

Université de Montréal

Étiologie virale du sarcome dermique de doré, une tumeur fréquente de  
ce poisson

par

Arnaud Duval

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option pathologie

Août 2005

©Arnaud Duval, 2005





## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Université de Montréal**  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Étiologie virale du sarcome dermique de doré, une tumeur fréquente de  
ce poisson

présenté par  
Arnaud Duval

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

.....  
Dr David W. Silversides, président-rapporteur

.....  
Dr Daniel Martineau, directeur de recherche

.....  
Dr Stéphane Lair, membre du jury

**RESUME EN FRANÇAIS**  
**ET MOTS-CLES**

Le virus du sarcome dermique de doré (WDSV) est un rétrovirus complexe de poisson, et constitue le membre modèle du genre *Epsilonretrovirus*. Le sarcome dermique du doré, auquel le WDSV a été relié étiologiquement, est une tumeur bénigne qui se développe et régresse selon un cycle saisonnier.

Le WDSV encode un oncogène accessoire, Orf A, homologue de la cycline D et impliqué dans le développement tumoral. Cependant, même les oncogènes viraux ne peuvent transformer seuls une cellule hôte. Leur action doit être complétée par l'expression d'autres oncogènes, ou par la perte de fonction de gène "tumeur suppresseur". Ainsi, le développement du sarcome dermique du doré pourrait impliquer d'autres voies que celle d'Orf A.

À l'aide d'une méthode PCR, nous avons caractérisé 89 sites d'insertion provirale dans 19 tumeurs sur les 26 testées. Sept insertions provirales réparties dans 3 tumeurs sont subvenues chez un gène homologue des calpains, dont un membre a été décrit comme agissant en tumeur suppresseur. De plus, l'analyse RT-PCR des transcrits de ce gène dans les tumeurs a mis en évidence la présence de nombreuses erreurs d'épissage chez 18 tumeurs sur 25 (72%). Ces transcrits aberrants présentaient des codons stop précoces et codaient donc théoriquement pour des protéines tronquées.

Ces résultats suggèrent une perte de fonction de la calpaïne impliquée dans le développement tumoral chez le sarcome dermique de doré.

**MOTS-CLES** : mutagénèse insertionnelle, épissage aberrant, tumeur, calpaïne, suppresseur de tumeur, poisson.

**RESUME EN ANGLAIS**

**ET MOTS-CLES**

Walleye dermal sarcoma virus (WDSV) is a piscine complex retrovirus, first member of the *Epsilonretrovirus* genus. WDSV is etiologically associated with a benign skin tumor which develops and regresses on a seasonal basis.

The WDSV genome contains a cyclin-like gene (*orf-A*) which has been involved in tumor development. However, even the strong growth signals provided by viral oncogenes are not sufficient to transform primary cells. They require the expression of other oncogenes or the loss of function of tumor suppressor genes. In addition to *orf A*, oncogenesis may be mediated by an additional pathway.

We characterized 89 proviral insertion sites in 19 tumors out of 26 using a PCR based method. Seven integrations occurred in a calpain-like gene in 3 tumors. In addition, RT-PCR analysis of tumor mRNA showed frequent and various aberrant splicing of this gene in 18 tumors out of 25 (72%). Aberrantly spliced transcripts showed new stop codons and thus code theoretically for truncated proteins.

Calpain was reported as a tumor suppressor gene in a rodent system.

Considered together, these observations suggest that the loss of calpain function contribute etiologically to the development of WDS.

KEY WORDS : insertional mutagenesis, aberrant splicing, tumor, calpain, tumor suppressor, fishes.



## TABLE DES MATIERES

RESUME EN FRANÇAIS.....	i
RESUME EN ANGLAIS.....	iii
TABLE DES MATIERES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABREVIATIONS.....	x
DEDICACES.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xii
I.        INTRODUCTION.....	1
II.       RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	3
1. LES RETROVIRUS.....	4
1.1 TAXONOMIE.....	4
1.2 MORPHOLOGIE DES VIRIONS.....	6
1.3 ORGANISATION DU GENOME DES ORTHORETROVIRINAE.....	8
1.4 CYCLE DE REPLICATION DES ORTHORETROVIRINAE.....	10
1.4.1 L'ENTREE DANS LA CELLULE HOTE.....	10
1.4.2 LA RETROTRANSCRIPTION.....	11
1.4.3 LA RE-LOCALISATION DU PROVIRUS AU NOYAU.....	15
1.4.4 L'INTEGRATION.....	16
1.4.5 LA TRANSCRIPTION VIRALE.....	17
1.4.6 LA PRODUCTION VIRALE.....	18

2. PATHOGENICITÉ DES ORTHORETROVIRINAE.....	19
2.1 ONCOGENESE.....	19
2.1.1 LES ONCOGENES VIRAUX.....	20
2.1.2 LES GENES ACCESSOIRES TRANSFORMANTS.....	22
2.1.3 LA MUTAGENESE INSERTIONNELLE.....	23
2.2 AUTRES PATHOLOGIES CAUSEES PAR LES RETROVIRUS.....	25
3. LE VIRUS DU SARCOME DERMIQUE DE DORE (WDSV).....	26
3.1 LATUMEUR.....	26
3.2 LE VIRUS.....	28
3.2.1 LES GENES ACCESSOIRES ET LEURS PATRONS D'EXPRESSION.....	30
3.2.1.1 ORF A.....	30
3.2.1.2 ORF B.....	33
3.2.1.3 ORF C.....	33
3.3 LES MECANISMES DE L'ONCOGENESE CHEZ LE WDS.....	35
III.    METHODOLOGIE.....	37
Article 1 : Arnaud Duval, Daniel Martineau	
Alterations of calpain expression in Walleye dermal sarcoma, a retrovirally-induced tumour.	
IV.    DISCUSSION.....	61
V.    CONCLUSION.....	68

VI. BIBLIOGRAPHIE.....70

VII. ANNEXES .....xiv

**LISTE DES TABLEAUX****Article**

Table 1 : Amorces utilisées en PCR.....	57
---	----

**LISTE DES FIGURES****Recension de littérature**

Figure 1 : Illustrations.....36

**Article**

Figure 1 : Schématisation des sites d'insertions provirales et d'hybridation des amorces PCR dans le gène homologue à la calpaïne.....58

Figure 2 : Résultats de Southern blot, Northern blot et RT-PCR.....59

Figure 3 : Schématisation des épissages aberrants obtenus dans les transcrits tumoraux du gène homologue à la calpaïne.....60

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

- ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
- ARN : Acide Ribo-Nucléique
- ASLV : Avian Sarcoma/Leukemia Virus
- BLV : Bovine Leukemia Virus
- FeLV : Feline Leukemia Virus
- HIV : Human Immunodeficiency Virus
- HFV : Human Foamy Virus
- HTLV : Human T-Cell Leukemia Virus
- IAP : Intracisternal type A Particles
- LTR : Long Terminal Repeat
- MLV : Murine Leukemia Virus
- MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus
- M-PMV : Mason-Pfizer Monkey Virus
- ORF : Phase de lecture ouverte
- PHV : Perch Hyperplasia Virus
- RNAse : Ribonuclease
- RSV : Rous Sarcoma Virus
- SIDA : Syndrome de l'Immuno-déficience Acquise
- SnRV : Snakehead Retrovirus
- WDSV : Walleye Dermal Sarcoma Virus
- WEHV : Walleye Epidermal Hyperplasia Virus

*À celui qui a su attendre l'accomplissement de ce projet,  
cloîtré dans le mutisme et l'abnégation,*

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les acteurs de ma vie que j'ai côtoyé durant ces trois enrichissantes années à la FMV au Québec.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers le Dr. Daniel Martineau pour m'avoir accepté sur ce projet et encadré tout au long de ce dernier. J'ai appris bien plus durant une seule année de cette Maîtrise que pendant la totalité de ma scolarité.

Je salue également ici les bons moments passés avec les membres réguliers ou temporaires du labo 3954 : Hélène, Noémie, Stan, Jessie et bien sûr cette très chère Bianca.

Aussi vont mes gratitudes à l'ensemble des membres et étudiants de la FMV pour les prêts, conseils, et autres aides apportés. Parmi ceux-là je remercie en particulier le Dr Zhiying Zhang qui a fait les découverte ayant mené à l'élaboration de mon projet, le Dr Carl Uhlund qui s'est occupé de récolter les échantillons de poisson, Marco Langlois qui a la compétence et la volonté d'aider pour tout ce qui touche à l'informatique, Guy Beauchamp qui s'est fendu des statistiques de mon projet.

Je place aussi une mention spéciale pour Micheline Saint-Germain qui m'a apporté une aide sans borne et a fait preuve d'une patience sans plus de limite pour les formalités administratives qui m'étaient échues.

J'envoie mes pensées à mes amis de France qui ne m'ont pas oublié malgré l'éloignement, en particulier Manu et Nasser,



de même qu'à ceux que j'ai rencontré au Québec et qui m'ont permis de ne jamais regretter d'avoir passer l'Atlantique : Alex, Joëlle, Simon, Sandra, Kristy, Véro, Mouaoui, Toffic, Carla, Débaï,... la liste est bien trop longue pour être complétée mais les noms de ceux qui ne sont pas cités ici n'en restent pas moins gravés en moi !

Je ne pouvais pourtant pas omettre les noms de Dr Florent, Tania, Alya, Florian, Pascale avec qui je partage des liens de profonde amitié.

Je réserve une ligne pour Beub (Nicolas Parent), étant donné que c'est la rencontre la plus étonnante et la plus intéressante qui me fut donnée d'être faite, au Québec comme ailleurs.

J'envois mes merci à ma famille également, pour leur soutien outre-océan, et particulièrement à Denis qui m'a accueilli et épaulé en terre Nord-Américaine à Montréal.

Je garde le meilleur pour la fin en louangeant François, complice au labo comme à la ville, et partenaire intrépide des heures de labeur comme des péripéties ludiques. Merci à toi, mon chum ! Quelque chose me dit que nous allons continuer à nous voir souvent.

# **INTRODUCTION**

Le sarcome dermique du doré (WDS) est une tumeur bénigne du poisson. Même si le doré (*Stizostedion vitreum vitreum*) se pêche et est élevé pour consommation, le caractère bénin et la nature externe de la lésion ne justifient pas de traitement à la pathologie. Mais les particularités uniques de la tumeur méritent une attention toute réfléchie, et plusieurs laboratoires de recherches dans le monde sont aujourd'hui et depuis de nombreuses années dédiés à la résolution de ses mystères.

En effet, en dépit d'une apparence maligne, le développement tumoral du WDS suit un cycle saisonnier, la tumeur apparaissant et croissant durant les saisons d'automne et hiver, puis régressant totalement sans même laisser de cicatrice au cours du printemps. Un tel renversement dans le processus tumoral est fort impressionnant lorsqu'il a lieu dans la nature et qu'il est systématique.

L'étude du WDS vise donc à comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans ce système, et permettra du même coup de mieux comprendre le cancer, fléau de notre époque. Les connaissances issues des travaux effectués sur le WDS serviront sans nul doute à poser les bases de nouvelles études afin de développer des thérapies originales et efficaces contre le cancer chez l'ensemble des animaux.

En dépit des nombreuses avancées réalisées sur ce sujet durant les dernières années, le WDS est encore trop mal connu pour que l'on puisse comprendre son fonctionnement dans son ensemble. Le présent projet se charge d'étudier la mutagenèse d'insertion, un aspect de la tumorigénèse laissé pour compte chez le WDS jusqu'à aujourd'hui.

**RECENSION DE LA  
LITTÉRATURE**

## 1. Les rétrovirus

### 1.1. Taxonomie

Tous les rétrovirus sont regroupés dans la famille des *retroviridae* (Murphy FA et al., 1995). Une précédente convention (Coffin JM, 1992) répartit ceux-ci en sept genres selon des critères de morphologie du virion ou de la pathogénicité du virus : les virus de mammifère de type C (ayant pour modèle le Murine Leukemia Virus ou MLV), les virus aviaires de type C (modèle Rous Sarcoma Virus ou RSV), les virus de type B (modèle Mouse Mammary Tumor Virus ou MMTV), les virus de type D (modèle Mason-Pfizer Monkey Virus ou M-PMV), les lentivirus (modèle Human Immunodeficiency Virus type 1 ou HIV-1), les virus du groupe HTLV/BLV (modèle Human T-Cell Leukemia Virus ou HTLV-1) et les spumavirus (modèle Human Foamy Virus ou HFV). A ces sept principales unités taxonomiques s'ajoutent ensuite les rétrovirus de mouches (Kim A et al., 1994 ; Song SU et al., 1994) et de poissons (Holzschu DL et al., 1995).

La complexité du classement s'accroissant à mesure de la découverte de nouveaux rétrovirus, et avec l'avènement des techniques de caractérisation génomique, il apparut nécessaire de remanier la taxonomie des rétrovirus en utilisant les nouvelles données (Pringle CR, 1998) (van Regenmortel MHV et al., 2000). Ainsi les *Alpharetrovirus* regroupent les rétrovirus aviaires de type C, le genre *Betaretrovirus* compte les rétrovirus de mammifère de type B et les rétrovirus de type D, les rétrovirus de mammifère de type C constituent le genre des *Gammaretrovirus*,

le genre des rétrovirus du groupe BLV-HTLV devient celui des *Deltaretrovirus*. Les *Lentivirus* et *Spumavirus* conservent leurs nomenclatures et leurs positions au sein des *Retroviridae*. Enfin, le genre des *Epsilonretrovirus* est créé en 1998 pour classer dans leur propre unité de taxonomie les rétrovirus de poissons qui échappaient aux exercices de comparaisons avec les autres espèces. Le WDSV (Walleye Dermal Sarcoma Virus) est nommé à cette occasion comme le modèle du genre (Pringle CR, 1998).

Les *Epsilonretrovirus*, selon le dernier rassemblement du comité international pour la taxonomie des virus (van Regenmortel MHV et al., 2000), ne comprennent officiellement que trois espèces, le *walleye dermal sarcoma virus* (WDSV), et les *walleye epidermal hyperplasia virus 1* et *2* (WEHV-1 et WEHV-2), toutes trois infectant la peau de doré. Les espèces *perch hyperplasia virus* (PHV) et *snakehead retrovirus* (SnRV) ont été proposées comme en faisant partie.

À l'échelle de la sous-famille, tous les genres à l'exception d'un seul sont regroupés dans les *Orthoretrovirinae*. En effet, les *Spumavirus* ont été isolés dans la sous-famille des *Spumaretrovirinae* en raison de leurs caractéristiques particulières, qui les différencient des autres membres des rétrovirus. Ainsi, les *Spumavirus* emportent dans leurs virions le matériel génomique déjà rétro-transcrit sous forme d'ADN complémentaire de pleine longueur (Yu SF et al., 1996). Il apparaît même d'après certaines études (Heinkelein M et al., 2000 ; Linial ML, 1999 ; Moebes A et al., 1997 ; Rethwilm A, 2003 ; Yu SF et al., 1999) que c'est l'ADN présent dans la particule virale qui joue le rôle d'agent actif lors de l'infection et non l'ARN génomique comme chez les autres rétrovirus (Lori F et al., 1992 ; Trono D, 1992).

Hormis cette différence majeure, ce genre accumule un certain nombre de distinctions, comme la présence d'un promoteur interne dirigeant l'expression de gènes accessoires (Löchelt M et al., 1993), ou le processus d'assemblage des particules virales, fort singulier (Lindemann D et al., 2001 ; Wilk T et al., 2001).

Il est à noter que les genres *Deltaretrovirus*, des lentivirus, des spumavirus et des *Epsilonretrovirus* incluent dans leurs caractéristiques une organisation génomique de type complexe, c'est-à-dire comprenant, en plus des gènes structuraux indispensables à la réplication du virus (également présents chez leur contrepartie les rétrovirus simples), des gènes dits accessoires. Les produits de ces gènes peuvent remplir une large gamme de fonctions telles que la régulation de gènes cellulaires et viraux (par exemple avec *tax*) (Yoshida M, 2001 ; Franchini G et al., 2003), l'optimisation de la virulence (comme c'est le cas pour *nef*) (Miller MD et al., 1994 ; Spina CA et al., 1994), l'évitement du système immunitaire de l'hôte (également observé chez *nef*) (Schwartz O et al., 1996 ; Collins KL et al., 1998).

## 1.2. Morphologie des virions

La structure d'un virion de rétrovirus prend en compte un génome constitué d'acides ribonucléiques (ARN), une matrice, une capsidie et une enveloppe (bicouche lipidique dans laquelle s'enchâssent des protéines de surface). Une particule virale renferme également les protéines virales qui lui seront nécessaires lors de la maturation et de l'infection et qui sont codées par son propre génome.

L'éventail de tailles des particules rétrovirales s'étale entre 80 et 100 nm. Ces données doivent être néanmoins considérées avec prudence en regard du nombre de sources élevées des informations et de l'imprécision des techniques de mesures selon l'analyse effectuée (Coffin JM et al., 1997 ; p29). Le coefficient de sédimentation des virions est observé à 600 S (rate zonal sedimentation).

Quatre grandes catégories furent définies à partir d'observations au microscope électronique (techniques de coupes minces) (Bernhard W, 1958 ; deHarven E, 1974).

Les particules de type A représentent une forme immature intracellulaire de certains virus. Elle est définie par l'acronyme IAP pour « Intracisternal type A Particles » (fig.1A). En effet, les virus de types B et D ainsi que les spumavirus ont, contrairement aux autres rétrovirus qui assemblent leurs structures à la membrane, la particularité de construire le noyau de la particule dans le cytoplasme, avant de l'envelopper à la membrane.

Les particules de type B matures et extracellulaires présentent un noyau rond et décentré (FIG.1B).

Les particules matures de type C centrent leur noyau qui prend une forme ronde parfois légèrement anguleuse (FIG.1C). Les *Alpharetrovirus* et *Gammaretrovirus* produisent des particules de types C, assemblant leurs particules immatures à la membrane cellulaire.

Les particules matures de type D forment des noyaux plus effilés, en forme de barre (FIG.1D).



Les membres du genre des *Betaretrovirus* assemblent des capsides immatures (particules de type A) dans le cytoplasme, pour que celles-ci bourgeonnent à la membrane et forment des particules de type B ou D selon l'espèce du virus.

Les spumavirus et lentivirus échappent à cette classification, car ils présentent des caractères atypiques. Par exemple, les lentivirus semblent appartenir au type C lors du bourgeonnement mais présentent un noyau conique (FIG.1E).

### 1.3. Organisation du génome des Orthoretrovirinae

Les *Orthoretrovirinae* possèdent un génome composé d'ARN simple brin, linéaire et non segmenté. Le noyau contient deux copies de l'acide nucléique, reliées par des ponts hydrogène. La taille du génome varie de 7 à 13 kilobases.

Le génome d'un rétrovirus est toujours bordé de séquences particulières nommées répétitions terminales longues (LTR), même si ces séquences ne sont pas conservées entre les différents virus. Elles n'en demeurent pas moins primordiales à la réplication puisque impliquées dans la rétro-transcription de l'ARN viral en ADN complémentaire double brin (le provirus), l'intégration du provirus dans le génome de l'hôte et la transcription virale (le promoteur viral, le site d'initiation de la transcription ainsi que le site de polyadénylation y prennent place).

Indispensable à l'encapsidation, c'est-à-dire à l'incorporation du transcrit de pleine longueur dans les nouvelles particules virales, le signal d'encapsidation (noté  $\psi$ ) est une séquence non conservée et mal définie qui englobe une partie de l'extrémité 3' du LTR et le début du gène *gag* (Mann R et al., 1983).

Le génome d'un rétrovirus non-défectif, c'est-à-dire capable d'infecter la cellule hôte et de se répliquer seul, comporte les trois ORF (phases de lecture ouvertes) des gènes suivants *gag*, *pro-pol* et *env*, dits structuraux (Fleissner E, 1971 ; Oroszlan S et al., 1971 ; Schäfer W et al., 1972 ; August JT et al., 1974).

*gag* code pour les protéines de la capsid (notée CA) et de la nucléo-capsid (NC), ainsi que pour celles de la matrice (MA) et se charge donc de produire les composantes du noyau de la particule virale, son squelette.

L'expression de *pro-pol* aboutit à la production de trois protéines. Une protéase (PR) découpe les produits protéiques de la traduction des ORF virales en unités fonctionnelles. Une rétrotranscriptase (RT) polymérise le provirus d'ADN double-brin à partir de l'ARN génomique viral, en amorçant son travail à l'aide d'un ARNt cellulaire défini, mais variable selon les espèces. Enfin l'intégrase (IN) se charge d'insérer le provirus au sein de l'ADN génomique de l'hôte.

Le gène *env* quant à lui, code pour les protéines qui iront se fixer dans l'enveloppe (SU et TM), et qui jouent un rôle déterminant dans l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales en formation, ainsi que dans la reconnaissance et l'infection de nouvelles cellules hôtes. C'est en outre le gène le plus variable chez les *Orthoretrovirinae* ; en effet, la partie codant pour SU se doit d'être versatile, car elle a pour fonction de reconnaître le récepteur sur la surface de la cellule hôte. Une grande diversité garantie donc au virus un plus large spectre de cellules cibles.

Fait marquant, le génome est toujours organisé selon le plan séquentiel décrit ci-dessus : LTR-*gag-pro-pol-env*-LTR. Ainsi jamais l'ordre des gènes n'est-il troublé chez aucun virus connu. Par contre, dans le cas de rétrovirus complexes, à ce schéma

classique peuvent s'ajouter des gènes accessoires. Ces derniers peuvent être positionnés à différentes places, toujours en aval de *pol* à l'exception unique d'*orf C* chez le WDSV et les virus de l'hyperplasie épidermique du doré 1 et 2 (WEHV 1 et 2), membres des *Epsilonretrovirus*. *orf C* est le seul gène accessoire situé entre le LTR et *gag*.

#### 1.4. Cycle de réplication des Orthoretrovirinae

Le cycle de réplication des *Orthoretrovirinae* peut être schématisé par la succession d'étapes suivantes (Swanstrom et al 1990 ; Luciw et al 1992 ; Coffin JM 1996).

##### 1.4.1. L'entrée dans la cellule hôte :

D'abord, les particules virales doivent être en présence de cellules correspondant à leur tropisme, c'est-à-dire appartenant à une espèce et un type cellulaire qu'elles sont capables de parasiter efficacement. Les virions doivent reconnaître la surface de la cellule hôte et y adhérer. Cet événement se fait via l'interaction spécifique de protéines virales de l'enveloppe avec la protéine membranaire cible cellulaire. La glycoprotéine virale externe SU va reconnaître le récepteur cellulaire. Cette interaction est importante et très spécifique. C'est cette connexion qui va déterminer en grande partie le tropisme et le pouvoir pathogène du virus. Le contact établi, le signal de reconnaissance est transmis de SU à la protéine

transmembranaire TM qui par un processus mal connu va promouvoir la fusion de l'enveloppe à la membrane cellulaire. Plus qu'un simple lien, le récepteur doit activer SU pour produire le signal. Ainsi dans le cas de HIV-1 et SIV, c'est un changement de conformation de SU qui provoquera son activation (Sattentau QJ et al., 1991 et 1993). Une partie de la structure virale, la nucléocapside (qui comprend le génome) va alors s'infiltrer dans le cytoplasme (Coffin JM et al., 1997 ; chapitre 3).

Il est important de noter ici que le récepteur utilisé par le virus pour reconnaître la cellule hôte possède une fonction cellulaire sans rapport avec l'infection. Le virus détourne donc une fonction cellulaire normale à son avantage. Cette « porte » membranaire varie pour chaque virus. Il n'y a pas de relation connue entre les différents récepteurs, le seul point commun à tous étant leur position membranaire. La spécificité de cette interaction *sine qua non* pour l'infection fait du gène *env* un sujet d'étude de choix pour combattre un virus.

#### 1.4.2. La rétro-transcription :

Dans le cytoplasme se déroule une étape intrinsèque et caractéristique des rétrovirus : il s'agit de la rétro-transcription (ou reverse transcription). Lors de celle-ci, le génome viral, composé d'ARN simple brin (ARNsb), est pris en charge par une protéine rétro-virale nommée reverse-transcriptase (ou rétro-transcriptase, RT) pour être recodé sous forme d'acide désoxyribonucléique double brin (ADNdb). Cet intermédiaire est appelé provirus. La protéine RT est donc une ADN-polymérase ARN-dépendante. De par l'importance capitale de cette activité, la séquence

nucléotidique codant pour les sites actifs de la molécule est la plus conservée du génome. Néanmoins, les séquences des RT des différents virus varient de manière significative (Doolittle RF et al., 1989).

La découverte de l'existence de la RT (Baltimore D, 1970 ; Temin H et al., 1970) a révolutionné le dogme de la biologie moléculaire, qui ne concevait à l'époque que le passage de l'ADN vers l'ARN. La protéine RT fonctionnellement autonome *in vitro* (Houts GE et al., 1978), possède toutes les qualités requises pour effectuer sa tâche. Malgré cette indépendance théorique vis-à-vis de co-facteurs, on sait que le travail de la RT est facilité par d'autres protéines virales, comme NC (nucléo-capside) qui favorise une hybridation ordonnée des acides nucléiques (Schulein M et al., 1978 ; Karpel RL et al., 1987 ; Weiss S et al., 1992) ou la protéase PR (Nagy K et al., 1994). La protéine RT est donc pourvue de deux activités enzymatiques distinctes : premièrement, c'est une ADN-polymérase qui peut aussi bien lire et s'appuyer sur l'ARN que sur l'ADN. Cette versatilité est nécessaire à l'accomplissement de la rétro-transcription. En effet, si la RT débute la synthèse d'ADN sur un génome ARN, la complétion de la rétro-transcription exige aux étapes suivantes qu'elle se base sur l'ADN qu'elle vient elle-même de polymériser. Deuxièmement la protéine RT est également capable de déployer une action de RNase H. Elle dégrade alors l'ARN spécifiquement engagé dans un duplexe ARN-ADN. La RT « efface » ainsi l'information ARN qu'elle vient de retranscrire en ADN, ce qui lui permet de polymériser l'autre brin ADN. Il apparaît donc que le génome ARN est consommé par l'étape de rétro-transcription. Ceci explique peut être la caractéristique des *Orthoretrovirinae* selon laquelle deux copies du génome

sont présentes dans chaque virion, augmentant les chances de réussite de l'étape de rétro-transcription (Coffin JM, 1979).

Comme toutes les polymérases, la RT initie la rétro-transcription à l'aide d'une amorce. Toutes les RT utilisent pour cela un ARN de transfert (ARNt) de la cellule encapsidatrice. L'ARNt employé varie selon le virus. Par exemples le virus du sarcome/leucémie aviaire (ASLV) se sert de l'ARNt tryptophane (Harada F et al., 1975), le virus du SIDA (HIV) de l'ARNt lysine (Ratner L et al., 1985 ; Jiang M et al., 1993).

Le déroulement de la rétro-transcription se fait selon une série d'étapes bien connues (Gilboa E et al., 1979 ; Varmus HE et al., 1982 et 1985 ; Coffin JM, 1990 ; Whitcomb JM et al., 1992 ; Champoux JJ, 1993 ; Telesnitsky A et al., 1993). Brièvement, la RT polymérise le provirus un brin à la fois, en s'appuyant sur l'ARN génomique qu'elle dégrade au fur et à mesure. Elle doit également « sauter » de l'ARN sur l'ADN nouvellement formé, pour pouvoir générer le second brin d'ADN et compléter les extrémités des LTR. La RT se servira alors de l'ADN nouvellement formé d'abord comme amorce, puis aussi comme gabarit. C'est par cette procédure que le provirus se retrouve plus long que l'ARN génomique, étendu à ses bouts par une partie de LTR. Le provirus n'en est pas moins colinéaire sur le reste de la molécule.

*In vitro*, la RT montre une activité peu fidèle (Battula N et al., 1974 ; Williams KJ et al., 1992 ; Bebenek K et al., 1993). Par là, on entend qu'elle fait de nombreuses erreurs lors de la rétro-transcription. Ce manque de fiabilité est attribué à l'absence d'activité enzymatique de correction des erreurs (« proof-reading

activity ») (Battula N et al., 1976) chez cette enzyme, ainsi qu'à sa propension à reconnaître et utiliser des amorces imparfaites (Perrino FW et al., 1989 ; Bakhanashvili M et al., 1992 ; Pulsinelli GA et al., 1994). La fréquence d'erreurs de la RT est estimée à  $10^{-4}$ , même si cette moyenne est à considérer comme approximative. En effet, l'occurrence des erreurs est sujette à de nombreux facteurs, et il est impossible de déterminer sa valeur exacte (Coffin JM et al., 1997 p143). Cette insuffisance dans la fidélité se retrouve *in vivo*. Un fort taux de mutation permet aux virus de s'adapter rapidement aux changements d'environnements et aux agressions (Katz RA et al., 1990 ; Coffin JM, 1993 et 1995 ; Wain-Hobson S, 1993). La rapidité d'évolution du génome d'un rétrovirus a été évaluée un million de fois plus élevée que celle du génome de son hôte (Gojobori T et al., 1985). Ces informations mettent en évidence l'utilité d'une RT faillible pour le rétrovirus, lui assurant une survie et une agressivité accrues.

Mais si la RT est un atout pour le rétrovirus, elle est tout autant une cible thérapeutique potentielle. En effet, bien que les télomérases usent d'une activité ADN-polymérase ARN-dépendante pour l'entretien des extrémités des chromosomes (Blackburn EH, 1993), aucune fonction biochimique cellulaire n'est comparable à celle de la RT. La particularité étant toujours une cible de choix, des inhibiteurs de RT à visées de traitement ont été développés. Malheureusement, ces médicaments sont souvent toxiques pour le patient, ou leurs effets sont contournés par le virus qui produit des mutants résistants. En synergie avec des inhibiteurs de protéases et différents inhibiteurs de RT, ces molécules produisent toutefois des résultats positifs (Coffin et al 1997 ; chapitre 12).

#### 1.4.3. La re-localisation du provirus au noyau :

L'ADN viral rétro-transcrit doit alors se rapprocher de l'ADN génomique de l'hôte. Après l'entrée dans la cellule, le voyage à travers le cytoplasme jusqu'au noyau est pressenti actif, sans que l'on connaisse vraiment la nature du mécanisme qui pourrait être impliqué (Coffin JM et al., 1997 ; p167-168 ; Katz RA et al., 2003). En effet, la viscosité du milieu cytoplasmique et sa perméabilité laissent à penser que la simple diffusion d'un intermédiaire de réplication rétro-viral est négligeable autant qu'insuffisante (Luby-Phelps K et al., 1987).

Le cytoplasme franchi, le provirus doit encore passer dans le même compartiment que l'ADN cible. Il existe deux cas de figure possible à cette étape. Si l'acide nucléique est incapable de pénétrer de manière active dans le noyaux en interphase (comme c'est le cas pour les *Alpharetrovirus* et les *Betaretrovirus*), il devra attendre la dislocation de la membrane nucléaire lors d'une division cellulaire pour effectuer une translocation passive. Le virus concerné se révèle par conséquent inapte à infecter efficacement une cellule qui ne se divise pas (Roe T et al., 1993 ; Lewis PL et al., 1994).

Cette caractéristique n'est néanmoins pas partagée par les lentivirus. Par exemple, le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) exporte son acide nucléique dans le noyau (Miller MD et al., 1995 ; Bell P et al., 2001), par l'action conjointe de plusieurs protéines dont MA (Bukrinsky MI et al., 1993 ; Karageorgos L et al., 1993) et Vpr, une protéine accessoire du virus (Heinzinger NK et al., 1994). Pour les virus



possédant cette habilité, la réplication dans des cellules hôtes qui ne se divisent pas est possible (Weinberg JB et al., 1991).

#### 1.4.4. L'intégration :

Survient alors l'intégration, autre caractéristique d'importance capitale des rétrovirus qui ne leur est néanmoins pas exclusive. L'intégration du provirus dans le génome de l'hôte est une étape décisive dans la pérennité des rétrovirus et leur réplication. En effet, l'ADN viral est incapable de se répliquer de manière autonome comme le ferait un épisode. Plus encore, il est vite dégradé par la machinerie cellulaire ; dans les jours ou même les heures suivant l'infection (Donehower LA et al., 1984). L'intégration est donc pour le provirus un moyen de se maintenir de manière stable dans la cellule et du même coup être transmis à la descendance cellulaire. Concomitamment, l'intégration à un site adéquat permet aux gènes viraux ainsi qu'au génome viral d'être transcrits efficacement (Jordan A et al., 2003).

L'intégrase (IN), une autre protéine virale, a pour fins de se fixer aux génomes viraux et cellulaire, de les rassembler, et d'incorporer le premier dans le second (Coffin JM et al., 1997 ; Bushman FD, 2001 ; Flint SJ et al., 2004). Pour ce faire, elle doit couper l'ADN de l'hôte, et liguer les extrémités du provirus à celles récemment créées. Il est à noter que si l'intégrase reconnaît spécifiquement les extrémités du provirus (les LTR), elle accomplit l'intégration de ce dernier dans le génome de l'hôte d'une manière non-spécifique.

La sélection du site d'intégration est néanmoins présumée influençable par différents facteurs, et ne serait donc pas entièrement aléatoire. La séquence primaire de l'ADN (Holmes-Son ML et al., 2001), les structures de l'ADN (Katz RA et al., 1998 ; Muller HP et al., 1994), du nucléosome (Pryciak PM et al., 1992), et de la chromatine (Taganov KD et al., 2004 ; Vijaya S et al., 1986), ainsi que l'activité transcriptionnelle (Scherdin U et al., 1990 ; Weidhaas JB et al., 2000 ; Wu X et al., 2003) ont été reportées comme impliquées dans le choix du site d'intégration. Des hypothèses selon lesquelles des protéines engagées dans la transcription cellulaire puissent être utilisées par le complexe d'intégration pour diriger l'insertion rétrovirale ont été émises récemment (Bushman FD, 2003 ; Narezkina A et al., 2004) mais il reste à définir les mécanismes moléculaires s'y référant.

Malgré ces influences, aucun consensus entre les espèces n'a pu être fait sur une éventuelle préférence du site d'intégration des provirus.

#### 1.4.5. La transcription virale :

Une fois intégrés sous la forme d'un provirus, les membres des *Orthoretrovirinae* vont mimer les gènes cellulaires et utiliser la machinerie cellulaire pour exprimer leurs génomes. Les ARN viraux issus de la transcription du provirus sont traités comme les ARNm cellulaires, et sont donc coiffés en 5' et poly-adénylé en 3'. La transcription des ARN viraux est assurée par l'ARN polymérase II de l'hôte (Coffin JM et al., 1997 ; pp205-207). De nombreuses protéines cellulaires vont ainsi participer à l'élaboration des transcrits viraux, ainsi que des protéines virales, dans

certains cas. Par exemple, Tax est une protéine accessoire du HTLV-1, trans-activatrice du promoteur du LTR (Felber BK et al., 1985 ; Sodroski JG et al., 1984).

Toutes les protéines virales sont codées par le provirus, mais pas à partir du même transcrit. A l'instar de nombreux gènes cellulaires, la transcription du provirus abouti à plusieurs transcrits différents, par le truchement de l'épissage différentiel. Là encore, c'est le complexe d'épissage de l'hôte qui se charge de la fonction. Les gènes *gag* et *pro-pol* vont être exprimés via le transcrit de pleine longueur, et *env* à partir d'un transcrit épissé. Les protéines accessoires sont exprimées à partir de ces mêmes transcrits ou d'autres correspondant à des épissages différents (Coffin JM et al., 1997 ; chapitre 6).

#### 1.4.6. La production virale :

La virémie est l'étape finale qui boucle le cycle de vie des *Orthoretrovirinae*. Lorsque les protéines virales ont été produites (la traduction des protéines virales est elle aussi assurée par la machinerie cellulaire), elles s'organisent pour former les particules virales à la membrane de la cellule. Les protéines Gag (MA, CA et NC) sont particulièrement investies dans le processus (Dickson C et al., 1984). Les particules virales ainsi en construction sont immatures. Elles émergent de la cellule hôte productrice par bourgeonnement, ce qui n'entraîne pas la lyse cellulaire et assure une production virale plus régulière et importante. Après avoir quitté la cellule hôte, la particule virale va subir un processus de maturation. Une protéase (PR) clive de manière spécifique les constituants Gag et Pro-Pol qui vont se

réorganiser en un noyau structuré (Vogt VM, 1996). Le virion est alors mature, capable d'infecter une nouvelle cellule.

## 2. Pathogénicité des Orthoretrovirinae

Les rétrovirus sont associés à une large gamme de maladies, affectant une grande variété d'organisme. Néanmoins, seuls les *Orthoretrovirinae* sont pathogènes ; pour une raison qui reste encore à élucider, les *Spumaretrovirinae* ne provoquent pas de maladie chez leurs hôtes.

Il est également intéressant de signaler que l'étude de l'induction tumorale par les rétrovirus a grandement contribué à la compréhension moderne des tumeurs au niveau de la biologie moléculaire (Bishop JM, 1991).

### 2.1. Oncogénèse

Il a été rapporté de nombreux cas de tumeurs associées à l'infection par des rétrovirus chez les animaux, et ce depuis presque cent ans (Ellerman V et al., 1908). Le type des lésions reliées à la présence d'un rétrovirus dépend de l'espèce de ce dernier. Elles sont souvent d'origines mésenchymateuse (sarcomes) ou hématopoïétique (leucémie), beaucoup plus rarement épithéliale (carcinome).

Il est pratique, pour expliquer l'implication des *Orthoretrovirinae* dans l'oncogénèse, de classer ceux-ci en trois grandes catégories : les virus oncogènes

portant dans leur génome un oncogène viral, ceux portant un gène accessoire tumorigène et ceux qui n'en portent pas (les rétrovirus simples).

### 2.1.1. Les oncogènes viraux :

Certains *Orthoretrovirinae* portent dans leur génome un gène capable de promouvoir la transformation cellulaire (Bishop JM et al., 1982). On appelle ce type de gène un oncogène viral et les virus qui les portent des virus transformant ou virus ARN oncogène de classe I.

Il est maintenant admis que ces virus ont procédé à la « capture » (ou transduction) d'un gène cellulaire à potentiel transformant (proto-oncogène ou *c-onc*). La contrepartie virale de ce gène est appelée *v-onc*. Ainsi une excision atypique d'un provirus ou une recombinaison entre celui-ci et le génome de l'hôte peut amener à la production de particules virales porteuses d'une séquence cellulaire altérée (Stehelin D et al., 1976 ; Hanafusa H et al., 1977).

En temps normal, un proto-oncogène possède une fonction normale et utile à la cellule, souvent en rapport avec la régulation du cycle cellulaire. Mais si sa séquence est modifiée adéquatement ou son expression bouleversée (comme par exemple régulée par le promoteur viral), il peut acquérir une activité oncogène.

À l'exception notoire de souches du fameux virus du sarcome de Rous (Rous P, 1911) encore étudié de nos jours, les souches rétrovirales porteuses d'oncogène(s) sont défectives, c'est-à-dire qu'elles ont perdu une partie de leur génome et ne peuvent se répliquer seules dans une cellule hôte. Elles ont besoin pour cela d'être

placées en situation de co-infection avec ce qu'on appelle un virus auxiliaire ("helper"), un rétrovirus proche qui possède lui un génome entièrement fonctionnel (en particulier les gènes structuraux *gag*, *pro-pol* et *env*) et qui infecte les mêmes types cellulaires. Les souches défectives qui ne peuvent produire la totalité des protéines virales requises vont utiliser celles produites par les souches non-défectives pour encapsider leurs génomes et produire leurs particules virales. Les *v-onc* sont souvent de très puissants inducteurs de tumeurs, et la présence d'un rétrovirus auxiliaire de même qu'une réplication virale ne sont pas toujours nécessaires pour déclencher la prolifération incontrôlée de la cellule (Fung YK et al., 1983 ; Green PL et al., 1987 ; Poirier Y et al., 1989).

En dépit de sa nature non défective qui le distingue des autres rétrovirus transformants, le virus du sarcome de Rous (RSV) reste l'exemple cité pour ceux-ci par considération historique (Rous P, 1911). Il est à noter par contre, que le RSV possède également des souches défectives (Goldé A et al., 1966). Il porte donc en sus des gènes structuraux une phase de lecture ouverte nommée *v-src* (Wang LH et al., 1976 ; Brugge JS et al., 1977), porteuse du pouvoir oncogène du RSV et codant pour une protéine Tyrosine kinase : p60<sup>src</sup> (Hunter T et al., 1980). Le gène viral est dérivé d'un proto-oncogène cellulaire : *c-src* (Stehelin D et al., 1976 ; Shalloway D et al., 1981 ; Takeya T et al., 1983). Cette tyrosine kinase est une des pièces maîtresses d'une cascade de signalisation déterminante dans des domaines aussi variés et primordiaux que l'adhésion entre les cellules, la motilité, la survie et la prolifération cellulaires (Martin G, 2001).

Le phénomène de transduction de proto-oncogène par un rétrovirus correspond néanmoins à une série d'aberrations et d'erreurs peu communes. Cela reste un évènement exceptionnel, rarement observé dans la nature et qui n'y constitue pas une cause significative de tumeur (Coffin JM et al., 1997 ; pp502-503). Mais ce type de rétrovirus a joué un rôle de première importance dans l'étude et la compréhension des tumeurs, de par sa capacité à induire les tumeurs rapidement et transformer les cellules *in vitro*, ainsi qu'en permettant d'identifier de nouveaux oncogènes et proto-oncogènes.

#### 2.1.2. Les gènes accessoires transformants :

Il existe également des gènes viraux à action transformante qui ne possèdent pas d'homologie détectable avec des gènes cellulaires. Ceux-là possèdent une activité originale, qui ne détourne pas une fonction cellulaire. Ce sont des gènes accessoires par opposition aux gènes structuraux *gag*, *pro-pol* et *env*, mais ils appartiennent aux génomes sauvages et les lignées qui les portent ne sont pas défectives. Ces gènes ont été découverts plus tardivement et leurs fonctions demandent à être investiguées plus en profondeur. De plus, chacune de ces séquences codantes est un cas particulier, et montre souvent une polyvalence dans leurs fonctions.

L'exemple le plus étudié est certainement celui de la protéine Tax, codée par les virus du groupe HTLV/BLV. Le virus de type 1 de la leucémie humaine des cellules-T (HTLV-1) est l'agent étiologiquement relié à la leucémie des cellules-T chez l'adulte (ATL), une tumeur liquide très agressive (Hinuma Y et al., 1981 ;

Yoshida M et al., 1982 et al. Kalyanaraman VS, 1982 ; Wong-Staal F et al., 1983). HTLV-1 ne charrie pas de *v-onc* dans ses particules virales (Seiki M et al., 1983), et l'étude de la mutagenèse insertionnelle qu'il cause n'a rien révélé de probant (Seiki M et al., 1984). Par contre, HTLV-1 possède une séquence propre aux virus de son genre : *pX*, qui encode trois protéines virales, Tax, Rex et p21<sup>X</sup> (Lee TH et al., 1984 ; Slamon DJ et al., 1984 ; Kiyokawa T et al., 1985). Tax est une protéine multifonctionnelle qui confère aux virus qui la code un très fort pouvoir oncogène (Grassmann R et al., 1989 ; Hinrichs SH et al., 1987 ; Nerenberg M et al., 1987 ; Pozzatti R et al., 1990 ; Tanaka A et al., 1990). Ainsi, Tax influence l'activité transcriptionnelle de certains gènes cellulaires impliqués dans la croissance (Lemoine FJ et al., 2001), et possède également une action post-transcriptionnelle sur des protéines de la cellule, incluant p53 (Cereseto A et al., 1996 ; Pise-Masison CA et al., 1998 ; Suzuki T et al., 1996). Tax est en outre capable d'inhiber le système de réparation de l'ADN de l'hôte (Miyake H et al., 1999), ce qui contribue à l'instabilité génomique de la cellule, et donc facilite l'oncogénèse (Marriott SJ et al., 2002).

### 2.1.3. La mutagenèse insertionnelle :

La tumorigénèse par mutagenèse insertionnelle est de loin la plus courante des trois. De plus, elle s'applique à tous les rétrovirus, de par leur capacité à s'intégrer, y compris à ceux qui portent un gène transformant viral. Par voie de conséquence les deux événements peuvent avoir lieu ensemble et travailler de concert. Les virus oncogènes à ARN qui ne portent pas d'oncogènes viraux dans leurs



génomomes (et donc qui médient la tumorigénèse par mutagénèse insertionnelle) sont dits de classe II ou chroniques. La plupart des tumeurs résultant de l'infection par ces virus touchent les cellules hématopoïétiques, plus rarement les cellules épithéliales. Elles sont décrites comme contribuant de manière significative au nombre des cancers chez le chat (domestique), la souris (en laboratoire) et le poulet (en élevage).

Le processus d'intégration du provirus est intrinsèquement mutagène et ce de plusieurs manières. Ainsi il brise la séquence originale de la région touchée, et introduit des éléments-*cis* de régulation d'expression et d'épissage. Un provirus s'insérant à proximité d'un gène impliqué dans la croissance ou la différenciation cellulaires, peut dérégler l'expression de ce proto-oncogène et ainsi initier la tumorigénèse. De même, un provirus s'intégrant dans la région d'un gène suppresseur peut muter celui-ci et amoindrir sa fonction, participant ainsi à la transformation cellulaire.

Les cas de proto-oncogènes impliqués par mutation insertionnelle dans l'étiologie des cancers ne manquent pas chez les animaux (Coffin JM et al., 1997 ; pp486-491). Par exemple, *c-myc* est un facteur de transcription très souvent touché par ce type de mutagénèse lors du développement d'un lymphome causé par l'infection d'un virus de la leucémie aviaire (ALV) (Hayward WS et al., 1981 ; Payne GS et al., 1981).

On peut également citer p53, le « gardien du génome » (Lane DP, 1992), comme un suppresseur de tumeur touché couramment par la mutagénèse insertionnelle des rétrovirus comme le virus de la leucémie murine (MLV) (Wolf D et al., 1984 ; Ben David Y et al., 1988).

Le choix du site d'intégration d'un provirus est un événement aléatoire. De plus, les insertions ayant un pouvoir transformant sont des événements rares. Cela explique le long temps de latence d'apparition de ce type de tumeurs après l'infection. En effet, contrairement aux cas de transductions, le processus n'est pas direct, et demande de nombreuses modifications génomiques, agissant de concert sur les mécanismes de contrôle de la croissance cellulaire (Li J et al., 1999). Par conséquent, plus le nombre de cellules infectées est élevé, et plus les chances sont fortes que les mutations à potentiels oncogènes appropriées aient lieu. Les rétrovirus simples qui causent fréquemment des tumeurs sont donc ceux capables de causer une virémie intense chez un hôte approprié. L'évolution de la maladie se fait en plusieurs étapes mais elle peut prendre un caractère malin très agressif. Cette évolution progressive de la tumorigénèse implique le caractère clonal des mutations importantes.

## **2.2. Autres pathologies causées par les rétrovirus**

Les autres pathologies causées par les rétrovirus intéressent moins le présent mémoire, mais ne sont pas triviales pour autant.

Les syndromes d'immunodéficiences acquises sont ainsi reportés chez la souris, le chat et les singes et les primates. Le syndrome de l'immunodéficiences acquise humaine (SIDA), causée par le lentivirus HIV, constitue une préoccupation majeure de la médecine moderne. Les rétrovirus impliqués dans le développement de ces syndromes peuvent être simples (e.g. virus de la leucémie féline FeLV) ou au

contraire porter un oncogène viral (e.g. RSV) ou même plusieurs gènes accessoires (e.g. HIV). C'est en infectant les cellules du système immunitaire et en les détruisant que ces virus sapent les défenses de l'hôte (Coffin et al 1997 ; chapitre 11).

On dénombre aussi plusieurs maladies du système nerveux central reliées aux rétrovirus chez les mammifères, incluant des encéphalopathies, des encéphalomyélites, des dégénération astrocytaires ainsi que des cas d'hémorragies intracérébrales. Les rétrovirus ont également été rapportés comme étant impliqués dans des cas d'anémie chez le cheval et le chat, d'arthrite, de pneumonie et de mammite chez la chèvre et le mouton, de maigreur pathologique et ostéopétrosis chez le poulet (Coffin et al 1997 ; chapitre 10).

### **3. Le virus du sarcome dermique de doré (WDSV)**

#### **3.1. La tumeur**

Le sarcome dermique du doré (walleye dermal sarcoma ou WDS) est une tumeur mésoenchymateuse du doré (ou doré jaune ou walleye ou *Stizostedion vitreum vitreum*) qui a d'abord été remarquée au lac Oneida à New York (Walker R, 1969) puis ailleurs au Canada (Yamamoto T et al., 1976 et 1988). Les premiers observateurs de la lésion ont pu remarquer une très forte incidence sur 27% des adultes à la fin de l'automne au lac Oneida (Poulet FM et al., 1994). Plus intéressant encore est le cycle saisonnier d'apparition et de régression de la tumeur (Bowser PR et al., 1988). En effet, fréquemment observables durant la fin de l'automne et au

printemps, les lésions ne sont que rarement visibles en été. De même, une réponse inflammatoire a été associée aux tumeurs durant le printemps et l'été, mais se révèle indétectable durant l'automne lorsque le nombre des tumeurs augmente. La fréquence des lésions n'a pas été étudiée durant l'hiver en raison de la glaciation des plans d'eau dans les régions concernées.

Une étude plus large des tumeurs a été réalisée en 1990 (Martineau D et al., 1990b), approfondissant la description de celles-ci. Ainsi les lésions sont-elles externes, nodulaires, d'un diamètre de 2 à 5 mm (FIG.1H). Elles présentent très fréquemment une distribution multifocale (c'est-à-dire plurielle), et sont réparties en groupes sur la peau du poisson.

Les lésions ne sont pas encapsulées, mais gardent une démarcation nette vis-à-vis des tissus sains environnants, qu'elles repoussent à mesure de leur croissance (FIG.1G). La provenance des tumeurs est dermique, l'épiderme restant parfois intact et couvrant ces dernières. Les lésions prennent assise sur l'écaille, mais le type cellulaire infecté à l'origine demeure incertain (ce pourrait être la première couche des cellules sur l'écaille ou les fibroblastes présents dans la couche profonde du derme). Le centre de la tumeur est très souvent nécrotique. Des plages de nécrose sont aussi observées aux sites d'infiltration massive de lymphocytes.

Au sein même de la tumeur, les cellules néoplasiques affichent une répartition désordonnée. Une variation dans le degré de néoplasie est également observée allant des cellules de type fibroblastique, plus différenciée avec un rapport noyau-cytoplasme normal, jusque des cellules plus néoplasiques, souvent regroupées et présentant des noyaux de taille et d'aspect varié de caractère anaplasique. La tumeur

est également formée d'une matrice de collagène qui emplit l'espace intercellulaire de manière inégale. On peut parfois noter au sein de cette dernière la présence de fines spicules de matrice osseuse.

Le point le plus important confirmé par cette étude concerne l'absence d'invasion sur les sites tumoraux et à plus forte raison de métastase chez les poissons infectés (Martineau D et al., 1990b). Par contre, lors d'expérimentation de transmissions de la maladie à des alevins, des comportements invasifs des lésions obtenues ont pu être observés à plusieurs reprises (Earnest-Koons K et al., 1996). Malgré les caractéristiques histologiques malignes décrites plus haut et à cause de son comportement biologique, le WDS est donc une tumeur bénigne. Ce principe est appuyé par la régression saisonnière de la tumeur, au printemps (Bowser PR et al., 1988).

Enfin, le virus du WDSV a été mis en évidence comme étant l'agent étiologique de la lésion, d'une part par sa présence dans les cellules tumorales (Martineau D et al., 1991 et 1992), par la transmission de la maladie à des alevins de doré, à l'aide d'un homogénat acellulaire filtré de tumeur (Martineau D et al., 1990a) et par l'apparition de tumeurs de la peau semblable au WDS chez des souris transgéniques pour un gène accessoire du WDSV (Lairmore MD et al., 2000).

### **3.2. Le virus**

Morphologiquement, le WDSV fut d'abord classé parmi les rétrovirus à virion de type C (Walker R, 1947 ; Walker R, 1969) (FIG.1F). Avec l'avènement de

la caractérisation et de la philologie génétiques et l'analyse des virus oncogènes des poissons, il est devenu évident que ces derniers échappaient à la classification établie (Holzschu DL et al., 1995). Un septième genre, nommé *Epsilonretrovirus* a donc été créé pour le WDSV (Pringle CR, 1998). La taxonomie du WDSV s'établit donc comme tel : *Virus rétro-transcrit*, il fait partie en tant que rétrovirus de la famille des *Retroviridae*. Au sein de la sous-famille des *Orthoretrovirinae*, il constitue un membre du genre nouvellement formé des *Epsilonretrovirus*.

Le WDSV possède un génome de 12.7 Kb (Martineau D et al., 1992) (le plus long des rétrovirus) et peut être décrit comme un rétrovirus oncogène et complexe. Oncogène signifie que le développement de la tumeur est associé à sa présence dans le tissu affecté (Walker R, 1969 ; Yamamoto T et al., 1976 et 1988 ; Martineau D et al., 1991 et 1992). Le caractère complexe du virus se rapporte à l'inclusion de trois gènes accessoires dans son génome, en plus des gènes structuraux *gag*, *pro-pol* et *env*. Ces trois phases de lecture ouverte (Orf) sont simplement nommées *orf A*, *orf B* et *orf C* (Holzschu DL et al., 1995). Tous les gènes du virus sont présents chez la souche sauvage ce qui fait du WDSV un des seul rétrovirus oncogène complexe non-défectif. *orf A* et *orf B* prennent place en aval de *env*, tandis que *orf C* s'insère entre le LTR 5' et *gag*, place unique chez les rétrovirus pour un gène accessoire (Holzschu DL et al., 1995).

C'est l'ARNt de l'histidine qui est utilisé pour initier la rétro-transcription (Holzschu DL et al., 1995).

### 3.2.1. Les gènes accessoires et leurs patrons d'expression

En accord avec l'évolution saisonnière de la tumeur, le patron d'expression du provirus ainsi que la production virale changent au cours de l'année de manières quantitative autant que qualitative. Ainsi un homogénat acellulaire de tumeur est-il capable de transmettre la maladie à des alevins de doré si la lésion a été prélevée au printemps (Bowser PR et al., 1990 et 1996 ; Martineau D et al., 1990a), alors que cela se révèle impossible lorsqu'on utilise un inoculat de lésion prélevée en automne (Bowser PR et al., 1996). Ces résultats suggèrent une production virale au printemps uniquement. En concordance, il a été observé qu'à partir du printemps, lors de la régression tumorale, les cellules néoplasiques présentaient de 10-50 copies d'ADN viral pour la plupart non-intégrées ce qui n'est pas le cas en automne (Bowser PR et al., 1996 ; Martineau D et al., 1991 et 1992). Finalement, l'étude des transcrits viraux corrobore ces observations, puisque le transcrit viral génomique (donc de pleine longueur 12.7kb) n'est exprimé que lors de la régression tumorale, au printemps (Bowser PR et al., 1996 ; Quackenbush SL et al., 1997). Le transcrit épissé correspondant au gène structural *env* (7.4kb) suit le même schéma d'expression.

#### 3.2.1.1. orf A

*orf A* est le gène accessoire du WDSV le plus étudié. Il est exprimé par six transcrits sub-génomiques, épissés selon des tailles allant de 2.4 à 3.3kb (Bowser PR et al., 1996 ; Quackenbush SL et al., 1997 ; Rovnak J et al., 2001). Ces ARN sont

aussi bien détectés en automne qu'au printemps, mais présents en des quantités au moins 100 fois plus importantes dans les tumeurs en régression au printemps que dans les tumeurs en développement à l'automne (Quackenbush SL et al., 1997). Cependant, le transcrit A1, de taille 3.3kb et comprenant l'orf A de pleine longueur ainsi que la partie 3' du gène *env*, est lui détecté uniquement dans les tumeurs en développement (automne) et constitue alors le transcrit de l'*orf A* le plus abondant (Rovnak J et al., 2001). Ensemble, ces observations suggèrent que les différents ARN codés par *orf A* sont impliqués à la fois dans le développement et la régression tumorales.

Également, les 112 premiers aa codés par le transcrit A1 de *orf A* ont été désignés comme dirigeant la protéine dans le noyau de la cellule (Rovnak J et al., 2001). En contraste, les transcrits A3 à A5 codent pour des protéines tronquées qui restent domiciliées dans le cytoplasme.

La découverte la plus intéressante au sujet de *orf A* est sans conteste son homologie distante avec les cyclines D humaines (LaPierre LA et al., 1998). Les cyclines cellulaires, en association avec les kinases cycline-dépendante, entraînent la progression du cycle cellulaire au niveau du passage du point de contrôle G1 vers S (Sherr CJ, 1995 et 1996). Le dérèglement de l'expression de la cycline D humaine a été impliqué dans certains cas de cancers humains (Jiang W et al., 1992 ; Lammie G et al., 1991 ; Motokura T et al., 1991). Il a été en outre rapporté que l'intégration du virus de la leucémie murine (MLV) aux locus des cyclines D1 (*Fis1*) et D2 (*Vin1*),



était responsable d'un lymphome des cellules T (Mucenski ML et al., 1987 ; Tremblay PJ et al., 1992).

Le cycle d'une levure déficiente en cycline a pu également être complété à l'aide de *orfA*, appelé à cette occasion cycline rétrovirale (rv-cyclin) (LaPierre LA et al., 1998). Dans cette expérimentation, une levure (*S. cerevisiae*) à laquelle il manque les cyclines de l'étape G1 du cycle cellulaire (les gènes *Cln*) est transformée à l'aide d'un vecteur plasmidique contenant la séquence d'*orf A* sous contrôle d'un promoteur inductible par le galactose. Les cellules ainsi ingénierées poussent sur milieux contenant du galactose (lorsque *orf A* est exprimé donc) mais ne développent pas de colonie sur milieu sans galactose.

Ultérieurement, il a été déterminé que les 49 acides aminés (aa) de la partie N-terminale de *orf A* étaient similaires dans leur séquence à la première boîte cycline de la cycline A humaine. Le peptide exprimé est en outre capable d'inhiber certains promoteurs eucaryotes de manière non-spécifique, ainsi que la croissance de cellules mammifères ou de poisson (Zhang Z et al., 1999b). Le paradoxe ainsi soulevé par les résultats apparemment contradictoires des deux études de LaPierre LA et Zhang Z a déjà pu être observé chez la cycline A humaine, reconnue comme impliquée dans la formation de cancer (Brechot C, 1993) comme dans l'apoptose (Hoang A et al., 1994 ; Meikrantz W et al., 1994).

Enfin récemment, la cycline rétrovirale a été reconnue comme inductrice de tumeurs de la peau présentant des points communs avec le WDS chez des souris transgéniques (Lairmore MD et al., 2000). Le gène accessoire *orf A* est donc

vivement soupçonné d'être l'un des principaux agents responsables de la tumorigénèse des cellules infectées.

#### 3.2.1.2.orf B

A l'instar de *orf A*, *orf B* est exprimé à partir d'un ARNm épissé, de 1.8kb et unique. De la même manière, il est détectable au printemps dans une forte proportion comme tous les autres transcrits viraux, mais également faiblement en automne, avec le transcrit A1 de 3.3kb de *orf A*, alors que les autres transcrits viraux manquent à cette période (Bowser PR et al., 1996 ; Quackenbush SL et al., 1997).

La fonction de *orf B* et de la protéine qu'il code demeure inconnue. La seule information relative à ce sujet est le lien distant qui relie la protéine issue de *orf B* à celle codée par *orf A* (LaPierre LA et al., 1999). Cette information suggère qu'*orf B* est issu d'une duplication du gène *orf A*.

#### 3.2.1.3.orf C

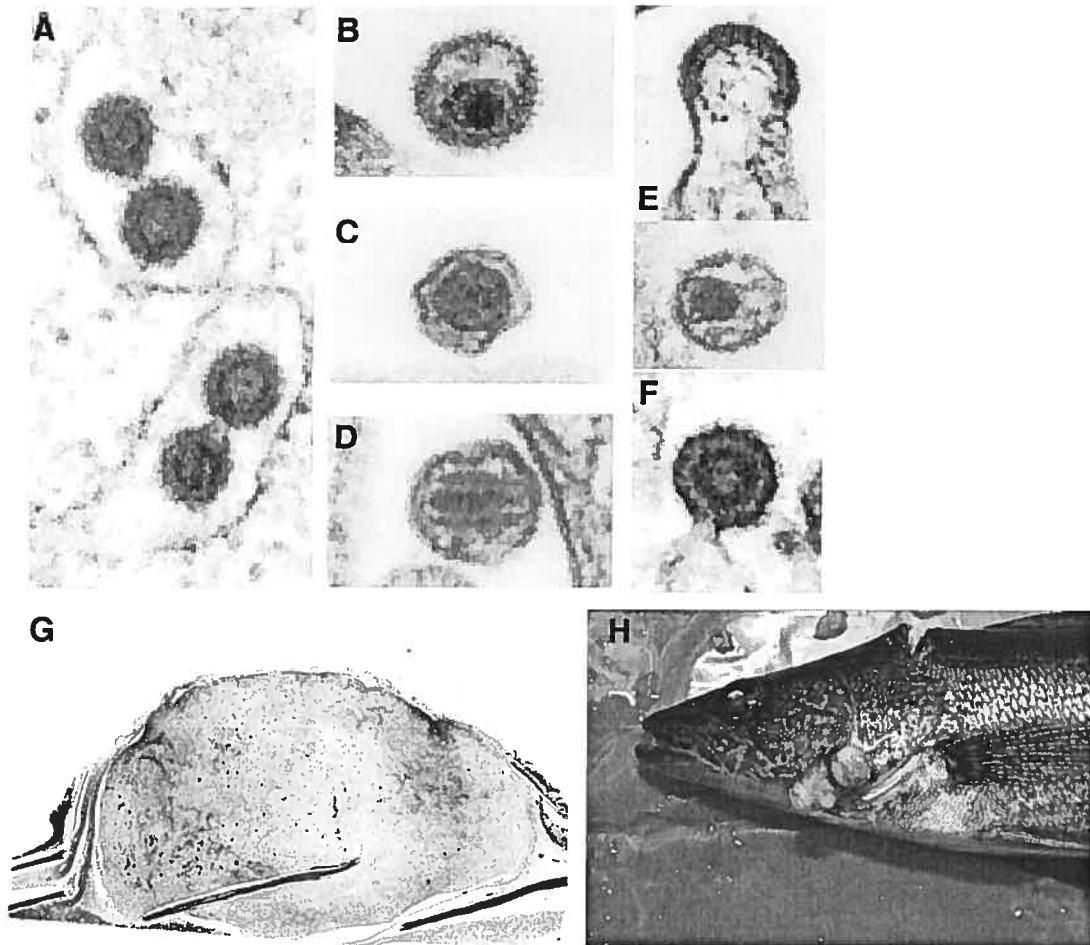
Comme déjà discuté dans la section 1.3., le gène *orf C* se distingue des autres gènes accessoires rétroviraux de par la place qu'il occupe dans le génome. Ainsi, dans le monde des rétrovirus, il constitue la seule phase de lecture de taille conséquente connue (environ 130 aa) à s'insérer entre le LTR 5' et *gag* (Holzschu DL et al., 1995).

Contrairement aux deux autres gènes accessoires du WDSV, *Orf C* est exprimé à partir du transcrit de pleine longueur non épissé. L'ARN génomique est uniquement exprimé au printemps, dans les tumeurs en régression, en quantité élevée (Bowser PR et al., 1996 ; Quackenbush SL et al., 1997). La protéine prédite en fonction de la séquence nucléique se révèle composée de 120aa, pour un poids moléculaire de 14.1kDa. Aucune homologie avec *orf C* n'a été découverte à ce jour (LaPierre LA et al., 1999). Un domaine WW putatif a cependant été décrit (WX<sub>42</sub>YX<sub>36</sub>WX<sub>33</sub>W), présumant une interaction avec des domaines riches en proline (LaPierre LA et al., 1999).

Une étude récente a grandement aidé à la compréhension du rôle d'Orf C (Nudson WA et al., 2003). En plus de vérifier la présence de la protéine dans les tumeurs en régression, la fonction de la protéine a été grandement éclairée. Localisée aux mitochondries, Orf C est associée à l'apoptose et serait impliquée dans la désorganisation du potentiel membranaire des organelles. Ce phénomène est connu comme déclencheur du relargage de la cytochrome c, évènement relié étroitement à la mort cellulaire programmée. Ainsi, comme il a été suggéré auparavant (Bowser PR et al., 1996 ; Martineau D et al., 1992 ; Quackenbush SL et al., 1997), la régression du WDS serait au moins en partie causée par apoptose, un mécanisme ici médié par Orf C (Nudson WA et al., 2003).

### **3.3. Les mécanismes de l'oncogénèse chez le WDS**

Si les avancées décrites ci-dessus permettent une vision plus claire du processus de tumorigénèse impliqué dans le sarcome dermique du doré, celui-ci demeure incomplet. Ainsi l'implication de la protéine Orf A dans le développement tumoral est plus que probable en regard à son activité cycline. Mais cette seule protéine accessoire ne peut pas expliquer entièrement le phénomène. Il est maintenant bien établi que la cancérisation requiert des événements multiples (Malumbres M et al., 2001). Si de telles études ont déjà porté leurs fruits chez d'autres rétrovirus, l'analyse des sites d'insertions des provirus n'a jamais été effectuée chez le WDS.



**FIG.1 : Illustrations**

A-F : Microscopies électronique en coupe mince de virions rétroviraux.

Photos A-E tirées et adaptées de *Retrovirus* (Coffin JM et al., 1997). (A) Particules intracisternales de type A dans le réticulum endoplasmique. (B) Particule de type B (MMTV), (C) Particule de type C (MLV). (D) Particule de type D (M-PMV). (E) Lentivirus (BIV ; en haut : en bourgeonnement ; en bas : particule extracellulaire mature). (F) Particule virale du WDSV (Daniel Martineau). (G) Coupe d'un nodule de sarcome dermique de doré (Daniel Martineau). (H) Vue macroscopique d'un sarcome dermique de doré (Daniel Martineau)

**MATERIEL, METHODES  
ET RESULTATS**

## Alterations of calpain expression in Walleye dermal sarcoma, a retrovirally-induced tumour

KEY WORDS : insertional mutagenesis, aberrant splicing, tumor, calpain, tumor suppressor, fishes.

Arnaud Duval<sup>1</sup>, Daniel Martineau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dép. Microbiologie et Pathologie ; Faculté de Médecine Vétérinaire (FMV), Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

## ABSTRACT

Walleye dermal sarcoma virus (WDSV) is a piscine complex retrovirus, first member of the retroviral Epsilonretrovirus genus. WDSV is etiologically associated with a benign skin tumour, walleye dermal sarcoma (WDS), which develops and regresses on a seasonal basis. The WDSV genome contains a cyclin-like gene (*orf-A*) which has been involved in tumor development. However, even the strong growth signals provided by viral oncogenes are not sufficient to transform primary cells. For this, the expression of other oncogenes or the loss of function of tumor suppressor genes is required. Thus in addition to *orf A*, WDS development oncogenesis may be mediated by an additional pathway.

We characterized 89 proviral insertion sites in 19 tumors out of 26 using a PCR based method. Seven integrations occurred in a calpain-like gene in 3 tumors. In addition, RT-PCR analysis of tumor mRNA showed frequent and different aberrant splicing of this gene in 18 tumors out of 25 (72%). Aberrantly spliced transcripts showed new stop codons and thus coded theoretically for truncated proteins. Considered together, these observations suggest that the loss of calpain function contributes etiologically to the development of WDS. This is consistent with the role of calpain as a tumor suppressor gene.

**KEY WORDS** : aberrant splicing, calpain, fishes, insertional mutagenesis, tumor suppressor genes.



## INTRODUCTION

Walleye dermal sarcoma virus (WDSV), the first member of the retroviral genus *Epsilontretroviruses* (17), causes walleye dermal sarcoma (WDS), a seasonally regressing tumour restricted to skin. The high prevalence of WDS in adult walleyes in some North American lakes is probably due to elevated host density and reduction of biodiversity in those lakes (22).

Retroviruses transform cells through several major mechanisms: insertional mutagenesis, oncogene transduction, and oncogenic viral proteins. The WDSV genome contains accessory genes of which *orf-A*, a cyclin-like gene, most likely contributes to the transformation of dermal cells based on the following observations: *orf-A* complements a cyclin-deficient yeast mutant (9) and causes skin hyperplasia and tumours in transgenic mice (8). Even the strong growth signals provided by cellular oncogenes transduced by retroviruses or the weaker signals given by viral oncoproteins are most often insufficient to transform primary cells and/or to ensure tumor progression. In addition to these stimuli, the inappropriate expression of other oncogenes or the loss of function of tumour suppressor genes is required (13).

Calpains are a large family of cystein proteases activated by the elevation of intracytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. Fourteen calpain members have been characterized in humans, one of which, calpain 9 (nCL-4), is functionally described as a tumour suppressor gene (12).

Here we report proviral insertions within a calpain-like gene and the presence of aberrantly spliced transcripts in most tumours that we analyzed. These findings are

consistent with this walleye calpain functioning as a tumour suppressor gene, and suggest that calpain insufficiency is involved in WDSV-induced tumorigenesis.

## MATERIAL AND METHODS

**Sample preparation.** Tumours were harvested from Oneida Lake, near New York on April 13<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup>, 1996 (except for Tumour D in April 1996). Normal skin samples were collected on September 28<sup>th</sup> 1994, near Quebec City, Canada, and liver samples were collected in July 2000 (except for Liver A in July 2002) from walleyes. Genomic DNA (gDNA) samples were obtained by grinding tissue in nitrogen and then using Blood and Cell culture DNA Maxi Kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). Extraction of total RNA was carried out using Trizol Reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) method after grinding tissue in nitrogen. The quality of nucleic acid samples was verified by spectrophotometer analysis and agarose/EtBr gel electrophoresis for DNA and agarose/formaldehyde/EtBr gel electrophoresis for RNA.

**Characterization of walleye calpain sequences.** A walleye calpain-like gene (in submission : bankit748306 + bankit735345) was characterized by PCR, and PCR genome walking (BD GenomeWalker kit, CloneTech, Mountain View, CA). The corresponding cDNA (in submission: bankit735333) was characterized by RT-PCR and 3'RACE (Invitrogen).

**Characterization of proviral insertion sites.** A multi-step PCR method for cloning the host-LTR junctions was slightly modified (19).

Proviral insertion sites were characterized in 26 tumours as follows. A first PCR was performed on non-digested genomic DNA (gDNA) (500 ng/reaction) using a biotinylated LTR-specific primer (LSP3) and a flanking primer (FP1, 2, 3 or 4), with fixed ends and seven internal degenerated nucleotides. This flanking primer hybridizes within a statistically defined range in the template. A first magnetic beads-based purification separated the LTR-specific cDNA. The second PCR used a nested LTR-specific primer (LSP4) and a biotinylated primer (FSP) that anneal to the 5' tail-FP sequence, using 2  $\mu$ L of the purification product as template. A second purification segregated products amplified with FP primers. The last step consisted of two PCR reactions per sample, both carried out on 2  $\mu$ L of purified product. The first reaction used the same 5' tail-FP specific primer without biotin (FSP S) and nested LTR-specific primer; The second reaction used FSP S and a third nested LTR-specific primer (LSP S2), again using 2  $\mu$ L of the second purification product as a template.

The PCR-reaction products were migrated on 1.2% agarose/EtBr gel, and products were cloned in pGEM-T<sub>EASY</sub> (Promega, Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada) or TOPO-TA (Invitrogen) system. Resulting clones were sequenced on an automatic sequencer (ABI Prism 3100, Applied Biosystems, Foster City, CA) at Laboratoire de synthèse et d'analyse d'acides nucléiques (Université Laval de Québec, Sainte-Foy, Canada) or at GenomeQuebec Innovation Centre (University McGill, Montreal, Canada).

PCR reactions were carried out in a 50  $\mu$ L reaction volume containing 60 mM Tris-SO<sub>4</sub> (pH=8.9), 18 mM NaSO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.25 mM (each) deoxynucleoside

triphosphates, 0.5  $\mu\text{M}$  of the specific primers, 1.5  $\mu\text{M}$  of flanking primer (in the first PCR) and 2 U of Platinum DNA Taq polymerase HiFi (Invitrogen) using a Tgradient machine (Biometra GmbH i. L., Goettingen, Germany).

The first PCR step was 94°C for 3 min followed by 40 cycles (94°C for 30 s, 68°C to 60°C (-1°C/cycle) for 1 min and 68°C for 2.5 min) ended by a final extension at 68°C for 10 min. The second and third PCR-reactions used the same program except for the annealing temperature (70°C decreased 1°C/cycle to 62°C).

Database searches were done by the Blast algorithm (National Center for Biotechnology Information ; expect : 1000 ; word size : 7). Since FP can also anneal to the provirus, a part of WDSV could be amplified. Analysis was performed using DNASIS software (V2.0 ; Hitachi Software Engineering Co), to compare sequences with each other, with WDSV (accession NC\_001867) and with the walleye calpain-like gene.

**PCR on genomic DNA.** Two-step nested PCR was performed using gDNA (180 ng by reaction) for tumours 11, 13 and 23. Nested PCR used diluted (1/20) first PCR products as template. PCR reactions were carried out in a 50  $\mu\text{L}$  reaction volume containing 20 mM Tris-SO<sub>4</sub> (pH=8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM (each) deoxynucleoside triphosphates, 0.2  $\mu\text{M}$  of each primer and 2 U of Platinum DNA Taq polymerase (Invitrogen). Both PCR programs were 94°C for 3 min followed by 40 cycles (94°C for 30 s, 72°C to 64°C (-1°C/cycle) for 1 min and 72°C for 2.5 min) ended by a final extension at 72°C for 10 min (Table 1 ; Fig 1).

**Probe preparation.** Probes for Southern and Northern analysis were polymerized by PCR reactions and purified with QIAQuick Gel Extraction Kit (QIAGEN). The calpain probe used for Southern blots was synthesized using the primer pair Calp2Fr-Calp2Bk (Table 1) with walleye liver gDNA as a template; LTR Southern blot probe was synthesized using the primer pair LTR FO-LTR BA2 with tumour gDNA (Tumour D) as template; the calpain probe employed for Northern blot analysis was synthesized using the primer pair GW INT6-Calp2Fr with a plasmid that carry whole cDNA sequence of walleye calpain cDNA from RT-PCR carried out on walleye liver total RNA as template.

**Southern blot.** Southern blotting was done by standard method (18). 10 µg of gDNA from each tissue were digested by 500 U of concentrated *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III and *Xba*I (New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada) in separate vials for 20 hours. The samples were migrated in TBE on a 0.8% EtBr/agarose gel, at 5 V/cm overnight, DNA was blotted and UV-crosslinked onto a Hybond N+ nylon membrane (Amersham, Baie d'Urfé, QC, Canada) (18). Probes were synthesized by PCR and [ $\alpha^{32}$ P]-labelled with a random primed labelling kit (Roche, Laval, QC, Canada). Hybridization was performed in rolling tubes as described (18) using QuikHyb Hybridization Solution (Stratagene, Cedarlane, Hornby, ON, Canada). After stringent washes, blots were exposed on films (Kodak Biomax MR film, VWR Canlab, Mont-Royal, QC, Canada). Southern blot analyses were performed on gDNA from 26 tumours and 7 walleye livers. Membrane hybridized with the calpain probe were stripped and hybridized subsequently with the LTR probe.

**Northern blot.** Northern blotting was done by standard method (18). 20  $\mu\text{g}$  of total RNA were loaded (except for two normal skin tissue samples W1p and W4p : 10  $\mu\text{g}$ ) on 1.5% agarose/formaldehyde gel and migrated in MOPS buffer, at 5 V/cm for 3 hours. RNA was blotted onto a Hybond N nylon membrane (Amersham). Transfer and hybridization were performed as for Southern analyses.

Northern blot manipulations were performed on RNA samples extracted from 4 normal skin tissues and 8 tumours.

**RT-PCR.** RNAs were treated with DNase I (DNA-free<sup>TM</sup> DNase Treatment & Removal Reagent ; Ambion, Cedarlane, Hornby, ON, Canada) and reverse-transcribed using SuperScript II<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System (Invitrogen) with random hexamers. Then, the RNA was degraded with RNase H (2 U/reaction) (Invitrogen), 37°C for 20 min. For each sample, one reaction with RT and one reaction with DEPC-water replacing RT were carried out. For each RT experiment, an additional negative control reaction, without template, was also performed.

2  $\mu\text{L}$  of RT product were used as template for PCR (94°C for 3 min, followed by 36 cycles, 94°C for 30 s, 60°C to 52°C (-1°C/cycle) for 1 min and 68°C for 2.5 min) ending with an extension step (68°C for 10 min). RT-PCR products were analysed on 1.2% agarose/EtBr gel, cloned and sequenced as above.

RT-PCR qualitative analysis was performed on RNA samples extracted from 5 normal skins (W5p reaction was performed 6 times) and 25 tumours. Tumours and W5p products were sequenced.

## RESULTS

**Characterization of a walleye calpain-like gene.** The calpain-like gene mRNA (in submission : bankit735333) was 2106 bp from ATG to TGA and consisted of 21 exons. Genomic DNA (in submission : bankit748306 + bankit735345) was completely sequenced except for intron 14-15 which consisted of extended TA and GT repeats over 1.1 kb. The characterized 5' and 3' region were 10677 bp and 3394 bp respectively.

**WDSV provirus integrates within the calpain-like gene.** The combination of PCR/purification and nested PCR methods identified a total of 95 different insertion sites in 19 tumours. Flanking host sequences ranged from 11 bp to 1242 bp. All insertions characterized by the PCR/purification method took place at different sites except for tRNA glycine (2 insertions) and a calpain-like gene (7 insertions). There was no known oncogene. The integrations within the calpain-like gene occurred in 3 different tumours. Three insertions in the forward orientation were detected in tumour 11 in introns 9-10, 10-11 and 11-12. An insertion was detected in tumour 13 in intron 10-11 in the opposite orientation. Three insertions were detected in Tumour 23 in introns 10-11 and 14-15 in the forward orientation and one insertion was detected in Tumour 23 in intron 19-20 in the opposite orientation (Fig. 1).

Southern blot analysis showed no alterations in calpain hybridization patterns except for T23 which showed a faint single additional band in tumor DNA digested with *HindIII* and *XbaI* (2.3 and 3.1 kb, respectively (Fig.2A)). These additional bands were detected by

both calpain and LTR probes, confirming provirus insertion within the calpain-like gene in that tumor.

**Presence of aberrantly spliced calpain transcripts in tissues.** Normal skin and tumors as groups showed different RT-PCR patterns (Fig. 2C). Normal skin samples showed no more than two different calpain-like transcripts: the correctly spliced transcript (2180 bp) in all samples and a 2050 bp aberrantly spliced transcript (not sequenced) in 2 of the 4 normal skin samples. Tumour samples showed one to 4 bands, whose sizes ranged from 2.0 to 2.4 kb : tumour T10 showed the correctly spliced transcript with one aberrantly spliced transcript (2388 bp); T11 showed the correctly spliced transcript with 3 aberrantly spliced transcripts (2057 bp, 2262 bp and 2444 bp); T12 showed one aberrantly spliced transcript (2222 bp) without the correctly spliced transcript; T17 showed the correctly spliced transcript with one aberrantly spliced transcript (2366 bp); T19 showed the correctly spliced transcript only; T23 showed one aberrantly spliced transcript (2114 bp) without the correctly spliced transcript. In contrast, the RT-PCR product for cytokeratin (825 bp) used as control consisted of a single band in all tissues analyzed (Fig. 2C).

Five correctly-spliced identical transcripts and a single transcript with two aberrant splicing features (intron 13-14 was not spliced out and exon 18 was skipped, which resulted in the formation of a new stop codon at bp 1569 in exon 13) were cloned and sequenced from normal skin RNA (W5p).

Overall, thirty-six calpain-like cDNA were sequenced from 25 tumours of which 25 cDNAs were aberrant. Seven tumors (28%) showed only the correctly spliced, 2.180 kb,



calpain-like coding sequence. Four tumours (16%) showed both the correctly and aberrantly spliced transcript and 14 tumours (56%) showed one to three aberrantly spliced transcripts and no correctly spliced transcript.

Insertions of intron sequences were observed between exons 1-2, 4-5, 7-8, 8-9, 15-16 and 18-19, and ranged from 4 bp to entire introns (intron 18-19). Exon skipping was partial (exon 15, 10 bp and 54 bp) or complete (exons 9, 15, 16 and 18). Different combinations of insertions of intron sequences and exon skipping were observed (Fig. 3). Insertions of intron sequences occurred most often between exons 4 and 5 (10 occurrences) and between exons 8 and 9 (10 occurrences). The exons most frequently skipped were exon 9 (4 occurrences), exon 15 (5 occurrences) and exon 18 (9 occurrences, of which one occurred in normal skin). Except for a transcript in tumor 3, the new stop codons formed by the aberrant splicing junctions were irregularly distributed over the transcript.

**Calpain transcripts.** In addition to the expected calpain-like 2.3 kb transcript, Northern blot analysis of normal skin showed the presence of one to three longer transcripts (3.0, 4.7 and 6.4 kb) whose relative abundances varied between samples. In tumors in contrast, the 2.3 kb transcript was uniformly the most abundant transcript. (Fig.2 B).

## DISCUSSION

The integration of retroviral DNA within tumour suppressor genes can contribute to tumorigenesis. For instance, Murine leukemia virus (MuLV) integrates within the two alleles of NF-1 in BXH-2 mice, contributing to the very high incidence of myeloid leukemia seen in that strain (2). Integration of Friend murine leukemia provirus in both alleles of p53 may lead to the complete lack of p53 expression. In turn, these alterations contribute to the development and progression of erythroleukemia in infected mice (10). Calpain 9 (nCL-4), normally expressed in stomach, is expressed at abnormally low levels in human gastric cancers. The tumor suppressor function of this calpain has been further documented experimentally in a rodent model system using retroviral integration as part of an antisense RNA approach to identify genes whose inactivation leads to cellular transformation (12).

The insertion of retroviruses within the host genome is generally random allowing for preferences for transcribed regions shown by lentiviruses and preferences for promoter regions shown by *Gammaretrovirus* such as murine leukemia virus (MLV) (21). Thus the integration of WDSV within the same gene in 3 of 26 tumours strongly supports the hypothesis that the walleye calpain-like is involved in the etiology of WDS. Based on these results, we expected to observe rearrangement of this gene by Southern blot analysis. Surprisingly, rearrangement was observed in only one of the three tumours (T23) (Fig.2A). This apparent lack of rearrangement could be explained by the deletion of large regions of the proviruses. Alternatively WDS tumours may be poly or oligoclonal with regards to WDSV insertion sites. This situation would be similar to

avian leukosis virus (ALV)-induced osteopetrosis in chicken, which is a non clonal growth of osteoblastic cells (16). Interestingly, both WDS and ALV-induced osteopetrosis share other important features: both display abnormally proliferating cells originating from bone, both are osteogenic and both contain large amounts of unintegrated viral DNA (14, 15).

In humans, most genes have less than 13 exons, probably because splicing error rate increases with higher numbers of exons (11). Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a common proliferative disease in humans which is characterized by a non clonal proliferation of diverse cell types, fibroblasts and Schwann cells (20). Aberrant splicing of the NF-1 transcript, with or without mutations, contributes to the etiology of this lesion. The large number of exons (60 exons) of the NF-1 gene partly explains the high frequency of splicing aberrations seen in abnormally proliferating cells (7). Similarly, the relatively high number of exons (21 exons) in the walleye calpain-like gene may contribute to aberrant splicing. Consistent with the role of aberrant splicing of calpain in WDS, walleye cytokeratin cDNA, which has a small number of exons (6 exons), did not show aberrant splicing in walleye tissue by RT-PCR (Fig. 2C).

Aberrant splicing caused by retroviral integration has been reported in other systems. The Graffi murine leukemia provirus integrates in a distant region upstream of the cyclin D2 gene, and alters the splicing of that gene by an unknown mechanism which triggers tumor development (3).

Aberrantly spliced transcripts were not detected by Northern blot analysis in WDS tumors. This could be due to the low resolution of Northern blot and the small variation (a maximum of 265 bases) in the length of the abnormal transcripts.

Most tumours (18/25 tumors analyzed by RT-PCR, or 72 %) contained aberrantly spliced transcripts and no normal transcript (14/25 tumors, or 56 %). Splicing aberrations were both various and extensive. In twenty four of 25 aberrantly spliced transcripts, the first stop codons formed downstream of the aberrant junctions were irregularly distributed along the transcript, leading to the production of proteins truncated at various sites, most often near the N-terminal end (Fig. 3). Considered together, the above observations support the hypothesis that no functional proteins were coded by these transcripts.

RT-PCR analysis showed that aberrantly spliced transcripts are rare in normal skin (Fig. 2C), indicating that frequent aberrant splicing is a feature of tumors, not of normal walleye tissues. The single aberrant splicing observed in skin was exon 18 skipping, the most frequent site of whole exon skipping in tumors, suggesting a common mechanism, such as a specific secondary structure of the walleye calpain-like mRNA predisposing to this error.

In tumors, some sites were affected more frequently by aberrant splicing (Fig. 3). Aberrant splicing of NF-1 often occurs at specific sites (5). Aberrant splicing of that gene has been reproduced *in vitro*, without mutations, in tumour and primary cells kept under conditions found in spontaneous tumours, such as elevated or low temperature and low pH. Aberrant splicing was most frequent at the lowest temperature assayed (7°C) (7). It was concluded that aberrant splicing at specific junctions is probably due to changes in

pre-mRNA secondary structures imposed by high and low temperatures. Fish are poikilotherms and WDS tumours develop in the fall when water temperature decreases. Accordingly, it has been hypothesized that water temperature plays a major role in the development of WDS (1, 4, 23).

In conclusion, we propose that frequent aberrant splicing of calpain transcripts in WDS is caused by two different mechanisms, retroviral integration and low temperatures. Our findings suggest that similarly to the aberrant splicing of the NF-1 transcript in neurofibromatosis type 1, the aberrant splicing of walleye calpain-like mRNA is involved in the etiology of WDS.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Council of Canada grant number 138236-01 to DM. We thank Carl Uhland for providing walleye liver samples.

## REFERENCES

1. **Bowser PR, Wolfe MJ, Forney JL, Wooster GA.** 1988. Seasonal prevalence of skin tumors from walleye (*Stizostedion vitreum*) from Oneida Lake, New York. J Wildl Dis. **24(2)**:292-298.
2. **Cho BC, Shaughnessy JD Jr, Largaespada DA, Bedigian HG, Buchberg AM, Jenkins NA, Copeland NG.** 1995. Frequent disruption of the Nf1 gene by a novel murine AIDS virus-related provirus in BXH-2 murine myeloid lymphomas. J Virol. **69(11)**:7138-7146
3. **Denicourt C., C. A. Kozak, E. Rassart.** 2003. *Gris1*, a new common integration site in Graffi murine leukemia virus-induced leukemias: overexpression of a truncated cyclin D2 due to alternative splicing. J Virol. **77(1)**:37-44
4. **Fodor S.K., V.M. Vogt.** 2002. Walleye dermal sarcoma virus reverse transcriptase is temperature sensitive. J. Gen. Virol. **83**:1361-5
5. **Friedman JM.** 1999. Epidemiology of neurofibromatosis type 1. Am J Med Genet. **89(1)**:1-6
6. **Kambol R., P. Kabat, M. Tristem.** 2003. Complete nucleotide sequence of an endogenous retrovirus from the amphibian, *Xenopus laevis*. Virology **311**: 1-6

7. **Kaufmann D., W. Leistner, P. Kruse, O. Kenner, S. Hoffmeyer, C. Hein, W. Vogel, L. Messiaen, B. Bartelt.** 2002. Aberrant Splicing in Several Human Tumours in the Tumour Suppressor Genes Neurofibromatosis Type 1, Neurofibromatosis Type 2, and Tuberous Sclerosis 21. *Cancer Res.* **62(5):1503-9**
8. **Lairmore M. D., J. R. Stanley, S. A. Weber, D. L. Holzschu.** 2000. Squamous epithelial proliferation induced by walleye dermal sarcoma retrovirus cyclin in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97(11):6114-6119**
9. **LaPierre L. A., J. W. Casey, D. L. Holzschu.** 1998. Walleye retroviruses associated with skin tumours and hyperplasias encode Cyclin D homologs. *J. Virol.* **72(11):8765-8771**
10. **Lee CR, Cervi D, Truong AH, Li YJ, Sarkar A, Ben-David Y.** 2003. Friend virus-induced erythroleukemias: a unique and well-defined mouse model for the development of leukemia. *Anticancer Res.* **23(3A):2159-2166**
11. **Lewin B.** Exons and introns: genes show a wide distribution of sizes. 1997. *In:* B. Lewin (ed.), *Genes*, Vol. VI, p670. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.

12. **Liu K., L. Li, S. N. Cohen.** 2000. Antisense RNA-mediated deficiency of the calpain protease, nCL-4, in NIH3T3 cells is associated with neoplastic transformation and tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **275(40):**31093-8
13. **Malumbres M., M. Barbacid.** 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **1(3):**222-31
14. **Martineau D., P. R. Bowser, G. Woodster, J. L. Forney.** 1990. Histologic and Ultrastructural Studies of Dermal Sarcoma of Walleye (Pisces: *Stizostedion vitreum*). *Vet. Pathol.* **27:**340-346
15. **Martineau D, R. R. Renshaw, J. R. Williams, J. W. Casey, P. R. Bowser.** 1991. A large unintegrated retrovirus DNA species present in a dermal tumor of walleye *Stizostedion vitreum*. *Dis. Aquat. Org.* **10:**153-158
16. **Neiman P., K. Beemon K, J. A. Luce.** 1981. Independent recombination between avian leukosis virus terminal sequences and host DNA in virus-induced proliferative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78(3):**1896-900
17. **Pringle C. R.** 1998. Virus taxonomy. *Arch. Virol.* **143:**1449-1459

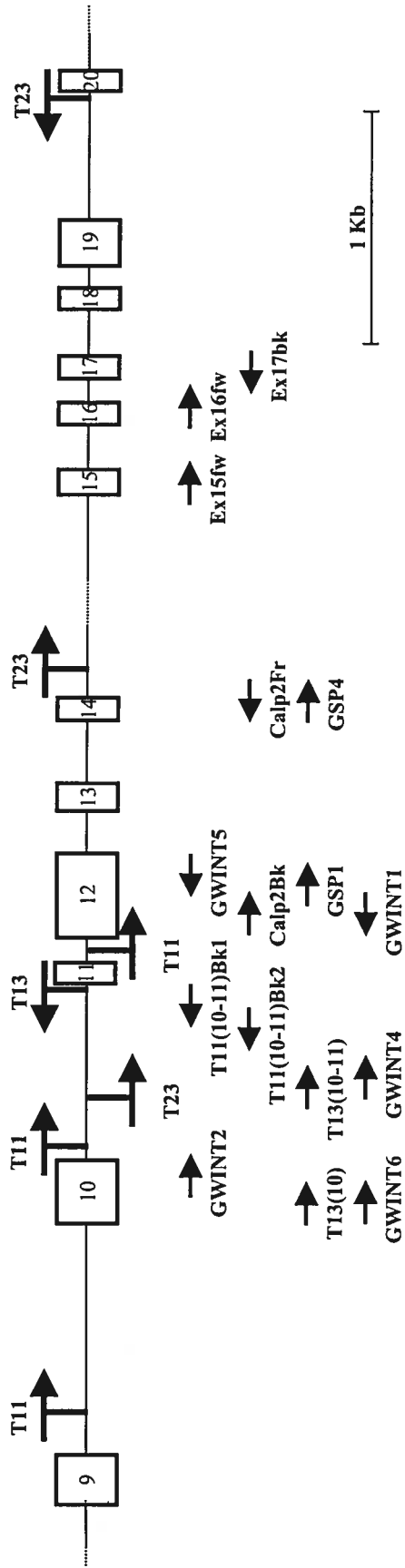


18. **Sambrook J., D. W. Russell.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
19. **Sorensen A. B., M. Duch, P. Jorgensen, F. S. Pedersen.** 1993. Amplification and sequence analysis of DNA flanking integrated proviruses by a simple two-step polymerase chain reaction method. *J. Virol.* **67(12):7118-24**
20. **Venable J. P.** 2004. Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res.* **64:7647-7654**
21. **Wu X, Burgess SM.** 2004. Integration target site selection for retroviruses and transposable elements. *Cell Mol Life Sci.* **61:2588-2596**
22. **Zhang Z., D. Du Tremblay, B. F. Lang, D. Martineau.** 1996. Phylogenetic and epidemiologic analysis of the walleye dermal sarcoma virus. *Viol.* **225(2):406-412**
23. **Zhang Z., E. Kim, D. Martineau.** 1999. Functional characterization of a piscine retroviral promoter. *J. Gen. Virol.* **80:3065-72**

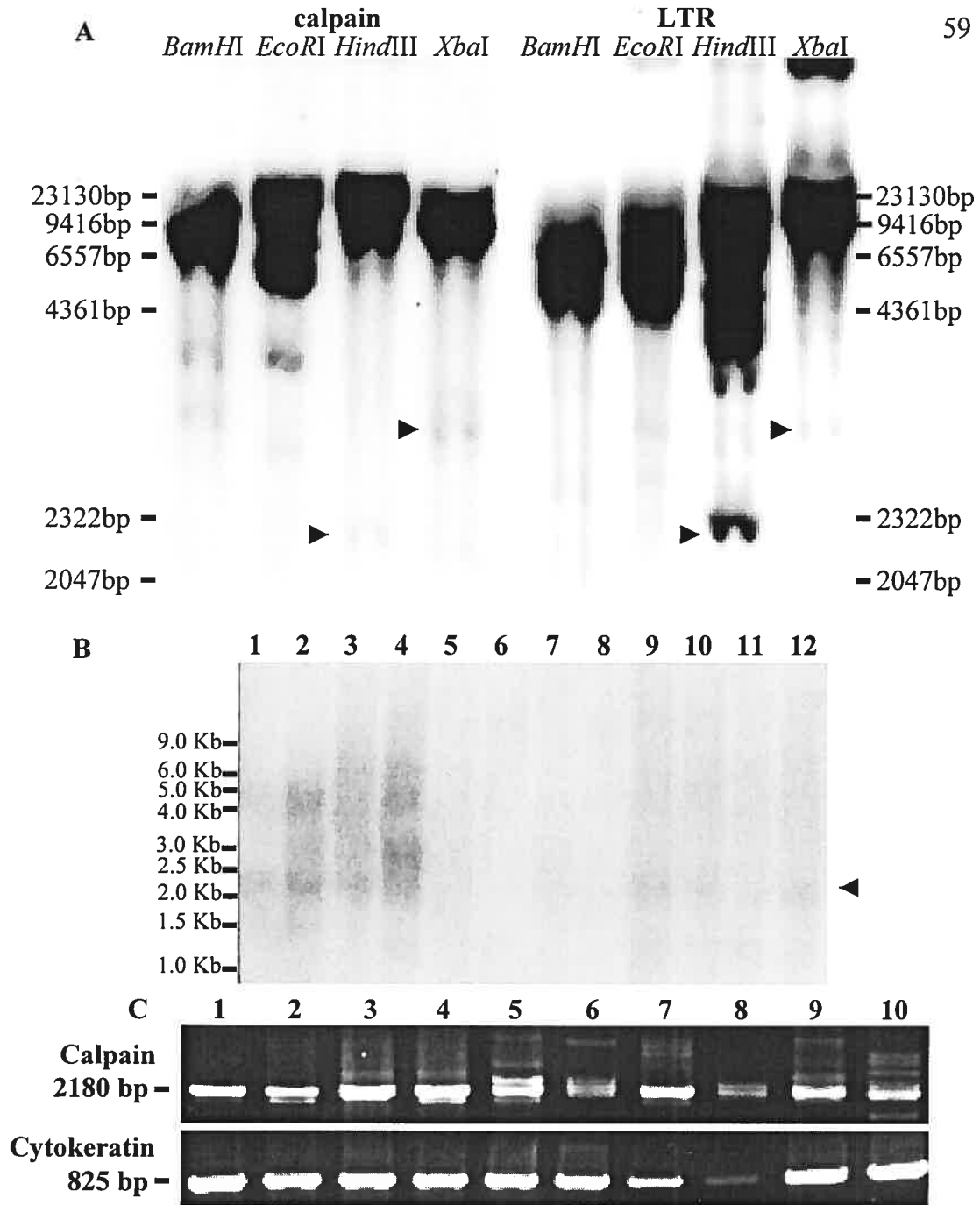
Table 1 : Oligonucleotides used in PCR

primer	sequence	origin	accession	position <sup>b</sup>
FP1	CAGTCAAGCTTGTCCAGGAATTCNNNNNNNGGCCT	NA <sup>c</sup>		
FP2	CAGTCAAGCTTGTCCAGGAATTCNNNNNNNGCGCT	"		
FP3	CAGTCAAGCTTGTCCAGGAATTCNNNNNNNCCGGT	"		
FP4	CAGTCAAGCTTGTCCAGGAATTCNNNNNNNCGCGT	"		
FSP <sup>a</sup>	CAGTTCAAGCTTGTCCAGGAATTC	"		
FSP S	CAGTTCAAGCTTGTCCAGGAATTC	"		
LSP3 <sup>a</sup>	GGTGTGAATGCATGTTGCCTTCAAACAGT	WDSV	NC_001867	12608
LSP4	ACTCCCTCACAGTTGCTGTGGTGTGTGAT	"	"	7
LSP S2	GGCTGCTTTCCTTCTTCGAACAT	"	"	93
LTR FO	ATGTTCTTATATTCGCTTAG	"	"	12296
LTR BA2	CAGGCCAGTCACATTTGTCT	"	"	92C
GW INT 1	GCTGAGGCATGACGCAGGAAGTAG	calpain	bankit748306 <sup>d</sup> bankit735345 <sup>d</sup>	9420C
GW INT 2	TTCGTGGTCGGTCTGATCCAGAAG	"	"	8276
GW INT 4	ACGCCAACACAGAGACAGAGGAAG	"	"	8755
GW INT 5	GTCAGCCTGTTTCTCGGAGAAGAC	"	"	9578C
GW INT 6	CTGGACCAACCTCAGTTTGTGAT	"	"	8200
Ex0 fw	CCCGTTCCAGACTCTTACTCCATA	"	"	1922
Ex15 fw	CCTACGAGCTGCAGAAGATCCTCAA	"	"	11178
Ex16 fw	TCAGCATCACAACGTGTCGTAACAT	"	"	11491
Ex17 bk	TTGAACTCCAGCAGACCCAGTTTAC	"	"	11819C
Ex21+ bk	CTCAGCTCTGATCCGGTTCTGGTT	"	"	14035C
Calp2Fr	GATCGTCCACATCGTCTTCATC	"	"	10249C
Calp2Bk	CAGAGGAACGTCCACCTGAATA	"	"	9381
GSP1	CTGATCGTCCCGTCTACCTTCGAAC	"	"	9501
GSP4	AAGACGATGTGGACGATCAGTTCAG	"	"	10232
T11(10-11)bk1	TTACCTCCGCCGAGGAGATCCTCTTTCACT	"	"	9213C
T11(10-11)bk2	AGACGTCACGTGGTACACGCTGTGTAACCT	"	"	8971C
T13(10)	CACGTTCTGGACCAACCCTCAGTTTGTGAT	"	"	8194
T13(10-11)	GCTGTCTGGATTTACCCTGCAGAGATCTGA	"	"	8682
ctk3fw	AGAATGAGCTAGCCATGCGTCAAT	cytokeratin	AY129690	176
ctk5rv	TAAGTTGGGACTGTAGCTCGATCT	"	"	610C

<sup>a</sup> Biotinylated primer<sup>b</sup> C design reverse direction primers<sup>c</sup> cf ref.19<sup>d</sup> currently in submission



**FIG.1.** The walleye calpain gene from exon 9 to 20 to scale. Exons are represented as boxes. Introns are represented as lines. **Insertion positions** are indicated as well as direction and tumour which in these occur. All **primers** used (see also table 1) are showed with their direction by arrows.



**FIG.2. (A)** Southern blot analysis of calpain-like gene and LTR reorganization in tumor 23. Enzymes used and molecular weight are indicated. Additional bands that corresponds with both probes are showed by arrow heads.

**(B)** Northern blot analysis of calpain-like mRNA expression in walleye normal skins (lanes 1-4) and tumors (lanes 5-12). The expected 2300 bp band is showed by an arrow head.

**(C)** RT-PCR analysis of calpain-like and cytokeatin mRNA expressions in normal skins (lanes 1-4) and tumors (lanes 5-10)



## **DISCUSSION**

Cette étude est la première à s'intéresser à la mutagenèse d'insertion chez le WDSV. En effet, bien que le phénomène soit présent chez tous les rétrovirus et que deux modes de mutagenèse puissent advenir simultanément, la plupart des études impliquant un rétrovirus complexe oncogène portent sur ses protéines accessoires. De fait, de tels gènes sont porteurs d'un pouvoir transformant puissant, et leur action peut masquer l'effet aléatoire de l'insertion. Malgré cela, le processus de transformation d'une lignée primaire est un phénomène nécessairement multifactoriel (Malumbres M et al., 2001). On peut donc imaginer qu'une transduction d'oncogènes chez une lignée primaire puisse être complétée par une mutagenèse insertionnelle au cours de l'évolution tumorale.

Le choix du site d'intégration proviral est considéré comme un processus aléatoire. La détection de trois insertions différentes du provirus dans le même gène chez une même tumeur peut être interprétée comme révélatrice d'une sélection de ces mutations pour la tumorigénèse.

En outre, cette hypothèse peut être envisagée sans clonalité. Les étapes précoces de la transformation cellulaire étant assurées par l'oncogène viral (qui chez le WDSV est transduit dans toutes les cellules infectées), une croissance accrue des cellules hôtes est déjà amorcée. La mutagenèse d'insertion interviendrait alors aux étapes plus tardives, pour poursuivre l'évolution de la tumeur et lui permettre d'atteindre des dimensions supérieures ainsi qu'une expansion plus rapide. Ce raisonnement appuie nos résultats : bien que des sites d'insertion dans le gène homologue à la calpaïne ont été caractérisés dans 3 tumeurs, les réarrangements attendus en analyse Southern blot n'ont pu être vérifiés que chez une seule d'entre-

elles. Nous avons émis l'idée qu'une oligo- ou poly-clonalité pourrait être la cause de ce résultat. Les sites d'insertions seraient dans ce cas présents chez les tumeurs à une fréquence inférieure à 1 par cellule. Cette occurrence rendrait la détection de ces sites plus ardue, aussi bien par technique de Southern blot que de PCR (bien que cette dernière soit la plus à même de le faire en raison de son fort pouvoir d'amplification).

Nous avons détecté jusqu'à trois insertions par tumeur dans le gène homologue à la calpaïne. Si l'on considère le gène en question comme portant 2 allèles par cellule, une telle fréquence implique 2 insertions au moins sur le même allèle, événement moins probable. Concernant un tel événement, il pourrait être avancé qu'une pseudo-tétraploïdie augmenterait les chances de multiples insertions dans un gène calpaïne. La pseudo-tétraploïdie fait référence à la duplication du génome d'une espèce dans l'évolution de celle-ci. Les gènes dupliqués qui ont été conservés ensuite diffèrent peu entre eux. Certains poissons comme la truite (Allendorf FW et al., 1984) possèdent un génome pseudo-tétraploïde. De même, les calpaïnes regroupent chez l'humain 14 membres d'une même famille de gènes qui présentent une homologie entre eux (Goll DE et al., 2003) et pourraient être confondus. Mais les identités observées lors de la comparaison entre les sites d'insertions caractérisés et le gène homologue à la calpaïne (annexe II) écartent ces possibilités.

Tous les sites d'insertions qui ont été caractérisés adviennent dans une séquence intronique. Ainsi la séquence codante n'est-elle pas brisée. Cela n'écarte pas pour autant la possibilité d'un dérèglement de l'expression du gène touché.



Le provirus intégré dans un intron peut perturber l'excision de ce dernier lors du processus d'épissage. Une modification de la structure secondaire de l'intron due à la présence du provirus pourra gêner la reconnaissance des sites d'épissage et empêcher l'excision de l'intron. Le provirus introduit également ses propres séquences consensus d'épissage qui sont compatibles avec le complexe d'épissage de la cellule hôte, amenant à l'expression d'un transcrit fusion entre des exons cellulaires et viraux. Il peut également promouvoir une transcription aberrante : un ARN anti-sens s'il est intégré dans la direction opposée au sens de transcription, ou un transcrit codant pour une protéine tronquée ou de fusion s'il est intégré dans le sens de la marche.

Les insertions sont orientées indépendamment de tout patron, et à des sites différents le long du gène. Les résultats ne sont groupés entre les exons 9 à 20 que parce que la technique de PCR nichée (« nested ») est guidée par les amorces employées (Table 1 de l'article ; Fig.1 de l'article). Cette absence de consensus suggère un effet aléatoire de l'insertion du provirus du WDSV. La sélection de la cellule portant une mutation va dépendre de l'avantage mitotique que cette mutation va lui conférer.

Les calpaïnes sont des protéases-cystéine dépendantes de la concentration intra-cytoplasmique en ion calcium. Les membres de cette famille sont bien issus de gènes différents, malgré une homologie entre eux, et non d'un épissage différentiel d'un même gène. On appelle les gènes impliqués dans ce type de relation des paralogues et on suppose leur origine comme provenant d'une duplication d'un

même gène ancestral. Du point de vue de l'évolution, la fonction calpaïne est conservée des bactéries (Blattner FR et al., 1997) jusqu'aux mammifères supérieurs. Une telle présence répartie sur la totalité du royaume du vivant implique un caractère vital et primordial à la fonction. Le système calpaïne, résumé dans la récente étude de Darrel E. Goll et al. (2002), comprend également un inhibiteur naturel : la calpastatine.

Les deux calpaïnes principales, la  $\mu$ -calpaïne (calpaïne 1) et la m-calpaïne (calpaïne 2) sont formées d'un hétérodimère impliquant la petite sous-unité régulatrice 1. On considère l'expression des calpaïnes principales comme ubiquitaire. Il reste qu'une particularité majeure de ces protéines est leur fine régulation post transcriptionnelle. La  $\mu$ -calpaïne est activée *in vitro* par des concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  de l'ordre micro-molaire tandis que la m-calpaïne requiert des concentrations millimolaires. En plus de ces deux membres, la famille calpaïne compte d'autres membres, dont certains sont spécifiques à certains tissus. La calpaïne 9, aussi appelée nCL-4, en fait partie puisqu'elle est exprimée dans l'estomac.

Les fonctions physiologiques des calpaïnes et leurs mécanismes exacts d'action restent un mystère irrésolu. Elles sont impliquées dans des domaines aussi variés que le remodelage du cytosquelette et la motilité cellulaire, le cycle de division cellulaire, l'apoptose, la différenciation cellulaire et la transmission de signaux cellulaires. La diversité des domaines dans lesquels elles interviennent ainsi que la précision de leur système de régulation post-traductionnelle laisse présager d'un rôle d'intégration des signaux cellulaire ainsi que d'une place centrale pour les calpaïnes dans le fonctionnement de la cellule.

Le gène caractérisé dans cette étude a été confirmé par les Drs Beatriz García Díaz et Peter L. Davies comme étant fort probablement la calpaïne 2 de doré. Ils ont également réussi à cloner l'intron 14-15 qui manquait à la caractérisation du gène. Ce dernier n'a pu être toutefois séquencé en raison des particularités de cette région (voir l'annexe I pour les séquences utilisées lors de ce projet).

En séquençant systématiquement tous les ADN complémentaires des transcrits de tumeurs du gène homologue à la calpaïne, nous cherchions à vérifier la présence d'une séquence provirale qui confirmerait la mutagenèse d'insertion. Aucune séquence de cette sorte n'a été trouvée, mais les résultats furent édifiants. En effet, une large proportion des transcrits (25 transcrits sur 36 transcrits tumoraux séquencés) détectés chez les tumeurs portaient des mutations d'épissage aberrant. Mieux encore, le transcrit normalement épissé n'était pas détectable chez 56 % (14/25) des tumeurs testées, tandis qu'au moins un transcrit comportant des erreurs d'épissage se manifestait dans 72 % des cas (18/25). Les erreurs d'épissage impliquées conduisent presque toutes à un codon stop aberrant. Ainsi le transcrit mal épissé code-t-il pour une protéine tronquée, qu'on peut supposer non fonctionnelle. De tels résultats suggèrent une relation entre l'oncogenèse du WDS, et l'expression amoindrie du gène homologue à la calpaïne.

Il a été rapporté qu'une insertion rétrovirale pouvait causer un défaut d'épissage (Denicourt C et al., 2003). Il est aussi admis que la machinerie d'épissage n'est pas infallible et produit une faible quantité d'aberrations en temps normal (Berg LP et al., 1996).

Un nombre élevé d'exons accroîtrait aussi les chances d'erreur d'épissage comme évoqué dans une étude précédente (Kaufmann D et al., 2002). Dans cette même étude, les auteurs rapportent des résultats forts similaires aux nôtres. Ainsi les transcrits du gène de la neurofibromatose de type 1 (NF1) sont-ils sujets à de nombreuses aberrations d'épissage, en particulier chez les cellules tumorales.

La fréquence d'erreurs d'épissage chez NF1 est également décrite comme étant influençable par la température et le pH. Les deux extrêmes dérangent le processus d'épissage, mais c'est à la température la plus basse (7°C) que le système rencontre le plus de difficultés. Cette observation est particulièrement importante dans les conditions de développement du WDS. Il a déjà été émis que la température de l'eau pourrait influencer l'évolution de la tumeur au cours des saisons en modifiant l'efficacité transcriptionnelle du promoteur LTR (Bowser PR et al., 1988), ou l'activité de la rétrotranscriptase (Fodor SK et al., 2002). Ici nous ajoutons que la chute de la température de l'eau en automne pourrait modifier l'expression du génome de l'hôte et affaiblir ses défenses face à la progression tumorale. Des études fonctionnelles sont requises pour vérifier les conclusions de nos travaux.

# **CONCLUSION**

En définitive, nous avons effectué une étude originale de l'oncogenèse du WDS, la mutagenèse du WDSV n'ayant pas été investiguée auparavant. Nos résultats suggèrent fortement l'implication d'un gène homologue aux calpaïnes de mammifère, dont un membre est considéré comme porteur d'une activité "tumeur suppresseur". L'inactivation d'une telle fonction dans une cellule hôte participerait à sa transformation.

De plus, la caractérisation des transcrits pour ce gène dans les tumeurs a révélé une forte incidence d'erreurs d'épissage. Le gène homologue à la calpaïne, que nous avons caractérisé à la fois sur le cDNA et l'ADN génomique, est donc sujet à ce type d'erreurs, particulièrement chez le WDS.

Le mécanisme d'épissage a été reporté influençable par la température chez des cellules humaines transformées en culture, spécialement lorsque celle-ci décroît. Le cycle saisonnier du WDS impliquant une progression tumorale aux périodes froides de l'année, cela suggère fortement un rôle déterminant pour la température du milieu dans le développement de la tumeur. Nous évoquons ici l'hypothèse selon laquelle un épissage rendu moins efficace par les conditions extérieures puisse réduire la quantité de transcrits fonctionnels d'un gène "tumeur suppresseur" au dessous d'un seuil significatif et ainsi avantager la progression tumorale.

Le travail présenté concerne le domaine génétique et porte sur des aspects essentiellement qualitatifs. Pour vérifier les conclusions rapportées ici, des études fonctionnelles et quantitatives s'imposent.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. Allendorf FW, Thorgaard GH. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. In: Turner BJ (ed) Evolutionary genetics of fishes. 1984 ; Plenum, New York, pp 1-53.
2. August JT, Bolognesi DP, Fleissner E, Gilden RV, Nowinski RC. A proposed nomenclature for the virion proteins of oncogenic RNA viruses. *Virology* 1974 ; 60:595-601.
3. Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Aboud M. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology* 2004 ; 1 (1):20.
4. Bakhanashvili M, Hizi A. Fidelity of the RNA-dependent DNA synthesis exhibited by the reverse transcriptases of human immunodeficiency virus types 1 and 2 and of murine leukemia virus: mispair extension frequencies. *Biochemistry* 1992 ; 31(39):9393-8.
5. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970 ; 226(5252):1209-11.
6. Battula N, Loeb LA. The infidelity of avian myeloblastosis virus deoxyribonucleic acid polymerase in polynucleotide replication. *J Biol Chem* 1974 ; 249(13):4086-93.



7. Battula N, Loeb LA. On the fidelity of DNA replication. Lack of exodeoxyribonuclease activity and error-correcting function in avian myeloblastosis virus DNA polymerase. *J Biol Chem* 1976 ; 251(4):982-6.
8. Bebenek K, Kunkel TA. The fidelity of retroviral reverse transcriptases. *Reverse transcriptase* (ed. Skalska AM et Goff SP) 1993 ; pp85-102. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
9. Bell P, Montaner LJ, Maul GG. Accumulation and intranuclear distribution of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA. *J Virol.* 2001 ; 75(16):7683-91.
10. Ben David Y, Prideaux VR, Chow V, Benchimol S, Bernstein A. Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus. *Oncogene* 1988 ; 3(2):179-85.
11. Berg LP, Soria JM, Formstone CJ, Morell M, Kakkar VV, Estivill X, Sala N, Cooper DN. Aberrant RNA splicing of the protein C and protein S genes in healthy individuals. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996 ; 7(6):625-31.
12. Bernhard W. Electron microscopy of tumor cells and tumor viruses : a review. *Cancer Res* 1958 ; 18:491-509.

13. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991 ; 64:235-248.
14. Bishop JM, Varmus H. *Tumor Viruses* (eds. Weiss R, Teich N, Coffin J) 1982 ; pp. 999-1108. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
15. Blackburn EH. Telomeres. *Reverse transcriptase* (ed. Skalka AM et Goff SP) 1993 ; pp411-424. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
16. Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 1997; 277(5331):1453-74.
17. Bowser PR, Martineau D, Wooster GA. Effects of water temperature on experimental transmission of dermal sarcoma in fingerling walleyes (*Stizostedion vitreum*) from Oneida Lake, New York. *J Aquat An Health* 1990 ; 2:157-161.
18. Bowser PR, Wolfe WJ, Forney JL, Wooster GA. Seasonal prevalence of skin tumors from walleye (*Stizostedion vitreum*) from Oneida Lake, New York. *J Wildl Dis* 1988 ; 24(2):292-298.
19. Bowser PR, Wooster GA. Regression of dermal sarcoma in adult walleyes (*Stizostedion vitreum*). *J Aquat An Health* 1991 ; 3:147-150.

20. Bowser PR, Wooster GA, Quackenbush SL, Casey RN, Casey JW. Comparison of fall and spring tumors as inocula from experimental transmission of walleye dermal sarcoma. *J Aquat An Health* 1996 ; 8:78-81.
21. Brechot C. Oncogenic activation of cyclin A. *Curr Opin Genet Dev* 1993 ; 3:11-18.
22. Brugge JS, Erikson RL. Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature* 1977 ; 269(5626):346-8.
23. Bukrinsky MI, Sharova N, McDonald TL, Pushkarskaya T, Tarpley WG, Stevenson M. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 ; 90(13):6125-9.
24. Bushman FD. *Lateral DNA Transfer: Mechanisms and Consequences* 2001 ; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
25. Bushman FD. Targeting survival: integration site selection by retroviruses and LTR-retrotransposons. *Cell* 2003; 115(2):135-8.

26. Cereseto A, Diella F, Mulloy JC, Cara A, Michieli P, Grassmann R, Franchini G, Klotman ME. p53 functional impairment and high p21waf1/cip1 expression in human T-cell lymphotropic/leukemia virus type I-transformed T cells. *Blood* 1996 ; 88(5):1551-60.
27. Champoux JJ. Roles of ribonuclease H in reverse transcription. *Reverse transcriptase* (ed AM Skalka et SP Goff) 1993 ; pp103-117. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
28. Cho BC, Shaughnessy JD Jr, Largaespada DA, Bedigian HG, Buchberg AM, Jenkins NA, Copeland NG. Frequent disruption of the Nf1 gene by a novel murine AIDS virus-related provirus in BXH-2 murine myeloid lymphomas. *J Virol.* 1995 ; 69(11):7138-46.
29. Coffin JM. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J Gen Virol* 1979 ; 42(1):1-26.
30. Coffin JM. Retroviridae and their replication. *Virology* (ed. Fields et al.) 1990 ; pp1437-1500. Raven Press, New York.
31. Coffin JM. Reverse transcription and evolution. *Reverse transcriptase* (ed AM Skalka et SP Goff) 1993 ; pp445-479. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

32. Coffin JM. HIV population dynamics *in vivo*: Implications for genetic variation, pathogenesis and therapy. *Science* 1995 ; 267:483-489.
33. Coffin JM. Retroviridae and their replication. *Virology* (ed. Fields et al.) 1996 ; pp1767-1848. Raven Press, New York.
34. Coffin JM. Virus taxonomy: Structure and classification of retroviruses. *The retroviridae* 1992 ; 1:19-50 ed. JA Levy, Plenum Press, New York.
35. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. *Retroviruses* 1997 ; Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSHL, New York.
36. Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1998 ; 391:397-401.
37. deHarven E. Remarks on the ultrastructure of type A, B and C virus particles. *Adv Virus Res* 1974 ; 19:221-264.
38. Denicourt C, Kozak CA, Rassart E. *Gris1*, a new common integration site in Graffi murine leukemia virus-induced leukemias: overexpression of a truncated cyclin D2 due to alternative splicing. *J Virol.* 2003 ; 77(1):37-44.

39. Dickson C, Eisenman R, Fan H, Hunter E, Teich N. Protein biosynthesis and assembly. Molecular biology of tumor viruses, 2nd edition: RNA tumor virus 1/Text (ed Weiss et al.) pp513-648. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
40. Donehower LA, Varmus HE. A mutant murine leukemia virus with a single missense codon in pol is defective in a function affecting integration. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 ; 81(20):6461-5.
41. Doolittle RF, Feng DF, Johnson MS, McClure MA. Origins and evolutionary relationships of retroviruses. Q Rev Biol. 1989 ; 64(1):1-30.
42. Earnest-Koons K, Wooster GA, Bowser PR. Invasive walleye dermal sarcoma in laboratory-maintained walleyes *Stizostedion vitreum*. Dis Aquat Org 1996 ; 24 :227-232.
43. Ellerman V, Bang O. Experimentell leukamie bei huhnern. Zentralbl Bacteriol 1908 ; 46:595-609.
44. Felber BK, Paskalis H, Kleinman-Ewing C, Paviakis GN. The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeat. Science 1985 ; 229:675-678.

45. Franchini G, Nicot C, Johnson JM. Seizing of T cells by human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1. *Adv Cancer Res* 2003 ; 89:69–132.
46. Friedman JM. Epidemiology of neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet.* 1999 ; 89(1):1-6.
47. Fleissner E. Chromatographic separation and antigenic analysis of proteins of the oncornaviruses. I. Avian leukemia-sarcoma viruses. *J Virol* 1971 ; 8 :778-785.
48. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello R, Skalka AM. Principles of virology. Molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses, 2<sup>nd</sup> ed 2004 ; ASM Press, Washington DC.
49. Fodor SK, Vogt VM. Walleye dermal sarcoma virus reverse transcriptase is temperature sensitive. *J Gen Virol.* 2002; 83(Pt 6):1361-5.
50. Friedman JM. Epidemiology of neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet.* 1999 ; 89(1):1-6.
51. Fung YK, Crittenden LB, Fadly AM, Kung HJ. Tumor induction by direct injection of cloned v-src DNA into chickens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983 ; 80(2):353-7.

52. Gilboa E, Mitra SW, Goff S, Baltimore D. A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. *Cell*. 1979 ; 18(1):93-100.
53. Gojobori T, Yokoyama S. Rates of evolution of the retroviral oncogene of Moloney murine sarcoma virus and of its cellular homologues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 ; 82(12):4198-201.
54. Goldé A, Lacassagne MA. Non-defectivity of the Rous Schmidt-Ruppen virus strain. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1966 ; 262(2):329-31.
55. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W and Cong J. The calpain system. *Physiol Rev*. 2003 ; 83(3):731-801.
56. Grassmann R, Dengler C, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, McGuire K, Dokhelar MC, Sodroski JG, Haseltine WA. Transformation to continuous growth of primary human T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type I X-region genes transduced by a Herpesvirus saimiri vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 ; 86(9):3351-5.
57. Green PL, Kaehler DA, Risser R. Cell transformation and tumor induction by Abelson murine leukemia virus in the absence of helper virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 ; 84(16):5932-6.



58. Hanafusa H, Halpern CC, Buchhagen DL, Kawai S. Recovery of avian sarcoma virus from tumors induced by transformation-defective mutants. *J Exp Med* 1977 ; 146(6):1735-47.
59. Harada F, Sawyer RC, Dahlberg JE. A primer ribonucleic acid for initiation of in vitro Rous sarcoma virus deoxyribonucleic acid synthesis. *J Biol Chem* 1975 ; 250(9):3487-97.
60. Hayward WS, Neel BG, Astrin SM. Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature* 1981 ; 290(5806):475-80.
61. Heinkelein M, Pietschmann T, Jármy G, Dressler M, Imrich H, Thurow J, Lindemann D, Bock M, Moebes A, Roy J, Herchenröder O, Rethwilm A. Efficient intra-cellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. *EMBO J* 2000 ; 19:3436-3445.
62. Heinzinger NK, Bukrinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, Gendelmann HE, Ratner L, Stevenson M, Emerman M. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in non-divided host cells. *Proc Natl Acad Sci* 1994 ; 91:7311-7315.

63. Hinrichs SH, Nerenberg M, Reynolds RK, Khoury G, Jay G. A transgenic mouse model for human neurofibromatosis. *Science* 1987 ; 237(4820):1340-3.
64. Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita KI, Shirakawa S, Miyoshi I. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 ; 78(10):6476-80.
65. Hoang AT, Cohen KJ, Barrett JF, Bergstrom DA, Gang CV. Participation of cyclin A in Myc-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91:6875-6879.
66. Holmes-Son ML, Appa RS, Chow SA. Molecular genetics and target site specificity of retroviral integration. *Adv Genet* 2001 ; 43:33-69.
67. Holzschu DL, Martineau D, Fodor SK, Vogt VM, Bowser PR, Casey JW. Nucleotide sequence and protein analysis of a complex piscine retrovirus, walleye dermal sarcoma virus. *J Virol* 1995 ; 69:5320-5331.
68. Houts GE, Miyagi M, Ellis C, Beard A, Beard JW. Reverse transcriptase from avian Myeloblastis Virus. *J Virol* 1979 ; 29:517.
69. Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980 ; 77(3):1311-5.

70. Jiang W, Kahan S, Tomita N, Zhang Y, Lu S, Weinstein B. Amplification and overexpression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res* 1992 ; 52:2870-2873.
71. Jiang M, Mak J, Ladha A, Cohen E, Klein M, Rovinski B, Kleiman L. Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1993 ; 67(6):3246-53.
72. Jordan A, Bisgrove D, Verdin E. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J* 2003 ; 22(8):1868-77.
73. Kalnina Z, Zayakin P, Silina K, Line A. Alterations of pre-mRNA splicing in cancer. *Genes chromosomes and cancer*. 2005 ; 42:342-357.
74. Kambol R, Kabat P, Tristem M. Complete nucleotide sequence of an endogenous retrovirus from the amphibian, *Xenopus laevis*. *Virol* 2003 ; 311: 1-6.
75. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Nakao Y, Ito Y, Aoki T, Gallo RC. Natural antibodies to the structural core protein (p24) of the human T-cell leukemia (lymphoma) retrovirus found in sera of leukemia patients in Japan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982 ; 79(5):1653-7.

76. Karageorgos L, Li P, Burrell C. Characterization of HIV replication complexes early after cell-to-cell infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993 ; 9(9):817-23.
77. Karpel RL, Henderson LE, Oroszlan S. Interactions of retroviral structural proteins with single-stranded nucleic acids. *J Biol Chem* 1987 ; 262(11):4961-7.
78. Katz RA, Gravuer K, Skalka AM. A preferred target DNA structure for retroviral integrase in vitro. *J Biol Chem* 1998 ; 273(37):24190-5.
79. Katz RA, Greger JG, Boimel P, Skalka AM. Human immunodeficiency virus type 1 DNA nuclear import and integration are mitosis independent in cycling cells. *J Virol* 2003 ; 77(24):13412-7.
80. Katz RA, Skalka AM. Generation of diversity in retroviruses. *Annu Rev Genet* 1990 ; 24:409-45.
81. Kaufmann D, Leistner W, Kruse P, Kenner O, Hoffmeyer S, Hein C, Vogel W, Messiaen L, Bartelt B. Aberrant Splicing in Several Human Tumours in the Tumour Suppressor Genes Neurofibromatosis Type 1, Neurofibromatosis Type 2, and Tuberous Sclerosis 21. *Cancer Res.* 2002 ; 62(5):1503-9.

82. Kim A, Terzian C, Santamaria P, Pelisson A, Prud'homme N, Bucheton A. Retroviruses in invertebrates : The gypsy retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad 1994 ; 91:1285-1289.
83. Kiyokawa T, Seiki M, Iwashita S, Imagawa K, Shimizu F, Yoshida M. p27x-III and p21x-III, proteins encoded by the pX sequence of human T-cell leukemia virus type I. Proc Natl Acad Sci U S A 1985 ; 82(24):8359-63.
84. Lairmore MD, Stanley JR, Weber SA, Holzschu DL. Squamous epithelial proliferation induced by walleye dermal sarcoma retrovirus cyclin in transgenic mice. PNAS 2000 ; 97(11):6114-6119.
85. Lammie G, Fantl V, Smith R, Schuurin E, Broohes S, Michalides R, Dickson C, Arnold A, Peters G. D11S287, a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and linked to BCL-1. Oncogene 1991 ; 6:439-444.
86. Lane DP. *p53*, guardian of the genome. Nature 1992 ; 358:15-16.
87. LaPierre LA, Casey JW, Holzschu DL. Walleye retroviruses associated with skin tumors and hyperplasias encode Cyclin D homologs. J Virol 1998 ; 72(11):8765-8771.

88. LaPierre LA, Holzschu DL, Bowser PR, Casey JW. Sequence and transcriptional analysis of the fish retroviruses walleye epidermal hyperplasia virus types 1 and 2 : evidence for a gene duplication. *J Virol* 1999 ; 73:9393-9403.
89. Lee CR, Cervi D, Truong AH, Li YJ, Sarkar A, Ben-David Y. Friend virus-induced erythroleukemias: a unique and well-defined mouse model for the development of leukemia. *Anticancer Res.* 2003 ; 23(3A):2159-2166.
90. Lee TH, Coligan JE, Sodroski JG, Haseltine WA, Salahuddin SZ, Wong-Staal F, Gallo RC, Essex M. Antigens encoded by the 3'-terminal region of human T-cell leukemia virus: evidence for a functional gene. *Science* 1984 ; 226(4670):57-61.
91. Lemoine FJ, Wycuff DR, Marriott SJ. Transcriptional activity of HTLV-I Tax influences the expression of marker genes associated with cellular transformation. *Dis Markers* 2001 ; 17(3):129-37.
92. Lewin B. Exons and introns: genes show a wide distribution of sizes. 1997. *In: B. Lewin (ed.), Genes, Vol. VI, p670. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.*
93. Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 1994 ; 68(1):510-6.

94. Li J, Shen H, Himmel KL, Dupuy AJ, Largaespada DA, Nakamura T, Shaughnessy JD Jr, Jenkins NA, Copeland NG. Leukaemia disease genes: large-scale cloning and pathway predictions. *Nat Genet* 1999 ; 23(3):348-53.
95. Lindemann D, Pietschmann T, Picard-Maureau M, Berg A, Heinkelein M, Thurow J, Knaus P, Zentgraf H, Rethwilm A. Particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J Virol* 2001 ; 75:5762-5771.
96. Linial ML. Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J Virol* 1999 ; 73:1747-1755.
97. Liu K, Li L, Cohen SN. Antisense RNA-mediated deficiency of the calpain protease, nCL-4, in NIH3T3 cells is associated with neoplastic transformation and tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2000 ; 275(40):31093-8.
98. Löchelt M, Muranyi W, Flügel RM. Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependant and functional promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90:7317-7321.
99. Lori F, di Marzo Veronese F, de Vico AL, Lusso P, Reitz MS Jr, Gallo RC. Viral DNA carried by human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* 1992 ; 66:5067-5074.

100. Luby-Phelps K, Castle PE, Taylor DL, Lanni F. Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 ; 84(14):4910-3.
101. Luciw PA, Leung NJ. Mechanisms of retrovirus replication. *the retroviridae*. 1992 ; ed. JA Levy pp159-298. Plenum Press, New York.
102. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001 ; 1(3):222-31.
103. Mann R, Mulligan RC, Baltimore D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 1983 ; 33(1):153–159.
104. Marriott SJ, Lemoine FJ, Jeang KT. Damaged DNA and miscounted chromosomes: human T cell leukemia virus type I tax oncoprotein and genetic lesions in transformed cells. *J Biomed Sci* 2002 ; 9(4):292-8.
105. Martin G. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Jun ; 2(6):467-75.



106. Martineau D, Bowser PR, Renshaw RR, Casey JW. Molecular characterization of a unique retrovirus associated with a fish tumor. *J Virol* 1992 ; 66 : 596-599.
107. Martineau D, Bowser PR, Woodster G, Armstrong LD. Experimental transmission of a dermal sarcoma in fingerling walleyes (*Stizostedion vitreum vitreum*). *Vet Pathol* 1990a ; 27:230-234.
108. Martineau D, Bowser PR, Woodster G, Forney JL. Histologic and Ultrastructural Studies of Dermal Sarcoma of Walleye (Pisces: *Stizostedion vitreum*). *Vet Pathol* 1990b ; 27:340-346.
109. Martineau D, Renshaw RR, Williams JR, Casey JW, Bowser PR. A large unintegrated retrovirus DNA species present in dermal tumor of walleye *Stizostedion vitreum*. *Dis Aquat Org* 1991 ; 10 : 153-158.
110. Meikrantz W, Gisselbrecht S, Tam SW, Schlegel R. Activation of cyclin A-dependant protein kinases during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91:3754-3758.
111. Miller MD, Wang B, Bushman FD. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes containing discontinuous plus strands are competent to integrate in vitro. *J Virol*. 1995 ; 69(6):3938-44.

112. Miller MD, Warmerdam MT, Gaston I, Greene WC, Feinberg MD. The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med* 1994 ; 179:101–113.
113. Miyake H, Suzuki T, Hirai H, Yoshida M. Trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 enhances mutation frequency of the cellular genome. *Virology* 1999 ; 253(2):155-61.
114. Moebes A, Enssle J, Bieniasz PD, Heinkelein M, Lindemann D, Bock M, McClure MO, Rethwilm A. Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol* 1997 ; 73:7305-7311.
115. Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A. A novel cyclin encoded by a bcl-linked candidate oncogene. *Nature* 1991 ; 350:512-515.
116. Mucenski ML, Gilbert DJ, Taylor BA, Jenkins NA, Copeland NG. Common sites of viral integration in lymphomas arising in AKXD recombinant inbred mouse strains. *Oncogene Res* 1987 ; 2:33-48.

117. Muller HP, Varmus HE. DNA bending creates favored sites for retroviral integration: an explanation for preferred insertion sites in nucleosomes. *EMBO J* 1994 ; 13(19):4704-14.
118. Murphy FA, Fauquet CM, Bishop BHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP Mayo MA, Summers MD. *Virus taxonomy: Sixth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. 1995 ; Springer-Verlag, New York.
119. Nagy K, Young M, Baboonian C, Merson J, Whittle P, Oroszlan S. Antiviral activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors in a single cycle of infection: evidence for a role of protease in the early phase. *J Virol* 1994 ; 68(2):757-65.
120. Narezkina A, Taganov KD, Litwin S, Stoyanova R, Hayashi J, Seeger C, Skalka AM, Katz RA. Genome-wide analyses of avian sarcoma virus integration sites. *J Virol* 2004 ; 78(21):11656-63.
121. Neiman P, Beemon K, Luce JA. Independent recombination between avian leukosis virus terminal sequences and host DNA in virus-induced proliferative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 ; 78(3):1896-900.

122. Nerenberg M, Hinrichs SH, Reynolds RK, Khoury G, Jay G. The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice. *Science* 1987 ; 237(4820):1324-9.
123. Nudson WA, Rovnak J, Buechner M, Quackenbush SL. Walleye dermal sarcoma virus Orf C is targeted to the mitochondria. *J Gen Virol* 2003 ; 84:375-381.
124. Oroszlan S, Foreman C, Kelloff G, Gilden RV. The group-specific antigen and other structural proteins of hamster and mouse C-type viruses. *Virology* 1971 ; 43:665-674.
125. Payne GS, Courtneidge SA, Crittenden LB, Fadly AM, Bishop JM, Varmus HE. Analysis of avian leukosis virus DNA and RNA in bursal tumours: viral gene expression is not required for maintenance of the tumor state. *Cell* 1981 ; 23(2):311-22.
126. Perrino FW, Preston BD, Sandell LL, Loeb LA. Extension of mismatched 3' termini of DNA is a major determinant of the infidelity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 ; 86(21):8343-7.
127. Pise-Masison CA, Choi KS, Radonovich M, Dittmer J, Kim SJ, Brady JN. Inhibition of p53 transactivation function by the human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax protein. *J Virol* 1998 ; 72(2):1165-70.

128. Poirier Y, Jolicoeur P. Distinct helper virus requirements for Abelson murine leukemia virus-induced pre-B- and T-cell lymphomas. *J Virol* 1989 ; 63(5):2088-98.
129. Poulet FM, Bowser PR, Casey JW. Retroviruses of fish, reptiles and molluscs. *The Retroviridae* 1994 ; ed Levy JA, Plenum Press, New York:1-38.
130. Pozzatti R, Vogel J, Jay G. The human T-lymphotropic virus type I tax gene can cooperate with the ras oncogene to induce neoplastic transformation of cells. *Mol Cell Biol.* 1990 ; 10(1):413-7.
131. Pringle CR. Virus taxonomy. *Arch Virol* 1998 ; 143:1449-1459.
132. Pryciak PM, Varmus HE. Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection. *Cell* 1992 ; 69(5):769-80.
133. Pulsinelli GA, Temin HM. High rate of mismatch extension during reverse transcription in a single round of retrovirus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 ; 91(20):9490-4.

134. Quackenbush SL, Holzschu DL, Bowser PR, Casey JW. Transcriptional Analysis of Walleye Dermal Sarcoma Virus (WDSV). *Virology* 1997 ; 237:107-112.
135. Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, Duran DR, Rafalski JA, Whitehorn EA, Baumeister K, Ifvanoff L, Petteway SR, Pearson ML, Lautenberger JA, Papas TS, Ghrayeb J, Chang NT, Gallo RC, Wong-Staal F. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 1985 ; 313(6000):277-84.
136. Rethwilm A. Foamy virus replication strategy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003 ; 277:1-26.
137. Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J* 1993 ; 12(5):2099-108.
138. Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by a agent separable from the tumor cells. *J Exp Med* 1911 ; 13:397-411.
139. Rovnak J, Casey JW, Quackenbush SL. Intracellular targeting of wleye dermal sarcoma virus orf A (rv-cyclin). *Virol* 2001 ; 280:31-40.
140. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edition 2001 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

141. Sattentau QJ, Moore JP. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J Exp Med* 1991 ; 174(2):407-15.
142. Sattentau QJ, Moore JP, Vignaux F, Traincard F, Poignard P. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J Virol* 1993 ; 67(12):7383-93.
143. Schäfer W, Lange J, Fischinger PJ, Frank H, Bolognesi DP, Pister L. Properties of mouse leukemia viruses. II. Isolation of viral components. *Virology* 1972 ; 47:210-228.
144. Scherdin U, Rhodes K, Breindl M. Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration. *J Virol* 1990; 64(2):907-12.
145. Schulein M, Burnette WN, August JT. Stoichiometry and specificity of binding of Rauscher oncovirus 10,000-dalton (p10) structural protein to nucleic acids. *J Virol* 1978 ; 26(1):54-60.

146. Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 1996 ; 2:338-342.
147. Seiki M, Eddy R, Shows TB, Yoshida M. Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. *Nature* 1984 ; 309(5969):640-2.
148. Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983 ; 80(12):3618-22.
149. Shalloway D, Zelenetz AD, Cooper GM. Molecular cloning and characterization of the chicken gene homologous to the transforming gene of Rous sarcoma virus. *Cell* 1981 ; 24(2):531-41.
150. Sherr CJ. D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* 1995 ; 20:187-190.
151. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Sciences* 1996 ; 274:1672-1677.
152. Slamon DJ, Shimotohno K, Cline MJ, Golde DW, Chen IS. Identification of the putative transforming protein of the human T-cell leukemia viruses HTLV-I and HTLV-II. *Science* 1984 ; 226(4670):61-5.



153. Sodroski JG, Rosen CA, Haseltine WA. Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. *Science* 1984 ; 225:381-421.
154. Song SU, Gerasimova T, Kurkulos M, Boeke JD, Corces VG. An Env-like protein encoded by a *Drosophila* retroelement: Evidence that *gypsy* is a infectious retrovirus. *Genes Dev* 1994 ; 8:2046-2057.
155. Sorensen AB, Duch M, Jorgensen P, Pedersen FS. Amplification and sequence analysis of DNA flanking integrated proviruses by a simple two-step polymerase chain reaction method. *J Virol.* 1993 ; 67(12):7118-24.
156. Spina CA, Kwoh TJ, Chowes MY, Guatelli JC, Richman DD. The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes. *J Exp Med* 1994 ; 179:115–123.
157. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 1976 ; 260(5547):170-3.

158. Suzuki T, Kitao S, Matsushime H, Yoshida M. HTLV-1 Tax protein interacts with cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4A and counteracts its inhibitory activity towards CDK4. *EMBO J* 1996 ; 15(7):1607-14.
159. Swanstrom R, Vogt PK. Retroviruses : Strategies of replication Current topics in microbiology and immunology. 1990 ; Vol.157. Springer-Verlag, Heidelberg.
160. Taganov KD, Cuesta I, Daniel R, Cirillo LA, Katz RA, Zaret KS, Skalka AM. Integrase-specific enhancement and suppression of retroviral DNA integration by compacted chromatin structure in vitro. *J Virol* 2004 ; 78(11):5848-55.
161. Takeya T, Hanafusa H. Structure and sequence of the cellular gene homologous to the RSV src gene and the mechanism for generating the transforming virus. *Cell* 1983 ; 32(3):881-90.
162. Tanaka A, Takahashi C, Yamaoka S, Nosaka T, Maki M, Hatanaka M. Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 ; 87(3):1071-5.
163. Telesnitsky A, Goff SP. Strong stop strand transfer during reverse transcription. *Reverse transcriptase* (ed AM Skalka et SP Goff) 1993 ; pp49-84. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

164. Temin H, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*. 1970 ; 226(5252):1211-3.
165. Tremblay PJ, Kozak CA, Jolicoeur P. Identification of a novel gene, *Vin1*, in murine leukemia virus-induced T-cell leukemias by provirus insertional mutagenesis. *J Virol* 1992 ; 66:1344-1353.
166. Trono D. Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia virus. *J Virol* 1992 ; 66:4893-4900.
167. van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. *Virus taxonomy : the classification and nomenclature of viruses. The seventh report of the International Committee on taxonomy of viruses.* 2000 ; Academic Press, San Diego.
168. Varmus HE, Swanstrom R. Replication of retroviruses. *Molecular biology of tumor viruses, 2<sup>nd</sup> edition: RNA tumor viruses* (ed R. Weiss et al.) 1982 ; pp369-512. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
169. Varmus HE, Swanstrom R. Supplement: Replication of retroviruses. *Molecular biology of tumor viruses, 2<sup>nd</sup> edition: RNA tumor viruses* (ed R. Weiss et al.) 1985 ; pp75-134. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

170. Venable JP. Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res.* 2004 ; 64:7647-7654.
171. Vijaya S, Steffen DL, Robinson HL. Acceptor sites for retroviral integrations map near DNase I-hypersensitive sites in chromatin. *J Virol* 1986 ; 60(2):683-92.
172. Vogt VM. Proteolytic processing and particule maturation. *Cur Top Microbiol Immunol* 1996 ; 214:95-131.
173. Wain-Hobson S. The fastest genome evolution ever described: HIV variation in situ. *Curr Opin Genet Dev.* 1993 ; 3(6):878-83.
174. Walker R. Lymphocystic and neoplasia in fish. *Anat Rec* 1947 ; 99:559-560.
175. Walker R. Virus associated with epidermal hyperplasia in fish. *Natl Cancer Inst Monogr* 1969 ; 31 : 195-207.
176. Wang LH, Duesberg PH, Kawai S, Hanafusa H. Location of envelope-specific and sarcoma-specific oligonucleotides on RNA of Schmidt-Ruppin Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976 ; 73(2):447-51.

177. Weidhaas JB, Angelichio EL, Fenner S, Coffin JM. Relationship between retroviral DNA integration and gene expression. *J Virol* 2000 ; 74(18):8382-9.
178. Weinberg JB, Matthews TJ, Cullen BR, Malim MH. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J Exp Med.* 1991 ; 174(6):1477-82.
179. Weiss S, Konig B, Morikawa Y, Jones I. Recombinant HIV-1 nucleocapsid protein p15 produced as a fusion protein with glutathione S-transferase in *Escherichia coli* mediates dimerization and enhances reverse transcription of retroviral RNA. *Gene* 1992 ; 121(2):203-12.
180. Whitcomb JM, Hughes SH. Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. *Annu Rev Cell Biol.* 1992 ; 8:275-306.
181. Wilk T, Geiselhart V, Frech M, Fuller D, Flügel, Löchelt M. Specific interaction of a novel foamy virus env leader protein with the N-terminal gag domain 2001. *J Virol* ; 75:7995-8007.
182. Williams KJ, Loeb LA. Retroviral reverse transcriptases: error frequencies and mutagenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992 ; 176:165-80.

183. Wolf D, Rotter V. Inactivation of p53 gene expression by an insertion of Moloney murine leukemia virus-like DNA sequences. *Mol Cell Biol* 1984 ; 4(7):1402-10.
184. Wong-Staal F, Hahn B, Manzari V, Colombini S, Franchini G, Gelmann EP, Gallo RC. A survey of human leukaemias for sequences of a human retrovirus. *Nature* 1983 ; 302(5909):626-8.
185. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 2003 ; 300(5626):1749-51.
186. Yamamoto T, Kelly RK, Nielsen O. Morphological differentiation of virus-associated skin tumors of walleye (*Stizostedion vitreum vitreum*). *Fish pathol* 1985 ; 20 : 361-372.
187. Yamamoto T, MacDonald RD, Gillespie DC, Kelly RK. Viruses associated with lymphocystic disease and dermal sarcoma of walleye (*Stizostedion vitreum vitreum*). *J Fish Res Board Can* 1976 ; 33 : 2408-2419.
188. Yoshida M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol* 2001 ; 19:475– 496.

189. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1982 ; 79(6):2031-5.
190. Yu SF, Baldwin DN, Gwynn SR, Yendapalli S, Linial ML. Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. Science 1996 ; 271:1579-1582.
191. Yu SF, Sullivan MD, Linial ML. Evidence that the human foamy virus genome is DNA. J Virol 1999 ; 73:1565-1572.
192. Zhang Z, Du Tremblay D, Lang BF, Martineau D. Phylogenetic and epidemiologic analysis of the walleye dermal sarcoma virus. Virol. 1996 ; 225(2):406-412.
193. Zhang Z, Kim E, Martineau D. Functional characterization of a piscine retroviral promoter. J Gen Virol. 1999a ; 80:3065-72.
194. Zhang Z, Martineau D. Walleye dermal sarcoma virus : Orf A N-terminal end inhibits the activity of a reporter gene directed by eukaryotic promoters and has a negative effect on the growth of fish and mammalian cells. J Virol 1999b ; 73(10):8884-8889.

# **ANNEXES**

## **ANNEXE I**

### **SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES UTILISÉES**



**Séquence du WDSV :**

Code d'accèsion NCBI : NC\_001867

*orf C* : 430-792  
*gag* : 800-2548  
*pro-pol* : 2545-6058  
*env* : 5974-9651  
*orf A* : 9674-10567  
*orf B* : 10570-11490

```

1 ggtctcactc cctcacagtt gctgtgggtg tgtgattcct cttctgcaga agatattaat
61 aaagtgtata acagacaaat gtgactggcc tgggctgctt tcctttcttc gaacatggat
121 ataatttaga taagtgaatt tgaattaaca ttttgggtgc gtgaccgga ttcttcaaaa
181 acctctggat tggataagga ggcttcaatt tatgaagcag gaatacctac ctacactaat
241 aaactggtga gtacctttat attttctcat aactttgtct aaataaaaca ataaaaagag
301 aataaataagg tacaagatcc agcatgtagg tgggaatact cctttattca gagaaatagc
361 aagaatcaca aaaacaaaca agaaaataaa taaatthatt ttgaaggaag gtagacatga
421 ccgtcacgta tggcttggta tcatcagcat cgggtggcacc ttgattactc cattctctaga
481 caaacctcc aagccttttt aaccactatc accttcatag atccccaat taaaatacaa
541 gagaacggac ttacagaagg cgaatacaaa actcaaattg ttaacaaat aataccacaa
601 cttttagtaa taccacacca gaattctcca ccccaatat gggtagaagg ccctagaatc
661 aaaggggatc ctacctggct gaaaataaat gcaaaattha ttactgagct aattccaaaa
721 cagaaaggta ccaaaaatat ttctacaaag acttacttat cacgthtatt cgttatttgg
781 ctacaaaact aaataaacca tgggtaactc ttctctact cctcctcctt cggctcttaa
841 aaactctgac ttatttaaga ctatgctaag aacacaatat tctggctccg tcaaaaccag
901 acgcatthaac caagacataa agaaaacagta cccactatgg ccagatcagg gtacctgcgc
961 caccaaacat tgggaacaag ccgtactaat cccattggat tcagtctcag aagaaccgc
1021 taaagtattg aatthttctac gagtaaaaat tcaagcccga aaaggggaaa cagcacgaca
1081 aatgacggca catactatta aaaactaat agtagggacc attgacaaaa ataagcaaca
1141 aacagaaata ttacaaaaaa cagacgaatc tgacgaagag atggatacca caaacaccat
1201 gctattcata gcaagaaaca aaagagaag aattgcacaa caacaacagc ctgacctagc
1261 ggcaacagcag caagtctcc tttacagcg agagcaacag cgagagcaac gagaaaagga
1321 cattaaaaaa cgcgatgaga aaaagaaaa attattgccg gatataaac aaaaggtgga
1381 acaaacagac atcggatgag cctcttctc tgatgcctca gcacaaaaac ctatcagtac
1441 tgacaacaac ccggacctaa aagttagcgg agttctgact cggtcctaac acacaacagt
1501 accttcaaac ataaccataa aaaaggatgg tacttccgta caatatcaac atcccattag
1561 gaattatcct actggcgaag ggaaccttac tgcacaagtt cgaaatccat tcaggccatt
1621 ggagttacaa cagcttagga aagattgccc tgcactgcca gaaggcattc cccagctagc
1681 agaattggtg acacagacca tggcaatcta taattgagac gaggcagacg ttgaacaatt
1741 ggccagagta atcttcccca cacctgttag acaaatagca ggtgttataa atggccatgc
1801 ggctgcaaac acagccgcta aaattcagaa ctatgtcaca gcatgtaggc agcattaccc
1861 cgcatgatgt gattggggga ctatacaagc ctttacatac aaacctcccc aaactgcccc
1921 cgaatatggt aaacacgctg agataatatt caaaaataat agtggacttg agtggcaaca
1981 tgcgacagta cctttcataa acatgggtgt acagggttta ccccctaaag tcaaccgtag
2041 tctgatgtct ggtaaccggg attggagtac caaaactata ccccaaatca taccctcat
2101 gcagcattac ctaaaccttg caaagcagaca ggatgcaaaa attaaacaaa ctcccctagt
2161 cttacagctt gcgatgccag cgcagacct gaacgggaat aaaggatatg taggctctta
2221 ccctacaaac gaaccatatt atctgttcca gcaacaacag cgacctgcac caagggcccc
2281 acctggaat gtaccagca atacctgctt cttttgcaaa caaccgggtc attggaagc
2341 tgactgcccc aataaaacac gtaatcttag aaacatggga aatatgggac gagggcgaag
2401 gatgggaggc cctccgtata ggtcacaacc ataccccgca ttatacaac ctctcaaaa
2461 ccaccaaaaac caatataatg gccgcatgga ccgggtcacag ctacaagcct ctgctcaaga
2521 gtggcttccc ggtacatatc ctgcatagga tccaattgac tgtccttatg aaaaatctgg
2581 tacaaaaaca acccaagatg taattaccac taaaaatgct gaaattatgg ttacagtaaa
2641 ccacacgaaa attcctatgt tggtagatag aggcgctgct ctgactgcaa taggagggc
2701 ggccacagtg gttcccagc tcaaatthac aaacacagaa attatagctg ttggatttc
2761 cgctgaacca gttccacatg tcttgcaaaa acctacaaaa attcagattg agaacaccaa
2821 tatagatatc tcccctgggt acaacctgta tcaaacatth catattctag gaagagatac
2881 cctttctaaa atgagagcca tagtatcttt cgagaaaaat ggagaaatga cagttctttt
2941 accaccgaca taccacaaac aattgtcatg tcagactaaa aacactctta acatagacga
3001 gtatttacta caatttccag accagctatg ggctcacta ccaacagata ttggctgaat
3061 gtttagtccc cctattacaa taaaatcaa agacaatgca tcattacat caattcgcca
3121 ataccatta cctaaagata aaaccgaagg actaaggcca ttaattagtt cactagaaaa

```

3181 tcaaggaata tlgataaaat gccatagccc atgtaataca ccaatcttcc ctattaagaa  
3241 agcaggtcgg gatgagatc gaatgatata tgacttacgc gcaataaata ataatagttgc  
3301 ccccttact gcagttgtgg caagtcctac cactgtatta tctaacctcg ctccgtcact  
3361 acattggttt acggtgatcg acctctcaaa tgcattcttt tcagtaccaa tacacaagga  
3421 cagtcaatac ctttttgccct tcacctttga gggacatcaa tacacatgga ctgtcttgcc  
3481 tcagggtctc atacatagcc ctaccctggt ttctcaggct ttgtaccaga gtctcccaa  
3541 aattaaatc aaaatttcct cggaaatctg catttacatg gatgacgttc tcattgcctc  
3601 aaaagatagg gacactaatt taaaagacac agctgttatg ttgcaacatt tggcttcaga  
3661 aggacataaa gtgtctaaaa agaaattaca gttgtgtcag caggaagtty tttatctggg  
3721 tcaattattg actcccgagg ggcgtaaaaat actaccagac agaaaagtaa cggctctaca  
3781 gtttcaacia cctactacga tccgacagat tctgtccctt ctaggctctg tgggctactg  
3841 caggcattgg ataccggaat tttctataca tagtaaattt ttggaaaaac aactgaaaaa  
3901 ggacaccgcc gagccattcc aactggacga ccagcaggta gaggctttaa acaaaactta  
3961 acatgcgata acaacagcac cagtattagt ggtccctgat ccagctaac ctttcaact  
4021 gtatacgtea cattcagaac atgcatccat tgctgtgttg actcagaaac atgacaggaag  
4081 aacgcggcct atagcttttt tatcgtccaa atttgacgct atagagtcgg ggcttccctc  
4141 atgtttgaaa gcttgtgctt ccatacacag aagtcttacg caggcggact cgtttathtt  
4201 aggcgcgcca ctgattatct atactacgca tgcaatatgt actcttttac aacgctatcg  
4261 atcacagctc gttaccgctt cccgcttcag ccaatgggaa gcggatttat tacgacctga  
4321 actaaccttt gttgcctgct cagcagctct tccggcgcac ttatatatgc agtcttgta  
4381 aaataatatt ccgctcatg actgctgttt acttaccac cgatctcca gggccccgacc  
4441 tgatttatct gatctcccaa tacctgacct tgatatgact ctgtttctg atggctcta  
4501 tacaaccggc agaggaggag cggcagtagt gatgcacagg cgggttactg atgattttat  
4561 aattatccat cagcaacctg gtggtgcttc agcacaacc gccgaattgt tagccttagc  
4621 cgcagcatgc cacttagcta ctgataaaac tgttaataata tatacagact cccgttacgc  
4681 ttatggtgtg gttcatgact ttgggcatct ctggatgcac agaggcttgg taacttccgc  
4741 tgaactcct ataaaaaatc acaaggaaat agagtacctg ttaaaacaaa tcatgaaacc  
4801 caaacaggtt tccgtaatta aaatagaggc ccacactaaa ggtgtaagta tggagggtgag  
4861 gggtaacgcc gctgctgatg agccgctaa aaatgctgtg ttttttagtcc agagggtact  
4921 gaagaagggg gacgccttg cgagtacgga cttggtcatg gaatacagtg agacggatga  
4981 gaaattcacc gccggagctg agttacatga cgggttatht atgcgagggg atcttattgt  
5041 cctccctcctc gaaatgcttc atgccatcct attggccata catggagtth ctcacacgca  
5101 caaaggggga ataatgtctt atttttogaa attttggaca cacccaaaag catctcaaac  
5161 catagacttg atactggggc atgttcagat atgtctcaaa cacaatccca aatacaaatc  
5221 acgactacaa ggtcatagac ctctaccaag cagaccgttt gccacactac aaatagactt  
5281 tgtccaaatg tgcgtgaaga aacctatgta tgccttggtt ataatagatg tcttttcaaa  
5341 atggccagaa ataataccat gtaacaaaga agatgcaaaa actgtatgty atataatatt  
5401 gaaagacata atcccaagat gggggttacc tgatcaaaa gactctgacc aaggaacgca  
5461 cttcacggct aaaataagcc aggaactgac ccaactccata ggagtggctt ggaaactaca  
5521 ctgccttgga caccacgat ccagtggtat agtggaaga acaaatcgaa ctctaaaatc  
5581 caaaatcata aaagcacaag aacagctgca atttccaaa tggacagaag tgttgccata  
5641 tgtcctattg gaaatgctg caaccctaaa gaaacacgga ctaagctctc atgagatagt  
5701 tatggggaga ccaatgaaaa ccacatattc aagtgatatg tcaacctatg gggccactga  
5761 cacattggtg acgtatatga ataaacttac acgacaattg tcagcatatc atcaacaggt  
5821 tgtggaccag tggccttcta caagcctccc cccaggccca gagcccggtt cctggtgtat  
5881 gcttagaaac ccaaagaaat catctaattg gaaaggacct tttctgatcc tctctctac  
5941 accaacggcg gtaaaagtty aaggacgacc aacatggata cacctggatc attgcaagtt  
6001 attgcatca tctctctcct cctcgttggg ggggcccagtc aaccagctac ttcttagag  
6061 aaagcacttc cgactgatgg tcccagcctg gagacatag aacataagac agaaaatggt  
6121 aatacaacca ggagcgaaga acaaagtccg gttagacct aaaaactag acaacaatta  
6181 atagacgaaa caccagaat atgtgcaaat gcatgggtaa taaggttgat aaccgaattt  
6241 cccaccgaat tagggaatat gagtcaaaaa caaaaaacca tagcaataca ggtgcacaat  
6301 accacaatga ctatggaaga aaccgttttc tccctagtat ctcatgtaaa taaaaagaat  
6361 tatgagatac acaatgtatc aggaatatgt accaaaatcc agttagtacc cggaaacttc  
6421 acgtgtagca cccgaaaaatg cattagtcaa acaaaaagaaa aaaggatcat tagtactacg  
6481 gtaaaagata cctacgaggt ttacctacct ttcgcatggt cacaaaaacc cacaggagga  
6541 gataaatacc cggagccaca aatagggtat aatacaggaa cagggaggct gaaccaatgg  
6601 aacaaagacg aattcgtaat aaaacaatgc agaaaagaaac gaggaaaaag acagatcacg  
6661 gtacctaaca gcacccttcc ccccacaggt actacagact tcacaaaatt tacccctaat  
6721 cctatatctc ccaacagtac ggccctgaat gagcttgagc aaaagactac accaatagga  
6781 acagagcaac catttaataa tgaaaaatgg cagaatttga tatttgggaa tatagttacg  
6841 aaaatggatc ccaatgtgta agccgagcta tttcaacaat ttaatatatc agacaaaacc  
6901 gtacaagtag agtttaagt gactagctc cccggacaaa acatatcatg tcaagcgata  
6961 tacaatactg aacatggtat aaacatagaa aacaaaaact gtgtaataag ccttatataa  
7021 gaaaatcgga aatthaaggc ccatgcttac attacgcgca caggctcata tgagtggta  
7081 gctcagcaag taacttcaaa aggaataata caagaagta gaacctgtg tactatagta  
7141 gaatgtgagt gtcctatagt aaaaaccatta ccaagaaggg gaataattcc attaaccatg  
7201 cctatgaggg tactaccaaa cccttcacct atcctaatac attcagcatt aaaatttgat  
7261 ttatctaaat ttgggttacc cccgtgttca ttctccccta tggaaatggga gacataatatt  
7321 actaaacctt tgaaaagggc tatgcatggt ttcgaggtcc atcaacggaa gaaacgagac  
7381 ctaggaatag gattacatag taccactaac tcatggtgga atgagcgaat ttcattaggg  
7441 ttgaccgtag aaagtgccga cagacaaaaa tatgatcaga aaatcttaaa ggtgttacia

7501 aaccttgcg tacaacaacg aacggatgta aaaaaccaac aaacattggg aaaggcattg  
7561 gaaactccca tatatacagat tacgcttcaa ttagccgaca gtcttacagc agcaatatta  
7621 aagcacgaac aacaacaaaa cgtgggaatc acttgtaaaag atatagccat cctaacagtg  
7681 acgcaaatcg ctacgtacct acgggatatt cagcatgagc acttacctgt atggtttata  
7741 gaacaaataa ctaatacaat tttgctacca gtaggacagg taataatgcc ggagataaca  
7801 gcccccccta tattgaaccc acttattgga tggaccagt cegtccgtgt aataggactt  
7861 acgcaccagc tcactatcac tactgtacag cagcctttat acaaagcagc aaacatggga  
7921 aacttccaag attggactcc cttccctcct tttattctag cgaataaaaac acacggtttc  
7981 agtatcgatt gtcccataat gcgaaactcc tttttgtgcc atacgctccc cacaccagtt  
8041 aaactttcag aatgggaaag aagtacatcg accatttatc aaacgtcacc ccaggtgtgg  
8101 ataacgcctg aaggaaaggc ctgcctaaat catcgaataa taacagttca ggacagaaca  
8161 tgcctgataa acaagccagg gtgctttatc cctaaacatc cttggagtgc agggaaacaa  
8221 actatagtcc caaccataa catacaacag aactttgtgc cagatactat agatacagag  
8281 gataatcaaa cccgggtatt acaaaaaggaa atgataagaag cgataccea ggcaaaaagg  
8341 gactacggag tactaaaaca gggccagata gcattgattc gacatcacga ggctattact  
8401 accattcttg gacaagaggc aacatatagc attaaagaaa cacaggcatt aatttcatct  
8461 atcgaacaag aggcattgga taataattta ttctctgggt atgacggctc tgtatgggtca  
8521 cagctacaat tgataatagt tgttatcaca tgtaccatac cacttttatg ggtatataat  
8581 acatgtttat tttttaaatt acgaagagcc ataagacggg aacgggacaa caatatagtg  
8641 gtagaatacc aagcacaac cagaggaaga agaacgcata tgactgagcc tatcactaaa  
8701 aaacaacgag caaaactgct acgacacgca aaaacaaaca gacgattgccc acgtagccta  
8761 agagctacac cagcgggatc tgcttttgaa atgggtacgt tggatccaca tggatccaca agaagaaacc  
8821 gttgagataa ataggataga cccttctcat accacggagg ccccatgaat  
8881 atggcaccga ttataagtgc ggacagttat gccttgccga ctcttataat taccataatg  
8941 ctagacagag aacttctaaa tcagggcatt gcgaaaagtaa ttacgctctt aaacgatcca  
9001 gcaagagaag tattcaacaa agcatataat ttggttacca ctaatcattt cactctggct  
9061 tatggatgtg acgagtcagc aggatgggtt aaccaacatg ctgaatacat gggaaagccg  
9121 gtaatcgtga cattggcggg cctagtaatt acgcctgtgg gtttggcttg gataccactc  
9181 ccacaacaag aaccattgga aaagttatct atggteccca atagcatgcc acatgtcacc  
9241 gtggccatgg ccgattatca tgagacaaaa gaaatgggca aaattgtgaa agacataaac  
9301 aacgaagaac ttcttttggg aaaaccacaa ctctttaagt gggaccgaag ggttttttgt  
9361 agcctgtccc cttgttataa gaggagtgtg cactggacac agtttgtctc atatcgcatg  
9421 ccctgctacg gcagtacagg ccgaagggac ctaacgcaat ctggcagcac cttatgtatt  
9481 atttcattgt ttattttatt taaagtaatt ttatttctag ttatgtgat cccgatgatc  
9541 taccacattt tattattatt attagtttta tttttttttt attttcttc attatatttt  
9601 attttttatt ttttcttgat ttttcttacg tacgtatata caaacgtata agactactac  
9661 agggtagctc caaatggata tcctctgtaga gtttctaacy gcccaggaac cattatccta  
9721 tggacatata ccgcccgtat attggaaga atattgaaat tggatagata gaatccctac  
9781 acataatcaa gctaccccga acacatggga agcaacccat atggctctgt taaaactaca  
9841 tgggactcct tccttttcta atccagcaca attacctctt gtggcagccg catgcctcca  
9901 gatagctgct aaacacacag aggcacatct aaggctggct gacccagact acataacct  
9961 gctgggagat ggagtctata ctaaacatc gttgcttctc acagaaacaa tggcactatt  
10021 cattgtcggg ggacacgctg gagcatacac cctggctgca tgtgactggt tggtaggatc  
10081 gcttccattc tcccagccg aaaatgactt actacaccct tacatgtacc attacattaa  
10141 actatcttat cgacacagaa caccgcacta tcaactcact cctggctgca gagcggcagt  
10201 agttattgct gggccgtaa aaggtgcaga tctctacagc ttcatgtct cctcctaata  
10261 gatgtatcat ctaactcaca tctctacagc ctttggcgaa gcagaacaga cccacttcac  
10321 tgcagcatta cagagacaaa tcaatctgga ctttggcgaa gcaagaacaga gagaggcggc  
10381 tgagagaaga gccctgttgg aaagagagag agagcaacaa ttacaagaag cgagagagag  
10441 attagatgat gtgatggcag tactggaggc agaggttgca atcacgataa ccacagccac  
10501 tgaaggcacg gacgctgaag acacgagtga ggtcagctc atcaacgctc tcgatccaat  
10561 aggataacta tgttttcaga ctcagattcc tcggacgagg aactaagcag aataattact  
10621 gacattgacg agagcccca ggataccag caaagtctac atctacgtgc tggggtaagt  
10681 cctgaggcaa gggttcccc tgggtggatta acacaggaag aatggacaat agactatttt  
10741 tcaacatatt ataccccact tttaaaccc ggtatacccc atgaaactaac acaacggtgt  
10801 acggattata cggccagtat tttgagacgg gcatcagcaa aaatgataca atgggactat  
10861 gtgttttacc tgcttctcag agtatggata atgttcccc ttatagcacg ggaaggccta  
10921 tcacacctta ctcacttatt gactettacc gatagaattg tgtaatgaaa ttcgttgggt  
10981 ttgggatggg atctaactgt gtttagcgcaa ttttctattc tgaatattca aggtgtatat  
11041 ttacctgaag taatagagtg gtttagcgcaa ttttctattc tatttacgca tgttacggtg  
11101 atagtagtgt ctgacggcat gatggactta ttactaatgt ttccaatgga catagaagaa  
11161 cagccattgg ctataaataat cgctctgcat gctttacaaa cttctatac tataatgacg  
11221 cctattttgt ttgcatctcc gctattagg attatctctt gtgttttata tgcttgtgga  
11281 cattgtcctt ccgctagaat gttgtatgca tacacaatca tgaatagata cacgggggaa  
11341 tcaatagcag aaatgcacac tgggtttagg tgtttcagg atcaaatgat agcctatgat  
11401 atggagttaa ccaattttct cagggatctg acagaggaag aaactccagt attagagata  
11461 accgaaccag agcccagccc tacggagtaa ctgtgtacat actccccctt tttccccacc  
11521 cctacatgtc atagtgtctc tgaatcgggc cgaccatgtc gtgtctgatg caggtgtcga  
11581 cacactggaa atataattaa aagaatctac ctcatgtcca tttttcagaa ttgtacaaat  
11641 caacacatct ttgtgttgtt agtacaaaag ggggaaatga gaaactaatt tttgttattt  
11701 tattatgttc ttatattcgc ttagctattc ttaaattgtt agtaagggtga catatgcatt  
11761 tcttctgata catgtttttt ctatgttgtg ttaaactatg ttatgtaacc ggttactgccc

```

11821 agacgctgta tactgactca tatgtaaccg taaaggccta taaaaagata cgctgatccc
11881 agatcagcat ggtgccagat gctagtagac gctaaccaca tataattaa cccatctggt
11941 tgtcattata ttgttgacac ttaggaaagt gctgtatagg cctaaagtag aaataacaac
12001 tgatcgtgga acagttggtg ctgaatgcat gttgccttca aacagtggtt tcttcaaaca
12061 gtatttactt ctgagaatcc atgaaagtat ataacgggtg cttgttcggt aagaacgggg
12121 tctcactccc tcacagtggc tgtgggtgtg tgattcctct tctgcagaag atattaataa
12181 agtggtataac agacaaatgt gactggcctg ggctgctttc ctttcttcga acatggatat
12241 aatthagata agtgaatttg aattaacatg agaaactaat tttgtttatt ttattatggt
12301 cttatattcg cttagctatt cttaaattgt tagtaagggt acatatgcat ttcttctgat
12361 acatgctttt tctatgttgt gttaaactat gttatgtaac cggttactgc cagacgctgt
12421 atactgactc atatgtaacc gtaaaggcct ataaaaagat acgctgatcc cagatcagca
12481 tgggtgccaga tgctagtaga cgctaaccac atataattaa acccatctgt ttgtcattat
12541 attggtgaca cttaggaaag tgctgtatag gctaaagta gaaataacaa ctgatcgtgg
12601 aacagttggt gctgaatgca tgttgcttcc aacagtggtt ttcttcaaac agtatttact
12661 tctgagaatc catgaaagta tataacgggt gcttgtgtgt aagaacgg

```

### LTR du WDSV (598pb) :

Recomposé à partir de la séquence NC\_001867

U3 : 1-446  
R : 447-522  
U5 : 523-598

```

1 gaaatgagaa actaattttt gttattttat tatgttttta tatttcgcta gctatttcta
61 aattgtagt aaggtagcat atgcatttct tctgatacat gctttttcta tgttgtgta
121 aactatgtta tgtaaccggt tactgccaga cgctgtatac tgactcatat gtaaccgtaa
181 aggcctataa aaagatcgc tgatcccaga tcagcatggt gccagatgct agtagacgct
241 aaccacatat aattaaacc atctgtttgt cattatattg ttgacactta ggaaagtgct
301 gtataggcct aaagtagaaa taacaactga tctgtggaaca gttggtactg aatgcatggt
361 gccttcaaac agtgttttct tcaaacagta tttacttctg agaatccatg aaagtatata
421 acggttgctt gttcggtaag aacggggtct ccccctca agtttctctc ttcttctctc
481 ttcttcttct gcagaagata ttaataaagt gtataacaga caaatgtgac tgacctgggc
541 tgctttcctt tcttcgaaca tggatataat ttagataagt gaatttgaat taacattt

```

LSP 3 : 5' GGTGCTGAATGCATGTTGCCTTCAAACAGT3'

LSP 4 : 5' AGTCCCTCACAGCTTCCCTGTTGCTTCTGAT3'

LSP S2 : 5' GGCTGCTTTCCTTTCTTCGAACAT3'

LTR FO : 5' ATGTTCTTATATTGGCTTAG3'

LTR BA2 : 5' CAGGCCAGTCACATTTGTCT3'

**Séquence du gène de walleye homologue à la calpaïne :**

bankit748306 + bankit735345

```

1   CAGCTGCTGG AATGTGAACG CCGAGTCAGA GATATGATGT CATCTTTGAT TTCTTCCAGT
61  ATCTGTAATA TTACATGGCT GCTTAATGAT TTCCTTAATC ACTCAACTGA AAAAGTGTGA
121 TCCTTGTTGAC AAAAATCTTT TTAGCTTGTC TCCTTGGCCT GTCTACTTCT TGCTCGGGTT
181 ACTGCTGCCA TTTCACCAGG AGGCATATGC CAAGAAACCT GCCTCCAATF CTTGTATATG
241 GTAATATATC GCATCTGCAG CCGCTTTGTA GTTCGCGTCA GGGGGAATAT AACTAGACA
301 TACAAATAGT TGCCCAAAC CTCTGGTAA ATATGTGGGT CTAGGGAAA CCGATAGGAG
361 TTCTAGGTTT GCAGCGTTT ACATTCGTTT ACACACGACT TGACACCGAA GGACCGTAAT
421 TAACAAACAA AAACAACAGA TACTAATAGA TATTGACCAA ACAATCAGAG CTCCCGTGTG
481 CATGTCAGCC GCTGAGCAGC GCCACATTCT TTATAATAAT AATAATAATA ATAATAATTC
541 CTTCCGCGCT GTCGGCGCTC GGGCCCTAAT AAAATACAAA AACCTAACTT GGTTTAGTCT
601 TCGACTGTCT TATTTTGTGT CACCTTCCTA TTTTAAACAT CTACACCTGC TGCTCACGAA
661 AACTTCCACC ACAGTATCAC GGATTACAAT TACAATAAC AACAGCCTTG TTCATACGGG
721 AGGCAGACTT CACACTGTCA AACCCACCA CCTCCCCGAC AGCATAGTGT GCCTCCTCCA
781 CTGAACAGCC CACATGCGGG GAAATCCTCA CCGCATGTCG GCGTGTGAGC TTCTCCAGCA
841 CCGCATGGTG CAGCCAAAC ACGGGCATAA TGCCCGGCTG AACTCAAAC TACCTGAACA
901 AAACCACCA CCAACTAATA ACTAACAACT ACACAACAAG ATAAACACGT ACAAACCCCT
961 AAATAAACAG AAAAACAGAG ATAGAACTC ACACGCTCCG TAGACACTCA CACATCCGCT
1021 CAGAGAGACA GAGACAGTTC GTCGTTGAT CGTTAACGTA GTGACTTFT GTGACTTFT
1081 GGGTCTGAGG TGTGTGTCAT ATTGTAGTGT CCAGAGCTCT GCTGCTCTCT CTCTGTCTCT
1141 GGTCTGTCTC ACTCAGGGGG AGAGGGGGGA GAAGGGGGGA GAGGGGCCAG CGGCTAGAGC
1201 AGCGGAAGCC AGTGTGCGCT TCTTTTACCG ACGATATCTT TTGCGTTTCT TATCCAAACA
1261 ACGTCAAACA CTGCATTAT CCAAACACAC ACACACACAC GGGTGGAGTG ACGAAGCTCT
1321 AAAGAATGAA GCTGTTTGTG GCTTCAGTCT CTCAGCAACA GAACTCCCTT CCTGCTTCA
1381 TGTTGACACA CTTAATACAA ACAGGACCGG AAGTCTGACC TGCACTCTCC ACAAATAAAA
1441 CTCCTGTTGT CTTGGTGAA AAACAACTC ATGGAAGTAA AAGTCTGAAA TGTAATAACT
1501 GAACTGAATC ACCTGAAAC AGGAAGGAAC CCTTCAAATG TTAACGGAG AATATTCAGA
1561 TTATTTACTT TGGTGAAGGT AGAACTAAA CACGCTAAA GTCTGATTA TTTACATGGA
1621 GTCTGGTGGG TTTGGTGATG GTGATTTCCG GGCTGTTTCA TGTTAAACTA AAAGGATCTT
1681 ACTCTTTGAC TAAAAGGTC TATCTCTGTA GGGATCTTTT CATAATGTGT CTGACATCTT
1741 TAAAAGTGA AGGATTTTAA TTTGAAGTA CTCACCAGTT TGACTGAAAT CCAACAGAG
1801 TCAACACTCC CTCTCTGGCA CAGCACACAC CTGCAGCCCC ACCTCTTTTC CTGCAGACTC
1861 TCCCAAACCT TTCCAGGAAC CAAACCAAAG ACCCTCCAGA CTCTCCCCGT TCCAGACTCT
1921 CCCCCTCCA GACTCTTTAC TCCATACTCG ACCGAGCTGC AGCATGTCGG GCATCGCCCG
1981 CACCCGTCAG CGCCGCGGG AGAAGGAGCA GGGCATCGG TCGTGCAGC AGGCGGTGAA
2041 GTACCTGAAC CAGGACTACG AGGCTCTCGG CCGCGCCTGC CTCGAGTCCG AAAGCCTCTT
2101 TAAGGACGAC GCGTTCCCGG CGGAGACCTC TTCTCTGGGC TTCAAAGAGC TGGGCGTTGG
2161 CTCCTACAAG ATCCGCGGGG TTTCTGGGA GAGACCGAG GTCGGTGGGA CTTAAAAACA
2221 CTCATTATTT TAATGGAGTT TGGTACAGAG CAACTGAACA GACGACACAT AGGAAAAGAT
2281 TTAAAGATGA CCACAACCTG TTGACATTG TTCAGACGTC TCTTCTTTTC TTTGCACATA
2341 GTATCCACCA AACTGTTGAA ACAATTCAC TCAATGAGTT TAATAATCCT AAACCCAAC
2401 CGCCCCAATG ATTGGCTGAT AATATTCAG TAACAAAAAT ACTTGTATCT CTAACTTTAT
2461 CAACTGCTTC TGGTGGCAA TGTCTTACG CATTACGCAC GCACACATCT GTGCATGTGT
2521 ACGGTTGATA ATGAGGCCCC AGGGTTTTGG GAATGATTGA GGGGCAATT AAAAAGCAGG
2581 ATTCTGTGAA TGGAGTTTGG TTTGAGGPTT GTTTAGTGGA GCATAAGAAG CAGCTCAGCG
2641 TGTTCTGCAG GTGTGAAGAA TCTGTGAGAC ATCTGAAAAC ATCAGATTAT AGATGAAAT
2701 GTGGATTATA TATTGCAGAT TAGAGGATAT TTATCTGCTC TGTATCTCAG TCTGTTGGCT
2761 GCTAACACCC AGCGCTGAAA GAAATAAAGA AAAGGAAGAA AGGACTCAGT TTCCTGTCCC
2821 AGAGGAGAGA AGAACTAGA AAATATTCAC ATTTAACAAG CTGACATCAC ACACATTTAC
2881 CTGTTTTATC ATACTGATTA ATGGATTATC AGAATAGTTG GCGATTAAGT TAATAGTTGA
2941 TGAATAATCC CTTTATCTTT GCAGCGCTAT GTAATGAAT GTATGTATTT TTCAGAAGCC
3001 CCAGACAGCG AGCGTGCAGC TGAAGGTGTA ATCAGATCTC TGTGTGTTT CCTGTGCAG
3061 AGTTTACCTC TGACCCCGAG TTCATCTGCT CCGGAGCCTC CAGGACCGAC ATCTGCCAGG
3121 GAGCGCTGGG TGAGACACAA CATTAAAGTCA CAGACATTTT AAGTTCTCTT TGTGAATTTT
3181 TAAACCAACA TGTCCACCTT GCCAAACCCA CCAGACTCCA TGCAAATAAT TACTACTTTT
3241 ATCAGCGTAA AACACACTTC ATTCAAAGTG GACAGAAACT AAATAAAACT ATCAAAGGCC

```

3301 ATCTTGGTTC ATCTTTCCAC TGTTCACA AATCACCCTC TGGTTTGGTT GAAATAAAC  
3361 CTTAATTCAC CCATTTACAT GTGGAGATAT GCTGGCTCTA TACACGCTAA AAGTCTCGAT  
3421 TATTTACATG GAGTCTGGTG GAAATATGCT GGCTCTATAC ACGCTAAAAG TCCTGATTAT  
3481 TTACATGGAG TCTGGTGATG GTGATTTTCA GTTAATCAAA GTGTGTGTGT GTGACAGACT  
3541 TGGCGCGCGT TGTCTGTCTG TCAACAGAAA CATTAAACCCA TTAACAGCGA GGAGTGTGTT  
3601 GACATAACAG TAACTAAGGG AAACACCTGA GACAGGCCGG GGGGGGGATT TAATTTCCAT  
3661 CTACAGAAGC TATATGAGAT ATTTTTCAAG ATATTTTATA ACAGAATGCC TAAAACCTGA  
3721 ACATCATTTT TAAAAAGCAT CCAGTTTATA TCTAACCTCT GTCTGTCTGT CTGTCTGTCT  
3781 GTCTGTCTGT CTGCTTCTCC **AGGTGACTGC** **TGGCTGCTGG** **CTGCCATCGC** **CTCTCTGACC**  
3841 **CTGAACCAGG** **AAGTTCTGGC** **TCGAGTCGTC** **CCTCATGGAC** **AGAGCTTCAG** **TAAAGGAGAG**  
3901 **TATGCCGGGA** **TCTTCCACTT** **CCAGGTACAC** AGAGAGACAG GCAGGCAGGC AGACAGACAG  
3961 ACAGACAGGC AGCGCCTGTA CGAGTTAGAT TTAAGAAGT AAAACAGAAC AGCAGAATTA  
4021 GAATCAGGTA ATCCTGAAAA AAGAAAATTG ACCTGCCTGT CTGTCTGTCT GTCTGTCTGT  
4081 CTGTCTGTCT GTCTGTAGTT **CTGGCAGTTT** **GGGGAGTGGG** **TGGACGTGGT** **GATTGACGAC**  
4141 **CGCCTGCCGG** **TTAAAGATGG** **AGAGTTGCTG** **TTCGTCCACT** **CGGCCGAGGG** **GAGGGAGTTC**  
4201 **TGGAGCGCTC** **TGCTGGAGAA** **AGCCTACGCC** **AAGTAAGACC** AGCCAGGGAT TCAACCCAC  
4261 AACCTTCTGT TCACTAACCC TAACCCTTAC GCCAAGTAAG ACCAGCCAGG GATTCAACCC  
4321 CACAACCTTC TGTTCACACG GGTTCAGTGT TTCATCTCCT CTCTGCTTCA CAGACAGTTC  
4381 GCTGTCTAAT TAAATGTTCC AGGTCAAACC GGACTAACCC AAGCTACCAC CAGAGTAGAG  
4441 CTTCAAATAT TAATCCATTA ATCTATCAAA GATTTATTTA TTACTTTTAG CTAAGTATGT  
4501 CGACTGTTTG GTGATTATTT TAAGCTATTT ATTTCAACCA TTTATTCTCA AAATATTCCA  
4561 ACTTTTTTCT AAAATACTAC GACCTTTTGT GATAGAACAA AGAGACAGCA GAACTTGTTT  
4621 TGAACFTTTC TTCAGTATCA GTAGTATATC TATGATATAA TCCTCCACCT GTCCCTGGAA  
4681 CAGGATCTCT ACTACAACCG GTAACTTGAT CAGCTGATCG CTGGGGCGGT TCAGGTGATA  
4741 ATAGACGCTG TGTGAGGTGT GTTCAGGTTT GGTTCAGCA CGTCGCTGAA TTCTTTACAT  
4801 TTGTTTCTCC AGCAGGATGA AACACACAGA CGCACGCACG CACGCACACA CACAGACACA  
4861 CACACACATT TAGACACACT CACACACGCA GACACACACA CACGCAGAGA CACACACACA  
4921 TGCACACACG CACACGCAGA TATACACACA CACACACACA CACACAGACA CACGCACACA  
4981 CACAGAGACA CACACACGCG CATGCACAAA TGCAGACACG CACACGCAGA CACACACGCA  
5041 CACATGTGTG GTTATCTCTC TGTGATGTCT **CTGCAGGTTG** **AACGGCTGTT** **ACGAGGCTCT**  
5101 **GTCTGGAGGA** **TCCACCCTG** **AGGGGTTGCA** **GGATTCACC** **GGAGGAATCG** **CAGAGGTCTA**  
5161 **CGAGCTCAA** **CAACCCGATG** **CTCGGCTGTT** **CCACATCATC** **CAGAAAGCTC** **AGAGCCGAGG**  
5221 **CTCACTGATG** **GGCTGCTCCA** **TAGACGTAAG** CTCTGATATA ACAGAGAGGA AACACTGGGG  
5281 TACAACAGGG TATACATAGA CGTAAGCTCT GATATAACAG AGAGGAAACA CTGGGGTACA  
5341 ACAGGGTATA CATAGACGTA AGCTCTGATA TAACAGAGAG GAAACACTGG GTTACAACAG  
5401 GGTATACATA GACGTAAGCT CTGATATAAC AGAGAGGAAA CACTGGGGTA CAACAGGGTA  
5461 TACATAGACG TAAGCTCTGA TATAACAGAG AGGAAACACT GGGGTACAAC AGGGGAAACA  
5521 CCGGGGTAAA TCGGGGCACA CAGGGCTACA ACAAGGAGCC AAACGGAAAA AAGGGGAAAC  
5581 CAACTGGGTA AACGGGGGTA CAACAGGTAA ATAAACAGTT TTCTAGCAGA CCTGGTTAAG  
5641 CTGTGATCAA TTTTGA AAAA CAATTTTGGG AGTTTAAATT GAAGTGCATA TATATATATA  
5701 TATATATAGA TAGATATATA TATAGATATA GTATAGTCGA GGAGGTTCAA CGTTTGTATT  
5761 AAAGTTAATT GAAATGTTTT **CCAGATCACG** **AGCTCGTCTG** **AGTCGGAGGC** **CGTCACTCTT**  
5821 **CAGAAGCTGG** **TGAAAGGCCA** **CGCCTACTCT** **GTGACCGGCA** **CAGCTCAGGT** **GAGAGCTGAG**  
5881 AGCCCCCCC CCTTGCACCT CAGCTGTCTG TCCTAACAAA GACCTGCGTT TTTGCCGAAC  
5941 ATCTGACGGC TGATGCAGGC CGTGTGAATG TGGCATTAAA CCACATTTCC CATGAGTCTT  
6001 AGCTCCTAGT CCTGGAGCGT TATACATTTG TTGAAAGTTA ATTGTGTTAA AAGGAGCAGC  
6061 AACACCTGCA GAGGGGCGGG TCTTCAGTCA GGTGGTGGGG CTGCTGGCGG CCAGTCAAGT  
6121 GTAACCTCTG GTGTGATTGG **CTGCAG** **AGCAACAGGG** **AGCAACAGGG** **AACTGATCC**  
6181 **GGATTAAGAA** **CTCTGGGGA** **CAGGTGAAAT** **GGATTCGAGC** **CTGGAGGAA** **AGGTAGGTAA**  
6241 CCCCCAACAG AGGGAGGGGG GGCATTTTCT GACATTTTTG TCTATTTTTT AGACTTATTG  
6301 TCACTTTTTT CAACGTTTAA GTCTTTTTTT CGGAAGTTTT TGGCGCTTTT TTCGACGTTT  
6361 TGCGGGGGGT GAGGTGAGAC ATTTGACTTC CTATGTACAG CCACCAAGC CCTCTGGGAA  
6421 CTGTAGTTCT AAAACATAGC GCATGATATG CCCCACATCAG TAGCAAGCAG ATATTGTTGC  
6481 GATATTTACT CTGTGTTGGA CAGATTTTAA TTTCGGCGTC ACATCTTGTT AAATAAAATG  
6541 CTGTGGACAG ATACTTCCC GCTTTATTGT GAAACC GTTT CCTGCTTTGA **CAGCTCGATG**  
6601 **CAGTGGCGTC** **GGATCAGCTC** **CGAGGACCGC** **GAGCGTCTGA** **GTCTATCGCTC** **CGAGGACCGA**  
6661 **GAGTCTCTGT** **AAAACCTCCAC** TTCCTGGCTC CAGATATTCT ACTTAAGTAA AAATACTATT  
6721 ACTTTTCATGA ACTTCATGTA AAATTATCGG TATAAAAATC TACTCAAGTA AAAAGTACTT  
6781 TACAAGTACC TACTTTTCAA CAGTGGGGGG AGCTATACTT CAAGTTTAAG AAGTTACAGT  
6841 ACATAAGAAA ATGGCCAGT TACCGTGCCT GATTGTAATC CGTGAGGTTG TGTGTGTGTG  
6901 TGTGTGTGAA GTCAACCCTC TGCCTGCTCT **TGCAGGATGT** **CTTTCGCCGA** **CTTCTCGCGA**  
6961 **CATTACGACC** **GTCTGGAGAT** **CTGCAACCTG** **ACGCCCGACG** **CCCTGAGCGA** **CGACACTGTC**  
7021 **TCCAAGTGGG** **CGTTGTCCAA** **GTTTCGACGGG** **AGCTGGAGGC** **GCGGATCCAC** **CGCCGGAGGC**

7081 **TGCAGGA**ACT **ACCCGG**GTCA **G**ACATCCTGC AAGCAGTGGT GGACAGACAG AGAGACAGAG  
 7141 AGGCAGGCAG GCAGGCAGAC AGGCAGAAAC ATCAGAGAGA CAGACAGGGA GACAGTAACA  
 7201 TGAGAGAGAC AGACAGACAA ACATTGTCCC ATGAGGGAGA TTAGTTTCCA CAGTCGGTTT  
 7261 TATGCACATT AATGCGACAT AAAGACCGTA AATAGAAACA TATTTACATG GCAGCGGTGA  
 7321 GGAGTCTGGA TGTAGAGAGT GATAGACGTC ATGACAATGG TGAGGGCAAG GCGTGTGTTC  
 7381 CCCCCCATTG TTGAACCCAA AGTTACGCC CTTGGCTGTTG CACAAATTA ACATCTACTA  
 7441 CCGTTGCTAT GGCAGCGTTA CCTTATCCTT CCAAAACAAC AGCTCCAGCA TCCTAAACTG  
 7501 CTGGGTGAGA AAACATATGG TCTCCGGGA GTAAACTCCC CAGAGCTAGG TTAGTGACAA  
 7561 GCATGTCTGG GACATGGATG CACCCAGATG GAAAGAGAGA GGAGAGAGGA GCTCAGTGTG  
 7621 TCACAGGAAG TCCCCCGCA GTCTAAAAC AGAACAGCAG AACTAAGAGC TGGTCCAAGG  
 7681 CAGACCTGAG CCAGTTCTAT AAGGATTGGT AGATGAATCT GATGACTATG AAGACAAGCA  
 7741 GAGAAGAGAA TAGCACCCTA AAATGTAAT AGTGACCCAT TCTGGATACC GCCATTGTCT  
 7801 CTGTAAGCAG CAATGCATTC TGGGAGCGTC ACGGTGAGGG GCATTGAGTT TCCCCTCCT  
 7861 CATTTCAGAA AAGTTGAATC CATGCTACTT TATGCTAATG AGGGGCATCC AGCTCGACTC  
 7921 TCCGCCCTG GAAAACGAA CATCTTTCAG AATAAAAGTC TGAATATTTT AACAAATGT  
 7981 TGGAAATGTTA TGAGAAAATA GTTGAATAT TTTTCGCAAA AAGTGAGAAT ATTTTACTT  
 8041 GACGGTCAGC CTCTGGACAA CTCCTGAACA TCTTGTAAT GACCGTTGTG GATCTACATG  
 8101 AAGACAGATT CAGCTACAGA TTAATCTCT CTAGAACTGT TTTCTTAAAG TGAATGTGAG  
 8161 AGAGTCTGAC GTTTAGTTTC CGAACGCTGC **AGACACGTT**C **TGGACCAAC**C **CTCAGTTGT**  
 8221 **GATCCG**TCTG **GAGGAG**AAAG **ACGATG**ACCC **GGCCG**ACGGC **GAGCTCG**GGCT **GCAGC**TTTGT  
 8281 **GTTCAG**CTG **ATCCAG**AAA **ACCGG**CGCCG **CGCCG**GAAG **CTGGG**GGAGG **ACATG**CACAC  
 8341 **GGTCG**GCTT **GCCAT**CTACC **AGGTG**AGACA **CGTGC**ACACG **GTGGG**TTTCG **CCGTCT**ACGG  
 8401 GGTGAGTAGT CTCTCACGTC CAGACCTCC TCCACAGCGC TCGGAGGAG GGTCTGTCTA  
 8461 GTCCACACAG CATTCTGGA TGGGAGTAAA ACGTGCTCTG GTTTATTGGC ATTTCTTTAA  
 8551 ACCAATCACA ATCATTGTGG GCGGGGCTAA GCTCCGGACG GAGCCACGGT GCGCTGCTA  
 8581 AATAGTCTCA GGAAGGAAC TGTTTTGGTG GAACATGTGG ACGTTCAAAA GTGGTTTTAG  
 8641 TCGTTCAACA GAAAACCCG ATTGGACAGA TAGTCTAGCT AGCTGTCTGG ATTTACCTG  
 8701 CAGAGATCTG AGGAGCAGTT AACCATAGTC CTCACAAATC CACCAGAGGT TAGA**ACGCCA**  
 8761 **ACACAG**AGAC **AGAGGA**AGG GACGGACATC CGGTGGATCT TCCACCGGC CCGAGCAATC  
 8821 CTGGAAGTGG AACGTTGTGG ATATAGACTA CAGAGTGAGA CACATGCACA AGGTTGGGTT  
 8881 CACCGTCTAC CAGCTCAGAC AGCAACTTGT ACTGTTCACT CCGGGCTGTT GGAGTTGCTT  
 8941 **CAGGT**TACAC **AGCGT**GTACC **ACGTG**ACGTC **TACGT**CCAGG **CGTCC**TACA GGATTCGAT  
 9001 GCCTTTTTTT GTGATTGTTA CAGCCCAAT GCCTTAGTTT GTGGCAGCTT TTGTAACAAA  
 9061 AAATTGCGAC GTATTCTCTG TTGTCCTGCC TAACAGACGA ATTGAAACCC AAGCTCCTTG  
 9121 GTGCTTTTTT GTGGATTTTT TCATCGTGT TTTGCGATG TTTTGTGGT TTTCTCTGAG  
 9181 CGAACTGAAA GAGGATCTCC TCGCGGAGG TAAAGAGCTC TTTGTTAACT CTCGTTCTTT  
 9241 CTTCTGTTGC **AGGTT**CCTGA **TGAGG**TACGG CCATCTTCT GCAGCTCACA GTTTGTTGCT  
 9301 CAACATTCA TTCTATTTTT TATCTGTGAC ATATTAGTC TCCAGTCTCA CCTCGTGTCT  
 9361 CTCTATCTCA **GTTCG**CGAT **CAGAG**GAAGC **TCCAC**CTGAA **TAGAA**TTAC **TCTCT**CGCT  
 9421 **ATGCT**CAAG **CGCTC**GCTCC **GAGACT**TTCA **TCAAC**CTGAG **GGAGG**TGTC **AGCCG**CTTCT  
 9481 **GTCTG**CCGCC **CGGAA**AATC **CTAACT**TTA **CTTAA**AGG **TAA**CGCAC **AAGA**ACGGAG  
 9541 **ACTT**CTGCGT **CCGCT**CTTC **TCCG**AGAAAC **AGGCT**GACTT **TCA**GTAAGTC AGATTCCAAC  
 9601 TGGGCTGCAG ACGCGGCGT GCAGGCAGAG GCCCAGATT CAGGGTTGAG GGTAAATGG  
 9661 GGGCCGGGAT GTTCCAACCG ATAAACCAGA AAATCTCACA GCCTTTTAT CACAGGCACT  
 9721 GTTTATAAAA TCATCTTCAT CTTCTCTAAA TGTACTTTCA TAAAAACTGG ATATAATGTT  
 9781 TTAATAAGGA ATGATGTTTT AAAGCTGAT GTGTTTGTG CT**GCAGAG** **ATGAC**GACC  
 9841 **CTGTC**GAGAG **CAGAG**TGGAG **ACGGT**CAGAT TTCACTCATT AACACTATAT ATATAACTA  
 9901 TTAGGGTTAG GAATCAGCAG ATATGAGATA TTCTGCGATA CATTGCAAAA TCTAATATAT  
 9961 CTTTATTATA TTTGATCAAA CTGCACCATC TAGTGGACTG AAAGAGCAAC TGATTGTAGT  
 10021 ATTCTGGTAC CCAAAGTTTA ATTATCAAGT GCAATTTATA TAATAAAAAGA TCGATACCTG  
 10081 GCGTCTGTAT TAATAGTCTG GATCATGGAA GAAGATAAAA GATGGATATC TATACAGTGT  
 10141 TACCACGGCA AATATCGCCA CATTGTATCT GTTTCTAAA ATAAACCTGT GGAGGGACGA  
 10201 TTTGTTGATT TGT**CCAG**AT **TGAGAT**C **ATGAG**CAAT **CTGAG**CAAT **GTT**CAGAAAA  
 10261 **CTGTT**TGAAC **AGCTG**GCAGG **AGGG**GTGAGC TGCTCATCTA TTGTACATTA CACATTTATA  
 10321 AATATAAATA TATATATATA TATATGTATA TGTATATATA TATATATGTG TATATGTATG  
 10381 TGTGTGTATA TATATATATA TGTGTATATG TATGTGTGTG TATATATATA TATATATATA  
 10441 TGTATGTGTG TGTGTATATA TATATATATA TATATATATA TATATATATA TATATATATA  
 10501 TATATATATA TATATATATA TGTGTGTGTA TATGTGTGTG TATATGTATG TATATGTATA  
 10561 TATATATGTG TGTATATGTG TATATATATA TGTGTATATG TGTATATATA TATGTCTATG  
 10621 ATATGTATAT ATATATGTGT ATATATGTAT ATATATATGT GTATATATGT GTATATA

Il manque environ 230pb (impossibles à séquencer) dans l'intron 14-15.

10678 TGTGTGTGTG TATATATATA TATATATATA TATATATATA TATATATATA TATATATATA TATATATATA  
10738 TATATATATA TATATATGTG TGTGTATATG TGTATATATA TGTGTGTATA TGTGTGTATA TGTGTATATA  
10798 TATGTGTGTA TATGTGTATA TATATATGTG TATATGTGTA TATATATATG TATATATATG TATATATATG  
10858 TATATATATA TGTGTATATA TGTATATATA TATGTGTATA TATGTGTATA TATATATGTG TATATATGTG  
10918 TGTATATATA GATGTATATA TGTATATATA TATGTATATA TATGTATATA TATGTATATA TATAGATATA  
10978 TATATGTATA TATATATATA TGTATGTATG TGTATATATA TGTATATATA GATATATATA TGTATATATA  
11038 TATATATGTA TGTATGTGTA TATATATGTA TGTATGTATA TGTATGTATG TATGTATATA TATGTATATA  
11098 TATATATATA TATATATATA TATATATGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGCG TCTCTGTGCT  
11158 **GCAGGACTGT** **GAGATTTCC** **CCTACGAGCT** **GCAGAAGATC** **CTCAACAGAG** **TGGTGACCAA**  
11218 **ACGTGAGAAA** CAAGACTTTT CTGCATTTTC AGTGATTTTG TCACTTTTGT TTTTGAATGT  
11278 TTATCGATGT TTGATGCTTT ATCCGACAGT TTTGACGTTT GTTTGCCAGT TTTTGCCTGCT  
11338 TTTGACGCTT TTCCGCCATA TTTGCCCTT TTCTCAGTGT TTTTGTAGCA GGTGTATTTT  
11398 TCGGTGTGAA CACTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGA ACAGTGTATC TGTGTGTGTG  
11458 TTTCT**GCAGG** **TTCTGACATT** **AAGACCAGCG** **GCTTCAGCA** **CACAACCTG** **CTAACATGG**  
11518 **TCAACATGTT** **GGACGTATCC** TTTTATTGAA ATAATCTCCT GACGTGTTAT AGATCAGATG  
11578 ATTAACGGAG AAATAACTGT AGTTCAGTGT ATAAACCAGA GACAGTGCC CCACTGGCTG  
11638 ATGGGTAAT AATGTGTGTG TGAACCTCCT GAACGTGTCT **GCAGAAAGAT** **GGCAGCGTA**  
11798 **AACGGGTCT** **GCTGGAGTTC** **AAAGTGCTGT** **GGACCAAAAT** **CGAGAGCTAC** **CTGGTGA**  
11758 TCAGATCCAG AACCTGGTTT CTGTTTCTCT TAAAGTTTCT CAACATCCTT GTCTCTGAAA  
11818 TAAGCAACAA CTTCCTGTAG AAGCTCCTCA TAACAGCATT GTCTCTGACT TCCAGCAGCT  
11878 TAGGGTCTCT GACTGTGTCT CTGACTGTCT CTGTGTCTCT GACTGTGTCT CTGACTGTCT  
11938 CTGTGTCTCT GACTGTCTCT GTGTCTCTGA CTGTCTCTGA GTCTCTGACT GTGTGACTGT  
12998 GTTTTCTTGT **GCAGAGTGT** **TTACCCTCAG** **AAGGACGTGG** **ATAATTCAGG** **GACGATGAGC**  
12058 **TCCACAGAGA** **TGAGGATGGC** **TGTGGAGGAA** **GCTGGTAAA** CCACTTCACC TCACAGCCTC  
12148 AGACCCCCC CCCCCGAGC CTCCCCGAGA GAGAACTGT CTGTCTGTCT GTGTTT**CAGG**  
12178 **TTTCAGTCTG** **AACAACGCGC** **TGCATCAGAT** **CCTGGTGGCT** **CGGTACAGCG** **AACAAGATCT**  
12238 **CACCGTCGAC** **TTCGACAAT** **TTGTGGCGTG** **TCTGGTTCGC** **CTGGAGACCA** **TGTTCACTGA**  
12298 **GTCCACACAG** TCCTCCCACT CAGAGCGCTT ACACGCAGTT CAAATGCCAC ATTATATTCA  
12358 CACGCAGTTC AAATACCACA TTATATTCAC ACGCAGTTCA AATACCACAT TATATTCACA  
12448 CGCAGTCAA ATACCACATT ATATTCACAC GCAGTCAA TACCACATTA TATTCACAG  
12478 CAGTTCAAAT ACCACATTAT ATTCACAAGC AGTTCAAATA CCACATTATA TTCACACGCA  
12538 GTTCAAATAC CACATTATAT TCACATCAG ACACCTTCTC CGGTTTCTAA ACTCTGATA  
12598 TGGGTAAGT TGGTTACAC GTCTGCAT GCTCCGTAGC TTTATTGTG GACGTTTAC  
12758 ATATTTTTTG AATACTTTCA AAGTTTTTTG TAGAGTTTTT TTATGTGTT TTTTTTATG  
12818 ATTTTTTCAC CGTTTCAAAG GTTTTAGTTT TAAGTTTTTC TTGTTTTTTC CACGTTTTTG  
12878 TTACTTTTTT CAACATTTTT ATCGCTCAT GATCATGAA CTTTCTGCTG TGACTGACTT  
12938 CTCTTTATCT TCATGATGAT GATGATGATA ATAATGATGA TGTGTTTTCC TCTCC**ACAG**  
13998 **CACCTTCTAC** **ACGCTGGACA** **AAGATAAGTC** **AGGAAGCGTG** **GAGCTCAGCA** **TGATGGAGCT**  
13058 **ATGAAACATG** TTCCTGTGA GGAAGCGTTG AGAGCAGATC ATCAGGACAG AGCTGCAGAT  
13118 CTCACACAAC TCTGTACAGA TTCATGTCAA TTTAAAGTTG TTCCCCGGTA ATTCCAGCTG  
13178 GTGTCTGTGC TCGTCTGG ACACCTGACA CACATCTGAC CAATAAGCAA TCAAACACGC  
13238 GGAAGAAAGT GACAAGAGCA GCAAAACCT CGGAAAAAGA GACAAATGTC AAAAGTCACA  
13298 AGAATGTTCA GAAAACGTTG AAAAAAGTG AGTCGGAGAC AAAACTTAGA AAGAAGTAC  
13358 AAAACCATCT TAAAAGTAG ACAAAAAAA CCCAGTAAA AACTAAAGTC TCAAAAAGCG  
13418 ACAAACCTT TGACCAATAG GACGAGTGA TGTCTTGTG TGGTTGTAG TAATTCATTT  
13478 GGTTCACATG GATGTCTCG AGAAGCGTCT CTCCATTATT TTATTTATAT ATATATATAT  
13538 ATATTTATTA TTATATTAT TATTATTATT ATTATTATTA TTATATTAT TTCTGGCTGA  
13598 GCCGTGGGCA TTCAACAGGC GGGCAGGAAG TGTAGAAGCC AGAACATCCG GTCAGACTCC  
13658 CGATCGTATA TCACATCACT ACGTGAGTTT AACAACCAA ACACAGAC TAATCTGTGA  
13718 TCCGTGTCTG TCAGAAGTGG ACTAAATGGA AGAAACCATT TAACTCTGTA GACCAGAAGC  
13778 ACAAATACC AGGAAGAATC CTCTAAACTG CCGTGTGACG GCGGGGCC CACAGAACCA  
13838 AACACGGTG ATTTTGGGGT TACACAGACC GAGACAGAGA TGATTTAATG TGATGAGATT  
13898 CTCTGCTGTG GCTTATTATT TAACTCAAAC TTTTCATGTC TCTTTTTTTA GTTTTAGTTT  
13958 ATGATAATAA CCTATAATTT CTCT**GCAGT** **GGCTGAACGT** **GTCCATGCTG** **TGAGGATCCA**  
14018 **GAACCAGAAC** **EGGATCAGAG** **CTGAGATATA** GTCCGGGTGC TGACTGAAGA TTGTTTACAT  
14078 GTTGATTATT AATCATGAAG GAGAGCGATA TTTTATTACT AAATGTTCCG TTACATACCG  
14138 GGGTTAAAGA GGGCTGGAAC AGTGTGTGTTA TAT



**Légende :**

exon 1   exon 2   exon 3   exon 4   exon 5   exon 6   exon 7   exon 8   exon 9  
 exon 10   exon 11   exon 12   exon 13   exon 14   exon 15   exon 16   exon 17   exon 18  
 exon 19   exon 20   exon 21

Calp2Fr:           5' AAACCTCCAGATGATTTTCAAG 3'  
 Calp2Bk:           5' CAGAGGAACGTCACCTGAAT 3'  
 GW INT1:          5' ACTGAGGCATGACGCAGGAAQTAA 3'  
 GW INT2:          5' TTGAGGATGCTGATTCAGAA 3'  
 GW INT4:          5' ACGCCAACACAGAGACAGAGGAAG 3'  
 GW INT5:          5' GTCAGCCTGTTTCTCGGAGAAGAC 3'  
 GW INT6:          5' CTGGACCAACCCTCAGTTTGTGAT 3'  
 GSP1:             5' TTGATGCTCCCTTCACTTCGAA 3'  
 GSP4:             5' AAGACGATGTGGACGATCAGTTCAG 3'  
 Ex0fw :            5' CCCGTTCCAGACTCTTTACTCCATA 3'  
 Ex15fw:           5' CCTACGAGCTGCAGAAGATCCTCAA 3'  
 Ex16fw:           5' TCAGCATCACAACGTTTCGTAACAT 3'  
 Ex17bk:           5' TTGAACTCCAGCAGACCCAGTTTAC 3'  
 Ex21+bk :         5' CTCAGCTCTGATCCGGTTCTGGTT 3'  
 T11 (10-11)bk1:       5' TTACCTCCGCCGAGGAGATCCTCTTTCAGT 3'  
 T11 (10-11)bk2:       5' AGACGTCACGTGGTACACGCTGTGTAACCT 3'  
 T13 (10) :         5' CACGTTCTGGACCAACCCTCAGTTTGTGAT 3'  
 T13 (10-11) :        5' GCTGTCTGGATTTACCCTGCAGAGATCTGA 3'

**Séquence de l'ARNm de calpain de walleye :**

bankit735333

ATGTCGGGCATCGCCGCCACCCTGCAGCGCCGCCGGGAGAAGGAGCAGGGCATCGGCTCGTGCAGCCAGGCGGTGA  
 AGTACCTGAACCAGGACTACGAGGCTCTGCGGGCGCGCTGCCTCGAGTCCGAAAGCCTCTTTAAGACGACGCGTT  
 CCCGGCGGAGACCTCTCTCTGGGCTTCAAAGAGCTGGGCGTTGGCTCCTACAAGATCCGCGGGGTTTCTGGGAG  
 AGACCGACGAGTTTACCTCTGACCCCCAGTTCATCGTCTCTGAGCCTCCAGGACCGACATCTGCCAGGGAGCGC  
 TGGGTGACTGCTGGCTGCTGGCTGCCATCGCCTCTCTGACCTGAACCAGGAAGTTCTGGCTCGAGTCTGCCCTCA  
 TGGACAGAGCTTCAAGTAAAGGAGAGTATGCCGGGATCTTCCACTTCCAGTTCTGGCAGTTTGGGGAGTGGGTGGAC  
 GTGGTGATTGACGACCCGCTGCCGGTTAAAGATGGAGAGTTGCTGTTCGTCCACTCGGCCGAGGGGAGGGAGTTCT  
 GGAGCGCTCTGCTGGAGAAAGCCTACGCCAAGTTGAACGGCTGTTACGAGGCTCTGTCTGGAGGATCCACCCTGA  
 GGGGTTTCGAGGATTTACCCGGAGGAATCGCAGAGGTTACGAGCTCAAACAACCCGATGCTCGGCTGTTCCACATC  
 ATCCAGAAAGCTCAGAGCCGAGGCTCACTGATGGGCTGCTCCATAGACATCACGAGCTCGTCTGAGTCCGAGGCCG  
 TCACCTCTCAGAAGCTGGTGAAGGCCACGCCCTACTCTGTGACCGGCACAGCTCAGTTGAGACACCAGGAGGAAAC  
 AGAGAAAGTGCATCCGATCCGAGAACCCCTGGGACAGCTGAAATTCGACTGGAGCCTCGAGCCGACAACTCGATGCAG  
 TGGCGTCGGATCAGCTCCGAGGACCGCGAGCGTCTGAGTCATCGCTCCGAGGACGGAGAGTTCTGGATGTCTTTCG  
 CCGACTTCCTGCGACATTACGACCGTCTGGAGATCTGCAACCTGACGCCCGACGCCCTGAGCGCAGCAGACTGTCTC  
 CAAGTGGGCGTTGTCCAAAGTTCGACGGGAGCTGGAGGCGCGGATCCACCGCCGAGGCTGCAGGAATACCCGGAC  
 ACGTTCTGGACCAACCCTCAGTTTGTGATCCGCTCTGGAGGAGGAAGACGATGACCGGCCGACGGCGAGCTCGGCT  
 GCAGCTTCTGTTCCCTCTGATCCAGAAAGAACCGGCGCCGCGCCCGGAAGCTGGGGGAGGACATGCACACGGTCGG  
 CTTGCCATCTACCAGGTTCTGATGAGTTCGGCGATCAGAGGACCGTCCAGCTGAAATAGAACTACTTCTCTGGT  
 CATGCCCTCAGCGCTCGCTCCGAGACTTTCATCAACCTGAGGGAGGTGTGCAGCCGCTTCTGTCTGCCGCCCGGAG  
 AATACCTGATCTCTGATCTGATCTGAAACCGCACAAAGACCGGAGACTTCTGCGTCCGCGTCTTCTCCGAGAAACA  
 GGCTGACTTTCAAGAGATGGACGACCCTGTGAGAGCAGAGTGGAGACGATTGAGATCATGAAAGACGCTGTGGAC  
 CATGAGTTCAGAAAACGTTTGAACAGCTGGCAGGAGGGGACTGTGAGATTTCTCCTACGAGCTGCAGAAGATCC  
 TCAACAGAGTGGTGACCAAACGTTCTGACATTAAGACCAGCGGCTTCAACATCAAAAGTGTCTGTAACAAGGTCAA  
 CATGTTGGACAAAGATGGCAGCGGTAAGTGGTCTGCTGGAGTTCAAAGTGTGTGGACAAAATCGAGAGCTAC  
 CTGAGTGTTTACCGTCAGAAGGACGTGGATAATTCAGGGACGATGAGCTCCACAGAGATGAGGATGGCTGTGGAGG  
 AAGCTGGTTTCACTCTGAACAACGCGCTGCATCAGATCCTGGTGGCTCGGTACAGCGAAACAAGATCTCACCGTCGA  
 CTTGACAACCTTTGTGGCTGTCTGGTTCGCCCTGGAGACCATGTTCAACACCTTCTACACGCTGGACAAAGATAAG  
 TCAGGAAGCGTGGAGCTCAGCATGATGGACTGGCTGAACGTGTCCATGCTGTGAGGATCCAGAACCCAGAACCGGAT  
 CAGAGCTGAGATATAGTCCGGGTGCTGACTGAAGATTGTTTACATGTTGATTATTAATCATGAAGGAGAGCGGATAT  
 TTTATTACTAAATGTTCCGTTACATACCGGGGTTAAAGAGGGCTGGAACAGTGTGTTATATAAAAAAAAAAAAAA  
 AAAA

**Légende :**

exon 1 exon 2 exon 3 exon 4 exon 5 exon 6 exon 7 exon 8 exon 9  
 exon 10 exon 11 exon 12 exon 13 exon 14 exon 15 exon 16 exon 17 exon 18  
 exon 19 exon 20 exon 21

Calp2Fr: 5' GATGTTCCACATCGTCTTCAT 3'  
 Calp2Bk: 5' CAGAGGAACGTCACCTGAATA 3'  
 GW INT1: 5' GCTGAGGCATGACGCAGGAAGTAG 3'  
 GW INT2: 5' TTCTGTTTCCTTCTGATTCANAAA 3'  
 GW INT5: 5' GTCAGCCTGTTTCTCGGAGAAGAC 3'  
 GW INT6: 5' CTGGACCAACCCTCAGTTTGTGAT 3'  
 GSP1: 5' CTAATCTCCCTCTACTTTTCAA 3'  
 GSP4: 5' AAGACGATGTGGACGATCAGTTTCA 3'  
 Ex15fw: 5' CCTACGAGCTGCAGAAGATCCTCAA 3'  
 Ex16fw: 5' TCAGCATCAAAAGTGTCTGTAACA 3'  
 Ex17bk: 5' TTGAACTCCAGCAGACCCAGTTTAC 3'  
 Ex21+bk : 5' CTCAGCTCTGATCCGGTCTGGT 3'  
 T13 (10): 5' CACGTTCTGGACCAACCCTCAGTTTGTGAT 3'

**Séquence de la cytokératine du doré :**

Code d'accèsion NCBI : AY129690

```

1 atccgtcagt tcatggagag taagtcctcc ccctctgccc gtgactactc acattttgag
61 gccaccattg ctgatctgca tggaaagatc caggatgcca ctcgtaacaa tggaggcatc
121 tatctgtcta ttgacaatgc aaaactggca gcagatgact tcagaaccga gtatgagaat
181 gagctagcca tgcgtcaatc agtggaggca gatatcgccg gtctaaagag actggtggat
241 gagctgacac tggccagatc agacctggag atgcagatag aaggcctcaa ggaggagctg
301 atctacctaa aaaagaacca cgaggaggaa ttggcatcca tgagatctca gatgactgga
361 cagatcaatg tggaggtgga tgcaaaacaa cagccagacc tgggcagcat catggctgaa
421 atgcgtgaac agtatgagag tgtggctaac aagaaccaga aagaacttga agcttggttc
481 caaaciaaagt cagagtcact gaacaaggaa gtggcagtca gcacagaaac tctccaacg
541 tcaaagtcag aatcaacga aatccgacgc aactccaag gcctggcaga ggcactttag
601 tcccaactta gcatgaaagc gtccctggaa ggcactttag ctgagacaga gtcacggtat
661 tccatgcagc tccaaggcct ccagaggcag gtgacgtccc tggaagaaca actgatgcac
721 ctgcgttctg acatggaacg ccagagccaa gaatacaaaa tgctgctcga catcaagaca
781 aggctggaga tggagattgc agagtacaag atgctgctgg aca

```

ctk3fw : 5' AGAATGAGCTAGCCATGCGTCAAT3'ctk5rv : 5' TAACTTGGGACTGTAGCTGGATCT3'

## **ANNEXE II**

### **DÉTAILS DES INSERTIONS DU WDSV DANS LE GÈNE CALPAIN**



## séquence du gène calpain de doré de l'exon 19 à l'exon 20

**GTTTCAGTCTGAACAACGCGCTGCATCAGATCCTGGTGGCTCGGTACAGCGAACAAGATCTCACCGTCGACTTCGA**  
**CAACTTTGTGGGCTGTCTGGTTCGCCTGGAGACCATGTTCA**GTGAGTCCACACAGTCCCTCCACTCAGAGCGCTTA  
 CACGCAGTTCAAATGCCACATTATATTCACACGCAGTTCAAATACCACATTATATTCACACGCAGTTCAAATACCA  
 CATTATATTCACACGCAGTTCAAATACCACATTATATTCACACGCAGTTCAAATACCACATTATATTCACACGCAG  
 TTCAAATACCACATTATATTCACAAGCAGTTCAAATACCACATTATATTCACACGCAGTTCAAATACCACATTATA  
 TTCACACTCAGACACCTTCTCCGGTTTCTAAACTCTGATAATGGGTAAGCTCTGGTTACACGCTGCACATGCTCC  
 GTAGCTTCTATTGTCGACGCTTACATATTTTTGAATACTTTCAAAGGTTTTTGTAGAGTTTTTTTATGCTGTTT  
 TTTTTAATGATTTTTTACCAGTTCAAAGGTTTTAGTTTTAAGTTTTCTTGTTTTTTCCACGTTTTTGTACTTT  
 TTTCAACATTTTTATCGCTCATGATCATGAACTTTCTGCTGTGACTGACTTCTCTTTATCTTCATGATGATGAT  
 GATGAT **AATAATGATGATGTTGTTTCCCTCTCCACAGACACCTTCTACACGCTGGACAAAGATAAGTCAGGAAGCG**  
**TGGAGCTCAGCATGATGGAG**

**Légende :**

exon 9 exon 10 exon 11 exon 12 exon 14 exon 19 exon 20

	Insertion T11 203 (sens fw)		Insertion T23 840/980 (sens fw)
	Insertion T11 280 (sens fw)		Insertion T23 1450 (sens rv)
	Insertion T11 1750 (sens fw)		Insertion T23 400 (sens fw)
	Insertion T13 610 (sens rv)		

Insertion T11 203 (sens fw)

ACTCCCTCACAGTTGCTGTGGTGTGTGATTCCTCTTCTGCAGAAGATATTAATAAGGTGTATAACAGACAAATGT  
GACTGGCCTGGGCTGCTTTCCCTTCTTCGAACATGGATATAATTTAGATAAGTGAATTTGAATTAACACAATTGCAA  
GACCTTCTCCACAGCGC

85% sur 26pb

Insertion T11 280 (sens fw)

ACTCCCTCACAGTTGCTGTGGTGTGTGATTCCTCTTCTGCAGAAGATATTAATAAAGTGTATAACAGACAAATGT  
GACTGGCCTGGGCTGCTTTCCCTTCTTCGAACATGGATATAATTTAGATAAGTGAATTTGAATTAACAATTTTCATT  
CTATTTTTTATCTGTGACATATTCAGTCTCCAGTCTCACCTCGTGTCTCTCTATCTCAGTCCGGATCAGAGGAA  
CGTCCACCTGAATAAGAACTACTTCCCTGCGTCATGCCCTCAGC

100% sur 102pb

Insertion T11 1750 (sens fw)

AACAGACAAATGTGACTGGCCTGGGCTGCTTTCCCTTCTTCGAACATGGATATAATTTAGATAAGTGAATTTGAAT  
TAACATCCCATGAGGGAGATTAGTTTCCACAGTCGGTTTTATGCACATTAATGCGACATAAAGACCGTAAATAGAA  
ACATATTTACATGGCAGCGGTGAGGAGTCTGGATGTAGAGAGTGATAGACGTCATGACAATGGTGAGGGCAAGGCG  
TGTGTTCCCCCATTGTTGAACCCAAAGTTACGCCCTTGGCTGTTGCACAAATTAACATCTACTACCGTTGCTA  
TGGCAGCGTTACCTTATCCTTCCAAAACAACAGCTCCAGCATCCTAAACTGCTGGGTGAGAAAACATATGGTCTCC  
GGGGAGTAAACTCCCCAGAGCTAGGTTAGTGACAAGCATGTCTGGGACATGGATGCACCCAGATGGAAAGAGAGAG  
GAGAGAGGAGCTCAGTGTGTACAGGAAGTCCCCGGCAGTCTAAACTAGAACAGCAGAACTAAGAGCTGGTCCA  
AGGCAGACCTGAGCCAGTCTATAAGGATTGGTAGATGAATCTGATGACTATGAAGACA

100% sur 510pb

Insertion T13 610 (sens rv)

GCTGTCTGGATTTACCCTGCAGAGATCTGAGGAGCAGTTAACCATAGTCCTCACAAATCCACCAGAGGTTAGAACG  
CCAACACAGAGACAGAGGAAGGGGACGGACATCCGGTGGATCTTCCACGCGGCCGGAGCAATCCTGGAAGTGAAC  
GTTGTGGATATAGACTACAGAGTGAGACACATGCACAAGGTTGGGTTACCGTCTACCAGCTCAGACAGCAACTTG  
TACTGTTCAAGTCCGGGCTGTTGGAGTTGCTTCAGGTTACACAGCGTGTACCACGTGACGTCTACGTCCAGGCGTCC  
CTACAGGAATTTCGATGCCTTTTTTTGTGATTGTTACAGCCAAATGCCTTAGTTTGTGGCAGCTTTTGTAAAAAAA  
AATTGGCAGCTATTCTCTGTTGCCTGCCTAACAGACGAATTGAAACCAAGCTCCTTGGTGCCTTTTTTGTGGATT  
TTTTCATCGTGTGTTTGCAGTGTGTTTGTGGCTTTTTCTGAGCGAACTGAAAGAGGATCTCCTCGGCGGAGGTAA  
AGAGCTCTTTGTTAACTCTCGTTCTTCTTCTTGTAAATTCAAATTCACCTTATCTAAATTATATCCATGTTTCGAAG  
AAAGGAAAGCAGCCCAGGCCAGTCACATTTGTCTGTT

100% sur 534pb

Légende :

**exon 12**

encadré : amorces  
en gris : séquence du LTR  
en rouge : différences avec la séquence de calpain  
(un x correspond à une délétion)





# ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE<sup>1</sup>

## IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

<b>Nom de l'étudiant</b> Arnaud DUVAL		<b>Code permanent</b> [REDACTED]
<b>Sigle du programme</b> M.Sc.	<b>Titre du programme</b> Sciences vétérinaires	<b>Option</b> Pathologie

## DESCRIPTION DE L'ARTICLE

<b>Auteurs</b> Arnaud Duval, Daniel Martineau	
<b>Titre</b> Alterations of calpain expression in Walleye dermal sarcoma, a retrovirally-induced tumour.	
<b>Revue</b> Journal of Virology	<b>Date de publication</b> 2005

## COAUTHOR'S DECLARATION

<b>Déclaration</b> À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord pour que Arnaud DUVAL inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : « Étiologie virale du sarcome dermique de doré, une tumeur fréquente de ce poisson. »		
<b>Coauteur</b> Daniel MARTINEAU	[REDACTED]	<b>Date</b> 31 août 2005
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>

Envoyé à la FES le

<sup>1</sup>Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001