

Transduction d'oncogènes par les rétrovirus : étapes et mécanismes

La transduction est le processus par lequel un rétrovirus capture un gène cellulaire. Les passages répétés d'un rétrovirus dépourvu d'oncogène sur des cultures quiescentes de cellules de neurorétine aviaire embryonnaire donnent fréquemment naissance à de nouveaux virus mitogènes ayant transduit des oncogènes de la famille des sérine/thréonine kinases *mil/raf*. Les intermédiaires moléculaires qui se succèdent lors des différentes étapes de la capture d'oncogènes sont : un transcrite chimérique, comportant des séquences virales et cellulaires fusionnées par un épissage alternatif ; un rétrovirus complet dont l'extrémité 5' est identique à celle de l'ARN précédent ; enfin, un rétrovirus qui a acquis des séquences *gag* supplémentaires et dont la capacité répliquative est accrue. Le modèle suggéré par ces études, qui fait de l'ARN chimère l'étape clef du processus, permet d'expliquer la genèse de la plupart des rétrovirus transformants isolés *in vivo*.

Marie-Paule Felder
Alain Eychène
Maria Marx
Georges Calothy

ADRESSE

M.-P. Felder : étudiante en doctorat.
A. Eychène : chargé de recherche à l'Inserm.
M. Marx : directeur de recherche au Cnrs.
G. Calothy : directeur de l'URA 1443 du Cnrs.
Institut Curie, Biologie centre universitaire,
laboratoire 110, 91405 Orsay Cedex,
France.

m/s n° 4 vol. 10, avril 94

La capture de gènes cellulaires par des rétrovirus, appelée transduction rétrovirale, est le processus naturel qui a permis la découverte des oncogènes [1]. Les oncogènes transduits par les rétrovirus, appelés *v-onc*, ont subi des modifications par rapport aux proto-oncogènes cellulaires (*c-onc*) dont ils dérivent. Ces altérations (mutation,

amputation, fusion avec des gènes viraux, surexpression) sont responsables de la transformation maligne des cellules infectées par le virus recombinant. La transduction d'un oncogène s'accompagne généralement de l'inactivation par délétion d'un ou de plusieurs gènes (appelés *gag*, *pol* et *env*) de réplication du virus. La propagation de tels virus nécessite donc la présence d'un

RÉFÉRENCES

1. Stéhelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming genes of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 1976; 260: 170-3.
2. Crisanti-Combes P, Privat A, Pessac B, Calothy G. Differentiation of chick embryo neuroretina cells in monolayer cultures. An ultrastructural study. I. Seven days retina. *Cell Tissue Res* 1977; 185: 159-73.
3. Calothy G, Poirier F, Dambrine G, Mignatti P, Combes P, Pessac B. Expression of viral oncogenes in differentiating chick embryo neuroretinal cells infected with avian tumor viruses. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1980; 44: 983-90.
4. Marx M, Crisanti P, Eychène A, et al. Activation and transduction of *c-mil* sequences in chicken neuroretina cells induced to proliferate by infection with an avian lymphomatosis virus. *J Virol* 1988; 62: 4627-33.
5. Marx M, Eychène A, Laugier D, et al. A novel oncogene related to *c-mil* is transduced in chicken neuroretina cells induced to proliferate by infection with an avian lymphomatosis virus. *EMBO J* 1988; 7: 3369-73.
6. Crews MC, Erikson RL. Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to *mek* of it all. *Cell* 1993; 74: 215-7.
7. Calogeraki I, Barnier JV, Eychène A, Felder MP, Calothy G, Marx M. Genomic organization and nucleotide sequence of the coding region of the chicken *c-Rmil*(*B-raf*) proto-oncogene. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193: 1324-31.
8. Eychène A, Béchade C, Marx M, Laugier D, Dezélee P, Calothy G. Molecular and biological properties of *c-mil* transducing retroviruses generated during passage of Rous-associated virus type 1 in chicken neuroretina cells. *J Virol* 1990; 64: 231-8.
9. Felder MP, Eychène A, Barnier JV, Calogeraki I, Calothy G, Marx M. Common mechanism of retrovirus activation and transduction of *c-mil* and *c-Rmil* in chicken neuroretina cells infected with Rous-associated virus type 1. *J Virol* 1991; 65: 3633-40.

virus auxiliaire, qui est généralement le virus d'origine. La grande majorité des virus ayant transduit un oncogène a été isolée à partir de tumeurs survenues dans diverses espèces animales (poule, souris, chat, etc.), apparues après de multiples infections. Par conséquent, les mécanismes de la transduction, et plus particulièrement les événements précoces de celle-ci, n'ont fait l'objet que d'hypothèses difficiles à vérifier dans ces systèmes *in vivo*.

Nous avons développé un système biologique qui a permis d'étudier en culture cellulaire les mécanismes de la transduction d'oncogènes, notamment par l'identification des intermédiaires moléculaires impliqués dans la genèse d'un virus recombinant.

Transduction des oncogènes *mil/raf* et *Rmil/B-raf* dans les cellules de neurorétine

Dans notre système biologique, la cellule hôte choisie est la cellule de neurorétine (NR) d'embryon de poule. La neurorétine dérive du neuroectoderme et constitue une entité fonctionnelle du système nerveux central spécialisée dans le traitement du signal lumineux. Les cellules NR prélevées au huitième jour du développement embryonnaire et mises en culture cessent rapidement de se diviser et expriment différents marqueurs de différenciation neuronale [2]. Ces cellules se mettent rapidement et massivement à proliférer après infection par des rétrovirus porteurs d'oncogènes [3]. L'expression de l'oncogène présent dans le génome du rétrovirus est nécessaire à l'induction et au maintien de cette multiplication cellulaire.

Le RAV-1 (*Rous-associated virus type 1*), un virus de lymphomatose aviaire dépourvu d'oncogène (*figure 1*), peut également induire la prolifération des cellules NR en culture [4, 5]. Toutefois, celle-ci n'est observée que dans un nombre restreint de cellules et après un certain temps de latence. Lorsque l'on passe de façon répétée les surnageants de cultures induites à proliférer sur de nouvel-

les cultures, on observe une induction de la prolifération de plus en plus rapide et massive. Ce phénomène est lié à l'apparition de virus ayant transduit un oncogène, de façon reproductible et avec une fréquence élevée. Le clonage moléculaire des virus recombinants (appelés IC pour Institut Curie), apparus au cours de plusieurs expériences indépendantes, a permis de montrer que le RAV-1 transduisait systématiquement, soit le gène *c-mil*, soit le gène *c-Rmil* (respectivement appelés *c-raf* et *B-raf* chez les mammifères). Ces deux gènes appartiennent à la famille des oncogènes *mil/raf* codant pour des sérine/thréonine protéine kinases impliquées dans la transmission de signaux de division ou de différenciation de la membrane cellulaire vers le noyau. Il a été montré récemment que le produit du gène *c-raf*, prototype de la famille, pouvait interagir avec la protéine Ras et activer la « cascade des MAP kinases » [6]. Le gène *c-Rmil*, quant à lui, était jusqu'alors inconnu et a été identifié au cours de ces expériences [5]. La parenté entre ces deux gènes se retrouve non seulement au niveau de la séquence protéique mais aussi au niveau de leur organisation génomique, très similaire (*figure 2*) [7]. Ainsi, dans tous les virus IC, la recombinaison entre séquences virales et cellulaires s'est faite dans une région homologue des gènes *c-mil* et *c-Rmil*. La portion transduite de ces gènes correspond au domaine catalytique contenant l'activité sérine/thréonine protéine kinase. De ce fait, la délétion de la partie aminotermine régulatrice de ces protéines aboutit à l'activation constitutive du domaine kinase présent dans les virus IC.

L'un des avantages de ce système biologique est la possibilité d'analyser l'évolution des virus isolés aux différents passages des surnageants de culture au cours d'une même expérience (*figure 3*) [8, 9]. En effet, nous avons caractérisé deux types de virus: l'un apparu après un nombre restreint de passages (virus précoces) et l'autre engendré après de multiples passages (virus tardifs). Le clonage moléculaire et l'établissement de la séquence nucléotidique ont montré que ces deux types de

RÉFÉRENCES

10. Felder MP, Laugier D, Eychène A, Calothy G, Marx M. Occurrence of alternatively spliced leader- Δonc -polyA transcripts in chicken neuroretina cells infected with Rous-associated virus type 1: implication in transduction of the *c-mil/c-raf* and *c-Rmil/B-raf* oncogenes. *J Virol* 1993; 67: 6853-6.
11. Eychène A, Barnier JV, Dezélee P, et al. Quail neuroretina *c-Rmil(B-raf)* proto-oncogene cDNAs encode two proteins of 93.5 and 95 kDa resulting from alternative splicing. *Oncogene* 1992; 7: 1315-23.
12. Swanstrom R, Parker RC, Varmus HE, Bishop JM. Transduction of a cellular oncogene: the genesis of Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 2519-23.
13. Herman SA, Coffin JM. Differential transcription from the long terminal repeats of integrated avian leukosis virus DNA. *J Virol* 1986; 60: 497-505.
14. Geryk J, Dezélee P, Barnier JV, et al. Transduction of the cellular *src* gene and 3' adjacent sequences in avian sarcoma virus PR2257. *J Virol* 1989; 63: 481-92.
15. Ikawa S, Hagino-Yamagishi K, Kawai S, Yamamoto T, Toyoshima K. Activation of the cellular *src* gene by transducing retrovirus. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 2420-8.
16. Nilsen TW, Maroney PA, Goodwin RG, et al. *c-erbB* activation in ALV-induced erythroblastosis: novel RNA processing and promoter insertion result in expression of an amino truncated EGF receptor. *Cell* 1985; 41: 719-26.
17. Adler HT, Reynolds PJ, Kelley CM, Sef-ton BM. Transcriptional activation of *lck* by retrovirus promoter insertion between two lymphoid-specific promoters. *J Virol* 1988; 62: 4113-22.
18. Rosson D, Dugan D, Reddy EP. Aberrant splicing events that are induced by proviral integration: implications for *myb* oncogene activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 3171-5.
19. Stuhlmann H, Berg P. Homologous recombination of copackaged retrovirus RNAs during reverse transcription. *J Virol* 1992; 66: 2378-88.
20. Zhang J, Temin HM. Rate and mechanism of non-homologous recombination during a single cycle of retroviral replication. *Science* 1993; 259: 234-8.

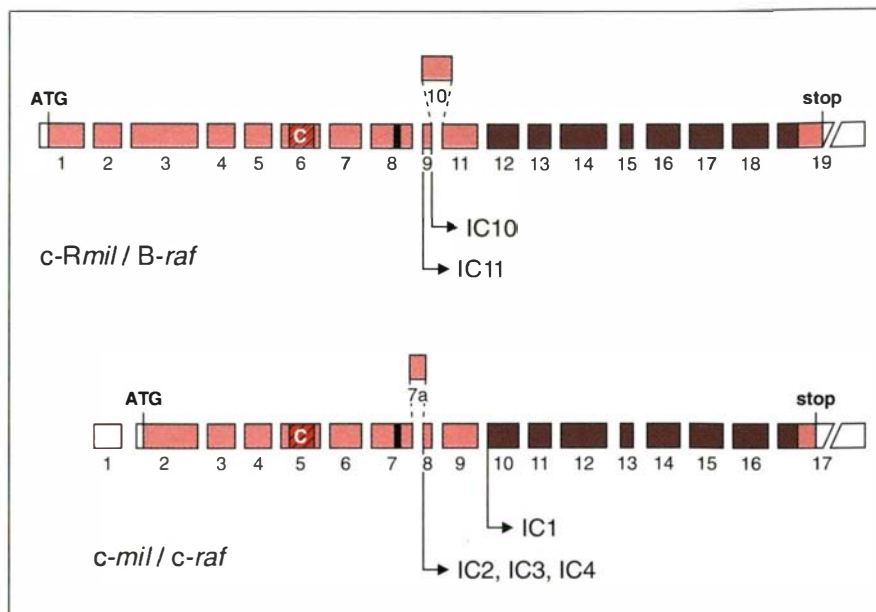


Figure 2. **Organisation génomique des gènes *c-Rmil/B-raf* et *c-mil/c-raf*.** Les boîtes sont de longueur proportionnelle à la taille des exons qu'elles représentent. Les exons faisant l'objet d'un épissage alternatif figurent au-dessus des autres (la transduction de l'exon 10 du gène *c-Rmil* n'a pas été observée). Les protéines *Rmil/B-raf* et *Mil/Raf* ont en commun une région riche en cystéines (boîte hachurée), une région riche en sérines (en noir) et le domaine kinase (en bistré). Les points de jonction entre séquences virales et cellulaires dans les virus IC sont indiqués.

séquences de l'oncogène présentes sur le virus précoce.

En résumé, les mécanismes à l'origine de la jonction 5' sont différents pour les virus précoces et tardifs alors que leur jonction 3' est identique. L'ensemble de ces données suggère qu'il existe une filiation entre virus précoces et tardifs: en d'autres termes, les virus tardifs résulteraient d'une recombinaison entre un virus précoce et le RAV-1. Cette hypothèse a été vérifiée lors d'expériences de cotransfection d'un virus précoce et du RAV-1 dans les cellules NR. En effet, les passages répétés des surnageants de ces cultures aboutissent systématiquement à la genèse d'un virus ayant acquis des séquences *gag* supplémentaires. La genèse des virus précoces, quant à elle, implique un mécanisme d'épissage entre séquences virales et cellulaires. Cette recombinaison se ferait donc au niveau de l'ARN, par un épissage alternatif.

La synthèse d'un ARN chimérique virus-oncogène constitue une étape clef de la transduction

L'analyse des virus précoces a suggéré que la jonction 5' se faisait par un épissage au niveau d'une molécule d'ARN. Nous avons donc recherché la présence de transcrits chimériques comportant la séquence *leader* du RAV-1 et des séquences des gènes *c-mil* ou *c-Rmil*, dans des cultures de cellules NR induites à proliférer par le RAV-1 [10]. Un ADNc (ADN complémentaire) contenant des séquences *leader* fusionnées à des séquences de l'oncogène *Rmil*, a été cloné par la technique d'amplification par PCR (*polymerase chain reaction*) associée à la transcription inverse. Sa séquence (figure 4) a été comparée à celle du virus précoce IC11 [9] et à celle de l'ADNc du gène *c-Rmil* [11]. L'ARN correspon-

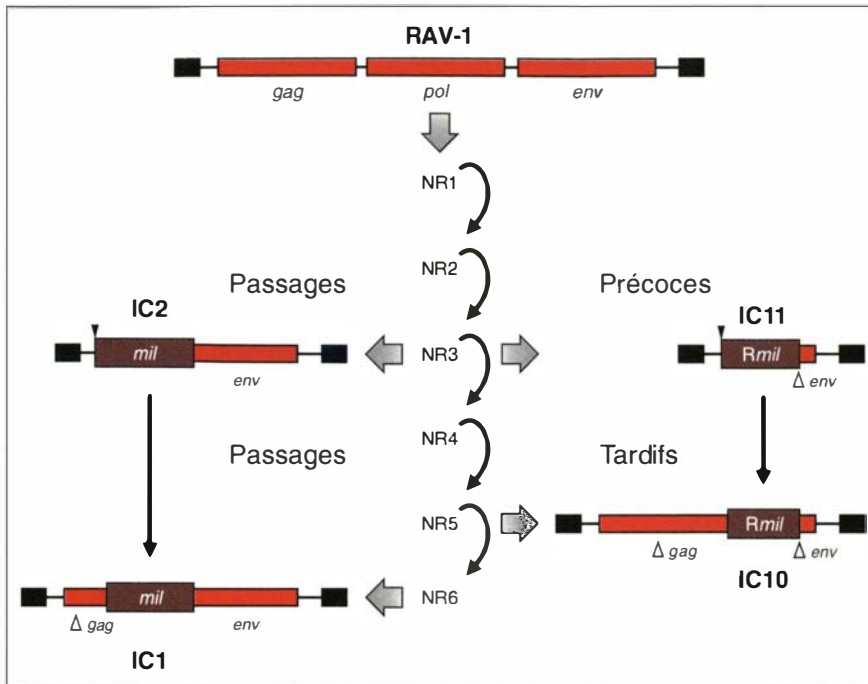


Figure 3. **Organisation génomique des virus mitogènes engendrés au cours des passages précoces ou tardifs du RAV-1 sur des cultures de cellules de neuro-rétine (NR).** Dans une expérience, ont été engendrés les virus IC2 puis IC1 qui ont transduit l'oncogène *c-mil*. Dans une autre expérience, ont été engendrés les virus IC11 puis IC10 qui ont transduit l'oncogène *c-Rmil*. NR1 : première infection de cultures de NR par le RAV-1. NR2 correspond à l'infection d'une nouvelle culture de NR avec le surnageant de la culture NR1 présentant des foyers de prolifération, etc. Les virus isolés aux expériences NR3 sont dits précoces et se caractérisent par une jonction 5' résultant d'un épissage (triangle noir) entre le site donneur du leader du RAV-1 et un site accepteur de l'oncogène. Les virus isolés aux expériences NR5 et NR6 sont dits tardifs et se caractérisent par l'expression d'une protéine de fusion contenant des séquences *gag* additionnelles.

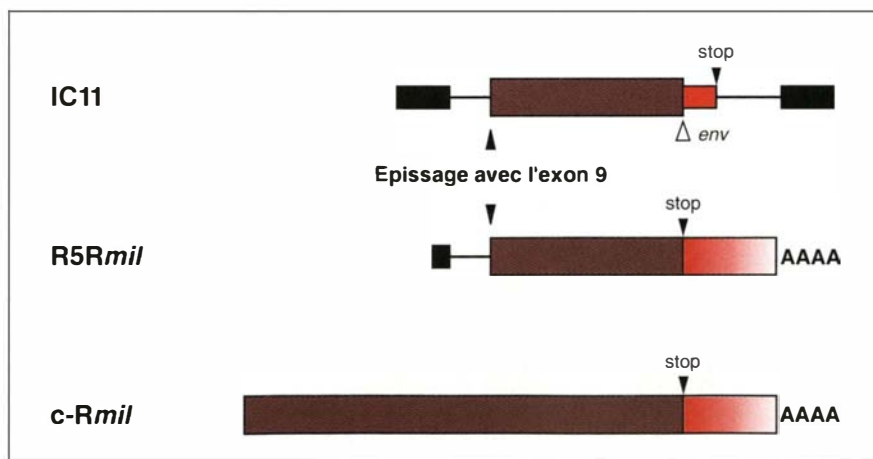


Figure 4. **Organisation génétique du transcrit R5Rmil (leader- Δ Rmil-polyA) et comparaison avec le provirus IC11 et avec l'ADN complémentaire du gène *c-Rmil* aviaire.** L'ARN R5Rmil résulte d'un épissage entre le leader du RAV-1 et l'exon 9 du gène *c-Rmil*. Il comporte la totalité du domaine kinase suivie des séquences 3' non codantes (en dégradé) strictement identiques à celles présentes sur l'ADN complémentaire du gène *c-Rmil*. AAAA : queue polyA.

dant, appelé R5Rmil, a donc la structure *leader-Rmil-polyA*, la jonction 5' s'effectuant, comme pour le virus IC11, avec l'exon 9. R5Rmil présente donc une phase ouverte de lecture comportant les codons pour les six premiers résidus de la protéine Gag, fusionnés aux codons pour les 387 derniers résidus de la protéine *c-Rmil*. L'analyse de cette molécule démontre qu'il existe effectivement un épissage alternatif entre des séquences virales et des séquences cellulaires dans les cellules induites à proliférer par le RAV-1.

Des expériences similaires indiquent que de tels transcrits chimériques comportant des séquences, soit du proto-oncogène *c-mil*, soit du proto-oncogène *c-Rmil*, sont présents dans toutes les cultures infectées par le RAV-1, et ce avant même l'apparition de foyers de division cellulaire. Cela suggère que des transcrits *leader-mil-polyA* ou *leader-Rmil-polyA* pourraient être impliqués dans l'induction de la division des cellules NR et dans la genèse des formes virales précoces. Pour vérifier ces deux points, nous avons transfecté une construction pouvant engendrer le transcrit R5Rmil dans des cultures de cellules NR. Ces cultures sont rapidement induites à proliférer, ce qui démontre la propriété mitogène du transcrit. L'une de ces cultures a été infectée par le RAV-1 puis son surnageant utilisé pour infecter de nouvelles cultures. Celles-là sont massivement induites à proliférer et l'analyse de leur contenu génomique montre la présence d'un virus complet portant des séquences *Rmil*. L'ARN chimérique *leader-Rmil-polyA* peut, par conséquent, se recombiner avec le RAV-1 pour engendrer un virus complet. Dans le processus de transduction, un tel transcrit représente donc une molécule clef que notre système a permis d'isoler.

Mécanismes de la transduction d'oncogènes par les rétrovirus

Les résultats présentés dans les deux paragraphes précédents nous ont permis de proposer un mécanisme de transduction des oncogènes

(figure 5). Il est généralement admis que l'intégration du provirus à proximité de l'oncogène est la première étape de l'activation et de la capture d'oncogènes [12]. Ainsi, dans la cellule NR, le RAV-1 s'intégrerait dans le *locus c-mil* ou *c-Rmil* et ce, dans la même orientation transcriptionnelle que le proto-oncogène. La transcription du RAV-1, qui commence dans la région LTR (*long terminal repeat*) 5', serait à l'origine de certains ARN, appelés *readthrough*, comportant des séquences virales suivies de séquences cellulaires situées en aval du provirus. En effet, Herman *et al.* ont décrit qu'environ 15 % des transcrits du RAV-1 échappent au clivage et à la polyadénylation qui ont lieu normalement dans la séquence LTR 3' [13]. L'épissage alternatif d'un tel transcrit *readthrough* entre le site donneur du RAV-1 et un site accepteur de l'oncogène *c-mil* ou *c-Rmil* engendrerait une molécule chimérique *leader-onc-polyA* semblable à celle décrite dans le paragraphe précédent. Certains virus ayant transduit un autre oncogène, le gène *src*, présentent une jonction 5' résultant d'un épissage, analogue à celle des virus IC précoces [14, 15]. Par ailleurs, des transcrits virus-*onc-polyA*, résultant d'un épissage alternatif, ont été isolés dans des systèmes aviaires [16] et murins [17, 18], bien que dans ces derniers la synthèse de rétrovirus à partir de transcrits *readthrough* n'ait pas été démontrée. De ce fait, l'épissage entre un site donneur viral et un site accepteur d'oncogène pourrait représenter un mécanisme général de formation de la jonction 5' lors de la transduction.

L'obtention d'un rétrovirus complet à partir d'un transcrit chimérique requiert l'acquisition d'une extrémité rétrovirale 3' incluant une séquence LTR. Nous avons montré que pour tous les virus IC il existe des analogies entre séquences virales et cellulaires au niveau du point de jonction. Cela suggère que la recombinaison en 3' résulte d'un saut de matrice de la transcriptase inverse, de l'ARN du RAV-1 sur le transcrit chimérique. En effet, ces deux transcrits, pourvus de la séquence *leader* (qui contient les

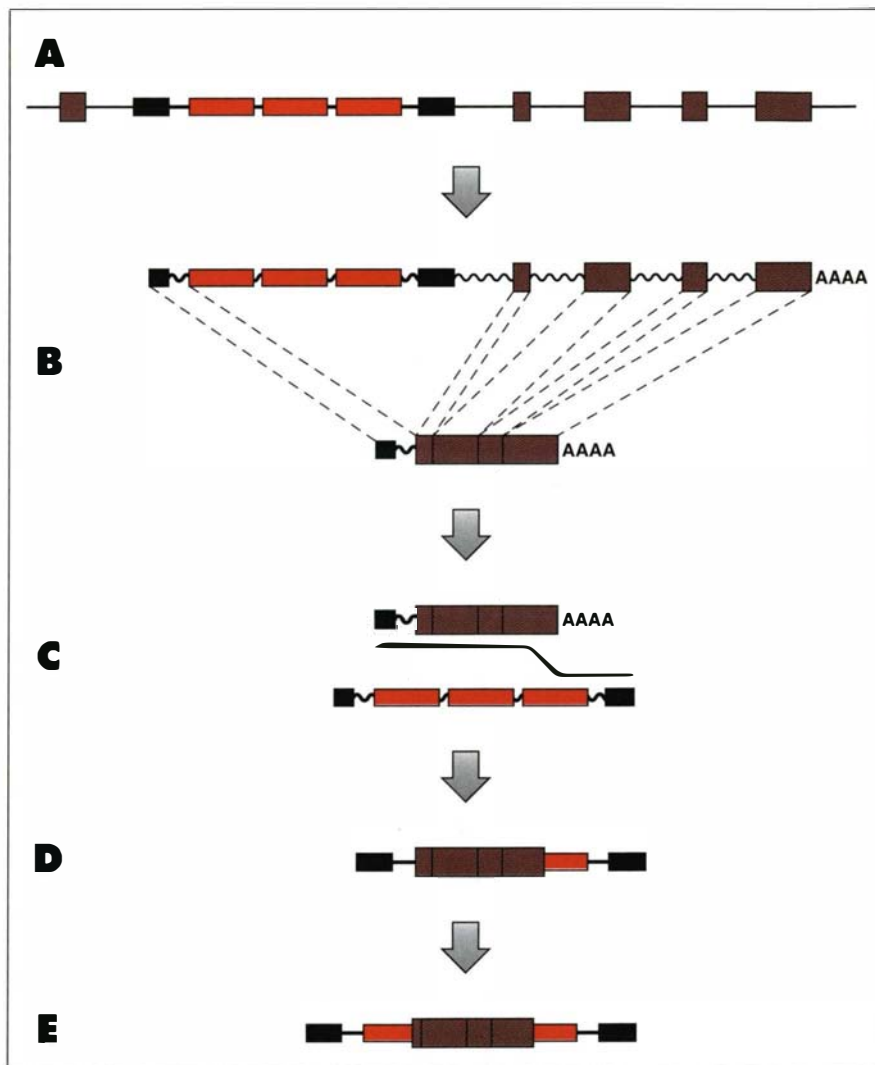


Figure 5. **Mécanisme de transduction de proto-oncogènes par les rétrovirus.** **A.** Le RAV-1 s'intègre dans le locus des gènes *c-mil* ou *c-Rmil* dans le même sens transcriptionnel. **B.** L'ARN polymérase, ignorant le signal de polyadénylation présent dans la séquence LTR 3', cotranscrit le RAV-1 et les séquences cellulaires situées en aval. L'épissage alternatif de ce transcrit *readthrough* engendre un ARN de type *leader- Δ onc-polyA*. **C.** La coencapsulation de ce transcrit avec le RAV-1 favorise des sauts de matrice par la transcriptase inverse (flèche brisée), au niveau d'homologies de séquences. De ce fait, le transcrit chimérique acquiert une extrémité 3' virale et constitue un virus de type précoce. **D.** La recombinaison ultérieure entre le virus précoce et le RAV-1 (elle aussi favorisée par des homologies de séquences) engendre un virus de type tardif qui présente un avantage sélectif.

signaux d'encapsidation), sont susceptibles d'être coencapsidés, ce qui permettrait un démarrage de la transcription inverse alors que les deux molécules sont encore associées. Des expériences mettant en jeu des constructions virales qui portent comme marqueurs de sélection des gènes de résistance à des antibiotiques, ont confirmé que la transcription inverse était un processus favorable aux recombinaisons entre molécules présentant des analogies de séquences [19, 20].

Notre système a également permis de caractériser les formes virales qui se succèdent lors de la transduction d'oncogènes. Nous avons montré que les virus tardifs résultent de la recombinaison entre le virus précoce et le RAV-1 au niveau d'analogies de séquences entre l'oncogène et le gène *gag*. Ces virus tardifs présentent donc un avantage sélectif grâce aux propriétés répliquatives et transformantes accrues que leur confère l'acquisition de séquences *gag* supplémentaires [8]. La vaste majorité des rétrovirus transformants exprime une protéine de fusion Gag-onc, suggérant ainsi que notre modèle puisse rendre compte de la transduction d'autres proto-oncogènes.

En conclusion, les travaux présentés ici ont permis de disséquer les étapes de la transduction des gènes *c-mil* et *c-Rmil*. L'étape cruciale du processus est l'épissage alternatif entre séquences virales et cellulaires, donnant naissance à des ARN hybrides, eux-mêmes à l'origine des formes virales précoces. Les mêmes événements sont probablement impliqués dans la transduction de nombreux oncogènes ■

Summary

Retroviral transduction of oncogenes: steps and mechanisms

Oncogene transduction, the process by which a cellular gene is captured by a retrovirus, was mainly described *in vivo*. We have developed a biological system allowing stepwise analysis of transduction mechanisms in tissue culture. Avian neuroretina (NR) cells, dissected at the 8th day of embryonic development, rapidly cease to divide and differentiate in culture. Serial passaging of a retrovirus that does not carry an oncogene on such cultures, leads with a high frequency to the emergence of new viruses that have transduced oncogenes from the *mil/raf* family of serine/threonine kinases. These viruses have been selected by their ability to induce NR cells division. This experimental system allowed the isolation of the following molecular intermediates generated during the successive steps of oncogene transduction: a chimeric transcript containing viral and cellular sequences joined together by an alternative splicing mechanism; then a complete retrovirus with a 5' end identical to that of the chimeric RNA; finally, a retrovirus that has acquired additional *gag* sequences, and, consequently, an increased replicative capacity. Structural analysis of these molecules led us to propose a general model for oncogene transduction in which the key step is the synthesis of chimeric RNAs. This model also explains the generation of the vast majority of acutely transforming retroviruses isolated *in vivo*.

TIRÉS A PART

G. Calothy.