires stromales d'endomètre ovin. Ces cellules n'expriment normalement pas l'enJSRV. L'expression expérimentale du enJS5F16 (une des copies du enJSRV au sein du génome) au sein de ces cellules inhibe au moins d'un facteur 300 leur infection par des vecteurs comportant *env* du exJSRV [Palmarini, M. *et al.* 2004].

3. Conclusion

On a donc une compétition au niveau des récepteurs cellulaires entre *env* du enJSRV et du exJSRV qui bloque et limite l'entrée du exJSRV dans la cellule.

B. Blocage du cycle répliatif du exJSRV

1. L'enJSRV ne peut pas libérer de particules virales dans le milieu extracellulaire

L'enJSRV forme des particules virales au sein du cytoplasme cellulaire mais celles-ci ne peuvent pas sortir de la cellule. En effet, la transfection de cellules 293T ne permet pas d'observer de particules virales dans le surnageant des cellules infectées [Mura, M. *et al.* 2004].

Une des hypothèses est que certains *loci* du enJSRV ne codent pas le domaine tardif L de la protéine codée par *gag*, dont l'absence permet la production de particules virales mais pas leur libération [Palmarini, M. *et al.* 2004].

2. L'enJSRV bloque la libération cellulaire du exJSRV

L'infection de cellules 293T par un clone du enJS56A1 (une autre copie du enJSRV) révèle une quantité importante de protéines codées par *gag* immatures dans le cytoplasme et l'absence de ces protéines dans le surnageant. L'infection de ces cellules par un clone du exJSRV montre la présence de protéines codées par *gag* matures et immatures au sein du cytoplasme, et un certain nombre de protéines matures dans le surnageant. La co-infection par les deux clones montre une quantité importante de protéines codées par *gag* non matures dans le cytoplasme et une absence de protéines dans le surnageant [Mura, M. *et al.* 2004]. On constate donc ici que la présence concomitante des formes endogène et exogène entraîne une restriction du cycle répliatif de la forme exogène.

Par microscopie électronique, on peut observer que des cellules 293T infectées par enJS56A1 produisent des particules virales qui sont essentiellement regroupées en région périnucléaire. Par contre, aucune particule n'est observée en bourgeonnement ou en dehors de la cellule. Ceci est une différence observée entre les particules du exJSRV et celles du enJS56A1: celles de ce dernier sont agglomérées en tas serrés [Mura, M. *et al.* 2004].

Les protéines codées par *gag* des enJS56A1 et exJSRV sont identiques à 94 %. Les différences majeures sont localisées dans deux régions (VR1 et VR2) qui sont riches en résidus

proline et localisées entre les protéines CA et MA. L'utilisation de chimères a permis d'estimer la séquence responsable du défaut de production virale et de l'interférence avec le cycle du exJSRV. Vraisemblablement, cette séquence d'acides aminés est proche du résidu 142 de la séquence codée par *gag* [Mura, M. *et al.* 2004].

La construction de clones du enJS56A1 possédant des mutations ponctuelles a amené à la conclusion que la mutation en position 21 d'une arginine présente chez l'exJSRV en un tryptophane chez l'enJS56A1 est déterminante pour les fonctions dominantes négatives du *gag* endogène [Mura, M. *et al.* 2004]. Cette conclusion est appuyée par des études ultérieures sur des provirus mutants [Murcia, P. R. *et al.* 2007]. Cette mutation introduit un acide aminé hydrophobe dans une portion exposée de la protéine. Il pourrait donc y avoir altération de la capacité de la protéine codée par *gag* à interagir avec des facteurs cellulaires nécessaires aux déplacements des particules virales dans la cellule [Mura, M. *et al.* 2004].

La séquence *Gag* code la protéine de structure du cœur de la nucléocapside rétrovirale et joue un rôle majeur dans l'assemblage rétroviral et le bourgeonnement des particules. Comme nous venons de le voir, l'enJS56A1, une des trois copies du provirus enJSRV, possède une mutation en position 21 de sa protéine codée par *gag*, remplaçant une arginine par un tryptophane. Cette arginine est conservée normalement chez tous les *betaretrovirus* [Murcia, P. R. *et al.* 2007].

Les *betaretrovirus* s'assemblent au sein du cytoplasme dans la région péricentrosomale puis se déplacent vers la membrane cellulaire par un mécanisme impliquant entre autre les endosomes et la glycoprotéine d'enveloppe virale. Parmi les déterminants du déplacement de la protéine codée par *gag* vers la membrane cellulaire, on trouve deux domaines, le domaine de liaison avec la membrane (M) et le domaine tardif (L). Les virus mutants pour le domaine M ont une capacité à rejoindre la membrane cellulaire altérée tandis que les mutants pour le domaine L ne peuvent pas sortir de la cellule et restent donc accolés à la membrane [Murcia, P. R. *et al.* 2007].

Il a été étudié alors la possibilité que ce soit le domaine M, dont le résidu 21 fait partie, qui soit responsable de l'effet dominant et négatif du enJS56A1 sur l'exJSRV. En fait, seul le résidu 21 est impliqué dans ce mécanisme [Murcia, P. R. *et al.* 2007].

Pour démontrer l'action directe ou indirecte du enJS56A1 sur l'exJSRV, des mutants possédant une séquence *gag* enJS56A1 tronquée ont été créés. Il a été observé qu'une séquence entière de *gag* enJS56A1 est nécessaire pour un blocage du exJSRV. La restriction du cycle viral du

exJSRV n'est pas seulement due à une compétition de récepteurs mais bien à une action du enJS56A1 sur l'exJSRV [Murcia, P. R. *et al.* 2007].

Plusieurs expériences ont permis de mettre en évidence une association en trans des deux virus voir même un co-assemblage [Murcia, P. R. *et al.* 2007].

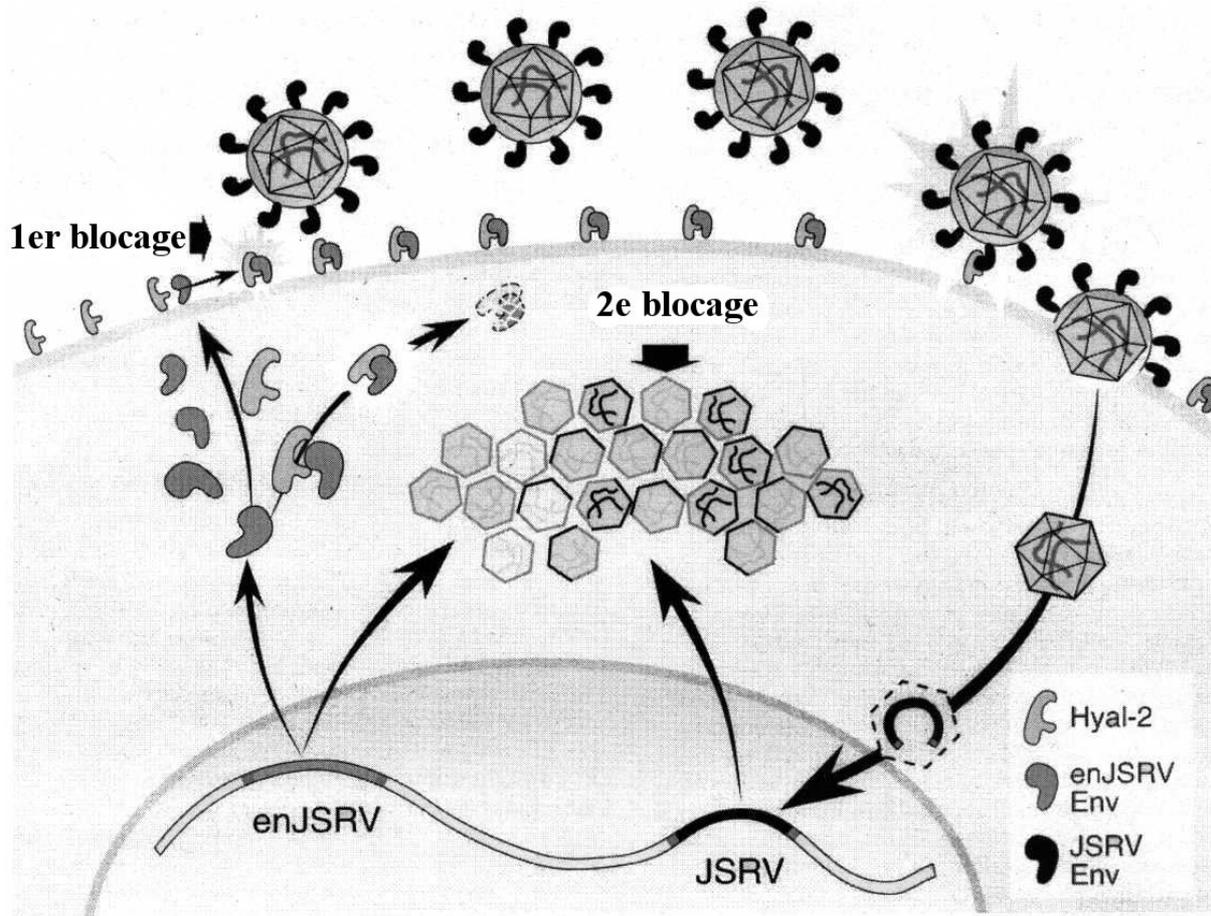
La protéine codée par *gag* du exJSRV normalement se déplace vers le centrosome après transcription, et le ciblage du centrosome est majoritairement déterminé par le résidu 21. Il semble que l'enJS56A1 ne rejoigne pas le centrosome. Le co-assemblage des enJS56A1 et exJSRV empêche donc les particules du exJSRV de rejoindre le centrosome et d'être ensuite ainsi guidées vers la membrane cellulaire [Murcia, P. R. *et al.* 2007].

C. Conclusion

On peut donc observer ici un cas particulier parmi les *Retrovirus* : c'est la première fois qu'un double blocage par un virus endogène, comprenant un blocage tardif, est décrit. En effet, l'enJSRV bloque d'une part l'exJSRV par compétition au niveau des récepteurs mais, d'autre part, il bloque la sortie des particules virales de l'exJSRV de la cellule (Figure 23). Il est vraisemblable qu'une mutation du résidu 21 de la séquence *gag* du enJSRV lui confère la capacité d'empêcher les particules virales du exJSRV, en se co-assemblant, de rejoindre le centrosome et donc la membrane cellulaire.

Ce blocage tardif permet d'entrevoir de nouvelles pistes pour les traitements antiviraux.

Figure 23. Blocages induits par l'enJSRV sur le cycle réplcatif du JSRV. D'après Palmarini, M. *et al.* 2004.



V. L'enJSRV permet une immunotolérance envers l'exJSRV

A. Une réponse immunitaire absente

La réponse immunologique à l'infection par le JSRV est peu comprise. Aucune réponse humorale spécifique n'est détectée [Summers, C. *et al.* 2002]. La réponse à médiation cellulaire est pour le moment inconnue bien qu'il ait été démontré une lymphopénie des CD4 et une neutrophilie

dans le sang périphérique des adultes en phase terminale d'APO. Il a, en outre, été montré que lors d'infections aiguës expérimentales et au cours du développement d'APO on observait une absence d'anticorps spécifiques de la protéine CA du exJSRV [Summers, C. *et al.* 2002].

Cette absence de réponse est surprenante car on sait, grâce à des études effectuées sur souris, que les tumeurs induites par le gène *env* du enJSRV peuvent être contrôlées par le système immunitaire normal de l'animal [Wootton, S. K. *et al.* 2005].

B. L'hypothèse d'une transformation des cellules immunitaires par l'exJSRV [Summer, C. *et al.* 2002]

Une des premières hypothèses, explorée par l'équipe de Summers *et al.*, est que le virus transforme les cellules de la réponse immunitaire.

Bien que peu de cellules immunitaires soient infectées, la charge provirale la plus importante se situe au sein des monocytes/macrophages, puis dans les cellules B et enfin T. Quoiqu'il en soit, il n'y a aucune évidence d'une transformation de ces cellules par le virus.

Une investigation des réponses lymphoprolifératives à une stimulation par mitogène a été entreprise. Elle montre une altération de la réponse cellulaire de l'hôte corrélée à la présence du exJSRV. En effet, une réponse diminuée à la stimulation par la concanavaleine A (ConA) est évidente dans les cellules mononucléées du sang périphérique des animaux infectés expérimentalement par l'exJSRV, très précocement (dès 8 semaines post-infection) au cours du processus tumoral des cellules épithéliales pulmonaires. Cette altération est aussi évidente chez les individus atteints d'APO.

Mais cette étude ne permet pas de mettre en évidence une transformation des cellules immunitaires (monocytes, macrophages, cellules B et T).

A l'instar de ce qui a été décrit pour le virus de la leucose féline ou le virus de la leucémie murine, on peut imaginer que l'immunosuppression serait due à la présence de la protéine transmembranaire p15E qui empêche l'agrégation des récepteurs ConA et donc interfère avec la redistribution du cytosquelette. On peut aussi émettre l'hypothèse que les mécanismes utilisés dans le processus néoplasique pourraient altérer la réponse cellulaire sans pour autant transformer la cellule.

Avec aucun anticorps spécifique circulant détecté et des altérations phénotypiques seulement démontrées chez l'adulte atteint d'APO, la réponse réduite à la stimulation par ConA indique une altération au sein de l'immunité systémique. Ce changement est un événement précoce au cours de l'infection par l'exJSRV, maintenu pendant le processus tumoral et retrouvé au stade terminal de l'APO.

C. Une immunotolérance induite par enJSRV

Une autre hypothèse émise est que le défaut d'anticorps ne provient pas d'une action du exJSRV sur les cellules de l'immunité mais d'une action du enJSRV sur la formation de ces cellules. En effet, on peut imaginer que la présence du provirus homologue entraîne une immunotolérance vis-à-vis du virus exogène [York, D. F. *et al.* 1992].

Le génome du enJSRV est fortement exprimé chez le fœtus ovin. Une expression spécifique de l'ARN du enJSRV est observée au sein de la *lamina propria* du tube digestif. Son expression est, de plus, détectée au sein des plaques de Peyer et dans le thymus des *fœtus*. En particulier, l'expression dans le thymus est détectée de manière prédominante au sein de la jonction cortico-médullaire [Spencer, T. E. *et al.* 2003]. La sélection finale des cellules T se déroule dans cette région du thymus.

Ceci soutient l'hypothèse que les moutons sont rendus tolérants à l'encontre du virus exogène par l'expression du enJSRV dans le fœtus au cours du développement du système immunitaire. Les moutons seraient donc immunotolérants vis-à-vis du virus JSRV exogène de par la présence du provirus enJSRV [Dunlap, K. A. *et al.* 2005 ; Palmarini, M. *et al.* 2004 ; Wootton, S. K. *et al.* 2005].

D. Discussion

Cette immunotolérance pose alors le problème de la vaccination. En effet, même si il a été montré que des anticorps pouvaient être détectés chez des moutons immunisés avec une protéine de capsid recombinante ou des protéines de surface en adjuvant, il est difficile d'imaginer un vaccin pouvant engendrer une forte réponse immune alors que la plupart des épitopes viraux seraient reconnus comme du soi [Palmarini, M. *et al.* 2004].

De plus, comme nous allons le voir dans le chapitre suivant, l'enJSRV joue un rôle important dans la reproduction ovine. On peut donc s'interroger sur les conséquences qu'il pourrait y avoir sur l'hôte si on trouvait un vaccin effectif contre l'exJSRV.

Enfin on peut s'interroger sur le bénéfice apporté pour l'hôte de cette immunotolérance et pourquoi la sélection naturelle l'a conservée au cours du temps.

VI. Rôle du enJSRV dans le processus de morphogenèse placentaire

Comme nous venons de le voir, un *Retrovirus* endogène (enJSRV) est exprimé au sein des cellules du mouton. Il n'a pas d'action pathogène propre mais il interagit de manière bénéfique et nuisible pour l'hôte avec son homologue exogène. L'étude de cet ERV a par contre permis de montrer qu'à la différence du exJSRV qui a un tropisme pulmonaire, l'enJSRV est spécifiquement exprimé au niveau du tractus génital des femelles.

A. Expression majeure de enJSRV au sein du tractus génital

L'ARNm de l'enveloppe du enJSRV a été détecté dans la lumière utérine et dans l'épithélium glandulaire superficiel de l'endomètre intercaronculaire ainsi que dans la portion cotylédonaire du placentome. Spécifiquement, l'ARNm *env* du enJSRV et la protéine d'enveloppe sont retrouvés au sein du trophoblaste mononucléaire, mais sont surtout abondants dans les cellules binucléées géantes du trophoblaste et les plaques syncytiotrophoblastiques du placentome [Dunlap,

K. A. *et al.* 2006a]. Aucune expression d'ARNm des enJSRV n'a été détectée dans la portion caronculaire du placentome [Dunlap, K. A. *et al.* 2005].

Comme on l'a vu précédemment, le génome ovin contient environ 20 copies du *betaretrovirus* endogène enJSRV [Hecht, S. J. *et al.* 1994]. Ces copies correspondent en réalité à 3 séquences différentes, qui possèdent toutes au moins un cadre de lecture pour un des gènes de structure, mais qui sont incapables de former des particules virales infectieuses [Dunlap, K. A. *et al.* 2006a]. Il a été montré que ces 20 copies sont activement transcrites au sein de l'endomètre [Dunlap, K. A. *et al.* 2005 ; Mura, M. *et al.* 2004].

D'un point de vue physiologie comparée, la présence de l'expression de *env* du enJSRV au sein du tractus génital et du placenta est extrêmement similaire à ce qui est observé chez l'homme et la souris où on retrouve une glycoprotéine de membrane hautement fusogénique, appelée syncytin, produite par le gène d'enveloppe d'un ERV, qui induit la formation de *syncytia* après réaction avec les récepteurs des *Retrovirus* de type D [Dunlap, K. A. *et al.* 2005].

On peut donc s'interroger sur l'expression de ce *Retrovirus* spécifiquement au sein du tractus génital de la femelle et le rôle qu'il peut y jouer.

B. Placentation chez les ovins [Dunlap, K. A. *et al.* 2006a]

Chez toutes les espèces, l'implantation du blastocyste précède et est requise pour la placentation. C'est un processus hautement coordonné qui implique que le blastocyste se détache de la *zona pellucida*, se positionne et s'attache par adhésion du trophoblaste à l'épithélium de la lumière de l'endomètre. Chez le mouton, l'oocyte fécondé se développe en une *morula* au sein de l'oviducte puis est transporté vers l'utérus au 4^e jour enveloppé par la *zona pellucida* acellulaire. La *morula* se développe en blastocyste au 6^e jour qui se détache de la *zona pellucida* entre le 7^e et le 8^e jour puis prend une forme sphérique ou tubulaire au 11^e jour. Entre le 12^e et le 16^e jour, le trophoblaste du blastocyste s'allonge en une forme filamenteuse. Les cellules mononucléées du trophoblaste produisent l'interféron tau (IFN- τ) qui est le signal de reconnaissance de la gestation chez les ruminants. Le blastocyste est à ce moment là considéré comme un *conceptus*. Alors que celui-ci s'allonge, l'implantation commence avec l'apposition et l'attachement du trophoblaste à

l'épithélium utérin entre le 13^e et 15^e jour. Au 16^e jour, le conceptus commence à être fermement attaché voire à adhérer à l'épithélium de la lumière de l'endomètre. Parallèlement à l'agrandissement du trophoblaste pendant l'élongation du *conceptus*, les cellules géantes binucléées du trophoblaste commencent à se différencier des cellules mononucléées. Au sein du *conceptus* ovin, les cellules binucléées apparaissent en premier entre le 14^e et 16^e jour de gestation. Aux environs du 18^e jour, elles forment 15 à 20 % du trophoctoderme qui est apposé à l'épithélium utérin. Après formation, les cellules binucléées migrent et fusionnent avec des cellules épithéliales de la lumière de l'endomètre, produisant des cellules trinucléées foeto-maternelles hybrides. La migration continue de cellules binucléées et la fusion en cellules trinucléées, accompagné du déplacement ou de la mort des cellules épithéliales utérines restantes, est envisagé comme étant à la source des plaques syncytiales multinucléées qui contiennent jusqu'à 25 nuclei et couvrent chaque caroncule entre le 20^e et le 24^e jour.

Pendant la gestation, le *syncytium*, au sein duquel aucune division nucléaire n'a été trouvée s'étend de manière conséquente pendant la formation des cotylédons placentaires. Vraisemblablement, ses *nuclei* dérivent de la différenciation, migration et fusion continue des cellules binucléées. Les cellules binucléées et le syncytiotrophoblaste multinucléé jouent un rôle essentiel dans la morphogenèse du placenta.

Entre le 20^e et le 60^e jour, les aires cotylédonaires du placenta, qui sont principalement formées par les villosités chorioniques et les plaques syncytiales, commencent à s'interdigiter avec les caroncules de l'endomètre maternel pour former les placentomes. Les placentomes fournissent une source de nutrition hématotrophique pour le fœtus. On notera que les cellules binucléées et les *syncytia* multinucléés du placenta ovin produisent des peptides et des hormones stéroïdiennes, comme la progestérone et l'hormone lactogène placentaire.

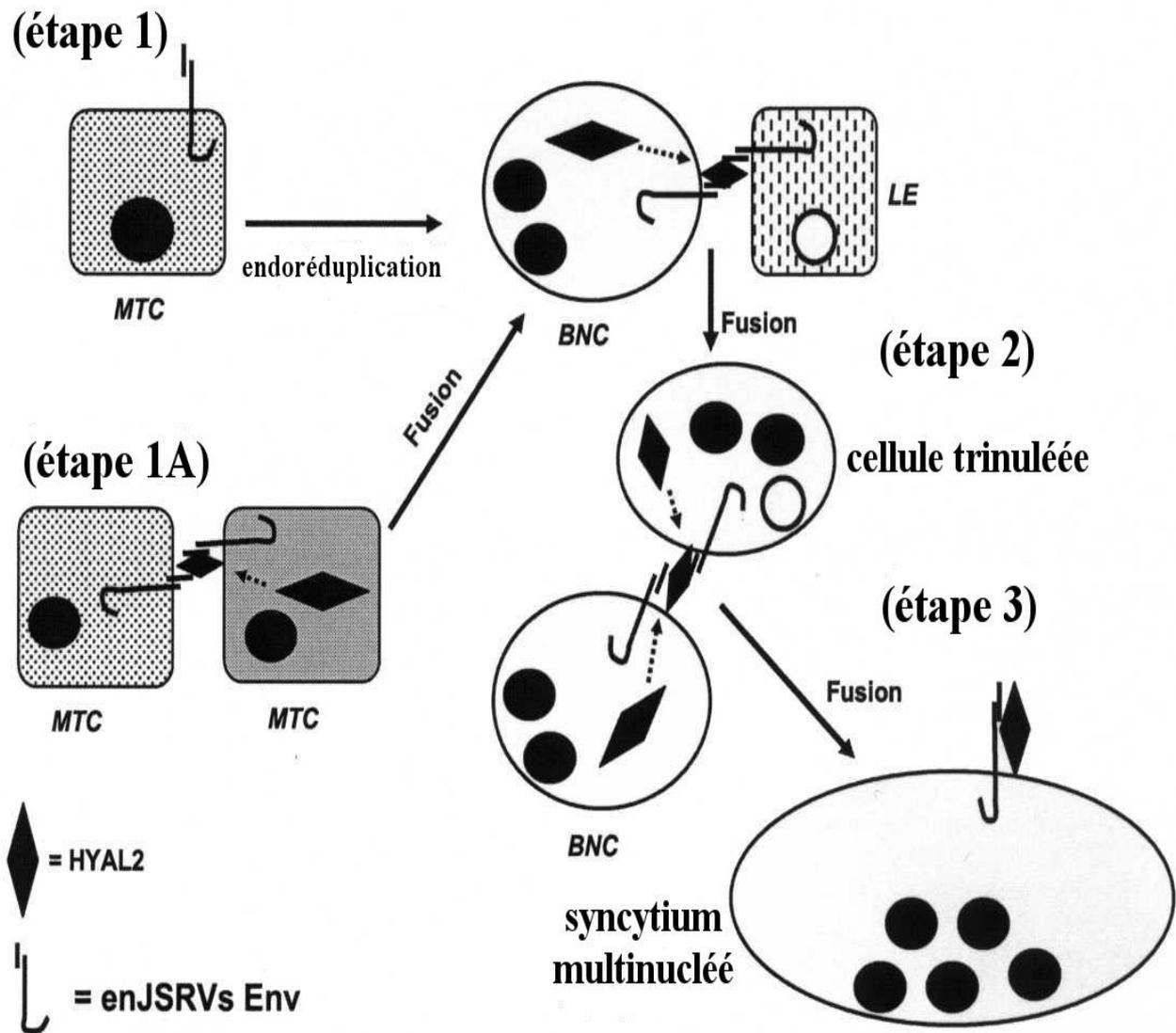
C. Corrélation entre placentation et expression de enJSRV et HYAL-2

Par northern blot, Dunlap *et al.* ont pu détecter le génome complet du enJSRV ainsi que l'ARNm *env* du enJSRV correctement épissé dans l'endomètre intercaronculaire à partir du 12^e jour et jusqu'au 30^e. Cet ARNm a principalement été détecté dans l'endomètre intercaronculaire après le 30^e jour et dans les placentomes du 40^e au 120^e jour de gestation [Dunlap, K. A. *et al.* 2005].

HYAL-2 est une protéine cellulaire de surface qui sert de récepteur pour l'entrée du exJSRV dans les cellules *via* les protéines d'enveloppe du exJSRV. Nous avons déjà pu voir que HYAL-2 se lie aussi aux protéines d'enveloppe du enJSRV. On peut donc se demander si l'expression du enJSRV au sein du tractus génital est corrélée à l'expression de HYAL-2. L'ARNm de HYAL-2 n'est pas observé dans l'utérus maternel (épithélium de l'endomètre, stroma ou myomètre) [Dunlap, K. A. *et al.* 2006a]. Par contre HYAL-2, qui n'est pas exprimé au sein du conceptus au 10^e, 12^e et 14^e jour, y est exprimé au 16^e et au 18^e. L'ARNm de HYAL-2 n'a pas été détecté dans l'endomètre intercaronculaire indépendamment du jour de gestation. Par contre il a été détecté dans les placentomes du 40^e au 120^e jour. L'ARNm de HYAL-2 est exclusivement exprimé par les cellules binucléées et les plaques syncytiales des cotylédons placentaires mais dans aucun autre type de cellules du placentome [Dunlap ; K. A. *et al.* 2005].

La co-expression abondante de *env* du enJSRV et de HYAL-2 au sein des mêmes types cellulaires donne du crédit à l'hypothèse de leur implication dans la régulation du développement du *conceptus* ovin (embryon/*fœtus* et membranes extra-embryonnaires associées) et la morphogenèse du placenta, peut être entre autre en se liant sur les cellules binucléées et en favorisant ou en entraînant leur fusion en *syncytia* multinucléés (Figure 24).

Figure 24. Hypothèse sur le rôle biologique de env enJSRV et HYAL-2 au sein de la différenciation du trophoblaste chez le mouton. D'après Dunlap, K. A. *et al.* 2006a. MTC : cellules mononucléées du trophoblaste ; BNC : cellules binucléées géantes ; LE : épithélium de la lumière de l'endomètre.



D. Mise en évidence de l'association entre l'enJSRV et la placentation

Pour essayer de démontrer cette hypothèse, Dunlap *et al.* ont procédé à certaines expériences *in vivo* et *in vitro* : ils ont créé un oligonucléotide morpholino antisens (MAO) pour inhiber spécifiquement l'expression des ARNm *env* de enJSRV. Les MAO inhibent spécifiquement l'épissage de l'ARN et/ou sa traduction par un mécanisme de blocage stérique qui est RNase H-indépendant. Les morpholinos sont effectifs uniquement quand ils complètent la région nucléotidique autour du codon initiateur et/ou des sites d'épissage possibles d'un gène d'ARNm précis. La séquence nucléotidique autour de la séquence d'épissage SA et du codon initiateur de *env* du exJSRV et des *loci* du enJSRV connus sont fortement conservés, indiquant qu'un seul MAO devrait inhiber l'épissage et la traduction de la plupart des enJSRV [Dunlap, K. A. *et al.* 2006b]. En comparaison, la protéine codée par *gag* est produite à partir d'un ARN génomique complet alors que la protéine d'enveloppe est produite uniquement à partir d'un ARNm correctement épissé.

Comme nous venons de le voir, l'ARNm du enJSRV est d'abord détecté au 12^e jour, quand le blastocyste commence son élongation, impliquant la prolifération et l'agrandissement intense des cellules mononucléées du trophoctoderme. Celles-ci produisent IFN- τ , signal anti-lutéolytique qui agit sur l'endomètre, maintient la fonction du *corpus luteum* et assure ainsi une production continue de progestérone nécessaire à la gestation.

Dunlap *et al.* ont donc procédé à deux études:

- la première a pour but de quantifier l'effet de MAO-*env* sur la croissance des cellules mononucléées du trophoctoderme. Le niveau de IFN- τ a ainsi été mesuré et on observe que la quantité retrouvée dans les rinçages utérins des femelles traitées par MAO-*env* est considérablement plus basse que celle retrouvée chez les femelles traitées avec le placebo. Ils ont ensuite évalué les *conceptus* pour la présence de cellules géantes binucléées du trophoblaste : celles-ci sont en très petit nombre voire inexistantes chez les femelles traitées avec MAO-*env* alors qu'elles sont en nombre normal chez celles traitées avec le placebo. Enfin il a été confirmé que le retard de développement du *conceptus* des femelles traitées par MAO-*env* était associé à une réduction des *env* du enJSRV ; en effet la quantité de *env* du enJSRV est considérablement diminuée au sein des cellules accessibles à MAO-

env chez les femelles traitées, alors qu'elle est abondante chez les femelles traitées avec le placebo [Dunlap, K. A. *et al.* 2006b].

- la deuxième étude porte sur la capacité des conceptus des femelles traitées par MAO-*env* à engendrer une gestation. On a remarqué que les femelles traitées avec MAO-*env* montrent un taux de gestation de 20 % (comparé à 100 % et 83 % chez les femelles témoins), et on a observé un avortement précoce chez toutes les femelles traitées [Dunlap, K. A. *et al.* 2006b].

On voit donc ici que, quand une approche *in utero* est utilisée à l'aide d'un morpholino, la restriction des protéines d'enveloppe du enJSRV induit une réduction de la croissance du trophoctoderme pendant l'élongation du blastocyste et la formation du *conceptus*, une diminution des taux de IFN- τ et donc une lutéolyse et un retour en *oestrus*. Ces études soutiennent donc très fortement les hypothèses que l'enJSRV joue un rôle fondamental dans la croissance des cellules mononucléées du trophoctoderme et dans la différenciation des cellules géantes binucléées du trophoblaste pendant la période de péri-implantation, étapes clef de la gestation.

E. Interactions hormonales

Certaines études menées par Palmarini *et al.* ont montré que les LTR du *locus* enJSRV59A1 étaient transactivées au moins dix fois plus par la progestérone alors que les effets de celle-ci sur les LTR du exJSRV sont minimaux. Ces études montrent qu'au sein de l'endomètre ovin, l'expression de l'ARNm du enJSRV est corrélée au niveau de progestérone circulant et à l'expression des récepteurs épithéliaux à progestérone, suggérant que les LTR du enJSRV contenant les initiateurs et promoteurs viraux sont influencés par la progestérone [Palmarini, M. *et al.* 2001b] (Figure 25 & 26).

De plus, on sait que les cellules binucléées seules synthétisent et secrètent l'hormone lactogène placentaire, hormone clef au cours de la gestation, qui stimule la morphogénèse glandulaire endométriale et les fonctions différenciées pour la nutrition fœtale [Palmarini, M. *et al.* 2004]. Puisque l'enJSRV est vraisemblablement un activateur de la synthèse de cellules binucléées, on peut entrevoir ici un schéma d'action et rétroaction entre les cellules binucléées, l'enJSRV, la progestérone et l'hormone lactogène placentaire.

Figure 25. Effets du cycle oestral et du début de gestation sur l'expression des ARNm du enJSRV au sein de l'endomètre ovin. D'après Palmarini, M. *et al.* 2001b.

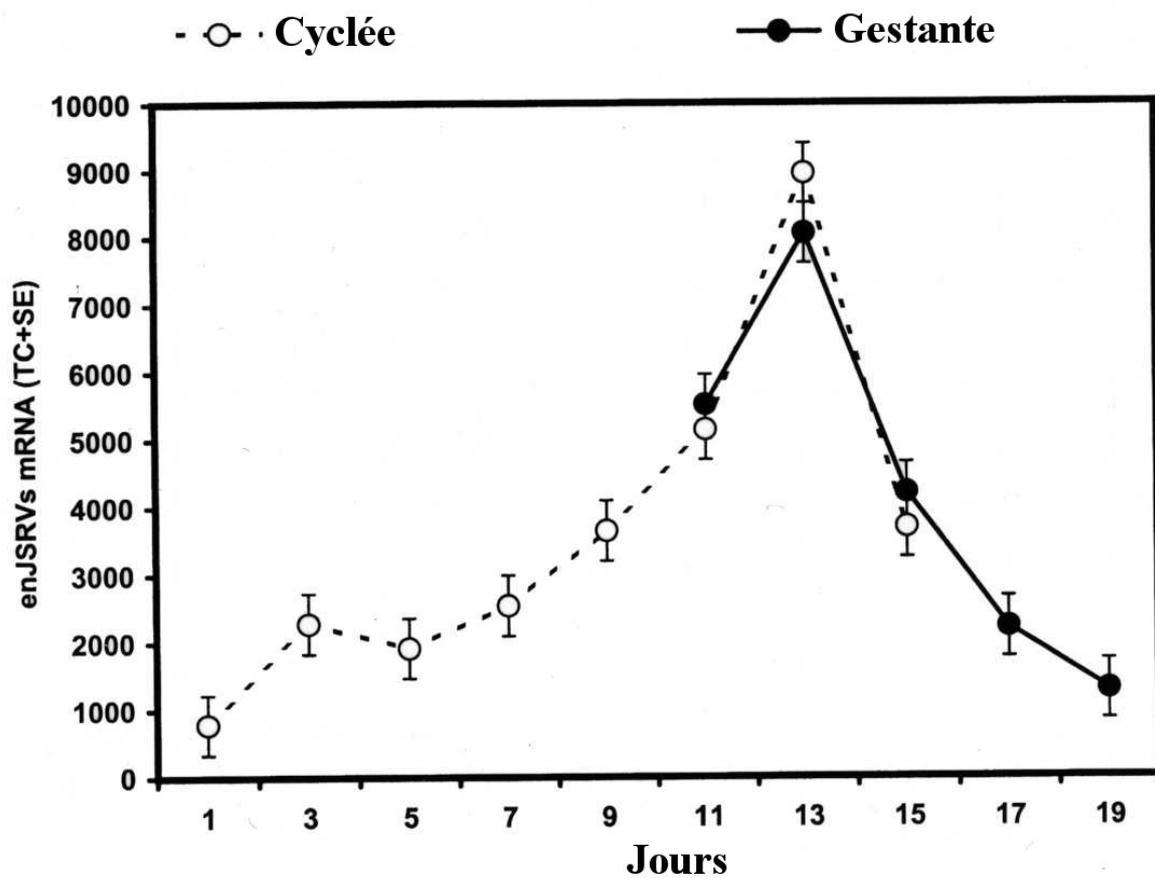
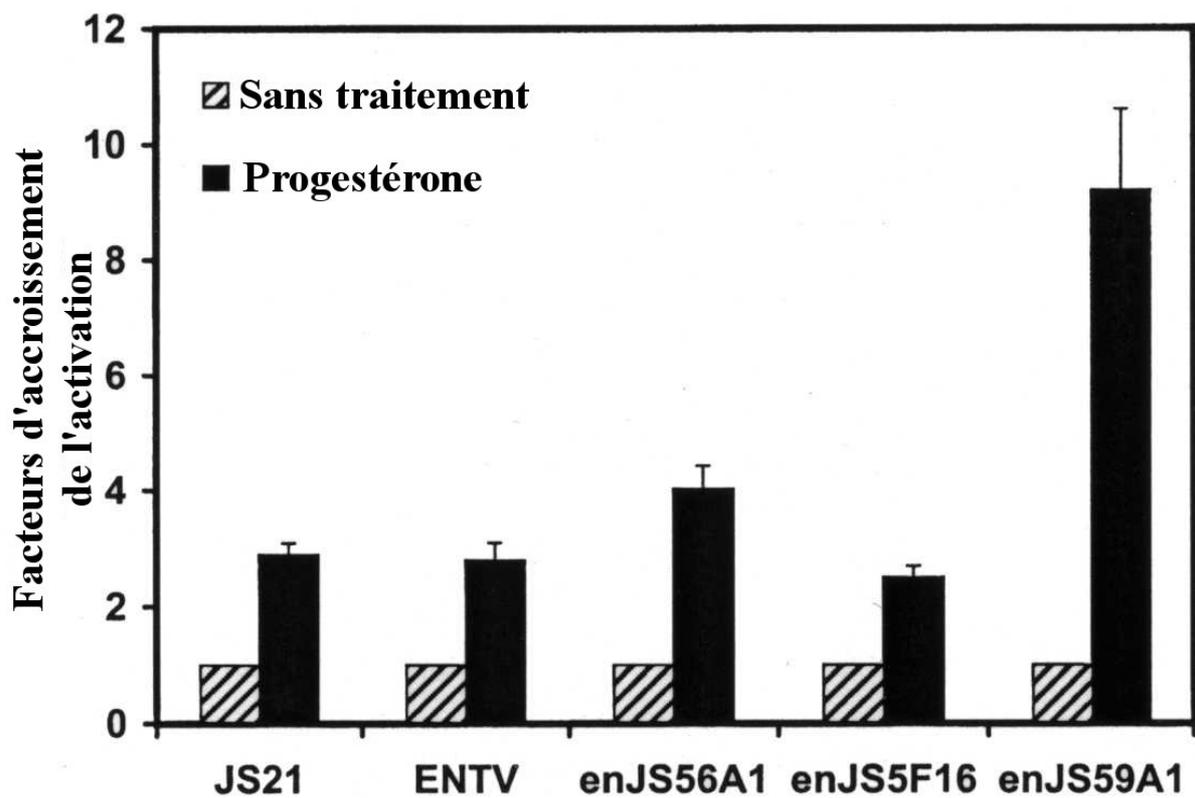


Figure 26. Effets de la progestérone sur l'activité des LTR de différentes souches du enJSRV dans des transfections utilisant des cellules d'épithélium de la lumière de l'endomètre ovin. D'après Palmarini, M. *et al.* 2001b. Les résultats sont exprimés en facteur d'augmentation de l'activation comparé à des témoins sans addition de progestérone.



VII. Conclusion

On vient donc de voir un modèle animal rare de tumeur épithéliale induite par un *Retrovirus* exogène, induisant l'oncogenèse par le biais de sa protéine d'enveloppe, le JSRV (ou exJSRV) qui présente plusieurs particularités uniques et intéressantes pour la recherche humaine.

En effet ce *Retrovirus* se trouve sous forme endogène au sein du génome des cellules hôtes. Cette forme endogène va interagir avec la forme exogène de deux façons : d'une part elle bloque le cycle répliatif du virus exogène en l'empêchant d'entrer dans la cellule et en l'empêchant de libérer ses particules ; d'autre part elle induit une immunotolérance de l'hôte vis-à-vis de la forme exogène. C'est la première fois qu'un blocage au niveau de la libération de particules est décrit et il peut donc permettre de faire évoluer les solutions thérapeutiques concernant les *Retrovirus*.

Une des hypothèses retenues pour le moment est que les enJSRV ont d'abord été sélectionnés pour leur effet protecteur sur l'hôte. L'expression du enJSRV au sein du tractus génital peut avoir conféré un avantage au niveau de l'évolution pour les ovins/caprins à travers la résistance aux infections associées aux *betaretrovirus* exogènes homologues circulants [Palmarini, M. *et al.* 2004; Dunlap, K. A. *et al.* 2005].

Cette sélection des enJSRV au niveau du tractus génital a pu amener une pression de sélection sur les *betaretrovirus* à tropisme pulmonaire plutôt que ceux à tropisme génital (Figure 27). En effet les LTR des exJSRV sont activés par des facteurs spécifiques des poumons comme HNF-3 β alors que les enJSRV testés ne sont pas affectés. Ces résultats soutiennent l'idée que les exJSRV et exENTV ont développé leur tropisme pulmonaire relativement récemment et vraisemblablement après l'intégration des *loci* du enJSRV dans la lignée germinale [Palmarini, M. *et al.* 2004]. Cette différence de déterminisme d'expression au sein des différents tissus semble être particulièrement liée aux séquences LTR des virus [Carlson, J. *et al.* 2003].

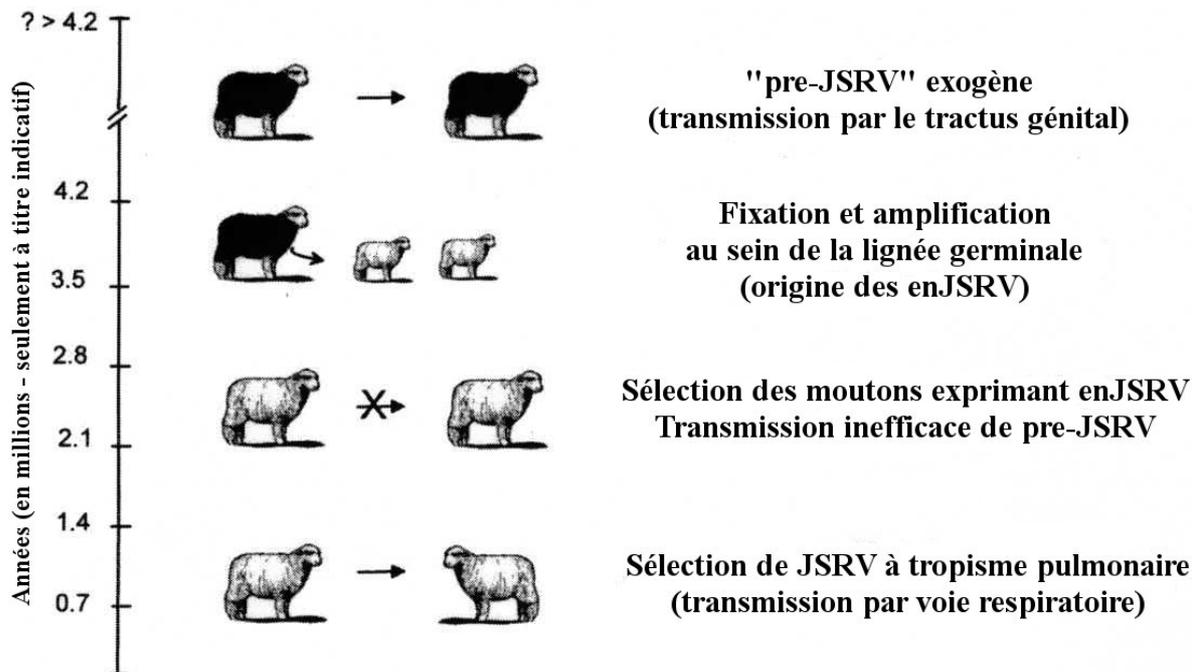
Il est possible que cette intégration des enJSRV chez les ruminants ait pu assister la pression sélective pour la formation de placentomes et de syncytiotrophoblastes [Palmarini, M. *et al.* 2004].

En effet, on a vu que l'enJSRV participe activement et de manière importante dans le processus de placentation. Malgré de nombreuses études, une preuve du rôle essentiel des *Retrovirus* endogènes n'a pas encore été trouvée chez l'homme. On a ici un exemple concret de *Retrovirus* étant indispensable au sein d'un processus physiologique.

L'hypothèse du *metavirus* postule que la distinction génétique entre le génome de l'hôte et le génome viral disparaît quand l'infection par le virus est indispensable à la survie de l'hôte. On peut

voir ici un cas où le génome viral a vraisemblablement aidé l'évolution. On peut se demander si l'enJSRV participe, comme il est supposé chez d'autres espèces, à la tolérance du *fœtus* par le système immunitaire maternel.

Figure 27. Modèle proposé pour l'évolution des *betaretrovirus* chez le mouton. D'après Spencer, T. E. *et al.* 2003. Les moutons en noir représentent l'espèce avant la fixation de enJSRV dans la lignée germinale. La période d'endogénisation reflète ce qui a été estimé pour les trois *loci* complets du enJSRV, elle n'est pas nécessairement représentative de tous les *loci* des enJSRV présents dans le génome ovin.



Sixième chapitre: *Retrovirus* endogène du Koala – un modèle d’endogénéisation récente

I. Koala

A. Histoire du koala

L'Australie s'est séparée des autres continents il y a environ 45 millions d'années, devenant une île sans aucun contact avec l'extérieur [Sharp, A. 1995]. La faune et la flore présentes à cette époque ont ainsi évolué, protégées de l'influence des autres territoires. Une partie des espèces, animales et végétales, retrouvées aujourd'hui sur l'île y sont donc endémiques.

Les premiers êtres humains à habiter l'île furent les aborigènes qui ont commencé à la peupler il y a environ 60.000 ans. L'homme « blanc » a colonisé le territoire uniquement à la fin du 18^e siècle [Sharp, A. 1995].

Le koala cendré (*Phascolarctos cinereus*) ou paresseux australien est un marsupial arboricole justement endémique de l'île. Il fut décrit pour la première fois en 1817 par le zoologiste Georg August Goldfuss. Il est le dernier représentant de la famille des Phascolarctidés encore vivant [Wikipedia, 2007a].

Chassé par les aborigènes en tant que gibier, il fût décimé par les colons qui firent de la vente de fourrure un commerce important à l'époque. Il est depuis protégé, considéré comme un animal en voie de disparition. Les koalas sont retrouvés à l'état sauvage dans quatre états australiens, tous situés sur les côtes est et sud-est : Queensland, New South Wales, Victoria et South Australia. Son statut varie d'un état à l'autre, allant de commun à rare et vulnérable [Sharp, A. 1995].

B. Classification

La classification du koala au sein du règne animal est résumée dans le tableau (Tableau 9) suivant:

Tableau 9. Classification classique. D'après Wikipedia, 2007a.

Règne	<i>Animalia</i>
Classe	<i>Mammalia</i>
Sous-classe	<i>Marsupiala</i>
Ordre	<i>Diprotodontia</i>
Sous-ordre	<i>Vombatiformes</i>
Famille	<i>Phascolarctidae</i>
Genre	<i>Phascolarctos</i>
Espèce	<i>Phascolarctos cinereus</i>

II. La découverte d'un *Retrovirus*

Après avoir longtemps été chassé pour sa fourrure, le koala est aujourd'hui une espèce protégée et très activement surveillée. Mais malgré cette protection, on observe un déclin de la population qui est dû d'une part à un faible taux de reproduction et d'autre part à une mortalité élevée [Obendorf, D. L. 1983 ; Booth, R. J. *et al.* 1999].

Les affections pathologiques qui vont être majoritairement retrouvées, aussi bien chez les animaux captifs que sauvages, sont les infections opportunistes et les syndromes néoplasiques [Obendorf, D. L. 1983 ; Booth, R. J. *et al.* 1999]. Les infections opportunistes les plus décrites sont la chlamydie à *Chlamydia pecorum* et *Chlamydia pneumoniae* avec tropismes oculaire, génital ou urinaire, le complexe rhinite/pneumonie (*Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium sp*, *Enterobacter sp*, *Proteus sp*,...) et la cryptococcose (*Cryptococcus neoformans var. gattii* et *var. neoformans*). Les syndromes néoplasiques quant à eux sont majoritairement représentés par les néoplasies lymphoïdes (qui sont principalement à cellule T, à haute prévalence de leucémie -63 %- et impliquant de nombreux organes [Connolly, J. H. *et al.*

1998]), les tumeurs craniofaciales des cartilages et os et les proliférations séreuses (mésothéliome, fibrosarcome, myxofibrosarcome) [Booth, J. H. *et al.* 1999].

(N.B. : le Koala Stress Syndrome (syndrome de stress du koala) qui a été décrit à une époque comme une pathologie majeure des koalas rentre en fait dans le cadre des néoplasies lymphoïdes).

Cet ensemble d'affections, par analogie à d'autres schémas similaires observées chez des espèces diverses, a fait suspecter une immunodéficience présente au sein de la population de koalas.

Cette hypothèse d'une immunodéficience présente de manière relativement généralisée au sein de la population pousse le centre de recherche du zoo de San Diego, alors gestionnaire de la population captive hors Australasie, à rechercher en 1993 la présence d'un agent infectieux en cause.

Une recherche virale ne met pas en évidence d'activité de transcriptase reverse au niveau des lymphocytes de sang périphérique mais des particules virales sont observées par microscopie électronique sur la plupart des cellules fixées [Worley, M. *et al.* 1993].

Il s'agit ici d'un *Retrovirus* en activité, infectant la majeure partie de la population présentée au zoo. Il est retrouvé aussi bien chez les animaux malades que chez les animaux sains [Worley, M. *et al.* 1993]. Il sera dénommé KoRV pour Koala *RetroVirus*. Hanger *et al.* ont déterminé la séquence complète de celui-ci (Figure28) [Hanger, J. J. *et al.* 2000].

Figure 28. Alignement multiple d'un échantillon représentatif de virus liés au virus de leucémie murine (MLV) utilisés dans les études phylogéniques. D'après Martin, J. *et al.* 1999. La séquence utilisée pour la comparaison est une séquence de 280 acides aminés dérivée de la région codant la protéase et la transcriptase reverse; les valeurs entre crochets correspondent au nombre d'acides aminés omis pour l'alignement; les astérisques représentent des codons stop tandis que les points d'interrogation indiquent des données manquantes; la séquence correspondant au KoRV est surlignée en gris. GaLV: virus de la leucémie des gibbons, RV Koala: *Retrovirus* du koala, SNV: spleen necrosis virus/ virus aviaire de la nécrose splénique, RV Echidna: *Retrovirus* des *Tachyglossidae*, RV boa constrictor: *Retrovirus* du boa constrictor (*Boa constrictor*), RV Pit Viper: *Retrovirus* des *Crotalines* (*Crotalinae*), RV Rook: *Retrovirus* du Corbeaux freux (*Corvus frugilegus*), RV Wren: *Retrovirus* des *Troglodytinae*, RV African crocodile: *Retrovirus* du crocodile du Nil (*Crocodylus niloticus*), RV False gharial: *Retrovirus* du faux-gavial de Malaisie (*Tomistoma schlegelii*), RV Natterjack toad: *Retrovirus* du crapaud calamite (*Epidalea calamita*), RV Rh. caecilianIV: *Retrovirus* des *Rhinatrema*idae.

	1		75
GaLV	EHSVLTQPMGKVGSRRTVVE-GATGS-KVYPWTTKRLLLKIGKQVTHSFLV IPECPAPFLGDRDLLTKLKAQIQFS		
RV Koala	EHSVLTQPMGKMGPKRTVVA-GATGS-KVYPWTTKRLLLKIGKQVTHSFLV IPECPAPFLGDRDLLTKLKAQIQFS		
SNV (fowlpox)	THSVVQKPVGPMKESVAII-GATGNIRNYPKSEGRVLDLGRGLVTHSFLV IPECPDFLLGRDLLQKLRATISFT		
RV Echidna	THSVVQKPVGPMTRDTVTIV-GATGATCRYPKTEGRIVDLGEGLVTHSFLV IPECPDFLLGRDLLLKLKLRATISFT		
RV Boa constrictor	GRSVVNRVFA7EGFTRIKVQ-GVSGSVTNSPVLAPVLC*MDGTRVQHQLYMPCEPIPLLGRDLMKRVGVTISFS		
RV Pit Viper	GRSVVNSQIAKPGPHQIQVQ-GVSGHILGTSNLKPVTCVFKGSEIQHEFLYIPECP IPLLGRYLLSRMGATISFD		
RV Rook	ANSVLMKALMPVGGDDYIVVH-GATGQSEKAYPCFKPLKYKIGKQWGIHKFLYLPNSPKALLGRDLEQLQATIIFR		
RV Wren	TYSVLMNLEGGQIGSKSTII-SATGKEENRPFLOPLDLCPGNKVLTHEFLYVPECPVPLLGRDMLAKLDAVITFE		
RV African crocodile	?FSI IPEKNPCAGTSEQHVE???GTQTRLPVCKPLLTAKVDDILEHSFPYSPSCPVALGRDMLTKIQAEIFFR		
RV False gharial	TFSMLPEKPAVGAESTYVTVGIEGKQSKLPVCRPLLTAKVGDNDLEHSFVYSACPVALLGQDVLTKLQAEIFFR		
RV Natterjack toad	EHSVVTDLVAPPSSGRTITVI-GATGRSAAKPVLKSRCLTGLGHHVVKHQFLYMPCEPVQLLGRDMLLKLQAQIAFL		
RV Rh. caecilianIV	EHSVVAKPVVPLSSQTIIVV-GATGTGATKPFLOQRTCELGGRKIAHQFLYMPCEPIPLLGRDMLAKLQAQISFA		
	76		142
GaLV	AEG[17]EEERYLHEK[13]FPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPVAVRQYFMSKEAREGIRPHIQKFLD		
RV Koala	TEG[17]EEERYLHEK[13]FPMVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPVAVRQYFMSKEAREGIRPHIQKFLD		
SNV (fowlpox)	GEG[16]EEERYLFLF[15]IPKVWAEINPPGLASTQAP IHVQLLSTALPVRVRYQYPIITLAKRSLRETIKRFRA		
RV Echidna	EAG[16]VEERYLFLVE[15]MPEVWAEINPPGLATTQVPHVQLTSTALP IRIHQYPIISLEARRSLRGSIRKPKA		
RV Boa constrictor	EGE[9]EETWRLMLA[14]VPLWAEADNPP?FAIRHPP I I IDTKPSASPVNRRQRAYSREAMEAIQTIIDRFLT		
RV Pit Viper	EGQ[9]DTMWRNLNVS[2]VPLWAEADNPPGFAAHPPVIVEVKPLATPVHIRQRSCSNEAIAAIIYSIQKYLK		
RV Rook	NGE[6]DQQYVEILS[16]FPGVWATDV-PGRAKNAPQPKIKLEGRQPVRIKQYPLKREDREGIGP IIEKFLK		
RV Wren	NRE[6]ESKTGQILM[16]IPSVWENDI-PGKSKLAQPVHVELKBTAMQVQYPIKLEAWQGIKTIKFLK		
RV African crocodile	DDQ[9]SPNYQMALL[13]DPSVWADGT-PARAKSVSPVRIIVLKDGEQPVV?QYPLIRAARAGLPLIEKYKR		
RV False gharial	GDQ[9]GSNYQMALL[13]HPQVWADGT-PARAKCVPPVKVSLKKEGEPVVRVQYPLKQRTKIGLPLIEKPKN		
RV Natterjack toad	PNG[19]EEEWRLYTA[14]IPGVWAENPPGLARNIPP IRIELKLGVPVSLRQYHIPQKAKKNIQSYLDKFIIR		
RV Rh. caecilianIV	EGG[20]EEEWRFYST[16]PPEVWAEADN-LSLAKNIAPVIVTLKPRVEPVHVRQYPLPRPAIEGIBCHLLKLLK		
	143		217
GaLV	LGVLVPCRSFWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLRE INKRVDIHP TLPNPNLLSSLPPSYTWYSVLDLKDAPFCL		
RV Koala	LGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVDIHP TVPNPNYLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAPFCL		
SNV (fowlpox)	AGILRPFVHSPWNTPLLPVRSKGTSEYRMVQDLREVNKRVTIHP TVPNPNYLLSSLPPDRWYSVLDLKDAPFCI		
RV Echidna	AGILRPFVHSPWNTPLLPVRSKGTSEYRMVQDLREVNKRVTIHP TVPNPNYLLSSLPPDRWYSVLDLKDAPFCI		
RV Boa constrictor	AGILVTTQSPWNTPLLPVRSKPGDS-FRPVQDLRLVNQV IPTIHPVVPNPTLLSLPPSAWFSVLDLKDAPFTI		
RV Pit Viper	AWILVPIQSPWNTPLLPVRSKPGDS-YRPVQDLRI INSVTVTIHPVVPNPTLLSLPPSMAEWFVLDLKDAPFTI		
RV Rook	MGLLKKSTSDFNTPLLPVRKPDGS-YRVVQDLRAVNKIITEDLYPVVANPYPILLTCLTPELWFTIILDLDGPFCL		
RV Wren	YQILEECSSEYNTPIFPVKKPBGD-YRLVQDLRAINEITKDIYYPVANPYTLLTS IREKYKWFVTVDLKDAPFCI		
RV African crocodile	CGWLVEGSSPYNTPIILGVPKADGVS-CRLVQDLRTVNKKVLS DHPVVPNPTLLTQVPGK?KIFSVLDLKDAPFSI		
RV False gharial	YKWLVEGSSPYNTPIILGVPKADGTYTYRLVQDLRAVNKKVLDADYVVPNPTLLTQIPPEAEVFSVLDLKDAPFSI		
RV Natterjack toad	YGILKPCTSFWNTPLLPVQKPGTDEYRPVQDLRAVNDVAVS IHPVVPNPNYLLALIPGGATYFTVLDLKDAPFCL		
RV Rh. caecilianIV	YGLLRKQQLFWNTPLLPVKKPGTGDYRPVQDLR*VHNAVETIHPV IHPNPTLLGLIPAEATHTVLDLKDAPFCI		
	218		280
GaLV	RLHPNSQPLFAFEWKDPEKNGTQQLTWTRLPQGFKNSTLFDALHRDLAPFRALNPQVVM		
RV Koala	KLHPNSQPLFAFEWRDPEKNGTQQLTWTRLPQGFKNSTLFDALHRDLASFRALNPQVVM		
SNV (fowlpox)	PLATESQLIFAFEWADABEGESQQLTWTRLPQGFKNSTLFDALNRDLQ????????????		
RV Echidna	PLTQSQQLLFAFEWIDMEGESQQLTWTRLPQGFKNSTLFDALSRDLQGYRFDHPTVTL		
RV Boa constrictor	AIHPSSQPLFAFEWEDPRSGRCT?YTWTRLPQGFKNSTLFDALGKDLDFCPVSAHNAI		
RV Pit Viper	PVHEISQPLFAFEWENPRTGQKSQYTWTRLPQGF????????????????????????		
RV Rook	PLHEASQKSF AFEWES PRSGRKTQLTWTRLPQGFKNSTLFDALGKDLDFCPVSAHNAI		
RV Wren	PLDKESRKLFAFEWENPESGRKTQLTWTRLPQGYKNSTLFDALGKDLDFCPVSAHNAI		
RV African crocodile	PLHESQKLF AFEWEDPTTHKQALMWTVLPQGF IAAPHIFGLSLQKDLKRWKGSHPAVTLL		
RV False gharial	PLHESQKLF AFEWEDPTTHKQALMWTVLPQGF ISAPHIFGMALQKDLR*QSHPEVTI		
RV Natterjack toad	RIAAESQCIFAPQWENAVTGSKRQHTWTRLPQGF????????????????????????		
RV Rh. caecilianIV	HLAPTSQQLFAFEWEDPTTRGQQLTWTRLPQGF????????????????????????		

III. Du statut d'exogène à endogène

Les particules virales ainsi trouvées se rapprochent donc de la famille des *Retrovirus*. En effet, des séquences de provirus entières et tronquées ont été détectées et contiennent, pour les séquences entières, tous les éléments génétiques de base communs aux *Retrovirus* de type C [Hanger, J. J. *et al.* 2000] : LTRs, *gag*, *pro-pol*, *env*, site de liaison à l'amorce ARNt, polypurine tract, boîte CAAT, boîte TATA, boîte Cys-His et signal de polyadénylation.

En outre, plusieurs observations laissent supposer qu'il s'agit ici d'un *Retrovirus* endogène, entier, actif, qui n'exclut bien évidemment pas la présence concomitante d'un homologue exogène. D'une part on retrouve ce provirus, lié aux *Retrovirus* simien de type C, dans l'ADN de tous les koalas examinés et dans tous les tissus par PCR et, par southern blot: l'ADN génomique montre des bandes similaires quel que soient les tissus, avec ou sans néoplasie lymphoïde. D'autre part des particules de type rétroviral sont produites par des cellules tumorales *in vivo* (ce qui implique une transcription provirale et un assemblage viral actifs) et on détecte des transcrits rétroviraux homologues aux séquences provirales dans le sang et de l'ARN viral accompagné d'une activité de transcriptase reverse dans le sérum [Hanger, J. J. *et al.* 2000].

Mais l'hypothèse de l'existence d'un virus endogène n'est pas si évidente à trancher car, malgré l'observation de plusieurs insertions tronquées [Hanger, J. J. *et al.* 2000], la grande majorité des insertions sont entières [Tarlinton, R. E. *et al.* 2006] et leur génome est compétent pour la réplication. De plus, des particules virales sont produites par les cultures de cellules mononuclées de sang périphérique. Il existe en outre un lien étroit avec un *Retrovirus* exogène (Gibbon ape Leukemia Virus). Enfin, le nombre de copies au sein du génome varie:

- en fonction des individus avec une diversité importante du nombre et des modèles d'intégration;
- avec des insertions dispersées sur l'ensemble du génome;
- avec un séquençage de la région hautement variable du gène d'enveloppe du virus montrant de grandes variations inter et intra individuelles.

Pour leur grande majorité – 63,5% - ces mutations sont silencieuses. Cependant, ce type de sélection pour des quasi-espèces fonctionnelles avec de nombreuses mutations silencieuses a été rapporté pour des virus exogènes mais n'est pas typique de virus endogènes. Chez ces derniers, on

retrouve en général une perte de fonctionnalité à travers des mutations aléatoires [Tarlinton, R. E. *et al.* 2006].

Toutes ces données sont plutôt caractéristiques d'un *Retrovirus* exogène, avec entre autre une virémie qui devrait être plus faible [Stoye, J. P. 2006] et un degré de conservation qui devrait être plus important chez un virus endogène. [Tarlinton, R. E. *et al.* 2006]

En effet, un provirus intégré peut normalement avoir cinq destins possibles:

- soit il devient une source pour des virus infectieux
- soit il évolue pour créer un génome viral qui s'amplifie au niveau intracellulaire
- soit il se dégrade en ADN non codant
- soit on rencontre des recombinaisons entre les LTR qui ne laissent qu'un LTR seul
- ou enfin il contribue à un gène qui peut avoir une fonction physiologique chez l'hôte.

Globalement, ces destins vont de potentiellement dangereux à bénéfique [Stoye, J. P. 2006].

L'évolution générale sur le long terme des *Retrovirus* endogènes va généralement vers une inactivité ou une activité bénéfique: une infectiosité trop importante a sur le long terme des conséquences marquées sur l'espèce hôte. C'est pourquoi on pourrait supposer par exemple que la sélection d'un bas niveau de répllication virale favoriserait la persistance à l'état endogène et serait incompatible avec l'état exogène. [Stoye, J. P. 2006]

En l'occurrence, concernant le KoRV, on observe la présence du virus dans le génome des cellules germinales avec:

- plus de similitudes relatives au modèle d'insertion quand il existe un lien de parenté entre les individus comparés;
- des modèles d'insertion des descendants qui se révèlent être une combinaison des modèles des parents;

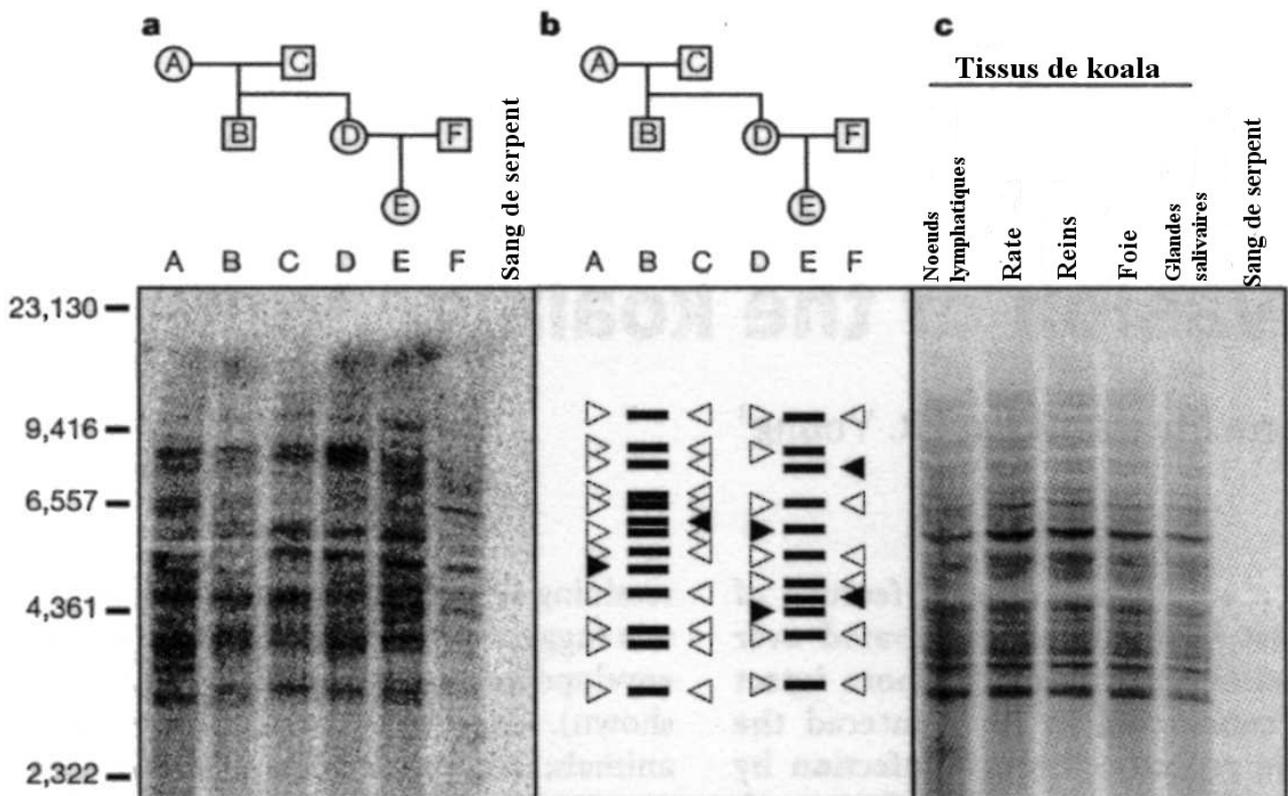
De plus, le modèle d'insertion viral ne varie pas entre les différentes cellules d'un même animal (Figure 29).

Tous ces arguments sont en faveur d'un *Retrovirus* endogène.

Pour conclure, nous nous trouvons donc ici face à un *Retrovirus* endogène qui a un statut particulier au sein des *gammaretrovirus* puisqu'il se comporte comme un virus exogène mais est présent sous forme endogène : ceci augmente la possibilité d'auto-activation et de recombinaison

avec des virus exogènes pour générer de nouveaux pathogènes avec une augmentation de la variété des espèces hôtes [Oliveira, N. *et al.* 2006].

Figure 29. Héritabilité des modèles d'insertion du KoRV. Mise en évidence d'une héritabilité du *Retrovirus*. D'après Tarlinton, R. E. *et al.* 2006. a: southern blot d'ADN digéré provenant de sang de koalas apparentés hybridé avec des sondes de la séquence *env* du KoRV; les liens de parenté des animaux A à F sont représentés au dessus du southern blot. b: représentation des profils d'insertions des descendants B et E avec l'héritage des parents indiqué par des flèches vides (provenance des deux parents) ou pleines (un seul parent). c: southern blot d'ADN digéré provenant de différents tissus d'un même koala. De l'ADN provenant de sang de serpent a été utilisé comme témoin de contrôle pour les deux southern blot.



IV. Origine du KoRV

Les premières études mettant en évidence le KoRV ont montré qu'il présentait de nombreuses homologies avec le Simian Sarcoma Virus (SSV) (virus du sarcome simien) et le Gibbon Ape Leukaemia Virus (GaLV) (virus de la leucémie du gibbon) [Hanger, J. J. *et al.* 2000] (Figure 28). Il a été démontré par la suite que le KoRV était en fait très fortement lié au GaLV (plus de 93 % d'identité au niveau des aminoacides et 85 % au niveau des acides nucléiques) [Martin, J. *et al.* 1999](Figure 30) et avec une séparation des deux virus relativement récente puisqu'il y a sensiblement autant de divergences entre le KoRV et le GaLV qu'entre deux souches du GaLV [Martin, J. *et al.* 1999 ; Hanger, J. J. *et al.* 2000] (Figure 31).

Figure 30. KoRV comparé à d'autres virus liés au Murine Leukemia Virus. D'après Martin, J. *et al.* 1999. Le pourcentage de divergence est calculé en utilisant des séquences utilisées lors d'études phylogéniques. GaLV: Gibbon ape Leukemia Virus, MuRRS: Murine retrovirus-related sequence, PERV: Pig Endogenous RetroVirus, SNV: Simian Sarcoma Virus.

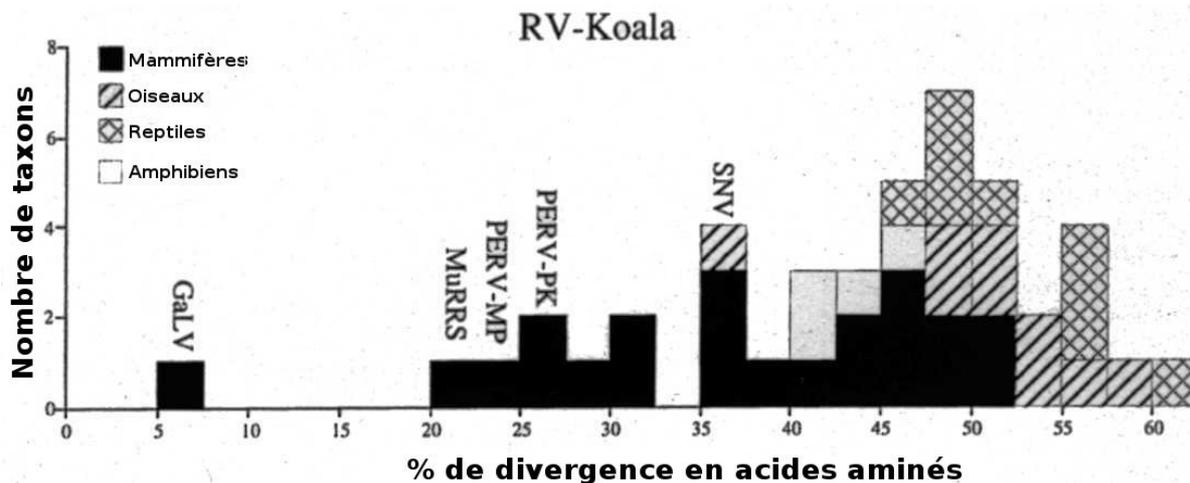
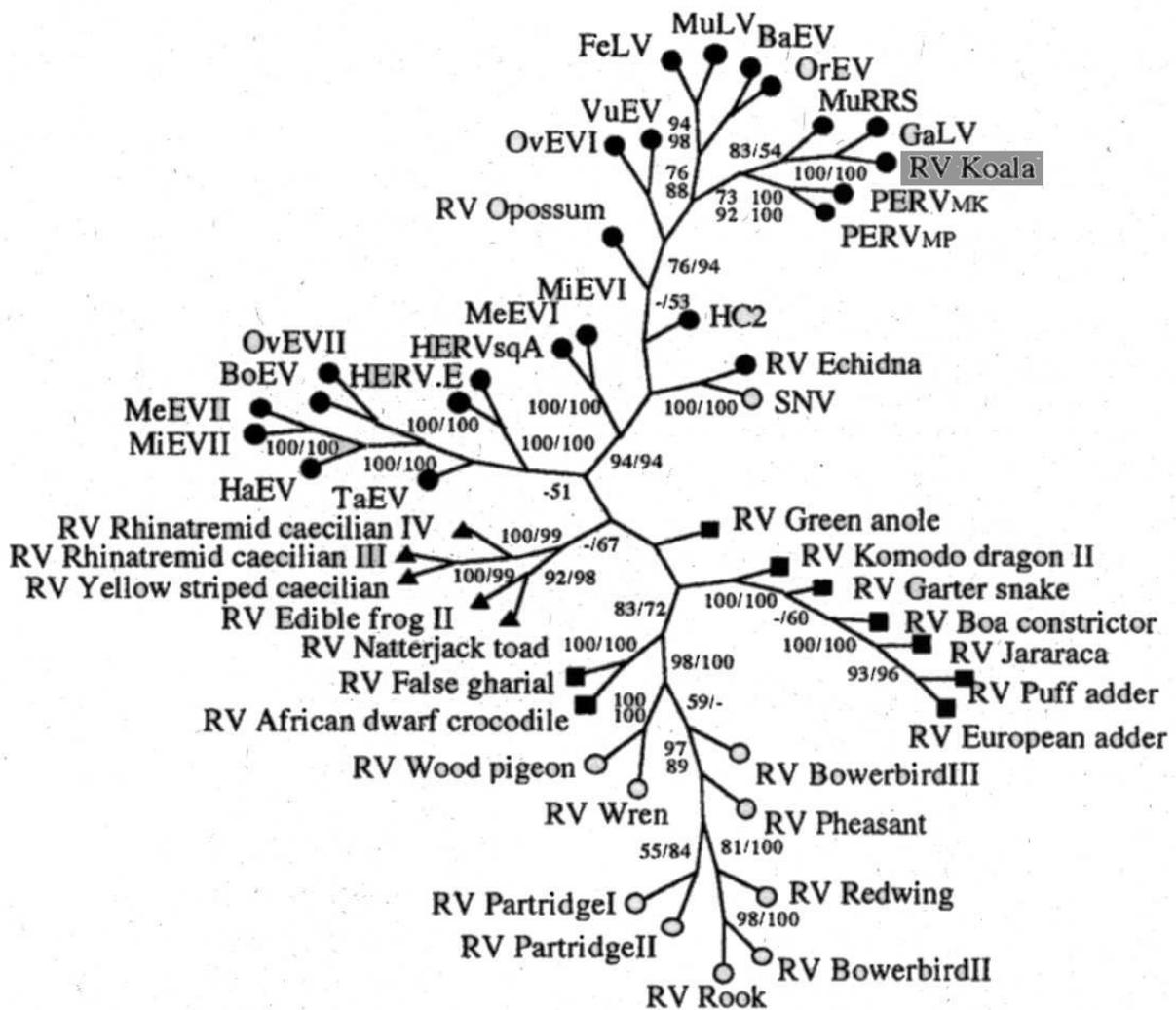


Figure 31. Arbre phylogénique de différents rétrovirus basé sur une région de 280 acides aminés codant pour la reverse transcriptase et la protéase rétrovirale. D'après Martin, J. *et al.* 1999. Le symbole sur chaque branche terminale indique la classe de l'hôte où le virus a été isolé : ●, mammifères ; ○, oiseaux ; ■, reptiles ; ▲, amphibiens; le KoRV est indiqué sur fond gris.

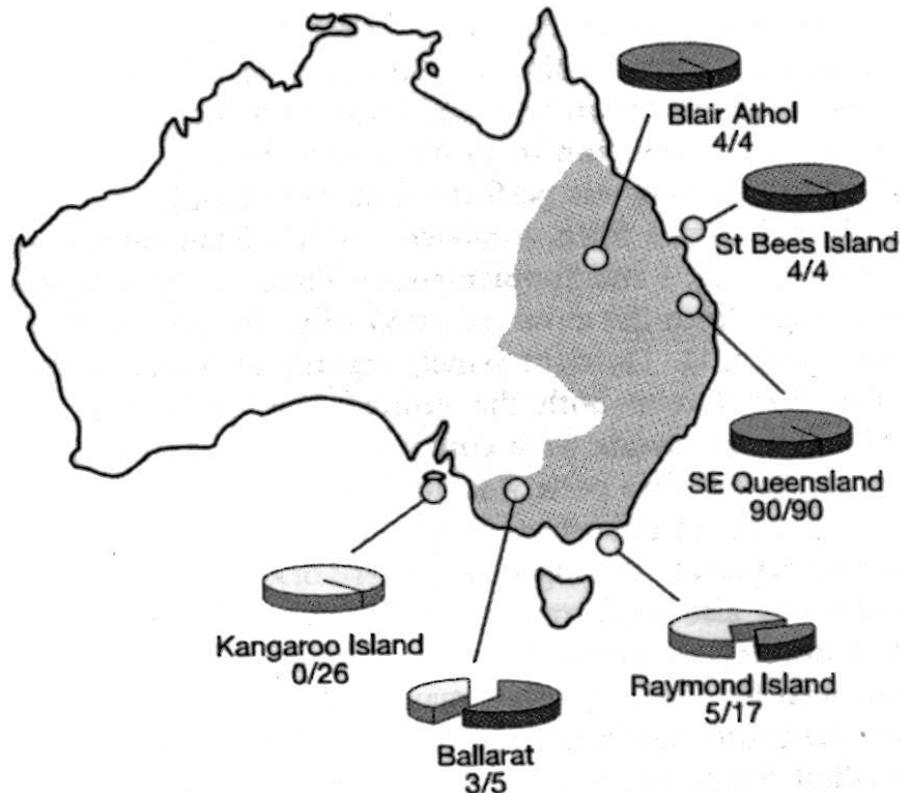


L'hypothèse de la présence du virus chez un ancêtre commun, avec évolution indépendante de celui-ci au sein des deux espèces après spéciation et formation de deux virus différents, est peu probable compte tenu du peu de différences qu'il existe entre les deux génomes et l'âge minimal de séparation des deux espèces (séparation de l'Australie des autres continents il y a 45 millions d'années). On a donc eu récemment transmission d'un virus de manière concomitante aux deux espèces ou transmission du virus d'une espèce à l'autre par le biais d'un hôte intermédiaire.

Cette notion d'événement récent est appuyée par l'absence du KoRV chez les autres marsupiaux présents en Australie [Hanger, J. J. *et al.* 2000] et par la découverte de populations de Koalas vierges de KoRV [Oliveira, N. *et al.* 2006].

En effet, au début du siècle, dans le but de protéger l'espèce, un certain nombre d'individus ont été déplacés sur une île – Kangaroo Island. Les derniers animaux exportés sur l'île l'ont été en 1920. Ces animaux ont ensuite servi à repeupler certaines régions australiennes. En étudiant cette population préservée, on s'est rendu compte qu'aucun individu n'était porteur du KoRV. Les études menées au sein des quatre régions où vivent des koalas sauvages ont montré que le pourcentage d'individus porteurs du KoRV augmentait en allant du sud vers l'est (faible sur Raymond Island, moyen sur Ballarat et 100 % sur SE Queensland, ST Bees Island et Blair Athol) [Tarlinton, R. E. *et al.* 2006] (Figure 32).

Figure 32. Prévalence de KoRV au sein des diverses populations de Koala. D'après Tarlinton, R. E. *et al.* 2006. La distribution des populations sauvages de koala en Australie est montrée par la zone grise; les taux de prévalence du KoRV au sein des différentes populations étudiées ont été définis par les résultats de PCR et PCR en temps réel sur de l'ADN extrait d'échantillons sanguins; les résultats sont représentés en camemberts avec les résultats positifs en gris foncé et négatifs en blanc; les valeurs indiquent le nombre d'échantillons positifs sur le nombre global d'échantillons testés.



Cette homologie avec le GaLV et la présence d'individus vierges de tout *Retrovirus* sont en faveur d'une endogénisation active, démarrée il y a moins de 200 ans.

L'hypothèse d'une transmission horizontale du *Retrovirus* n'est possible, vu la situation géographique des deux espèces, que par l'intermédiaire d'un vecteur hôte, porteur sain, probablement de type rongeur [Hanger, J. J. *et al.* 2000], soit simple messenger d'une espèce à l'autre, soit source commune du virus. Il se pourrait que ce rongeur soit arrivé d'Asie du sud-est par

les ports du nord de l'Australie et ait ainsi infecté les koalas dans une vague d'endogénéisation du nord vers le sud [Denner, J. 2007].

Il a été postulé que ce vecteur était une souris asiatique du type *Mus caroli* ou une espèce apparentée, chez qui on a retrouvé un *Retrovirus* endogène proche du GaLV et du KoRV [Stoye, J. P. 2006]. Cette hypothèse est aujourd'hui remise en question par certaines études qui ont montré que KoRV n'infectait pas les cellules de souris. La période hypothétique de contamination ne permettrait pas une évolution suffisante des deux virus pour qu'ils soient hôte-incompatibles aujourd'hui en ayant été compatibles il y a 200 ans ou moins [Fiebig, U. *et al.* 2006].

Une des questions qui se pose aussi est la présence du KoRV chez les koalas captifs et sauvages alors que pour le moment le GaLV n'a été retrouvé que chez des gibbons captifs.

L'apparition récente de ce *Retrovirus* endogène, au sein de la population de koalas est en tous cas extrêmement intéressante du point de vue de l'évolution. La quasi-majorité des *Retrovirus* endogènes que nous connaissons aujourd'hui ont été endogénisés il y a plusieurs milliers et surtout millions d'années. C'est la première fois que l'on assiste au phénomène pourrait-on dire en temps réel.

Retrouver l'origine du virus, reliant le GaLV et le KoRV peut permettre d'identifier les séquences reliées à l'évolution exogène ou endogène et de déterminer si une adaptation à ces modes de fonctionnement différents a eu lieu.

De plus, parmi l'ensemble des *Retrovirus*, deux genres (deltavirus et lentivirus) n'ont pas, dans l'état actuel des connaissances, généré de *Retrovirus* endogènes. Une explication basique serait l'absence de récepteurs spécifiques pour ces virus sur les cellules de lignée germinale [Stoye, J. P. 2006] mais la réponse est vraisemblablement plus complexe.

L'étude de cette endogénéisation « en temps réel » pourrait permettre de comprendre les caractéristiques requises pour une infection inter-espèce et s'il y a nécessité d'évolution d'un virus pré ou post contamination pour une invasion avec succès de la lignée germinale.

V. Implication clinique de la présence du KoRV

Le KoRV est donc un *Retrovirus* endogène apparenté aux *gammaretrovirus*, avec un génome entier, compétent au niveau de la réplication, transcrit activement et dont on retrouve des particules rétrovirales de type C. Cette transcription active du virus nous amène à chercher une relation avec les leucémies, lymphomes et immunodépressions, favorisant la chlamydiose, première cause de décès chez le koala. On sait en effet que ces affections sont connues pour être causées par des *Retrovirus* chez d'autres espèces animales (ex. : virus de la leucose féline chez le chat) [Tarlinton, R. E. *et al.* 2005].

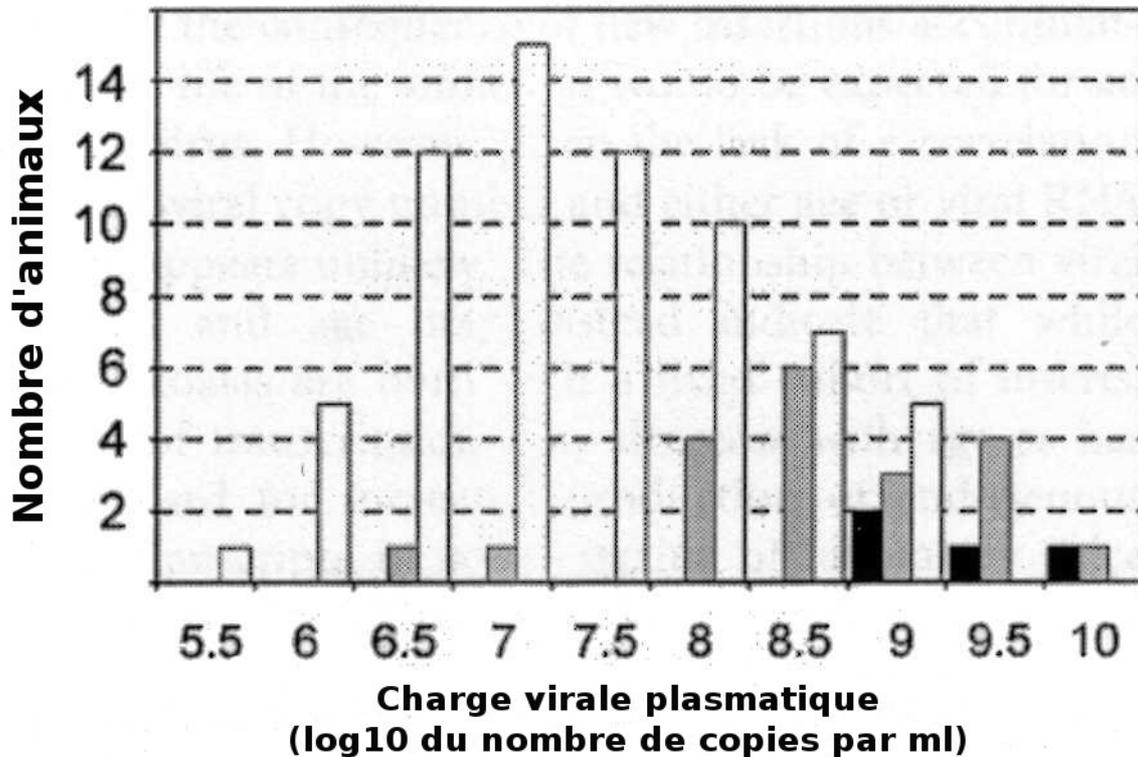
A. Corrélation entre charge virale et statut médical

Le virus a d'abord été isolé sur un animal atteint de leucémie lymphoïde. [Canfield, P. J. *et al.* 1988]. Les leucémies et lymphomes sont responsables d'environ 5 % des décès en milieu sauvage et jusqu'à 80 % des décès en milieu captif. Des particules virales ont été ainsi retrouvées chez différents animaux malades et une infection par le *Retrovirus* confirmée par isolement [Hanger, J. J. *et al.* 2000].

Tarlinton *et al.* ont donc essayé de rechercher d'éventuelles corrélations entre la charge virale et différents paramètres tel que l'âge, la masse corporelle, le sexe, l'origine et le statut médical. Ils se sont d'abord aperçus que les 90 animaux testés présentaient une charge virale significative, signe d'une virémie active. De plus, ils ont pu établir une association positive entre le niveau d'ARN viral et la présence de leucémies/lymphomes, l'âge (qui peut s'expliquer par un défaut de répression de l'expression du virus qui augmente avec le temps) et la présence de la chlamydiose (bien que cette association là soit moins évidente) (Figures 33).

Mais, il est difficile de dire si la présence de particules virales est une cause ou une conséquence de la maladie [Tarlinton, R. E. *et al.* 2005].

Figures 33. Comparaison de la charge virale et de l'état médical des animaux. D'après Tarlinton, R. E. *et al.* 2005. Blanc: animaux sains, gris : chlamydieuse clinique, noir : leucémie/lymphome.



B. Propriétés immunosuppressives

L'immunosuppression accompagne souvent l'infection rétrovirale et précède couramment le développement de néoplasmes chez les animaux infectés par des *Retrovirus* oncogènes. Il est de plus en plus évident que la protéine d'enveloppe p15E participe à l'immudépression pathogène induite par les *Retrovirus* [Cianciolo, G. J. *et al.* 1985].

Les HIV, MLV, FeLV sont quelques exemples de virus qui entraînent une immunodépression. Celle-ci favorise l'apparition d'infections opportunistes. L'hypothèse est qu'il existe une conservation fine de domaines immunosuppresseurs au sein des protéines transmembranaires d'enveloppe et en l'occurrence p15E [Cianciolo, G. J. *et al.* 1985].

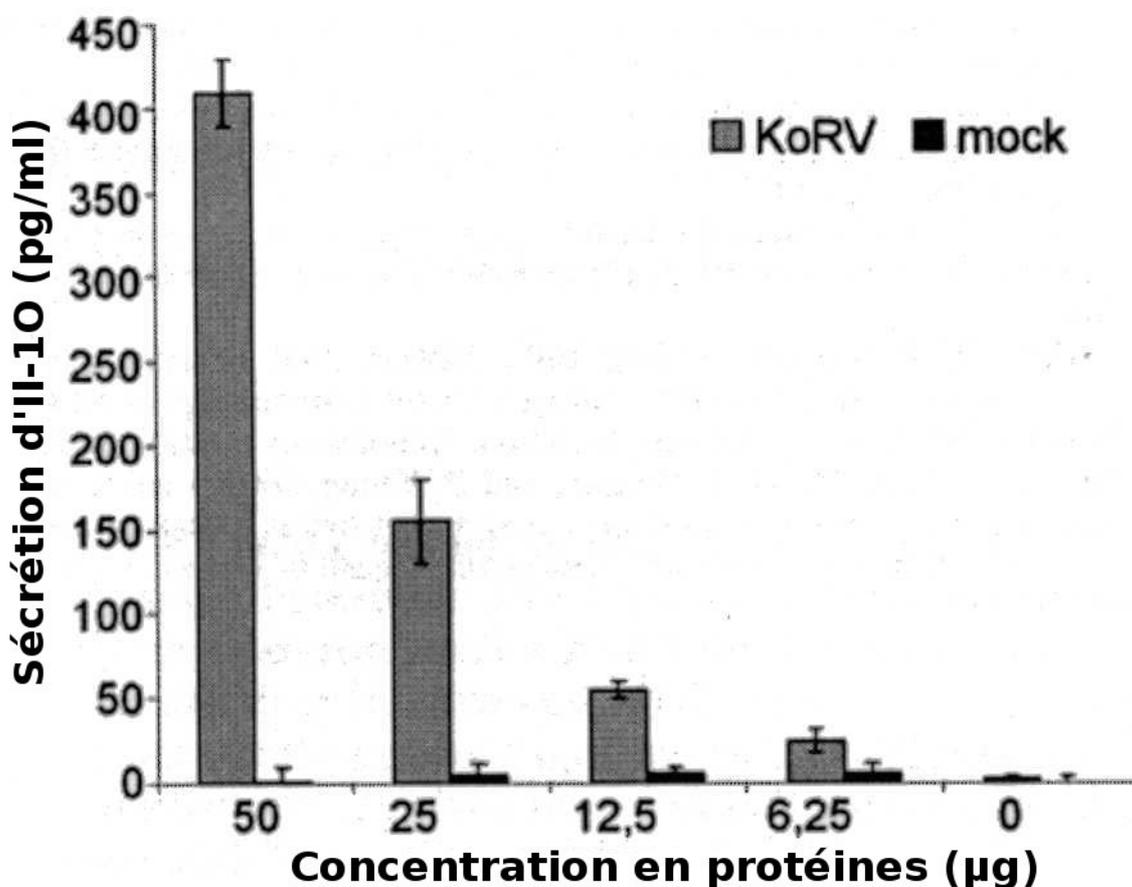
La séquence de ces domaines est retrouvée à l'identique chez le KoRV, le MLV et le FeLV. Ces séquences entraînent une inhibition de la prolifération de lymphocytes et une modulation de la

production de cytokines (entre autre une augmentation de la production d'interleukine-10, IL-10) [Fiebig, U. *et al.* 2006].

Fiebig *et al.* ont montré que le KoRV produit sur des cellules humaines 293 et des cellules de sang périphérique entraîne une augmentation de la production d'interleukine-10 ainsi que des facteurs Growth-related Oncogene GRO, d'interleukine-6 et de MCP-1 comme observés avec le HIV et le FeLV qui sont responsables d'une immunodépression *in vivo* [Fiebig, U. *et al.* 2006] (Figure 34).

Figure 34. Influence de préparations purifiées du KoRV et mock sur la production de IL-10.

D'après Fiebig, U. *et al.* 2006. Les surnageants de cellules 293 produisant du KoRV et de cellules 293 non infectées (mock) ont été centrifugés, puis incubés à différentes concentrations avec des cellules mononucléées de sang périphérique provenant de donneurs sains; la concentration en IL-10 a été mesurée dans le surnageant en utilisant une méthode d'immunomarquage enzymatique, les résultats sont exprimés en moyennes après soustraction de la concentration en IL-10 relarguée par les cellules non traitées.



C. Sélection et variété des espèces hôtes

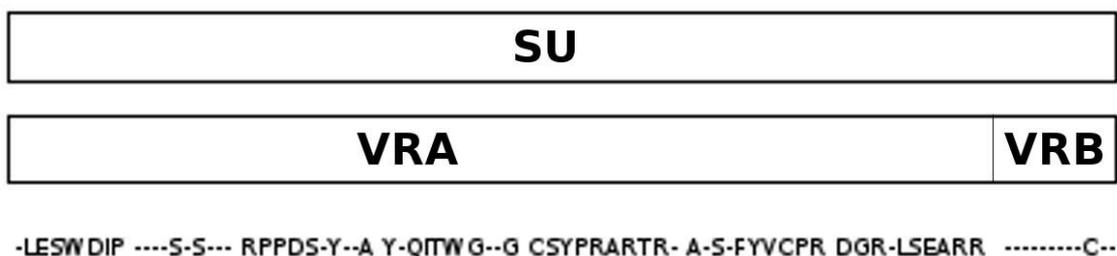
Les *gammaretrovirus* sont réparties en fonction des récepteurs qu'ils utilisent pour infecter la cellule, même si tous les virus d'une même classe de récepteurs n'ont pas les mêmes espèces hôtes. La connaissance de ces récepteurs est importante puisque la plupart des *Retrovirus* endogènes capables de se répliquer sont non pathogènes à cause, entre autres, d'une altération des récepteurs cellulaires, utilisés par le virus, sélectionnée par la cellule pour prévenir l'infection virale sans affecter ses fonctions normales [Stoye, J. P. 2006].

Différents récepteurs ont été mis en évidence jusqu'à présent: inorganic phosphate symporter PiT1 pour le GaLV, related phosphate symporter PiT2 pour la forme amphotrope du MLV, PiT1 et PiT2 pour la souche du MLV 10A1 et PiT1 et l'orthologue murin à PiT1 pour le KoRV [Oliveira, N. *et al.* 2006].

En ce qui concerne les espèces hôtes, le GaLV semble infecter les félins, canins, bovins, rats, chauve-souris et visons tandis que le KoRV a montré une infectiosité *in vitro* sur cellules de souris, de rat, de hamster, d'homme et de bovins [Oliveira, N. *et al.* 2006].

Les GaLV et KoRV sont donc conspécifiques : dérivés d'un progéniteur commun mais ayant des espèces hôtes distinctes qui se recoupent et des propriétés d'utilisation des récepteurs différentes. Une altération dans la composition de l'enveloppe entre le GaLV et le KoRV explique la capacité de ces deux virus à infecter deux hôtes très différents. Cela soulève le problème de la capacité potentielle de ce groupe de virus à évoluer et à coloniser de nouvelles espèces hôtes [Oliveira, N. *et al.* 2006] (Figure 35).

Figure 35. Comparaison des domaines d'enveloppe de GALV et KoRV. D'après Oliveira, N., *et al.* 2006. SU: protéine d'enveloppe virale, VRA/VRB: régions variables. Les résidus notés sont les résidus identiques aux deux domaines, les tirets marquent les résidus qui varient.



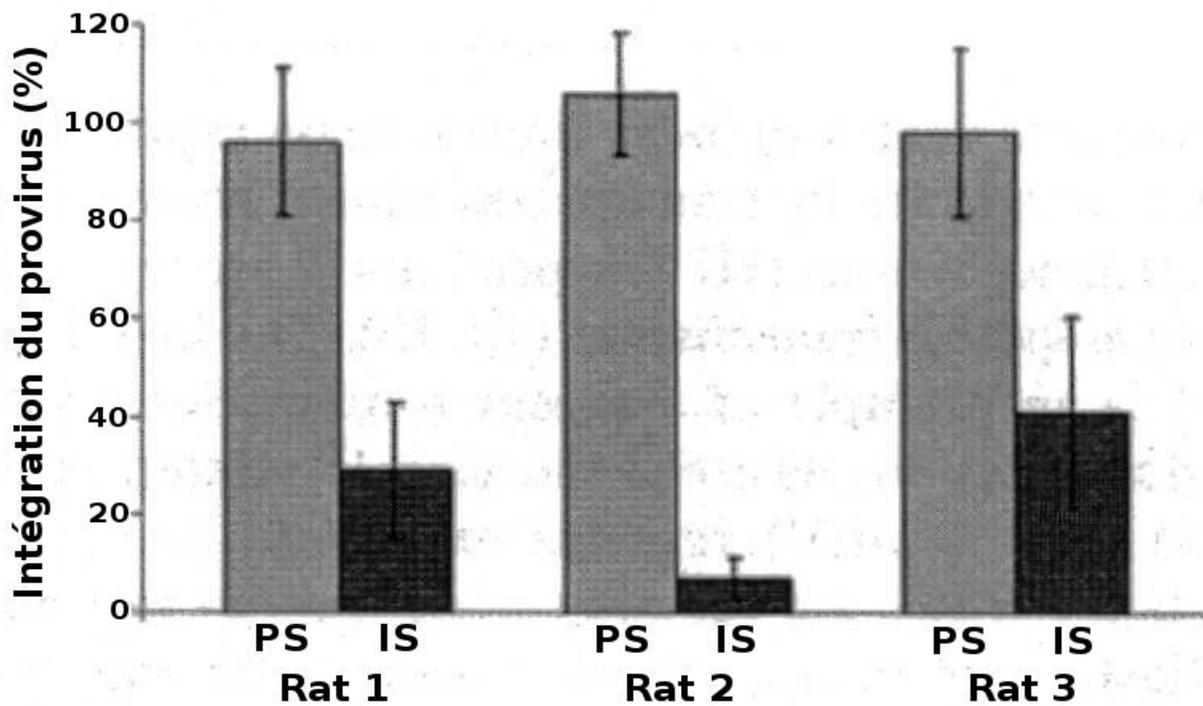
Une autre étude a retrouvé un spectre d'espèces hôtes pour le KoRV similaire à celui décrit précédemment (cellules rénales humaines 293, lignées de lymphocytes T humains C8166 et CEM et fibroblastes de rat rat1) avec infection de toutes ces cellules, en utilisant la PCR pour la mise en évidence de l'intégration du provirus et la microscopie électronique pour montrer la production de particules virales. Par contre, il n'y a pas eu infection des fibroblastes de souris NIH3T3 contrairement aux résultats de l'étude précédente [Fiebig, U. *et al.* 2006].

N.B : les particules virales produites après trois passages sur cellules humaines 293 donnent une morphologie uniforme alors que les particules virales retrouvées sur un lymphome [Fiebig, U. *et al.* 2006] et sur une leucémie [Tarlinton, R. E. *et al.* 2005] de koala ont présenté une morphologie polymorphe.

D. Perspectives de recherche thérapeutique

D'une part, des essais d'immunisation ont amené Fiebig *et al.* à tester un antisérum généré en immunisant des rats avec l'ectodomaine recombinant de p15E du KoRV. Ils ont ainsi obtenu une inhibition de l'intégration du provirus sur cellules humaines 293 d'environ 60 à 95 % [Fiebig, U. *et al.* 2006] (Figure 36).

Figure 36. Activité neutralisante d'un sérum de rat en comparaison d'un sérum pré-immun.
 D'après Fiebig, U. *et al.* 2006. IS: sérum immun, PS: sérum pré-immun; activité neutralisante mesurée à une dilution de 1:8; l'infection a été mesurée comme étant le pourcentage d'intégration du provirus en utilisant la PCR en temps réel; les résultats sont exprimées en moyennes et déviations standards.



D'autre part ils ont réussi à démontrer pour la première fois une transmission inter-espèce expérimentale d'un *gammaretrovirus in vivo*. En inoculant du KoRV pur ou des cellules de rat1 produisant du KoRV à des rats, ils ont obtenu une infection productive sur tous les animaux, ce qui implique donc une intégration *in vivo* [Fiebig, U. *et al.* 2006] (Tableau 10). Ces transmissions inter-espèces entre des individus non apparentés phylogénétiquement sont rares [Denner, J. 2007].

On peut donc envisager de tester des vaccins basés sur des anticorps neutralisants induits par immunisation avec p15E et gp70 d'une part et des médicaments antiviraux *in vivo* d'autre part.

Tableau 10. Infection in vivo de rats avec trois sources différentes de KoRV. D'après Fiebig, U., *et al.* 2006. a: les anticorps (Ac) spécifiques pour p15E ont été détectés par la méthode de Western blot; b: les provirus ont été mesurés sur cellules mononucléées de sang périphérique par PCR; c: le virus a été isolé en incubant du plasma et des cellules mononucléées de sang périphérique provenant de rats infectés avec des cellules 293 puis l'intégration du provirus a été mesurée.

Animal	Source du virus	Détection des Ac spécifiques à p15E ^a	Détection du provirus au: ^b		Isolation du virus au 42/63e jour ^c
			21e jour	63e jour	
4	Surnageant sans cellules provenant de cellules 293 infectées par le KoRV	+	-	-	+
5		+	-	-	+
6		+	+	-	+
7		+	-	-	+
8	Surnageant sans cellules provenant de cellules rat1 infectées par le KoRV	+	+	-	+
9		+	-	-	+
10		+	-	-	+
11		+	-	-	+
12	Cellules rat1 infectées par le KoRV	+	-	-	+
13		+	+	-	+
14		-	-	-	-
15		+	+	-	+

VI. Conclusion

Le Koala est un animal en voie de disparition qui doit son déclin majoritairement à des maladies opportunistes et néoplasiques. Il a été démontré que l'espèce est actuellement colonisée par un *Retrovirus* endogène de la famille des *gammaretrovirus* qui gagne peu à peu l'ensemble de la population et qui serait à l'origine de ces pathologies dominantes.

Cette espèce présente donc un double intérêt d'étude et du coup un double enjeu. D'une part pour la virologie en général, puisqu'elle représente à ce jour le seul exemple d'endogénéisation rétrovirale active, et que la découverte du virus initial et la compréhension du mécanisme de passage de l'état exogène à l'état endogène, servirait de modèle pour comprendre des phénomènes d'endogénéisation plus anciens et l'évolution des *Retrovirus* actuels ; d'autre part pour la sauvegarde de l'espèce, puisque la découverte d'un traitement (vaccin,...) permettrait de freiner ce déclin qui pourrait amener à moyen terme à la disparition de l'espèce. La question qui se pose aussi est la possibilité d'une transmission horizontale du virus, à partir des particules virales produites par la forme endogène.

Conclusion

La caractéristique la plus marquante des *Retrovirus* est que le génome viral, constitué de deux molécules d'ARN, se transcrit en ADN pour être par la suite intégré au sein du génome cellulaire. De ce mécanisme unique découle plusieurs conséquences. L'une d'elles est que cette intégration peut se fixer non pas seulement au sein d'une lignée cellulaire mais devenir héréditaire si elle a lieu au niveau de cellules germinales.

Le provirus devient alors entièrement partie intégrante du matériel génétique de l'hôte, de ses descendants voir même d'une espèce ou d'une sous-espèce.

Comme nous avons pu le voir, l'étude de ces provirus a montré, qu'à travers l'évolution, les nombreuses intégrations de *Retrovirus* ont fini par constituer une partie importante du génome des être vivants.

Ces séquences sont à l'origine de recombinaisons génétiques aussi bien avec le génome hôte que le génome viral exogène. Elles ont ainsi d'une part servi à la production de gènes cellulaires modifiés ayant des fonctions altérées, diminuées, augmentées ou largement déviées de leur rôle initial, d'autre part elles ont offert et offrent toujours aux virus exogènes infectant la cellule la possibilité d'accroître leur pouvoir pathogène par amplification des effets induits ou par facilitation de leur pouvoir infectieux (Figure 37).

Dans les différents exemples qui ont été traités ici, on a pu voir que les séquences endogènes permettent d'amplifier le pouvoir oncogène des *Retrovirus*. On a même pu observer que la séquence seule, sans infection par un virus exogène, pouvait être responsable d'effet cancérigène comme dans le cas du *Retrovirus* endogène du koala.

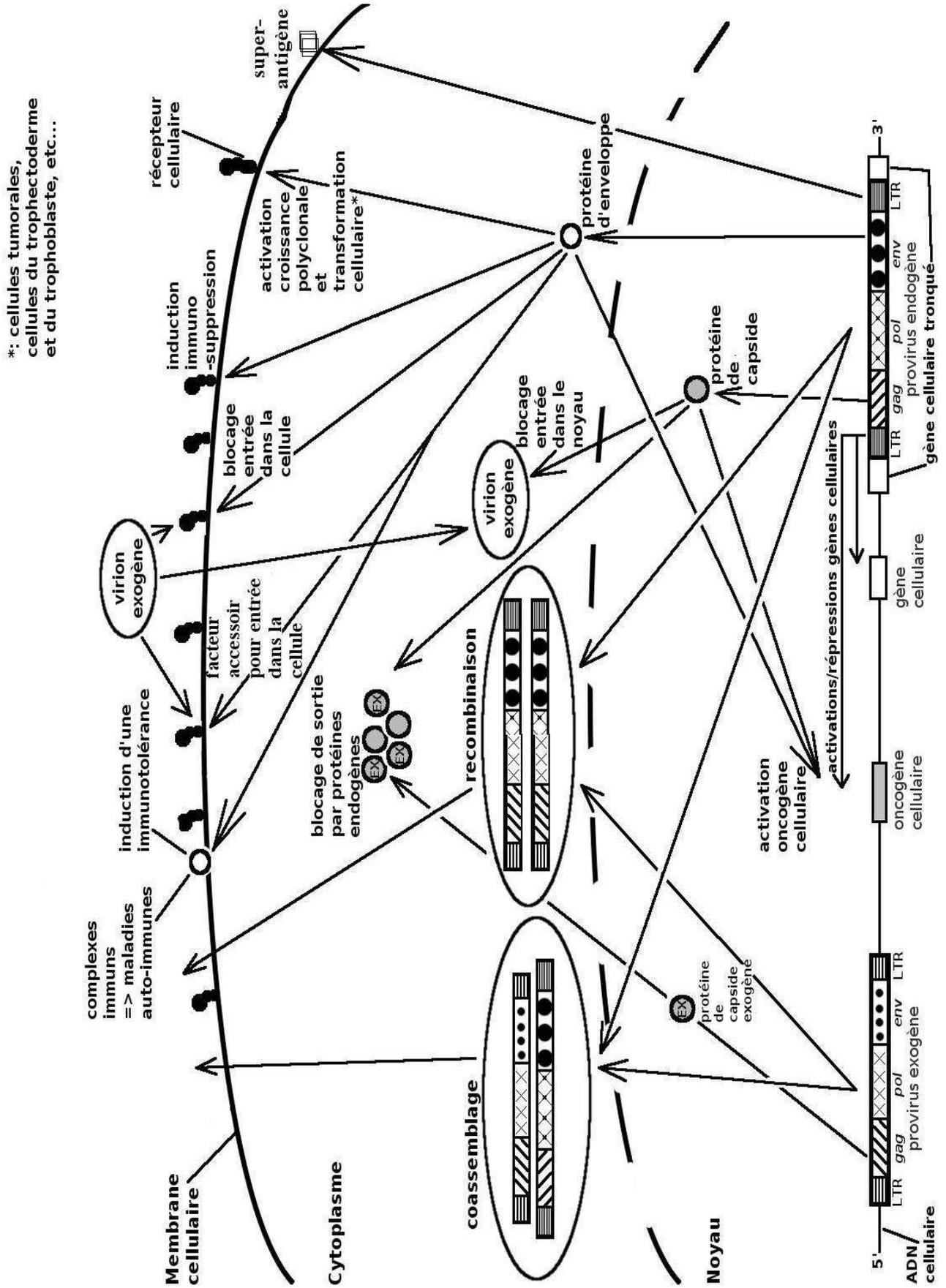
Parallèlement à ces actions négatives, la présence de ces provirus endogènes a eu aussi des effets positifs sur les cellules hôtes. Tout d'abord en sélectionnant les cellules protégées contre ces infections "internes", elle a permis le développement de mécanismes de défense contre les infections exogènes (Figure 37).

De plus, les mécanismes d'action propres aux virus ont aussi pu améliorer certains processus physiologiques de l'hôte. En effet, même si depuis de nombreuses années la science essaie de démontrer l'implication de ces *Retrovirus* endogènes dans des maladies humaines, peu d'études

démontrent clairement leur rôle direct. En revanche l'étude du modèle animal rejoint celui du modèle humain concernant l'implication des *Retrovirus* endogènes au cours de l'évolution du placenta des mammifères.

Le sujet est extrêmement vaste et surtout en constante évolution. L'étude des *Retrovirus* est relativement récente comparée à d'autres thématiques scientifiques et celle des *Retrovirus* endogènes encore plus jeune. Beaucoup d'hypothèses restent en suspens et le sujet est d'autant plus complexe que les *Retrovirus*, par leur pouvoir recombinant, sont en évolution permanente. Cependant la compréhension des différents mécanismes représente un enjeu majeur pour trois raisons principales. D'une part l'importance des maladies dues à des *Retrovirus*, et en particulier le VIH, nécessite de comprendre d'abord les voies de fonctionnement pour pouvoir proposer un traitement adéquat; d'autre part l'utilisation de vecteurs géniques, essentiellement à partir de *Retrovirus*, représente un espoir important pour la prévention ou le traitement de nombreuses maladies; enfin, ce qui est peut-être le plus fondamental et relié directement à notre étude, la compréhension des mécanismes d'action des provirus endogènes permet de mieux appréhender la fonction ou le fonctionnement de nombreux gènes cellulaires.

Figure 37. Schéma résumant les différents rôles des *Retrovirus* endogènes.



Bibliographie

1. Abkowicz, J. L., Holly, R. D., Grant, C. K. 1987. Retrovirus-induced feline pure red cell aplasia. *J. Clin. Invest.* 80: 1056-1063.
2. Alamgir, A. S. M., Owens, N., Lavignon, M., Malik, F., Evans, L. H. 2005. Precise identification of endogenous proviruses of NFS/N mice participating in recombination with Moloney ecotropic murine leukemia virus (MuLV) to generate polytropic MuLVs. *J. Virol.* 79: 4664-4671.
3. Anderson, M. M., Luring, A. S., Burns, C. C., Overbaugh, J. 2000. Identification of a cellular cofactor required for infection by feline leukemia virus. *Science.* 287: 1828-1830.
4. Anderson, M. M., Luring, A. S., Robertson, S., Dirks, C., Overbaugh, J. 2001. Feline Pit2 functions as a receptor for subgroup B feline leukemia viruses. *J. Virol.* 75 : 10563-10572.
5. Bai, J., Zhu, R.-Y., Stedman, K., Cousens, C., Carlson, J., Sharp, J. M., DeMartini, J. C. 1996. Unique long terminal repeat U3 sequences distinguish exogenous Jaagsiekte sheep retroviruses associated with ovine pulmonary carcinoma from endogenous *loci* in the sheep genome. *J. Virol.* 70 : 3159-3168.
6. Baychelier, P. 1994. Leucogen: un exemple de vaccin sous-unité. In: *Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.* Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris. 205-208.
7. Benveniste, R. E., Sherr, C. J., Todaro, G. J. 1975. Evolution of type C viral genes : origin of feline leukemia virus. *Science.* 190 : 886-888.
8. Bhadra, S., Lozano, M. M., Payne, S. M., Dudley, J. P. 2006. Endogenous MMTV proviruses induce susceptibility to both viral and bacterial pathogens. *PLoS Pathog.* 2: 1134-1143.
9. Boomer, S., Eiden, M., Burns, C. C., Overbaugh, J. 1997. Three distinct envelope domains, variably present in subgroup B Feline leukemia virus recombinants, mediate Pit1 and Pit2 receptor recognition. *J. Virol.* 71: 8116-8123.
10. Boone, L. R., Glover, P. L., Innes, C. L., Niver, L. A., Bondurant, M. C., Yang, W. K. 1988. Fv-1 N- and B-tropism-specific sequences in murine leukemia virus and related endogenous proviral genomes. *J. Virol.* 62: 2644-2650.
11. Booth, R. J., Blanshard, W. H. 1999. Diseases of koalas. In *Zoo and Wildlife Medicine Current Therapy 4*, M. E. Fowler, R. E. Miller. W.B. Saunders Company. 321-333.
12. Cachon-Gonzalez, M. B., Fenner, S., Coffin, J. M., Moran, C., Best, S., Stoyale, J. P. 1994. Structure and expression of the hairless gene of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 7717-7721.

13. Callahan, R and Smith, G. H. 2000. MMTV-induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways. *Oncogene*. 19: 992-1001.
14. Canfield, P. J., Sabine, J. M., and Love, D. N. 1988. Virus particles associated with leukemia in a koala. *Aust Vet J* ; 65 :327-328.
15. Carlson, J., Lyon, M., Bishop, J., Vaiman, A., *et al.* 2003. Chromosomal distribution of endogenous Jaagsiekte sheep retrovirus proviral sequences in sheep genome. *J. Virol.* 77 : 9662-9668.
16. Chang, Z., Pan, J., Logg, C., Kasahara, N., Roy-burman, P. 2001. A replication-competent feline leukemia virus, subgroup A (FeLV-A), tagged with green fluorescent protein reporter exhibits in vitro biological properties similar to those of the parental FeLV-A. *J. Virol.* 75: 8837-8841.
17. Cheng, H. H., Anderson, M. M., Hankenson, F. C., Johnston, L., Kotwaliwale, C. V., Overbaugh, J. 2006. *J. Virol.* 80: 1619-1628.
18. Cianciolo, G. J., Copeland, T. D., Oroszlan, S., and Snyderman, R. 1985. Inhibition of lymphocytes proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science* ; 230 :453-455.
19. Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E. 1997a. The place of retroviruses in biology. In *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. [en-ligne]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=rv.section.11>. Consulté le 6 Octobre 2007.
20. Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E. 1997b. Structural Classes of Retroelements and Replication Strategies. In *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. [en-ligne]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=rv.section.3432>. Consulté le 6 Octobre 2007.
21. Cohen, J. C. and Varmus, H. E. 1980. Proviruses of mouse mammary tumor virus in normal and neoplastic tissues from GR and C3Hf mouse strains. *J. Virol.* 35: 298-305.
22. Collingwood, T. N., Urnov, F. D., Wolffe, A. P. 1999. Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J. Molecular Endocrinology*. 23: 255-275.
23. Connolly, J. H., Canfield, P. J., Hemsley, S., and Spencer, A. J. 1998. Lymphoid neoplasia in the koala. *Aust Vet J* ; 76 :819-825.
24. Courreges, M. C., Burzyn, D., Nepomnaschy, I., Piazzon, I., Ross, S. R. 2007. Critical role of dendritic cells in mouse mammary tumor virus in vivo infection. *J. Virol.* 81: 3769-3777.
25. Cousens, C., Minguignon, E., Dalziel, G., *et al.* 1999. Complete sequence of enzootic nasal tumor virus, a retrovirus associated with transmissible intranasal tumors in sheep. *J. Virol.* 73 : 3986-3993.
26. Daibata, M., Taguchi, T., Nemoto, Y., Taguchi, H., and Miyoshi, I. 1999. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood*. 94 : 1545-1549.

27. Denner, J. 2007. Transspecies transmissions of retroviruses : New cases. *Virology*. A paraître. Doi : 10.1016/j.virol.2007.07.026.
28. Deroo, B. J. and Archer, T. K. 2001. Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling in vivo. *Oncogene*. 20: 3039-3046.
29. DesGroseillers, L. and 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.* 52: 945-952.
30. Devare, S. G., Rapp, U. R., Todaro, G. J., Stephenson, J. R. 1978. Acquisition of oncogenicity by endogenous mouse type C viruses: effects of variation in *env* and *gag* genes. *J. Virol.* 28: 457-465.
31. Dudley, J. and Risser, R. 1984. Amplification and novel locations of endogenous mouse mammary tumor virus genomes in mouse T-cell lymphomas. *J. Virol.* 49: 92-101.
32. Dunlap, K. A., Palmarini, M., Adelson, D. L., Spencer, T. E. 2005. Sheep endogenous betaretroviruses (enJSRVs) and the hyaluronidase 2 (HYAL2) receptor in the ovine uterus and conceptus. *Biology of Reproduction*. 73 : 271-279.
33. Dunlap, K. A., Palmarini, M., Spencer, T. E. 2006a. Ovine endogenous betaretroviruses and placental morphogenesis. *Placenta*. Vol.27 supplement A, Trophoblast research vol.20 : 135-140.
34. Dunlap, K. A., Palmarini, M., Varela, M., Burghardt, R. C., Hayashi, K., Farmer, J. L., Spencer, T. E. 2006b. Endogenous retroviruses regulate periimplantation placental growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(39) : 14390-14395.
35. EMEA-Agence Européenne des Médicaments. 2005. Notice Purevax. [en-ligne]. <http://www.emea.europa.eu/vetdocs/PDFs/EPAR/PurevaxFeLV/V-056-PI-fr.pdf>.
36. Evans, L. H and Cloyd, M. W. 1984. Generation of mink cell focus-forming viruses by Friend murine leukemia virus: recombination with specific endogenous proviral sequences. *J. Virol.* 49: 772-781.
37. Evans, L. H. and Malik, F. G. 1987. Class II polytropic leukemia viruses (MuLVs) of AKR/J mice: possible role in the generation of class I oncogenic polytropic MuLVs. *J. Virol.* 61: 1882-1892.
38. Evans, L. H., Lavignon, M., Taylor, M., Alamgir, A. S. M. 2003. Antigenic subclasses of polytropic murine leukemia virus (MLV) isolates reflect three distinct groups of endogenous polytropic MLV-related sequences in NFS/N mice. *J. Virol.* 77: 10327-10338.
39. Fiebig, U., Hartmann, M. G., Bannert, N., Kurth, R., and Denner, J. 2006. Transspecies transmission of the endogenous koala retrovirus. *J Virol* ; 80 : 5651-5654.
40. Frankel, W. N., Stoye, J. P., Taylor, B. A., Coffin, J. M. 1989a. Genetic analysis of endogenous xenotropic murine leukemia viruses: association with two common mouse mutations and the viral restriction locus Fv-1. *J. Virol.* 63: 1763-1774.

41. Frankel, W. N., Stoye, J. P., Taylor, B. A., Coffin, J. M. 1989b. Genetic identification of endogenous polytropic proviruses by using recombinant inbred mice. *J. Virol.* 63: 3810-3821.
42. Ghosh, S. K., Roy-Burman, P., Faller, D. V. 2000. Long terminal repeat regions from exogenous but not endogenous feline leukemia viruses transactivate cellular gene expression. *J. Virol.* 74 : 9742-9748.
43. Golovkina, T. V. 2000. A novel mechanism of resistance to mouse mammary tumor virus infection. *J. Virol.* 74: 2752-2759.
44. Golovkina, T. V., Chervonsky, A., Prescott, J. A., Janeway, Jr, C. A., Ross, S. R. 1994a. The mouse mammary tumor virus envelope gene product is required for superantigen presentation to T cells. *J. Exp. Med.* 179: 439-446.
45. Golovkina, T. V., Dudley, J. P., Ross, S. R. 1998. B and T cells are required for mouse mammary tumor virus spread within the mammary gland. *J. Immunology.* 161: 2375-2382.
46. Golovkina, T. V., Jaffe, A. B., Ross, S. R. 1994b. Coexpression of exogenous and endogenous mouse mammary tumor virus RNA in vivo results in viral recombination and broadens the virus host range. *J. Virol.* 68: 5019-5026.
47. Griffiths, D. J. 2001. Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biology.* 2(6) : reviews 1017.1-1017.5. [en-ligne]. <http://genomebiology.com/2001/2/6/reviews/1017.1>. Consulté le 6 Octobre 2007.
48. Groner, B. and Hynes, N. E. 1980. Number and location of mouse mammary tumor virus proviral DNA in mouse DNA of normal tissue and of mammary tumors. *J. Virol.* 33: 1013-1025.
49. Günzburg, W. H. and Salmons, B. 1992. Factors controlling the expression of mouse mammary tumor virus. *Biochem. J.* 283: 625-632.
50. Guyader, M. Les rétrovirus. [en-ligne]. <http://biologie.univ-mrs.fr/upload/p190/Retrovirus.Guyader.pdf>. Consulté le 6 Octobre 2007.
51. Hanger, J. J., Bromham, L. D., McKee, J. J., O'Brien, T. M., and Robinson, W. F. 2000. The nucleotide sequence of koala (*Phascolarctos cinereus*) retrovirus : a novel type C endogenous virus related to gibbon ape leukemia virus. *J Virol* ; 74 : 4264-4272.
52. Hartley, J. W., Wolford, N. K., Old, L. J., Rowe, W. P. 1977. A new class of murine leukemia virus associated with development of spontaneous lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 789-792.
53. Hasenkrug, K. J. and Chesebro, B. 1997. Immunity to retroviral infection: the Friend virus model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 7811-7816.
54. Hecht, S. J., Carlson, J. O., DeMartini, J. C. 1994. Analysis of a type D retroviral capsid gene expressed in ovine pulmonary carcinoma. *Virology.* 202 : 480-484.

55. Hecht, S. J., Stedman, K. E., Carlson, J. O., DeMartini, J. C. 1996. Distribution of endogenous type B and type D sheep retrovirus sequences in ungulates and other mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 : 3297-3302.
56. Herbein, G. 2003. Définition, structure, et classification des virus. [en-ligne]. www.chu-besancon.fr/virologie/definition_structure_virus.doc. publié le 3 Mars 2003. Consulté le 6 Octobre 2007.
57. Herniou, E., Martin, J., Miller, K., Cook, J., Wilkinson, M., and Tristem, M. 1998. Retroviral diversity and distribution among vertebrates. *J. Virol.* 72 : 5955-5966.
58. Herr, W. and Gilbert, W. 1983. Somatically acquired recombinant murine leukemia proviruses in thymic leukemias of AKR/J mice. *J. Virol.* 46: 70-82.
59. Herr, W. and Gilbert, W. 1984. Free and integrated recombinant murine leukemia virus DNAs appear in preleukemic thymuses of AKR/J mice. *J. Virol.* 50: 155-162.
60. Hoatlin, M. E., Kozak, S. L., Lilly, F., Chakraborti, A., Kozak, C. A., Kabat, D. 1990. Activation of erythropoietin receptors by Friend viral gp55 and by erythropoietin and down-modulation by the murine Fv-2^f resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 9985-9989.
61. Holland, C. A., Thomas, C. Y., Chattopadhyay, S. K., Koehne, C., O'Donnell, P. V. 1989. Influence of enhancer sequences on thymotropism and leukemogenicity of mink cell focus-forming viruses. *J. Virol.* 63: 1284-1292.
62. Huber, B. T., Hsu, P. N., Sutkowski, N. 1996. Virus-encoded superantigens. *Microbiological reviews.* 60: 473-482.
63. Ikeda, H. and Sugimura, H. 1989. Fv-4 resistance gene: a truncated endogenous murine leukemia virus with ecotropic interference properties. *J. Virol.* 63: 5405-5412.
64. Imai, S., Okumoto, M., Iwai, M. *et al.* 1994. Distribution of mouse mammary tumor virus in asian wild mice. *J. Virol.* 68: 3437-3442.
65. Irwin, M. J. and Gascoigne, R. J. 1993. Interplay between superantigens and the immune system. *J. Leukocyte Biology.* 54: 495-503.
66. Jarrett, O. 2003. Strategies for successful FeLV vaccination. In: *Proceeding of the World Small Animal Veterinary Association, Bangkok, Thailand.* [on-line]. <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2003&PID=6628&O=Generic>.
67. Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Taylor, B. A., Lee, B. K. 1982. Organization, distribution, and stability of endogenous ecotropic leukemia virus DNA sequences in chromosomes of *Mus musculus*. *J. Virol.* 43: 26-36.
68. Jolicoeur, P., Rassart, E., Kozak, C., Ruddle, F., Baltimore, D. 1980. Distribution of endogenous murine leukemia virus DNA sequences among mouse chromosomes. *J. Virol.* 33: 1229-1235.

69. Jung, Y. T., Lyu, M. S., Buckler-White, A., Kozak, C. A. 2002. Characterization of a polytropic murine leukemia virus proviral sequence associated with the virus resistance gene Rmcf of DBA/2 mice. *J. Virol.* 76: 8218-8224.
70. Kosmider, O. and Moreau-Gachelin, F. 2006. From mice to human: the "two-hit model" of leukemogenesis. *Cell Cycle.* 5: 569-570.
71. Kozak, C. A., Gromet, N. J., Ikeda, H., Buckler, C. E. 1984. A unique sequence related to the ecotropic murine leukemia virus is associated with the Fv-4 resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 834-837.
72. Kozak, C., Peters, G., Pauley, R. *et al.* 1987. A standardized nomenclature for endogenous mouse mammary tumor viruses. *J. Virol.* 61: 1651-1654.
73. Luring, A. S., Anderson, M. M., Overbaugh, J. 2001. Specificity in receptor usage by T-cell-tropic feline leukemia viruses : implications for the in vivo tropism of immunodeficiency-inducing variants. *J. Virol.* 75 : 8888-8898.
74. Luring, A. S., Cheng H. H., Eiden, M. V., Overbaugh, J. 2002. Genetic and biochemical analyses of receptor and cofactor determinants for T-cell-tropic feline leukemia virus infection. 76 : 8069-8078.
75. Leroux, C. and Archer, F. 2007. Interaction du virus JSRV avec les pneumocytes de type II au cours de l'adénocarcinome pulmonaire ovin. UMR754 INRA-ENVL-UCBL « Rétrovirus et pathologie comparée ». [en-ligne]. Mise à jour le 14 Mars 2007. http://www.inra.fr/sante_animale/actions_et_projets/reseaux_et_programmes_transversaux/virologie_2003_2005/rapports_finaux/interactions_du_virus_jsrv_avec_les_pneumocytes_de_type_ii_au_cours_de_l_adenocarcinome_pulmonaire_ovin. Consulté le 10 Octobre 2007.
76. Levy, J. A. 1999. Xenotropism: the elusive viral receptor finally uncovered. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 802-804.
77. Li, J-P. and Baltimore, D. 1991. Mechanism of leukemogenesis induced by mink cell focus-forming murine leukemia viruses. *J. Virol.* 65: 2408-2414.
78. Manley, N. R., O'Connell, M. A., Sharp, P. A., Hopkins, N. 1989. Nuclear factors that bind to the enhancer region of nondefective Friend murine leukemia virus. *J. Virol.* 63: 4210-4223.
79. Martin, J., Herniou, E., Cook, J., O'Neill, R. W., and Tristem, M. 1999. Interclass transmission and phyletic host tracking in murine leukemia virus-related retroviruses. *J Virol* ; 73 : 2442-2449.
80. Maubourguet, P., Péchoin, D., Demay, F. *et al.* 1990. *Petit Larousse illustré* 1991. Paris: Librairie Larousse. 1680p.
81. McDougall, A. S., Terry, A., Tzavaras, T., Cheney, C., Rojko, J., Neil, J. C. 1994. Defective endogenous proviruses are expressed in feline lymphoid cells : evidence for a role in natural resistance to subgroup B feline leukemia viruses. *J. Virol.* 68 : 2151-2160.

82. Mendoza, R., Anderson, M. M., Overbaugh, J. 2006. A putative thiamine transport protein is a receptor for feline leukemia virus subgroup A. *J. Virol.* 80: 3378-3385.
83. MicrobiologyBytes. 2007. Retroviruses. [en-ligne]. Mise à jour 11 Septembre 2007. <http://www.microbiologybytes.com/virology/Retroviruses.html>. Consulté le 6 Octobre 2007.
84. Miyazawa, M. and Fujisawa, R. 1994. Physiology and pathology of host immune responses to exogenous and endogenous murine retroviruses – From gene fragments to epitopes. *Tohoku J. Exp. Med.* 173: 91-103.
85. Moreau-Gachelin, F. 2006. Lessons from models of murine erythroleukemia to acute myeloid leukemia (AML): proof-of-principle of co-operative in AML. *Haematologica.* 91: 1644-1652.
86. Morozov, V. A., Lagaye, S., Löwer, J., Löwer, R. 2004. Detection and characterization of betaretroviral sequences, related to sheep Jaagsiekte virus, in Africans from Nigeria and Cameroon. *Virology.* 327 : 162-168.
87. Morozov, V. A., Morozov, A. V., Lagaye, S. 2007. Endogenous JSRV-like proviruses in domestic cattle : analysis of sequences and transcripts. *Virology.* 367 : 59-70.
88. Morris, D. W., Young, L. J. T., Gardner, M. B., Cardiff, R. D. 1986. Transfer, by selective breeding, of the pathogenic Mtv-2 endogenous provirus from the GR strain to a wild mouse line free of endogenous and exogenous mouse mammary tumor virus. *J. Virol.* 58: 247-252.
89. Mura, M., Murcia, P., Caporale, M., Spencer, T. E., Nagashima, K., Rein, A. Palmarini, M. 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 : 11117-11122.
90. Murcia, P., Arnaud, F., Palmarini, M. 2007. The transdominant endogenous retrovirus enJS56A1 associates with blocks intracellular trafficking of Jaagsiekte sheep retrovirus *gag*. *J. Virol.* 81 : 1762-1772.
91. Nethe, M., Berkhout, B., van der Kuyl, A. C. 2005. Retroviral superinfection resistance. *Retrovirology.* 2: 52.
92. Ney, P. A. and D'Andrea, A. D. 2000. Friend erythroleukemia revisited. *Blood.* 96: 3675-3680.
93. Nisole, S. and Saïb, A. 2004. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology.* 1 : 9.[en-ligne]. <http://retrovirology.com/content/1/1/9>. Consulté le 6 Octobre 2007.
94. Obendorf, D. L. 1983. Causes of mortality and morbidity of wild koalas, *Phascolarctos cinereus* (Goldfuss), in Victoria, Australia. *J Wild Dis* ; 19 : 123-131.
95. OIE. 2003. Ovine pulmonary adenomatosis. [on-line]. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/ovine_pulmonary_adenomatosis.pdf. consulté le 6 Octobre 2007.
96. Oliveira, N., Farrell, K. B., and Eiden, M. V. 2006. In vitro characterization of a koala retrovirus. *J Virol* ; 80 : 3104-3107.

97. Overbaugh, J., Riedel, N., Hoover, E. A., Mullins, J. I. 1988. Transduction of endogenous envelope genes by feline leukemia virus in vitro. *Nature*. 332 : 731-734.
98. Palmarini, M. and Fan, H. 2001a. Retrovirus-induced ovine pulmonary adenocarcinoma, an animal model for lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 93 : 1603-1614.
99. Palmarini, M., Cousens, C., Dalziel, R. G., Bai, J., Stedman, K., DeMartini, J. C., Sharp, J. M. 1996. The exogenous form of Jaagsiekte retrovirus is specifically associated with a contagious lung cancer of sheep. *J. Virol.* 70 : 1618-1623.
100. Palmarini, M., Gray, C. A., Carpenter, K., Fan, H., Bazer, F. W. and Spencer, T. E. 2001b. Expression of endogenous betaretroviruses in the ovine uterus : effects of neonatal age, estrous cycle, pregnancy, and progesterone. *J. Virol.* 75 : 11319-11327.
101. Palmarini, M., Hallwirth, C., York, D., Murgia, C., de Oliveira, T., Spencer, T., Fan, H. 2000. Molecular cloning and functional analysis of three type D endogenous retroviruses of sheep reveal a different cell tropism from that of the highly related exogenous jaagsiekte sheep retrovirus. *J. Virol.* 74 : 8065-8076.
102. Palmarini, M., Mura, M., Spencer, T. E. 2004. Endogenous betaretroviruses of sheep : teaching new lessons in retroviral interference and adaptation. *Journal of General Virology*. 85 : 1-13.
103. Palmarini, M., Sharp, J. M., De Las Heras, M., Fan, H. 1999. Jaagsiekte Sheep Retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep. *J. Virol.* 73 : 6964-6972.
104. Phipps, A. J., Hayes, K. A., Al-dubaib, M., Roy-burman, P., Mathes, L. E. 2000. Inhibition of feline leukemia virus subgroup A infection by coinoculation with subgroup B. *Virology*. 277: 40-47.
105. Ponta, H., Günzburg, W. H., Salmons, B., Groner, B., Herrlich, P. 1985. Mouse mammary tumor virus: a proviral gene contributes to the understanding of eukaryotic gene expression and mammary tumorigenesis. *J. gen. Virol.* 66: 931-943.
106. Portis, J. L., Czub, S., Robertson, S., McAtee, F., Chesebro, B. 1995. Characterisation of a neurologic disease induced by a polytropic retrovirus: evidence for differential targeting of ecotropic and polytropic viruses in the brain. *J. Virol.* 69: 8070-8075.
107. Pryciak, P. M. and Varmus, H. E. 1992. Fv-1 restriction and its effects on murine leukemia virus integration in vivo and in vitro. *J. Virol.* 66: 5959-5966.
108. Quigley, J. G., Burns, C. C., Anderson, M. M., Lynch, E. D., Sabo, K. M., Overbaugh, J., Abkowitz, J. L. 2000. Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia. *Blood*. 95: 1093-1099.
109. Quint, W., Boelens, W., van Wezenbeek, P., Cuypers, T., Maandag, E. R., Selten, G., Berns, A. 1984. Generation of AKR mink cell focus-forming viruses: a conserved single-copy xenotrope-like provirus provides recombinant long terminal repeat sequences. *J. Virol.* 50: 432-438.

110. Rigby, M. A., Rojko, J. L., Stewart, M. A., Kociba, G. J., Cheney, C. M., Rezanka, L. J., Mathes, L. E., Hartke, J. R., Jarrett, O., Neil, J. C. 1992. Partial dissociation of subgroup C phenotype and in vivo behaviour in feline leukemia viruses with chimeric envelope genes. *J. Gen. Virol.* 73: 2839-2847.
111. Risser, R. and Horowitz, J. M. 1983. Endogenous mouse leukemia viruses. *Ann. Rev. Genet.* 17: 85-121.
112. Roca, A. L., Nash, W. G., Menninger, J. C., Murphy, W. J., O'Brien, S. J. 2005. Insertional polymorphisms of endogenous feline leukemia viruses. *J. Virol.* 79 : 3979-3986.
113. Roca, A. L., Pecon-Slattery, J., O'Brien, S. J. 2004. Genomically intact endogenous feline leukemia viruses of recent origin. *J. Virol.* 78 : 4370-4375.
114. Rohn, J. L., Moser, M. S., Gwynn, S. R., Baldwin, D. N., Overbaugh, J. 1998. In vivo evolution of a novel, syncytium-inducing and cytopathic feline leukemia virus variant. *J. Virol.* 72: 2686-2696.
115. Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Lenz, J., Ruprecht, R., Cloyd, M. W. 1985. Tissue selectivity of murine leukemia virus infection is determined by long terminal repeat sequences. *J. Virol.* 55: 862-866.
116. Ross, S. R., Schmidt, J. W., Katz, E., Cappelli, L., Hultine, S., Gimotty, P., Monroe, J. G. 2006. An immunoreceptor tyrosine activation motif in the mouse mammary tumor virus envelope protein plays a role in virus-induced mammary tumors. *J. Virol.* 80: 9000-9008.
117. Rulli, K., Lobelle-rich, P. A., Trubetskoy, A., Lenz, J., Levy, L. S. 2001. Tissue distribution and timing of appearance of polytropic envelope recombinants during infection with SL3-3 murine leukemia virus or its weakly pathogenic SL3 Δ Myb5 mutant. *J. Virol.* 75: 522-526.
118. Sargison, N. 2003. NADIS sheep disease focus – Jaagsiekte. NADIS (National Animal Disease Information Service). <http://store.mlc.org.uk/articles/dodownload.asp?a=store.example.co.uk.23.12.2004.12.26.42.pdf&i=50525>. Consulté le 6 Octobre 2007.
119. Sharp, A. 1995. *The Koala Book*. Australian Koala Foundation. Pelican Publishing Company, Gretna.
120. Sheets, R. L., Pandey, R., Jen, W.-C., Roy-Burman, P. 1993. Recombinant feline leukemia virus genes detected in naturally occurring feline lymphosarcomas. *J. Virol.* 67 : 3118-3125.
121. Speck, N. A. and Baltimore, D. 1987. Six distinct nuclear factors interact with the 75-base pair repeat of the Moloney murine leukemia virus enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 7: 1101-1110.
122. Speck, N. A., Renjifo, B., Golemis, E., Fredrickson, T. N., Hartley, J. W., Hopkins, N. 1990. Mutation of the core or adjacent LVb elements of the Moloney murine leukemia virus enhancer alters disease specificity. *Genes & Dev.* 4: 233-242.

123. Spencer, T. E., Mura, M., Gray, C. A., Griebel, P. J. and Palmarini, M. 2003. Receptor usage and fetal expression of ovine endogenous betaretrovirus : implications for coevolution of endogenous and exogenous retroviruses. *J. Virol.* 77 : 749-753.
124. Stewart, M. A., Warnock, M., Wheeler, A., Wilkie, N., Mullins, J. I., Onions, D. E., Neil, J. C. 1986. Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. *J. Virol.* 58 : 825-834.
125. Stoye, J. P. 2006. Koala retrovirus : a genome invasion in real time. *Genome Biology* ; 7 : 241.
126. Stoye, J. P. and Coffin, J. M. 1987. The four classes of endogenous murine leukemia virus: structural relationships and potential for recombination. *J. Virol.* 61: 2659-2669.
127. Stoye, J. P., Moroni, C., Coffin, J. M. 1991. Virological events leading to spontaneous AKR thymomas. *J. Virol.* 65: 1273-1285.
128. Summers, C., Neill, W., Dewar, P., Gonzalez, L., van der Molen, R., Norval, M., Sharp, J. M. 2002. Systemic immune responses following infection with Jaagsiekte sheep retrovirus and in the terminal stages of ovine pulmonary adenocarcinoma. *J. of General Virology.* 83 : 1753-1757.
129. Swanson, I., Jude, B. A., Zhang, A. R., Pucker, A., Smith, Z. E., Golovkina, T. V. 2006. Sequences within the *gag* gene of mouse mammary tumor virus needed for mammary gland cell transformation. *J. Virol.* 80: 3215-3224.
130. Takeuchi, Y., Vile, R. G., Simpson, G., O'hara, B., Collins, M. K. L., Weiss, R. A. 1992. Feline leukemia subgroup B uses the same cell surface receptor as Gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* 66: 1219-1222.
131. Tarlinton, R. E., Meers, J., and Young, P. R. 2006. Retroviral invasion of the koala genome. *Nature* ; 442 : 79-81.
132. Tarlinton, R. E., Meers, J., Hanger, J., and Young, P. 2005. Real-time transcriptase PCR for the endogenous koala retrovirus reveals an association between plasma viral load and neoplastic disease in koalas. *J Gen Virol* ; 86 :783-787.
133. Thomas, C. Y., Khiroya, R., Schwartz, R. S., Coffin, J. M. 1984. Role of recombinant ecotropic and polytropic viruses in the development of spontaneous thymic lymphomas in HRS/J mice. *J. Virol.* 50: 397-407.
134. Troxler, D. H., Lowy, D., Howk, R., Young, H., Scolnick, E. M. 1977. Friend strain of spleen focus-forming virus is a recombinant between ecotropic murine type C virus and the *env* gene region of xenotropic type C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 4671-4675.
135. Varela, M., Chow, Y-H., Sturkie, C., Murcia, P., Palmarini, M. 2006. Association of RON tyrosine kinase with the Jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein. *Virology.* 350 : 347-357.
136. Weiss, R. A. 2006. The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology.* 3 : 67. [en-ligne]. <http://www.retrovirology.com/content/3/1/67>. Consulté le 6 Octobre 2007.

137. Wikipedia. 2007a. Koala. [en-ligne]. Mise à jour le 26 septembre 2007. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Koala>. Consulté le 5 Octobre 2007.
138. Wikipedia. 2007b. Classification des virus. [en-ligne]. Mise à jour le 18 Septembre 2007. http://fr.wikipedia.org/wiki/Classification_des_virus. Consulté le 6 Octobre 2007.
139. Wikipedia. 2007c. Retroviridae. [en-ligne]. Mise à jour le 26 Septembre 2007. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Retroviridae>. Consulté le 6 Octobre 2007.
140. Wikipedia. 2007d. Virus. [en-ligne]. Mise à jour le 10 Octobre 2007. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Virus>. Consulté le 11 Octobre 2007.
141. Wikipedia. 2007e. Virus classification. [on-line]. Mise à jour le 2 Octobre 2007. http://en.wikipedia.org/wiki/Virus_classification. Consulté le 6 Octobre 2007.
142. Wise, D. J., Carter, G. R., Flores, E. F. 2005. Retroviridae. In: A concise review of veterinary virology. [on-line]. Mis à jour le 19 Juillet 2005. <http://www.ivis.org/docarchive/A3415.0705.pdf>. Consulté le 12 Octobre 2007.
143. Wootton, S. K., Halbert, C. L., Miller, A. D. 2005. Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours. *Nature*. 434 : 904-907.
142. Worley, M., Rideout, B., Shima, A., and Janssen, D. 1993. Opportunistic infections, cancer and hematologic disorders associated with retrovirus infection in the koala. In *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians*. p.162.
144. Wu, T., Yan, Y., Kozak, C. A. 2005. Rmcf2, a xenotropic provirus in the asian mouse species *Mus castaneus*, blocks infection by polytropic mouse gammaretrovirus. *J. Virol.* 79: 9677-9684.
145. York, D. F., Vigne, R., Verwoerd, D. W., Querat, G. 1992. Nucleotide sequence of the Jaagsiekte retrovirus, an exogenous and endogenous type D and B retrovirus of sheep and goats. *J. Virol.* 66 : 4930-4939.
146. Yoshimura, F. K., Wang, T., Yu, F., Kim, H-R. C., Turner, J. R. 2000. Mink cell focus-forming murine leukemia virus infection induces apoptosis of thymic lymphocytes. *J. Virol.* 74: 8119-8126.

Etude bibliographique de l'implication des *Retrovirus* endogènes chez les mammifères et pathologies associées.

NOM et Prénom : MULOT Baptiste

RESUME

Les *Retrovirus* endogènes représentent une découverte récente de la génétique et de la virologie. Aucune association stricte n'a pu être démontrée à ce jour avec des maladies humaines. Chez les animaux, certaines pathologies cancéreuses sont induites par leur présence. Ce travail fait état des connaissances actuelles concernant l'implication des *Retrovirus* endogènes chez les mammifères. Chez quatre animaux (souris, chat, mouton et koala) la présence de *Retrovirus* endogènes a des conséquences pathologiques importantes. Malgré certaines actions directes au cours de processus pathogènes, le rôle majeur de ces séquences intégrées au génome est de favoriser des recombinaisons génétiques avec des formes exogènes de ces virus, et d'induire ainsi une évolution accélérée et/ou une pathogénicité accrue des *Retrovirus*. Parallèlement aux implications pathogènes, ces séquences apportent de nouvelles fonctions grâce aux gènes présents au sein des provirus endogènes, permettant l'évolution du génome de l'hôte et le protégeant notamment de certaines infections rétrovirales exogènes.

Mots clés RETROVIRUS ENDOGENE, PATHOLOGIE, CANCEROGENESE, MAMMIFERE, SOURIS, CHAT, MOUTON, KOALA.

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. ALCON-LE PODER Sophie

Assesseur : Dr. ARNE Pascal

Adresse de l'auteur :
17, rue de la Raquette
41110 Saint-aignan
FRANCE

Bibliographic study of the implication of mammals endogenous *Retroviruses* and associated pathologies.

SURNAME : MULOT

Given name : Baptiste

SUMMARY

Endogenous *Retroviruses* represent a recent discovery in genetics and virology. No strict association could have been demonstrated until nowadays with human diseases. Some tumor pathologies of animals are induced by the presence of these viruses. This work reviews the present state of our knowledge concerning the implication of endogenous *Retroviruses* within mammals. Within four mammals (mouse, cat, sheep and koala) the presence of endogenous *Retroviruses* has main pathological consequences. Despite some direct actions within pathological processes, the main part of these genomic integrated sequences is to contribute to genetic recombinations within exogenous forms of the virus and to induce a sped-up evolution and/or an increased pathogenicity of *Retroviruses*. Parallel to the pathogenic involvements, these sequences provid new functions thanks to genes present within the endogenous proviruses, permitting the evolution of the host genom and protecting it, in particular, from some exogenous retroviral infections.

Keywords ENDOGENOUS RETROVIRUS, PATHOLOGY, CARCINOGENESIS, MAMMALS, MOUSE, CAT, SHEEP, KOALA.

Jury :

President : Pr.

Director : Dr. ALCON-LE PODER Sophie

Assessor : Dr. ARNE Pascal

Author's address:
17, rue de la Raquette
41110 Saint-aignan
France