

Mécanisme de l'oncogénèse induite par le virus de la Leucose Bovine : rôle de la protéine virale Tax

I. SCHWARTZ (1), B. DA COSTA (1), D. LE RHUN (1), V. LAINÉ (1),
M. GUILLEMET (1) ET D. LÉVY (1).

(1) URA INRA d'Immuno-Pathologie Cellulaire et Moléculaire. –
Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort –
7, avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex. France.
Fax : 143967125. Tel : 143967126.

avec la collaboration de L. WILLEMS (2),
R. KETTMANN (2), J.J. PANTHIER (3).

(2) Laboratoire de génétique. Faculté agronomique.
Gembloux. B5800. Belgique.

(3) URA INRA de Génétique Moléculaire. –
Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort –
7, avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex. France.
Fax : 143967125. Tel : 143967168.

RESUMÉ. – Le virus de la leucose bovine enzootique (Bovine Leukemia Virus ou BLV) est un oncovirus génétiquement proche des virus des leucémies aiguës T humaines (Human T cell Leukemia Virus ou HTLV). La majorité (70%) des bovins infectés développent un syndrome lymphoprolifératif B accompagné d'une diminution des performances zootechniques et quelques rares animaux (1 à 5%) présentent un lymphosarcome B. Bien que le BLV semble déréguler la prolifération des seuls lymphocytes B, nous avons montré que le provirus se retrouve intégré non seulement dans les lymphocytes B, mais aussi dans les lymphocytes T tueurs/suppresseurs CD8+ T, dans les monocytes et dans les granulocytes.

La protéine Tax du BLV qui transactive l'expression virale est un candidat important au pouvoir pathogène de ce virus. Nous avons construit des vecteurs d'expression pour la protéine Tax que nous avons introduits dans des lymphocytes B murins *in vitro* et dans des souris transgéniques *in vivo*. Nos résultats montrent que la protéine Tax perturbe les réponses cellulaires à des facteurs régulateurs de prolifération. Notre modèle expérimental permettra d'étudier l'importance de ce mécanisme dans le développement du syndrome lymphoprolifératif induit par le BLV et pourrait également s'appliquer aux maladies lymphoprolifératives induites par les rétrovirus HTLV et HIV.

BLV induced oncogenesis : role of the Tax protein

I. SCHWARTZ (1), B. DA COSTA (1), D. LE RHUN (1), V. LAINÉ (1),
M. GUILLEMET (1) ET D. LÉVY (1).

Renc. Rech. Ruminants, 1994, 1, 81 – 84

SUMMARY – Bovine Leukemia virus (BLV) shows many structure and sequence similarities with human T cell leukemia virus (HTLV), a human retrovirus associated with acute T cell leukemia. Most of the infected cattle (70%) develop a B cell lymphoproliferative syndrome with altered productive traits and 1 to 5% of the animals die with lymphosarcoma. Although BLV seems to exclusively deregulate B cell proliferation, we found that BLV provirus is integrated in B cells, cytotoxic/suppressive CD8+ T cells, monocytes and granulocytes.

BLV Tax protein transactivates BLV expression and is an important candidate involved in BLV pathogenesis. We introduced expression vectors for the Tax protein in murine B cells *in vitro* and in transgenic mice *in vivo*. Our results show that the Tax protein alters the cellular responses to factors that regulate cell proliferation. Our experimental system will allow us to study this mechanism in the occurrence of the BLV induced lymphoproliferative syndrome and may also apply to the lymphoproliferative disease encountered in other retroviral infections such as HTLV and HIV.

INTRODUCTION

L'infection par le virus de la leucose bovine enzootique se manifeste chez 70% des bovins infectés par une augmentation chronique du nombre des lymphocytes circulants (lymphocytose persistante) et dans 1 à 5% des cas par un lymphosarcome B (Burny et al., 1980, Lewin, 1989).

Les ovins sont particulièrement sensibles à l'infection par le BLV dans des conditions strictement expérimentales (Mammerickx et al., 1988). La majorité des moutons infectés (90%) développent une lymphocytose persistante et un lymphosarcome B, 6 mois à 4 ans après l'infection. Etant donné leur facilité d'entretien, ils sont très utilisés en recherche expérimentale.

Le BLV est un rétrovirus qui présente des similitudes frappantes avec les virus des leucémies aiguës T de l'homme (Human T cell Leukemia Virus ou HTLV) (Sagata et al., 1985) et il constitue un modèle d'infection rétrovirale puissant pour l'étude des mécanismes viraux impliqués dans le pouvoir pathogène des rétrovirus leucémogènes. Les travaux que nous rapportons dans cette communication portent sur l'étude des différents types cellulaires infectés par ce virus *in vivo* chez les bovins et les ovins et sur le rôle de la protéine virale Tax dans le syndrome lymphoprolifératif induit par le BLV.

1. CIBLE CELLULAIRES DU BLV

Des travaux dans notre laboratoire en collaboration avec l'équipe de Richard Kettmann (Gembloux, Belgique), ont révélé que l'infection par le BLV concerne les lymphocytes B (Levy et al., 1987). Or, l'infection par le BLV conduit le plus souvent (70% des cas) à une lymphoprolifération de la population B porteuse des marqueurs CD5 et CD11 (Letesson et al., 1991). Chez la souris, il semble que les lymphocytes B-CD5⁺ constituent une population lymphocytaire B d'un lignage différent des lymphocytes B-CD5⁻ qui serait impliqué dans la synthèse d'autoanticorps (Hayakawa et al., 1985). Cette population serait elle préférentiellement infectée par le BLV?

Pour répondre à cette question, nous avons trié les lymphocyte B porteurs du marqueur CD5 chez des vaches infectées par le BLV par immunofluorescence avec un cytofluorimètre de flux et analysé l'ADN des cellules triées par la technique de polymérisation en chaîne (PCR) avec des amorces spécifiques du BLV suivie de Southern Blot. Nous avons ainsi trouvé que les lymphocytes B CD5⁺ ne présentent pas une sensibilité accrue à l'infection par le BLV par rapport à la population B CD5⁻ (figure 1) (Schwartz et al., 1994).

En utilisant les mêmes techniques, nous avons également montré que le BLV se retrouve dans les lymphocytes T CD8⁺, les monocytes et les granulocytes mais pas dans les lymphocytes T CD4⁺, compte tenu de notre sensibilité expérimentale (Schwartz et al., 1994). Ces résultats ont été obtenus à la fois avec les leucocytes de bovins et d'ovins infectés expérimentalement. Les paramètres qui conditionnent la sensibilité particulière des lymphocytes B CD5⁺ au pouvoir lymphoprolifératif du BLV ainsi que le rôle des différentes populations infectées dans la pathogénie sont à découvrir.

2. RÔLE DE LA PROTÉINE TAX DANS LA LYMPHOPROLIFÉRATION INDUITE PAR LE BLV

Le génome du BLV présente des séquences codant pour les protéines de capsid (gag), la transcriptase inverse (pol), la protéase virale (prt), les protéines d'enveloppe (env) et des protéines de régulation de l'expression virale (Tax, Rex, RIII et GIV). La protéine Tax transactive l'initiation de la synthèse virale à partir de la région U3 du LTR. Un vecteur codant pour la protéine Tax du BLV a été introduit dans des fibroblastes de rat par transfection et a conduit à leur immortalisation (Willems et al., 1990). La protéine Tax serait donc douée d'un pouvoir oncogène et il est vraisemblable qu'elle joue un rôle dans la lymphoprolifération induite par le BLV et dans l'apparition de lymphosarcomes. Pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués, nous avons construit des vecteurs d'expression de la protéine Tax que nous avons introduits dans des cellules lymphoïdes B murines et dans des souris transgéniques.

2.1. PROPRIÉTÉS CONFÉRÉES PAR LA PROTÉINE TAX DANS DES CELLULES LYMPHOÏDES IN VITRO

Le gène codant pour la protéine Tax a été inséré dans un vecteur d'expression sous contrôle transcriptionnel du promoteur des immunoglobulines. Ce vecteur a été transfecté dans des cellules lymphoïdes B murines, les cellules BCL1. Nous avons observé que les cellules BCL1 exprimant la protéine Tax prolifèrent jusqu'à atteindre une densité de saturation en culture de 4×10^6 par ml alors que les cellules BCL1 contrôles atteignent une densité maximale de 10^6 par ml (figure 2). Ainsi la protéine Tax modifie le contrôle de la densité de la population lymphoïde BCL1. Nous avons montré que les cellules BCL1 exprimant la protéine Tax sont devenues résistantes à un (ou des) facteurs inhibiteurs sécrétés lorsque les cellules sont à haute densité. L'identité de ce ou ces facteurs est à déterminer.

2.2. EXPRESSION DE LA PROTÉINE TAX PAR DES SOURIS TRANSGÉNIQUES

Deux vecteurs gouvernant l'expression de la protéine Tax ont été utilisés pour construire des souris transgéniques :
– un vecteur comprend les LTR du BLV en 3' et 5' de l'ADN complémentaire codant pour la protéine Tax (vecteur LTR-Tax-LTR).

– l'autre vecteur comprend le promoteur et le enhancer du gène des immunoglobulines murines en 5' de l'ADN complémentaire Tax et des séquences introns/exons dérivées du gène de l'hormone de croissance humaine en 3' (vecteur pIgpE-Tax).

Six lignées indépendantes de souris transgéniques ont été obtenues avec le vecteur LTR-Tax-LTR et sept lignées indépendantes avec le vecteur pIgpE-Tax. L'analyse de l'expression des transgènes est en cours. Ces souris nous permettront d'étudier le rôle de la protéine Tax dans la lymphoprolifération induite par le BLV et de valider ou non nos résultats obtenus *in vitro* chez l'animal.

Figure 1 : Détection du provirus BLV dans les lymphocytes B CD5⁺ et CD5⁻ des vaches 205 et J047 et dans les lymphocytes B CD11⁺ et CD11⁻ du mouton 130.

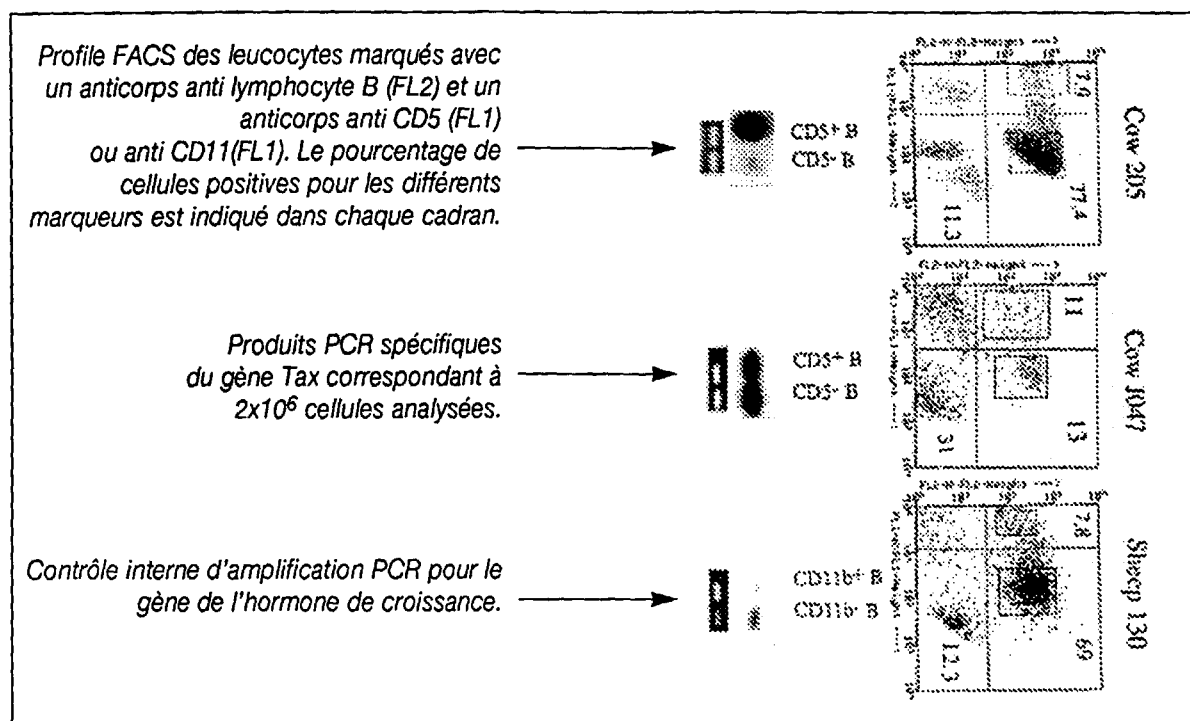
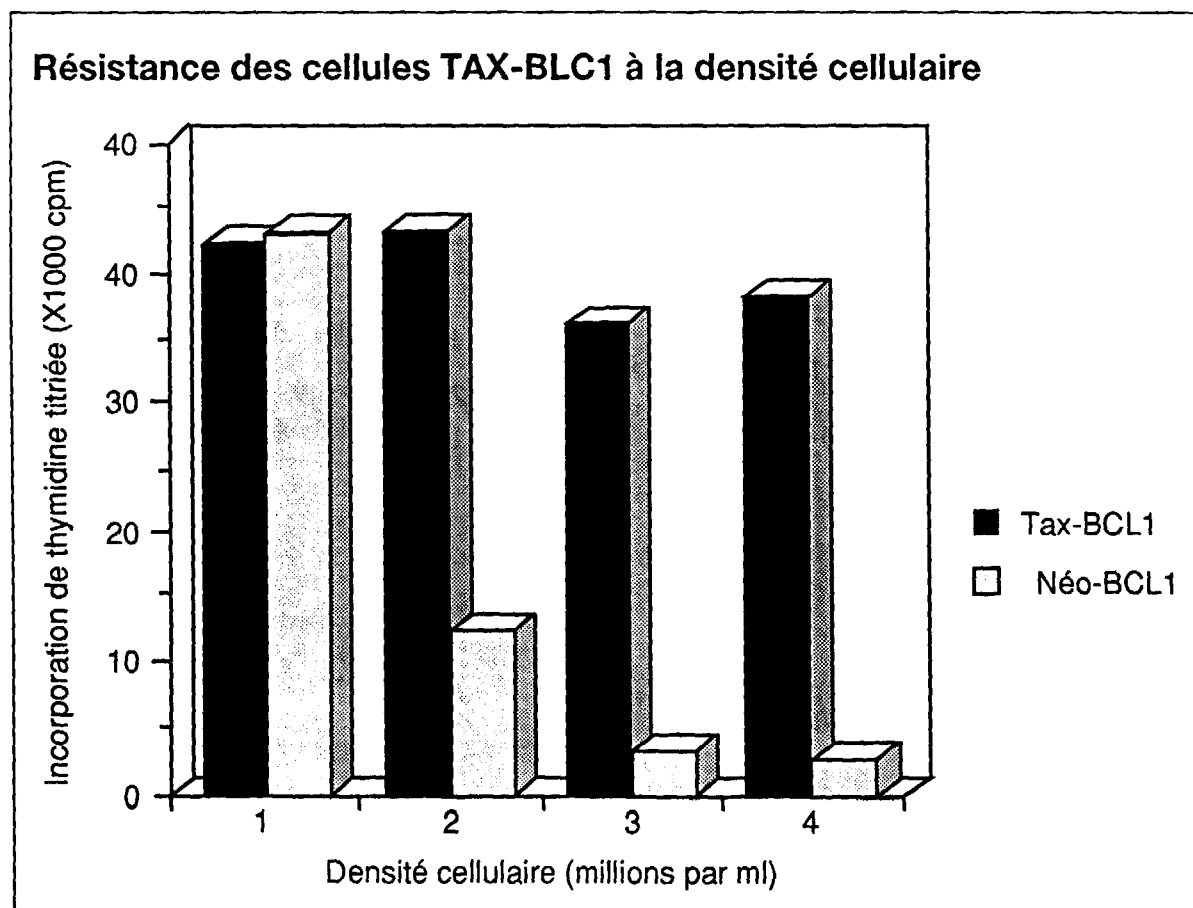


Figure 2 : Incorporation de thymidine tritiée par les cellules exprimant la protéine Tax (Tax-BLC1) et par les cellules contrôles (Néo-BLC1) mises en culture pendant 24 heures aux densités de 1, 2, 3, et 4x10⁶ cellules par ml de milieu de culture.



CONCLUSION

Le virus BLV est largement répandu dans le monde bien qu'il soit presque éliminé dans les élevages ouest-européens. L'infection par le BLV nuit aux performances zootechniques des bovins (Da et al., 1993, Brenner et al., 1989) et justifie les campagnes d'éradication menées en Europe. L'étude du BLV demeure intéressante en pathologie comparée car il présente de remarquables homologues avec les virus des primates et il est sans équivalent parmi les rétrovirus murins et aviaires. Nos résultats apportent des don-

nées nouvelles pour aider à comprendre les mécanismes impliqués dans la lymphoprolifération. La mise en évidence de l'infection des populations leucocytaires autres que les lymphocytes B laisse supposer que des interactions cellulaires entre lymphocytes B et les autres populations infectées pourraient jouer un rôle dans le pouvoir pathogène du virus. L'acquisition de résistance à un facteur inhibiteur de croissance par les cellules exprimant la protéine Tax constitue un mécanisme nouveau qui pourrait également s'appliquer à d'autres syndromes prolifératifs comme ceux rencontrés dans l'infection par les virus HIV et HTLV.

RÉFÉRENCES

- BRENNER, J., VAN HAAM, M., SAVIR, D., and TRAININ, Z. (1989). *Vet. Immunol. Immunopath.* 22, 299-305.
- BURNY, A., BRUCK, C., CHANHENNE, H., CLEUTER, Y., DEKEGEL, D., GHYSDAEL, J., KETTMAN, R., LECLERCQ, M., LEUNEN, J., MAMMERICKX, M., and PORTETELLE, D. (1980). *Bovine Leukemia Virus: molecular biology and epidemiology* (New York: Raven Press).
- DA, Y., SHANKS, R.D., STEWART, J.A., and LEWIN, H.A. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 6538-6541.
- HAYAKAWA, K., HARDY, R.R., and HERZENBERG, L.A. (1985). *J. Exp. Med.* 161, 1554-1568.
- LETESSON, J.J., VAN DEN BROECKE, A., MARBAIX CLEUTER, Y., DELCOMMENNE, M., MAGER, A., MAMMERICKX, M., BURNY, A., and DEPELCHIN, A. (1991). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 27, 207-213.
- LEVY, D., KETTMANN, R., MARCHAND, P., DJILALI, S., and PARODI, A.L. (1987). *Leukemia* 1, 463-465.
- LEWIN, H.A. (1989). *J. DAIRY. Sci.* 72, 1334-1348.
- MAMMERICKX, M., PALM, R., PORTETELLE, D., and BURNY, A. (1988). *Leukemia* 2, 103-107.
- SAGATA, N., YASUNUGA, T., TSUZUKU, J., OHISHI, K., OGAWA, Y., and IKAWA, Y. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 677-681.
- WILLEMS, L., HEREMANS, H., CHEN, G., PORTETELLE, D., BILLIAU, A., BURNY, A., and KETTMANN, R. (1990). *EMBO J.* 9, 1577-1581.
- SCHWARTZ, I., BENSALD, A., POLACK, B., PERRIN, B., BERTHELEMY, M. and LEVY, D. (1994). *J. Virol.* 68, 4589-4596.